



Université de REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

Laboratoire de Recherche en Nanosciences

Ecole Doctorale Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne

Discipline : Immunologie

par

Gilles Rousserie

le 30 Novembre 2012

Développement de bionanosondes en biofonctionnalisant des boîtes quantiques (quantum dots) par des anticorps

Directeur de thèse
Docteur Thierry Tabary

Membres du jury
Professeur Michaël Molinari
Professeur Vladimir Oleinikov
Professeur Fabrice Fleury
Docteur Thierry Tabary

N° attribué par la bibliothèque

||R|E|I| | | | |

Remerciements

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Igor Nabiev de m'avoir accepté au sein de son équipe et sans qui mon travail de thèse sur le projet ANR « nanodiagnostic de micrométastases » n'aurait pu être réalisée.

Je remercie Monsieur le Professeur Jacques Cohen pour m'avoir permis d'intégrer l'équipe EA3798, devenue depuis le Laboratoire de Recherche en Nanosciences (LRN) EA 4682. Je le remercie aussi pour toute l'aide précieuse qu'il m'a apporté au cours de ma thèse, tant au niveau scientifique qu'administratif.

Je remercie Monsieur le Professeur Michaël Molinari d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse ainsi que toute l'aide qu'il m'a apporté durant ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Vladimir Oleinikov d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Fabrice Fleury d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse.

Je remercie chaleureusement le Docteur Thierry Tabary pour son soutien et son accompagnement tout au long de ces quatre années de travail commun, ainsi que pour le temps et l'effort investit dans la révision de mon rapport de thèse. Je le remercie aussi pour sa disponibilité précieuse dès que j'avais besoin de lui. Merci Thierry !

Je remercie aussi le Docteur Alyona Sukhanova pour son expertise et ses conseils dans les diverses thématiques qui composent mon travail de thèse.

Je tiens aussi à remercier spécialement Brigitte Réveil pour sa précieuse aide technique, sa participation à certaines parties de ce travail ainsi que sa bonne humeur.

Je remercie aussi le Docteur Wael Mahmoud pour son aide et sa participation à certaines parties de ce travail

Je remercie aussi Nicolas Bouchonville pour m'avoir éclairé à de nombreuses reprises dans le domaine de la physique. Je le remercie aussi pour sa donation.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe qui m'ont apporté leur aide au cours de ces quatre années : Aymric Kisserly, Jean-Marc Millot, Hillal Hafian, Béatrice Donvito, Valérie Duret, Yohann Demont et Anthony Le Cigne.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes faisant partie d'autres équipes pour leur aide lors de mes travaux : Sandie Escotte, Christelle Doliwa, Floriane Oszust, Sylvie Guillaume, Christine Terrin, Erika Bourguet, William Hornebeck, Sylvie Brassart et Janos Sapi.

Encore merci à toutes ces personnes sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens aussi à remercier ma compagne pour son précieux soutien tout au long de ma thèse et la patience dont elle aura fait preuve.

Enfin je remercie aussi toutes ces personnes pour leur bonne humeur et les moments de partage, scientifiques ou non, lors de ces quatre années : Mehdi Sellami, Amandine Scandolera, Florence Draux, Stéphane Chevallier, Yohann Demont, Nicolas Bouchonville, Aida Meghraoui, Anthony Le Cigne, Karine Namur, Sana Tfaili, Hélène Peyret, et Julie Dodinot.

Résumé

Ce travail porte sur différentes méthodes de détection de protéines par des anticorps (Acs) marqués par des boîtes quantiques (QD, « *quantum dots* »). La première partie de la thèse porte sur le développement et l'optimisation de méthodes de conjugaison d'Acs polyclonaux à des QDs. Une étude de 2007 avait démontré que les conjugués anticorps-quantum dots (Acs-QDs) commerciaux ne présentent que de très rares anticorps fonctionnels à leur surface [Pathak *et al.*, 2007]. Nous avons donc : (i) développé des conditions de réduction ménagée des ponts disulfures des Acs en utilisant soit du dithiothreitol, soit du 2-mercapotethanolamine, (ii) purifié les fragments d'Acs fonctionnels grâce à une colonne d'affinité, (iii) conjugué ces fragments fonctionnels d'Acs aux QDs en utilisant l'agent de liaison amine-thiol SMCC et (iv) développé une méthode de purification des conjugués sur gel d'agarose afin d'éliminer les fragments d'Acs non conjugués et les QDs libres. Des tests en cytométrie en flux ont permis de déterminer l'efficacité des conjugués pour détecter l'expression de la molécule CD4 à la surface de lymphocytes T humains. Un marquage de CD4 réalisé avec des conjugués préparés selon notre méthode s'avère être cinq fois plus sensible qu'en utilisant des conjugués réalisés selon les recommandations commerciales. Une autre méthode de préparation des Acs pour la conjugaison aux QDs a été testée : l'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles sur des amines primaires grâce au *N*-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA). Cependant, cette méthode ne permet pas d'avoir un contrôle précis du nombre ni de l'emplacement des groupements fonctionnels sulfhydriles ainsi ajoutés. Les tests de conjugaison aux QDs qui ont été réalisés avec ces Acs-SH, en utilisant l'agent de liaison SMCC, a entraîné la formation d'agrégats de taille variable. Cette méthode a donc été abandonnée.

La seconde partie de la thèse porte sur la démonstration de la faisabilité et l'optimisation d'un marquage de l'antigène carcino-embryonnaire (CEA, « *carcinoembryonic antigen* ») humain à la surface de lignées cellulaires murines avec un anticorps simple domaine (sdAb) anti-CEA biotinylé détecté grâce à des conjugués streptavidine-QDs commerciaux et analysé par cytométrie en flux. Ces sdAbs ont été biotinylés selon deux approches : (i) avec des agents de biotinylation chimique qui permettent d'ajouter une biotine sur les amines primaires (biotinylation *in vitro*) et (ii) par une enzyme lors de leur production par *E. coli* (biotinylation *in vivo*). La détection du CEA humain à la surface des 100 000 cellules (lignées cellulaires murine MC38 et MC38-CEA) par ces sdAbs biotinylés a été testée en cytométrie de flux puis comparée à celle obtenue par un anticorps monoclonal biotinylé *in vitro*. Les résultats ont démontré que les sdAbs biotinylés ont une sensibilité de détection similaire que la biotinylation soit réalisée *in vitro* ou *in vivo*. Par contre, la sensibilité de la détection du CEA est environ cinquante fois meilleure en utilisant des sdAbs biotinylés (0,6 fmol d'anticorps sont nécessaires pour détecter le CEA) qu'avec des anticorps monoclonaux biotinylés (33 fmol).

Mots clefs : boîtes quantiques, anticorps simple domaine, immunoglobuline G, conjugués anticorps-quantum dot, Antigène carcino-embryonnaire et cytométrie en flux

Abstract

We have been working on different ways to detect proteins with antibodies (Abs) labeled by quantum dots (QDs). The first part of his work is to develop and optimize the conjugation of polyclonal antibodies to quantum dot. A study has reported that commercial antibody-quantum dots conjugates (Abs-QDs) present very few functional Ab fragments at the surface of the conjugate [Pathak *et al.*, 2007]. We had: (i) developed an advanced procedure of antibody reduction using dithiothreitol (DTT) or 2-mercaptoethanolamine (2-MEA) (to prevent the loss of antibody functions), (ii) purified the active fragments by affinity purification on column, (iii) conjugated the active reduced antibody fragments to QDs using the amine-thiol crosslinker SMCC for SH coupling, and (iv) developed the purification of the conjugates on agarose gel to remove free QDs and unconjugated antibody fragments. Our conjugates present about a five times better ability to detect CD4 by flow cytometry on 500 000 isolated human lymphocyte T cells than those made after the commercial procedure. Another procedure for antibody preparation was addition of sulfhydryl groups on primary amines using *N*-succinimidyl S-acetylthioacetate (SATA). However this procedure presents some variable yield and the number and the localization of sulfhydryl groups added on antibody cannot be fully controlled. Thereby, the conjugation of these Abs-SH to QDs using SMCC chemistry leads to the creation of aggregates. This Ab preparation in preparation for conjugation to QDs was abandoned.

The second part of our work focusses on testing and comparing the ability to detect carcinoembryonic antigen (CEA) by flow cytometry with anti-CEA single domain antibodies (sdAbs) labeled by QDs. The sdAbs were biotinylated by using two methods: (i) *in vitro* chemical biotinylation reagent which adds biotins on primary amines, and (ii) enzymatic *in vivo* biotinylation during their production in *E. coli*. These anti-CEA sdAb biotinylation methods were compared to *in vitro* biotinylated monoclonal Abs against CEA for their respective ability to detect human CEA on 100 000 mice cells (MC38 and MC38-CEA cell lines) using flow cytometry. The results show that the limit detection for biotinylated sdAbs is similar between *in vitro* and *in vivo* biotinylation. Furthermore the limit detection with biotinylated sdAb (0.6 fmol are required to detect CEA) is about fifty times better than with biotinylated monoclonal Abs (33 fmol).

Keywords: quantum dots, single domain antibody, immunoglobulin G, antibody-quantum dot conjugates, carcinoembryonic antigen and flow cytometry

Table des matières

Remerciements	2
Résumé	2
Abstract	5
Liste des abréviations	10
Objectifs de mes travaux	19
Introduction	22
I) Le cancer	24
1. L'importance du cancer	24
2. Le cancer du sein	27
3. Méthodes de détection des micrométastases	28
II) Les nanocristaux semi-conducteurs	30
1. Les quantum dots	30
a) La composition chimique des quantum dots	30
b) La synthèse des quantum dots	32
c) La solubilisation des quantum dots	33
d) La fonctionnalisation des quantum dots	34
e) Choix du quantum dot	35
2. La fluorescence des quantum dots	36
a) Principes généraux de la fluorescence	37
b) Schématisation en bandes d'énergie	38
c) Confinement quantique.....	41
d) Effet de la composition chimique sur la fluorescence	43
e) Paramètres optiques des fluorochromes	44
3. Les avantages des QDs par rapport aux fluorochromes organiques	45
a) Utilisation actuelle des fluorochromes organiques.....	45
b) Les limites des fluorochromes organiques	46
• Brilliance.....	46
• Photostabilité	47
• Spectroscopie.....	48
c) Les quantum dots repoussent les limites des fluorochromes organiques	49
• Brilliance.....	49
• Photostabilité	50
• Spectroscopie.....	50
d) Les nouvelles applications possibles	51
e) Les limites actuelles des quantum dots.....	52
• Le clignotement des quantum dots	52
• Synthèse des quantum dots.....	53
• Cytotoxicité	55
• Système de détection	56
III) Les anticorps	57
1. Les immunoglobulines.....	57

a)	Généralités	57
b)	La structure des anticorps	57
c)	La synthèse des anticorps	60
d)	L'utilisation des anticorps dans les techniques immunologiques.....	62
2.	Les anticorps simple domaine.....	64
a)	Généralités sur les anticorps simple domaine.....	64
b)	Structure des anticorps simple domaine	65
c)	Synthèse des anticorps simple domaine	66
d)	Autres avantages des sdAb sur les Ig conventionnelles	67

IV) Association des anticorps aux quantum dots68

1.	Nécessité de fonctionnaliser les QDs avec des biomolécules.....	68
2.	Utilisation d'agents chimiques hétérobifonctionnels.....	69
a)	Le carbodiimide.....	70
b)	Le SMCC.....	71
c)	Le PMPI.....	72
3.	Couplage via le système biotine/streptavidine.....	73

Problématique.....75

Matériel et méthode.....78

	Culture cellulaire.....	79
	Isolement des PBMC humaines.....	79
	Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris.....	79
	Réduction des anticorps par le dithiothreitol	80
	Réduction des anticorps par le 2-mercaptoéthylamine	80
	Protection des groupements fonctionnels sulfhydriles	81
	Détermination du profil de réduction des anticorps.....	81
	Western-blot.....	81
	Purification par affinité des fragments d'anticorps réduits fonctionnels	82
	Conjugaison des fragments d'anticorps aux quantum dots.....	82
	Purification des conjugués anticorps-Qdot [®] 585	83
	Addition de groupements fonctionnels sulfhydriles aux anticorps.....	84
	Activation des groupements fonctionnels sulfhydriles	85
	Quantification du nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles ajoutés.....	85
	Test de fonctionnalité des anticorps-SH anti-IgG de souris	86
	Conjugaison des anticorps-SH aux Qdot [®] 585	86
	Marquage immunologique des PBMC.....	87
	Marquage immunologique des cellules MC38 et MC38-CEA.....	87
	Cytométrie en flux	88

Purification de l'anticorps monoclonal anti-CEA.....	89
Biotinylation <i>in vitro</i> des anticorps.....	89
Quantification du nombre de biotines.....	90
Préparation des complexes sdAb biotinylés <i>in vivo</i> avec les conjugués SA-Qdot [®]	91
Immunomarquage des cellules avec les complexes sdAb-Qdot [®]	91
Marquage des cellules Mc38 et MC38-CEA pour la microscopie confocale.....	91
Résultats et discussion.....	92
I) Conjugaison d'anticorps polyclonaux aux quantum dots.....	93
1. Kits commercial.....	93
a) Présentation des conjugués QD-Ac commerciaux.....	93
b) Conditions de réduction de l'Ac selon le kit d'Invitrogen.....	94
c) Conjugaison des Acs aux QDs via des groupements thiol-esters.....	95
2. Préparation de l'Ac avant sa conjugaison aux QDs.....	96
a) Présentation des méthodes choisies.....	96
• Réduction des anticorps.....	96
• Ajout de groupements thiols sur les anticorps.....	97
b) Préparation de l'Ac afin d'avoir des groupements thiols libres.....	98
• Utilisation de différents ratios molaires Ac : SATA.....	106
• Détermination de la fonctionnalité de l'Ac après rajout de -SH.....	107
3. Conjugaison et purification des anticorps ainsi préparés aux QDs.....	109
4. Tests fonctionnels des différents conjugués Ac-Qdot [®]	112
II) Utilisation conjointe de QD et de sdAb.....	115
1. Choix de l'utilisation du système biotine/streptavidine.....	116
2. Méthodes de biotinylation envisagées.....	117
a) Biotinylation chimique <i>in vitro</i>	117
b) Biotinylation enzymatique <i>in vivo</i>	119
3. Choix du conjugué commercial streptavidine-Qdot [®]	119
4. Détermination de la concentration optimale des conjugués SA-Qdot [®] 800.....	121
5. Optimisation de la biotinylation <i>in vitro</i>	122
a) Comparaison des différents agents de biotinylation.....	122
b) Nombre de biotines ajoutées par sdAb.....	123
6. Comparaison fonctionnelle des deux méthodes de biotinylation.....	126
7. Biotinylation <i>in vitro</i> d'un anticorps monoclonal anti-CEA.....	128
a) Comparaison des différents agents de biotinylation.....	129
b) Nombre de biotine par mAc.....	130
8. Comparaison de la fonctionnalité des différents anticorps biotinylés.....	133
Conclusion et perspectives.....	136
Références bibliographiques.....	144
Annexes.....	165

L'équipe d'accueil et le laboratoire

J'ai réalisé mes travaux de thèse au sein de l'unité LRN « Laboratoire de Recherche en Nanotechnologies » dirigée par le professeur Jacques HM Cohen. Ce laboratoire est une composante de l'Université de Reims Champagne Ardenne (URCA). J'ai réalisé ma thèse sous la direction du Docteur Thierry Tabary. Tout au long de mes travaux, j'ai été aidé par le Docteur Alyona Sukhanova. Mes travaux de thèse ont été financés pendant trois ans par un projet financé par l'ANR (Agence nationale de recherche) sous le nom de « Nanodiagnostic de micrométastases » dont le coordinateur est le Professeur Igor Nabiev. Ce projet englobe une collaboration avec le laboratoire INSERM du Docteur Daniel Baty à Marseille et avec la société Protneomix dirigée par le Docteur Vehari Sakanyan à Nantes. L'objectif global de ce projet était de créer une plateforme diagnostique utilisant des nanoparticules fluorescentes permettant la détection multiparamétrique des cellules tumorales chez les patientes atteintes de cancer du sein et répartie dans des essais de thérapies adjuvantes. Puis une quatrième année de travaux m'a été permise grâce à un financement annuel octroyé par l'Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) dans le cadre de leur programme « ARC jeunes chercheurs ».

Liste des abréviations

2-MEA :	2-mercaptoéthylamine
Ac :	Anticorps
BGP :	Glycoprotéine biliaire
BL4 :	Clone de l'anticorps murin anti-CD4 humain
CD4 :	Cluster de différenciation 4
CD8 :	Cluster de différenciation 8
CDR :	Région déterminante de la complémentarité
CdSe :	Séléniure de cadmium
CdSe/ZnS :	nanocristal composé d'un cœur en séléniure de cadmium et d'une enveloppe en Sulfure de Zinc
CdTe :	Tellurure de cadmium
CdTe/ZnS :	nanocristal composé d'un cœur en tellurure de cadmium et d'une enveloppe en Sulfure de Zinc
CEA :	Antigène carcino-embryonnaire
CEACAM :	« <i>CEA related adhesion molecule</i> »
CH1 :	Domaine constant de chaîne lourde numéro 1
CH2 :	Domaine constant de chaîne lourde numéro 2
CH3 :	Domaine constant de chaîne lourde numéro 3
CTC :	Cellule tumorale circulante
CTD :	Cellule tumorale disséminée
DTT :	Dithiothreitol
E44 :	Acide glutamique en 44 ^{ème} acide aminé
EDC :	1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride
eCFP :	« <i>Enhanced cyan fluorescent protein</i> »
eGFP :	« <i>Enhanced Green fluorescent protein</i> »
ELISPOT :	« <i>Enzyme-linked immunosorbent spot</i> »
EPISPOT :	« <i>Epithelial Immunospot</i> »
EpCAM :	Molécule d'adhésion des cellules épithéliales
F37 :	Phénylalanine en 37 ^{ème} acide aminé
Fab :	Fragment de reconnaissance de l'antigène
F(ab) ₂ :	Fragment de reconnaissance de l'antigène (forme divalente)
FITC :	Fluorescéine

FR :	Région de charpente
FRAP :	Recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment
FRET :	Transfert d'énergie par résonance de type Förster
G44 :	Glycine positionné en 44 ^{ème} acide aminé
G47 :	Glycine positionné en 47 ^{ème} acide aminé
GFP :	« <i>Green fluorescent protein</i> »
HABA :	4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid
HCAb :	Anticorps chaîne lourde
HER2 :	Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains
His-tag :	Marqueur composé de 5 à 10 histidines consécutives
IARC :	Agence internationale pour la recherche sur le cancer
Ig :	Immunoglobuline
IgG :	Immunoglobuline G
IgA :	Immunoglobuline A
IgD :	Immunoglobuline D
IgE :	Immunoglobuline E
IgM :	Immunoglobuline M
IL10 :	Interleukine 10
IMGT [®] :	Système International d'information immunogénétique
I.R. :	Rayonnement d'infrarouge
L11 :	Leucine positionné en 11 ^{ème} acide aminé
L45 :	Leucine positionné en 45 ^{ème} acide aminé
mAc :	Anticorps monoclonal
MNC :	Maladies non contagieuses
NCA :	« <i>Nonspecific crossreacting antigen</i> »
NCD :	Maladies non contagieuses (« <i>Non contagious diseases</i> »)
NEM :	<i>N</i> -Ethylmaleimide
NHS :	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
NTA-Ni :	« <i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i> »
OMS :	Organisation mondiale de la santé
PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide
PBMC :	Cellules mononuclées du sang périphérique
PBS :	Solution tampon de phosphate

PE :	Phycoérythrine
PMPI :	<i>N</i> -(<i>p</i> -Maleimidophenyl)isocyanate
QD :	Quantum dot
Qdot [®] :	Quantum dot commercialisé par Invitrogen
Qdot [®] 525 :	Quantum dot commercial dont le pic d'émission de la fluorescence est à 525 nm
Qdot [®] 585 :	Quantum dot commercial dont le pic d'émission de la fluorescence est à 585 nm
Qdot [®] 625 :	Quantum dot commercial dont le pic d'émission de la fluorescence est à 625 nm
Qdot [®] 700 :	Quantum dot commercial dont le pic d'émission de la fluorescence est à 700 nm
Qdot [®] 800 :	Quantum dot commercial dont le pic d'émission de la fluorescence est à 800 nm
Qdot [®] 585-Ac6,06 :	Conjugués de Qdot [®] 585 et d'anticorps réduit par 6,06 mM de 2-MEA
Qdot [®] 585-Ac0,075 :	Conjugués de Qdot [®] 585 et d'anticorps réduit par 0,075 mM de DTT
Qdot [®] 585-Ac20 :	Conjugués de Qdot [®] 585 et d'anticorps réduit par 20 mM de DTT
R45 :	Arginine positionné en 45 ^{ème} acide aminé
S11 :	Sérine positionné en 11 ^{ème} acide aminé
SA-Qdot [®] 525 :	Conjugués commerciaux streptavidine-quantum dots dont le pic d'émission de fluorescence est à 525 nm
SA-Qdot [®] 565 :	Conjugués commerciaux streptavidine-quantum dots dont le pic d'émission de fluorescence est à 565 nm
SA-Qdot [®] 800 :	Conjugués commerciaux streptavidine-quantum dots dont le pic d'émission de fluorescence est à 800 nm
scFv :	Fragment variable simple chaîne
sdAb :	Anticorps simple domaine
SDS :	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE :	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
SMCC :	Succinimidyl 4-[<i>N</i> -maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate
TOPO :	Oxyde de tri- <i>n</i> -octylphosphine
U.A. :	Unité arbitraire
U.V. :	Rayonnement d'ultra-violets

V37 : Valine positionné en 37^{ème} acide aminé
V_H : Domaine variable de la chaîne lourde d'un anticorps
V_HH : Anticorps simple domaine
V_L : Domaine variable de la chaîne légère d'un anticorps
W47 : Tryptophane positionné en 47^{ème} acide aminé
ZnS : Sulfure de zinc

Liste des illustrations

Figure 1 (page 25) : Incidence et mortalité liées aux principaux cancers humains en 2008.

Figure 2 (page 26) : Distribution géographique des nouveaux cas de cancers dans le monde en 2008.

Figure 3 (page 26) : Distribution de la mortalité en France durant l'année 2008.

Figure 4 (page 32) : Représentation schématique des possibilités de recouvrement du spectre visible selon la composition du cœur des nanocristaux.

Figure 5 (page 35) : Représentation schématique de différentes biomolécules qui peuvent être conjuguées aux quantum dots.

Figure 6 (page 38) : Schématisation simple des changements électroniques d'un électron suite à son excitation selon le diagramme dit de Jablonski.

Figure 7 (page 40) : Représentation simple du bandgap, des bandes de valence et de conduction.

Figure 8 (page 42) : Représentation schématique de l'effet du confinement quantique sur le bandgap.

Figure 9 (page 49) : Caractéristiques spectrales de la fluorescéine, de la phycoérythrine et du texas-red, fluorochromes organiques couramment utilisés.

Figure 10 (page 51) : Caractéristiques spectrales de plusieurs quantum dots.

Figure 11 (page 58) : Schéma d'une Immunoglobuline G.

Figure 12 (page 60) : Schémas de différentes formes d'anticorps.

Figure 13 (page 66) : Schéma des différentes régions qui composent un V_H (domaine variable de chaîne lourde d'une IgG) et un V_{HH} (domaine variable de chaîne lourde d'un HCAb).

Figure 14 (page 69) : Schéma présentant quelques approches possibles pour la conjugaison de biomolécules aux quantum dots.

Figure 15 (page 71) : Schéma réactionnel de l'EDC avec un groupement carboxylique présent sur les quantum dots (QD) puis une amine primaire de l'anticorps (Ac).

Figure 16 (page 72) : Schéma réactionnel du sulfo-SMCC avec une amine primaire présente sur les quantum dots (QD) puis avec un groupement fonctionnel sulfhydriles de l'anticorps (Ac).

Figure 17 (page 73) : Schéma réactionnel du PMPI avec un groupement hydroxyle présent sur les quantum dots (QD) puis avec un groupement fonctionnel sulfhydriles de l'anticorps (Ac).

Figure 18 (page 77) : Diagramme des différentes approches développées pour la conjugaison des différents anticorps aux quantum dots.

Figure 19 (page 95) : Profils de réduction totale de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de DTT.

Figure 20 (page 99) : Profils de réduction ménagée de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de DTT.

Figure 21 (page 101) : Détermination de la nature des bandes du profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenues avec différentes concentrations de DTT.

Figure 22 (page 102) : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de 2-MEA.

Figure 23 (page 103) : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus durant une cinétique de réduction avec 6,06 mM de 2-MEA.

Figure 24 (page 105) : Efficacité de la purification par affinité des fragments fonctionnels de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris réduit.

Figure 25 (page 106) : Détermination du nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles ajoutés à l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris en fonction du ratio molaire SATA : Ac utilisé.

Figure 26 (page 108) : Influence du nombre de groupements –SH ajoutés aux anticorps grâce au SATA par ELISA.

Figure 27 (page 110) : Efficacité de la conjugaison des Ac aux Qdot[®] et de la purification des conjugués déterminées par migration dans un gel d'agarose 1,5%.

Figure 28 (page 110) : Profil des conjugués Ac-Qdot[®] réalisés avec les anticorps traités au SATA déterminé par migration dans un gel d'agarose 1,5%.

Figure 29 (page 112) : Profil des conjugués Ac-Qdot[®] réalisés avec les anticorps traités au SATA par migration dans un gel d'agarose 1,5% après l'essai de la purification.

Figure 30 (page 113) : Efficacité de la détection de CD4 à la surface des cellules en fonction des différents conjugués Ac-Qdot[®] par cytométrie en flux.

Figure 31 (page 114) : Détermination par cytométrie de flux de la concentration optimale des conjugués streptavidine-Qdot[®] 800 à utiliser.

Figure 32 (page 115) : Détermination de la limite de détection des conjugués Qdot[®]-Ac

Figure 33 (page 118) : Schéma de la réaction entre une amine primaire de l'anticorps et l'agent de biotinylation sulfo-NHS-biotine.

Figure 34 (page 120) : Détermination par cytométrie en flux du meilleur conjugué streptavidine-Qdot[®] pour le marquage du CEA.

Figure 35 (page 121) : Détermination de la dilution optimale des conjugués streptavidine-Qdot[®] 800 à utiliser pour la cytométrie en flux.

Figure 36 (page 122) : Détermination par cytométrie en flux du meilleur agent de biotinylation des anticorps simple domaine.

Figure 37 (page 123) : Séquence peptidique de l'anticorps simple domaine anti-CEA (clone 17).

Figure 38 (page 125) : Détermination par cytométrie en flux de l'influence du nombre de biotine ajouté à l'anticorps simple domaine sur la sensibilité de détection du CEA.

Figure 39 (page 126) : Comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés *in vivo* ou *in vitro*.

Figure 40 (page 129) : Détermination par cytométrie en flux du meilleur agent de biotinylation des anticorps monoclonaux.

Figure 41 (page 131) : Détermination par cytométrie en flux de l'influence du nombre de biotines ajoutées à l'anticorps monoclonal sur la sensibilité de détection du CEA.

Figure 42 (page 133) : Détermination par cytométrie en flux de l'influence du nombre de biotines ajoutées à l'anticorps monoclonal sur la sensibilité de détection du CEA.

Figure 43 (page 139) : Sensibilité de la détection du CEA selon les quantités de sdAb anti-CEA biotinylés *in vivo* et des conjugués SA-Qdot[®]800 utilisés pour le couplage des conjugués sdAb-Qdot[®] préalable à la réaction de marquage des cellules par cytométrie de flux.

Figure 44 (page 141) : Mise en évidence de l'importance de la source d'excitation pour un marquage haute sensibilité par immunohistochimie analysée en microscopie confocale.

Liste des tables

Table 1 (page 31) : Exemples de couples d'éléments possibles pour former un cœur de quantum dot semi-conducteur.

Table 2 (page 45) : Quelques paramètres optiques sur plusieurs molécules.

Table 3 (page 46) : Comparaison des propriétés de différents types de sondes utilisées en biologie.

Table 4 (page 87) : Détail des filtres du BD FACSCalibur™.

Table 5 (page 88) : Détail des filtres du Guava® easycyte™ plus.

Table 6 (page 119) : Coefficients d'extinction molaires de différents Qdot® utilisés en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

Table 7 (page 124) : Estimation du nombre moyen de biotines ajoutées par anticorps simple domaine anti-CEA.

Table 8 (page 127) : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés *in vivo* ou *in vitro*.

Table 9 (page 130) : Estimation du nombre moyen de biotine ajouté par anticorps monoclonal anti-CEA.

Table 10 (page 132) : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux l'impact du nombre de biotine ajouté à l'anticorps monoclonal sur la sensibilité de détection du CEA.

Table 11 (page 134) : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des différents anticorps biotinylés.

Objectifs de mes travaux

Le cancer du sein est un problème de santé publique et constitue, au niveau mondial, l'affection tumorale la plus fréquente chez la femme. Les métastases sont la cause principale de décès dans le cancer du sein [Alix-Panabières *et al.*, 2007]. Malgré de nombreuses recherches médicales réalisées pour améliorer le traitement des patients, la détection précoce du cancer reste l'élément clef pour la survie du patient. Le cancer, de par sa nature, est difficile à détecter et la meilleure méthode actuelle est de quantifier l'expression d'un panel de biomarqueurs tumoraux spécifiques du cancer du sein tel que les récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains (HER2), Ki-67 et des récepteurs hormonaux (aux œstrogènes et progestérone) [Jotwani *et al.*, 2009]. En effet la différenciation des cellules saines en cellules tumorales se traduit par des différences d'expressions de plusieurs protéines. Le suivi de l'expression de ces biomarqueurs peut être réalisé selon différentes approches telles que les puces, la cytométrie de flux ou par immunohistochimie [Kumaki *et al.*, 2011, Corcoran *et al.*, 2011, Lloyd *et al.*, 2010 et Esteva *et al.*, 2002]. Malheureusement toutes ces méthodes souffrent de limites communes : leur sensibilité de détection est relativement faible et les sondes utilisées ne permettent pas de marquages multiplexés à haut débit.

Les nanotechnologies pourraient permettre des avancées majeures pour la détection des cancers, leur diagnostic et leur traitement [Ferrari, 2005 et Biju *et al.*, 2010]. Les nanocristaux de semi-conducteurs « quantum dots » sont des nanosondes fluorescentes présentant un fort potentiel pour le diagnostic des cancers car ils possèdent d'intéressantes propriétés physicochimiques et optiques pour des analyses très sensibles et multiplexées. En effet, tous les quantum dots peuvent être excités par une même lampe U.V. tandis que la longueur d'onde de leur émission de fluorescence dépend directement de la taille et de la composition chimique du nanocristal [Ghasemi *et al.*, 2009]. Les pics de fluorescence émis sont étroits et symétriques. De plus, leur fluorescence est stable au cours du temps et suffisamment intense pour permettre la détection d'un quantum dot unique. Ce sont donc d'excellentes sondes qui permettraient de suivre simultanément un grand nombre de biomarqueurs et repousser les limites de détection actuelles pour permettre un diagnostic plus précoce du cancer du sein [Chen *et al.*, 2009]. Toutefois, l'utilisation des quantum dots dans un environnement biologique (*in vivo*, *in vitro* ou *ex vivo*) n'est rendue possible que grâce à des biomolécules conjuguées à leur surface. Dans le cadre d'un diagnostic du cancer du sein, des anticorps

spécifiques de biomarqueurs doivent être conjugués à des quantum dots afin de cibler les cellules tumorales sans cibler les cellules saines. En 2007, une étude a démontré que les principaux conjugués anticorps-quantum dots commerciaux possèdent seulement 0,1 anticorps fonctionnel présent à la surface d'un nanocristal [Pathak *et al.*, 2007]. Ce faible nombre serait en partie dû à une réduction de l'anticorps réalisée dans des conditions trop fortes et qui affecterait l'intégrité du site de reconnaissance de l'antigène. Cette réduction de l'anticorps est utilisée pour libérer des groupements fonctionnels sulfhydriles, nécessaires à la méthode de conjugaison choisie.

Les limites actuelles de détection devraient pouvoir être repoussées avec l'optimisation de cette méthode de conjugaison entre des anticorps et des quantum dots. L'augmentation du nombre d'anticorps fonctionnels à la surface d'un quantum dot permettrait d'obtenir des bionanosondes anticorps-quantum dots très brillantes, stables, capables de reconnaître et fixer spécifiquement l'antigène cible.

Des résultats préliminaires ont permis de confirmer que le protocole commercial de réduction de l'anticorps réduit totalement l'anticorps et que ce ne sont donc pas des conditions adaptées pour la synthèse de bionanosondes fonctionnelles. Les conditions de conjugaison des IgG aux QDs ont été développées dans la première partie de ma thèse afin d'avoir une réduction ménagée de l'anticorps, par des agents réducteurs, qui permet de conserver intact le site de reconnaissance de l'antigène tout en libérant des groupements fonctionnels sulfhydriles nécessaire à la conjugaison aux quantum dots. Différentes étapes de purification ont aussi été mises en place et permettent d'améliorer la sensibilité de détection de la protéine cible. La sensibilité de la détection de la protéine cible en utilisant les conjugués ainsi préparés a été comparée à celle obtenu avec des conjugués préparés selon les conditions proposées par le fabricant. Les résultats obtenus laissent suggérer que le nombre d'anticorps fonctionnels à la surface des quantum dots a été amélioré.

Dans la seconde partie de ma thèse, l'association innovante des anticorps simple domaines et des quantum dots a été étudiée. Les lamas produisent des anticorps dits à chaîne lourde qui ont la particularité de n'être composés que de deux chaînes lourdes. Ainsi leur domaine variable de la chaîne lourde qui est la base de la reconnaissance de l'antigène, a pu être isolé pour former ce que l'on appelle un anticorps simple domaine (sdAb) [Hamers-Casterman *et al.*, 1993]. En dépit de leurs petites tailles (environ 15 kDa), ces anticorps présentent une affinité et une spécificité de reconnaissance antigénique équivalente à celles des immunoglobulines classiques. Les sdAbs sont plus résistants aux hautes températures et aux

agents réducteurs, ils peuvent être clonés plus facilement que des anticorps traditionnels et leur production à grande échelle est possible dans des microorganismes [Perruchini *et al.*, 2009]. Une étude a aussi démontré que des anticorps simple domaine anti-CEA (antigène carcino-embryonnaire) par exemple reconnaissaient spécifiquement le CEA mais contrairement aux anticorps traditionnels, ne reconnaissent pas l'antigène non spécifique NCA (« *non-specific crossreacting antigen* ») [Behar *et al.*, 2009]. Le CEA n'est présent chez l'adulte que dans de rares tissus épithéliaux tandis que le NCA lui est très répandu. L'utilisation de ces anticorps pourrait permettre l'utilisation du CEA comme biomarqueur tout particulièrement pour la détection de cellules tumorales circulantes qui se rencontrent dans le sang où le CEA est absent chez les adultes sains. Ces anticorps sont donc particulièrement intéressants pour une future utilisation dans des plateformes de diagnostic fondées sur les marquages immunologiques.

Le système biotine/streptavidine est la stratégie qui a été choisie dans ce travail pour coupler l'anticorps aux quantum dots. Ce système a l'avantage d'être flexible lorsqu'on change l'anticorps. La haute affinité de la streptavidine pour la biotine rend ces complexes suffisamment stables pour être utilisés dans des analyses multiplexées. Plusieurs méthodes de biotinylation des sdAb ont été réalisées afin de déterminer laquelle offrait une meilleure reconnaissance par des conjugués quantum dot-streptavidine : une biotinylation chimique réalisée *in vitro* et une biotinylation enzymatique réalisée *in vivo*. La faisabilité de cette approche innovante a tout d'abord été testée grâce à des marquages de cellules mis en évidence par cytométrie en flux. Il est intéressant de noter que le choix de la stratégie de biotinylation des sdAbs détectés par les conjugués streptavidine-quantum dots a une influence sur la sensibilité de détection de l'antigène carcino-embryonnaire détecté à la surface de cellules par cytométrie de flux. L'orientation des sdAb à la surface des QDs pourrait être à l'origine des différences observées. Enfin, il est nettement plus simple et économique de produire et manipuler les sdAbs par rapport aux IgG, ce qui est important dans l'optique de la mise en place de méthodes de diagnostic à grande échelle.

Introduction

Le cancer du sein est un problème de santé publique et constitue, au niveau mondial, l'affection tumorale la plus fréquente chez la femme. Les métastases sont la cause principale de décès dans le cancer du sein [Alix-Panabières *et al.*, 2007]. Près de 30% des patientes atteintes d'un cancer du sein possèdent probablement des micrométastases. Les micrométastases sont les cellules tumorales circulantes (CTC) dans le sang et les cellules tumorales disséminées (CTD) dans la moelle osseuse. Ces cellules sont rares et difficiles à détecter. Les méthodes de détection actuelles souffrent de limites communes : leur sensibilité de détection est relativement faible et les sondes utilisées ne permettent pas de marquages multiplexés à haut débit.

Les nanotechnologies pourraient permettre des avancées majeures pour la détection des cancers, leur diagnostic et leur traitement [Ferrari, 2005 et Biju *et al.*, 2010]. Les nanocristaux de semi-conducteurs « quantum dots » sont des nanosondes fluorescentes présentant un fort potentiel pour cela car ils possèdent d'intéressantes propriétés physicochimiques et optiques pour des analyses très sensibles et multiplexées. Le projet « nanodiagnostic des micrométastases », coordonné par le Professeur Igor Nabiev, utilise les propriétés de ces conjugués anticorps-quantum dots pour la mise en place d'une plateforme multiparamétrique à sensibilité élevée pour la détection précoce du cancer du sein. Ce projet s'appuie sur le caractère innovant et performant de conjuguer des anticorps simple domaine à des quantum dots et vise aussi à permettre la détection de cellules tumorales circulantes et de cellules tumorales disséminées qui sont de très rares cellules en circulation dans l'organisme et qui sont les précurseurs des métastases. La sensibilité de détection de ces cellules grâce à ces conjugués permettrait donc d'aider au diagnostic moléculaire précoce afin de traiter plus efficacement les patientes et de réduire la probabilité d'apparition de métastases. Les anticorps simple domaine possèdent d'intéressantes caractéristiques qui font d'eux un outil de reconnaissance antigénique performant, économique et aussi adapté pour la sélection de nouveaux biomarqueurs [Muyldermans *et al.*, 2001].

Avant de décrire le travail réalisé, plusieurs notions seront introduites d'après des données bibliographiques : l'importance du cancer dans notre société sera rappelée suivie d'une présentation des quantum dots et de leur propriétés optiques en insistant sur les avantages et les limites de l'utilisation de ces fluorochromes dans des applications biologiques. Une description des anticorps permettra dans un premier temps de définir les anticorps traditionnels afin de mieux comprendre les avantages apportés par les anticorps simple

domaine. Enfin plusieurs méthodes de conjugaison anticorps aux quantum dots possibles seront détaillées.

I) Le cancer

1. L'importance du cancer

L'espérance de vie s'est nettement améliorée principalement grâce à l'endiguement de maladies mortelles telles que la tuberculose, la peste, le choléra. Depuis le milieu du XXème siècle, on peut espérer vivre 70, 80 ou 90 ans dans les pays développés, ce qui expose la population aux risques du cancer. Le cancer est une maladie qui peut toucher n'importe quel organe de n'importe qui n'importe où dans le monde. Le cancer et les maladies cardiaques sont aujourd'hui les principales maladies mortelles au monde. En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et L'agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC) ont édité un rapport sur le cancer dans le monde [World Cancer Report 2008]. En 2008, l'OMS a comptabilisé 7,6 millions de morts suite à un cancer à travers le monde, soit près de 13% de la mortalité mondiale [Globocan 2008]. L'incidence et la mortalité liées à chaque type de cancer ne sont pas les même en fonction du sexe (Figure 1, page 25). Les mécanismes cellulaires du cancer sont de mieux en mieux connus, tant pour le dépistage, le traitement de la maladie ou le suivi après traitement. En 2008, près de 70% des décès par cancer sont survenus dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, alors que les pays à fort revenus sont aussi très largement touchés par des nouveaux cas de cancer (Figure 2, page 26). Ces données statistiques révèlent que le cancer est une maladie qui touche toute la population mondiale mais qui est bien mieux pris en charge dans les pays à fort revenu, cette maladie n'est donc pas inéluctable. En France, le cancer a été la cause de 31% des morts en 2008 d'après les sources de l'OMS (Figure 3, page 26).

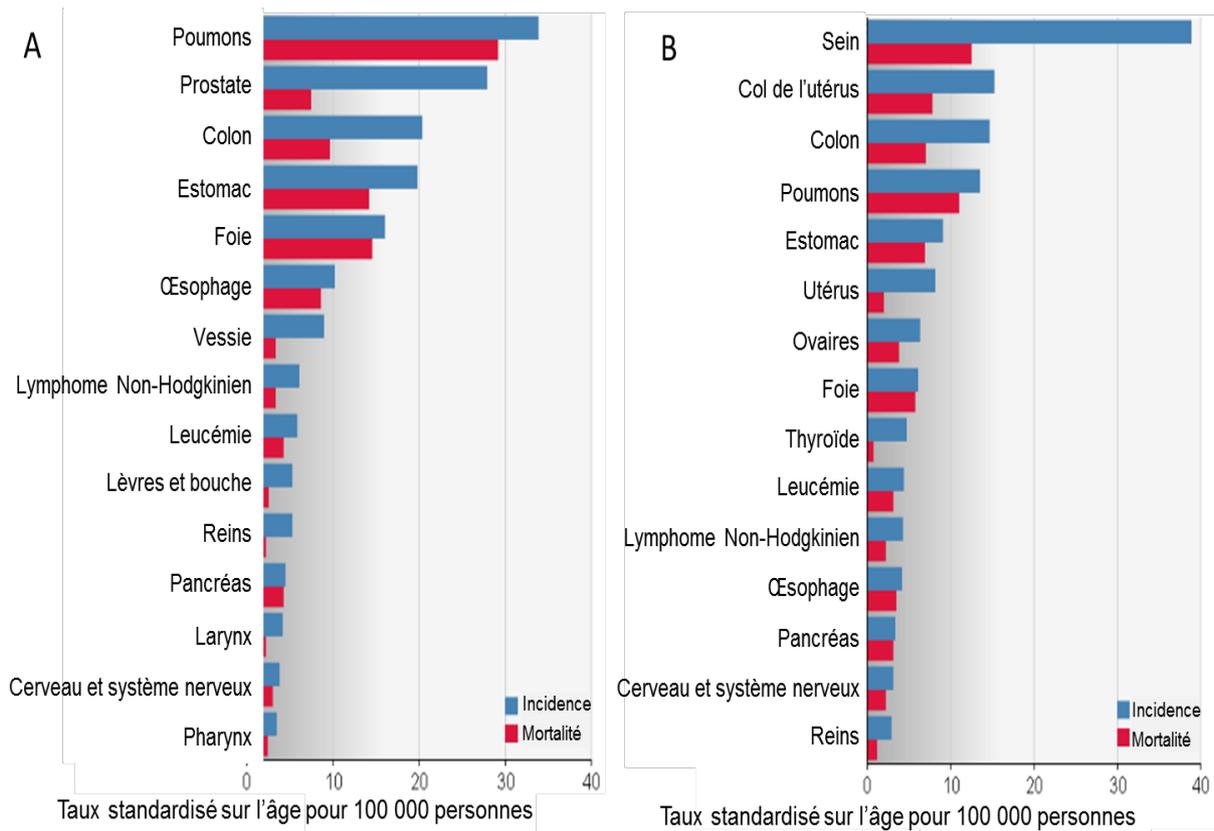


Figure 1 : Incidence et mortalité liées aux principaux cancers humains en 2008. L'incidence et la mortalité liées aux principaux types de cancers chez l'homme (A) et chez la femme (B). La standardisation sur l'âge est nécessaire lorsque l'on compare plusieurs populations qui diffèrent par rapport à l'âge parce que l'âge a une influence sur le risque de cancer. La figure est adaptée à partir de Globocan 2008 : <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>.

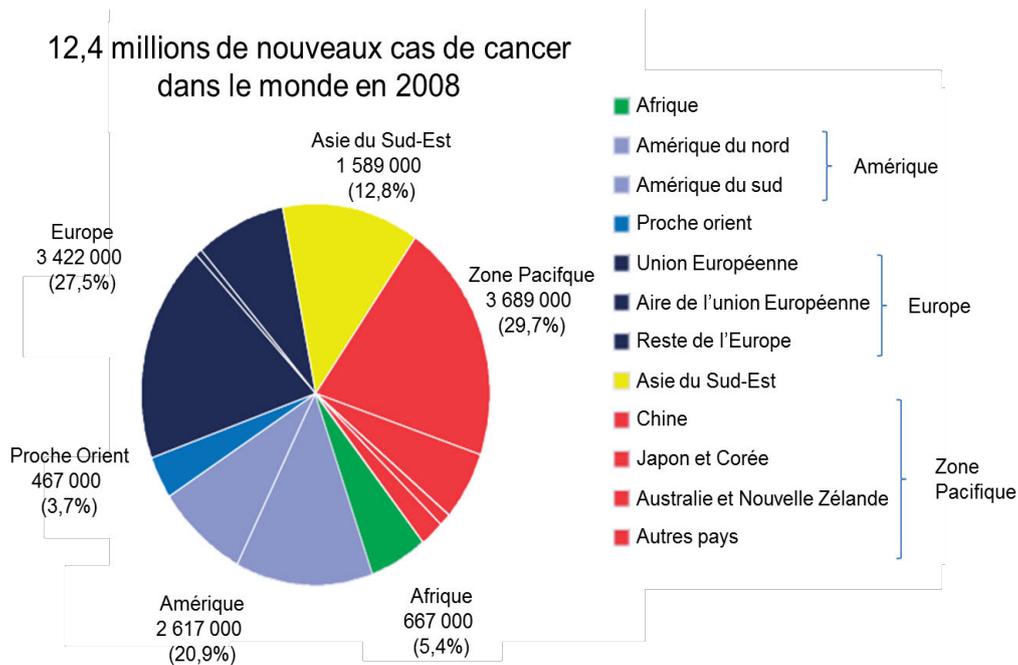


Figure 2 : Distribution géographique des nouveaux cas de cancers dans le monde en 2008. Figure adaptée du « world cancer report » publié en 2008 par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Agence internationale pour la recherche sur le cancer (IARC).

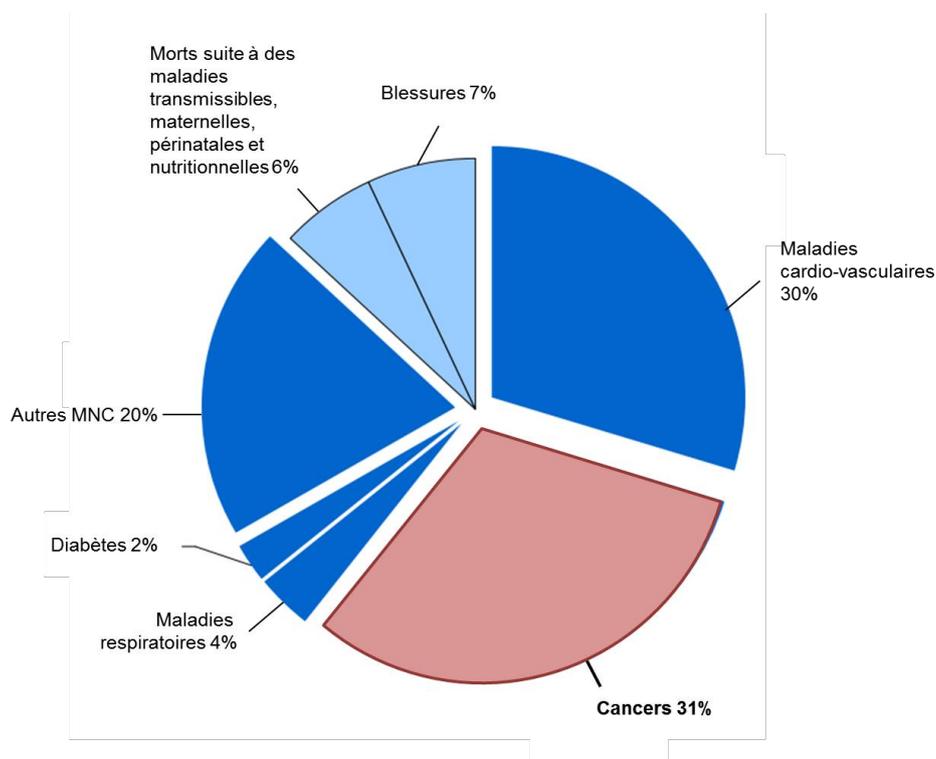


Figure 3 : Distribution de la mortalité en France durant l'année 2008. Les maladies non contagieuses (MNC) représentent 87% des morts. Les cancers sont la source de 31% des morts en France en 2008. Figure adaptée du rapport des maladies non contagieuses en France (OMS – « NCD Country Profiles ») publié en 2011.

2. Le cancer du sein

En 2008, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent au monde chez la femme avec près de 1,4 million de nouvelles patientes atteintes, soit 38,9% des nouveaux cas de cancers (Figure 1, page 25). Par contre, il n'est pas la cause du plus nombre de décès avec moins de 0,5 millions de patientes décédées, soit 12,4% des décès suite à un cancer dans le monde [Globocan 2008]. En France, comme dans d'autres pays développés, ce cancer fait l'objet d'un dépistage systématique annuel par mammographie. Ce cancer peut être traité assez efficacement s'il est dépisté et traité tôt avant que la maladie ne soit à un stade avancé. Dans les pays à revenus élevés, la plupart des cas de mortalité suite à un cancer du sein est liée à l'apparition de métastases. Il est donc très important de mettre en place des diagnostics précoces hautement sensibles et multiparamétriques afin de dépister et de pouvoir traiter ce cancer de façon encore plus précoce. Compte tenu de la répartition mondiale de l'incidence et de la mortalité liées à ce cancer, le paramètre économique doit également être pris en compte.

L'apparition de métastases est la cause principale de mortalité liée au cancer du sein dans les pays développés. Plus de 30% des patientes du cancer du sein sans aucun signe clinique ou pathologique de métastases possèdent des cellules tumorales disséminées dans leur moelle osseuse [Fehm *et al.*, 2006]. La présence de CTD dans la moelle osseuse est statistiquement de mauvais pronostic pour la survie de la patiente [Braun *et al.*, 2005].

Une étude récente laisse supposer que la présence d'une seule cellule tumorale circulante dans 7,5 mL de sang aurait un impact significatif sur la survie d'une patiente ne présentant pas de métastases issues d'un cancer du sein [Lucci *et al.*, 2012]. Les projets de recherche dans l'établissement et la standardisation de méthode de détection de ces CTC, de leur capacité de pronostic médical sont nombreux mais le cancer du sein est d'un point de vue clinique complexe avec entre autre une diversité des stades de la maladie, des profils d'expression protéique de biomarqueurs tumoraux, ainsi que l'éventuelle présence de CTC dans le sang ou CTD dans la moelle osseuse. La diversité des études menées (technique utilisée, volume sanguin étudié, nombre de patients atteints et sains ou l'interprétation des données) empêche de conclure clairement sur l'impact de la présence ou leur potentiel en pronostic clinique de ces cellules tumorales.

La détection des micrométastases (CTD et CTC) est donc un axe de développement prometteur pour améliorer le traitement et la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein.

3. Méthodes de détection des micrométastases

Les micrométastases sont des cellules tumorales rares, de l'ordre de quelques-unes pour environ dix millions de leucocytes et cinq milliards d'érythrocytes présents dans 1 mL de sang humain. Cette rareté impose que les techniques de détection de ces cellules soient hautement sensibles. Les techniques de détection des micrométastases courantes utilisent soit des anticorps, soit des acides nucléiques [Mahmoud *et al.*, 2010]. Ces techniques sont généralement précédées d'étapes d'enrichissement de ces cellules afin d'augmenter l'efficacité de la détection [Zach *et al.*, 2006 et Wong *et al.*, 2006]. Les méthodes qui utilisent des anticorps sont globalement plus sensibles que celles utilisant les acides nucléiques qui ont tendance à considérer des cellules saines comme tumorales. Il y a cinq méthodes de détection des micrométastases qui utilisent des anticorps : la microscopie à fluorescence, la cytométrie en flux, l'EPISPOT [Alix-Panabières *et al.*, 2009], le CellSearch System™ [Ali *et al.*, 2011] et les micropuces à anticorps [Rousserie *et al.*, 2010]. L'EPISPOT (« *Epithelial Immunospot* ») est une technique qui a été développée à partir de L'ELISPOT (« *Enzyme-linked immunosorbent spot* ») et qui permet de détecter les protéines qui sont sécrétées/relâchées par des cellules mises en culture sur une plaque recouverte d'anticorps de protéines cibles. Ces dernières seront donc reconnues et fixées par les anticorps couplés à la plaque. Un marquage est ensuite réalisé avec les mêmes anticorps selon le modèle « sandwich » [Alix-Panabières, 2012]. Le CellSearch System™ est une technique commercialisée par Veridex qui permet la détection dans le sang de cellules tumorales circulantes pour le pronostic de patients atteints de cancer du sein, de la prostate ou du colon. Ces techniques offrent des avantages et des limites. Les puces à anticorps développées pour la détection des micrométastases utilisent des anticorps anti-EpCAM (molécule d'adhésion des cellules épithéliales) qui n'est pas un biomarqueur stable. La microscopie à fluorescence et la cytométrie en flux souffrent toutes deux de la qualité des fluorochromes utilisés (généralement des fluorochromes organiques).

Plusieurs biomarqueurs sont considérées comme spécifiques des cellules tumorales (par rapport aux cellules saines) pour le cancer du sein par exemple : les récepteurs hormonaux (progestérone et œstrogènes) [Bogina *et al.*, 2011 et De Vies *et al.*, 2007], l'antigène Ki-67

[Luporsi *et al.*, 2012], le récepteur pour les facteurs de croissance épidermique humain (HER2) [Arteaga *et al.*, 2011]. Certaines de ces molécules sont déjà utilisées en routine clinique pour orienter la thérapie des patientes. Par exemple, les patientes HER2 positives seront soignées grâce à un anticorps Transtuzumab (Herceptin[®]), tandis que les patientes dont la tumeur présente des récepteurs hormonaux (progestérone et/ou œstrogènes) seront soignées grâce à des hormones.

L'Antigène carcino-embryonnaire (CEA) est aussi une macromolécule fortement glycosylée d'environ 180 kDa qui est naturellement exprimée par des cellules épithéliales dans plusieurs organes tels que le colon, la langue ou la muqueuse du pylore à un stade foetal ainsi que chez l'adulte. Le CEA n'est que très faiblement présent dans le sang à l'âge adulte. Le CEA est fortement surexprimé dans de nombreux cancers : pancréatique, gastro-intestinal, poumons, cou, sein. La mesure de la quantité de CEA présent dans le sang d'un patient est considérée utile à la détection de plusieurs cancers ainsi que pour le suivi de l'évolution du cancer suite à un traitement. Le CEA est aussi certainement impliqué dans la croissance du cancer ainsi que l'établissement des métastases [Hammarström, 1999], c'est donc un biomarqueur particulièrement intéressant.

Plusieurs autres protéines exprimées dans les tissus sains sont reconnues de façon non spécifique par les anticorps anti-CEA tels que l'antigène non spécifique (NCA, « *nonspecific crossreacting antigen* ») [von Kleist *et al.*, 1972] ou redéfini CEACAM6 (« *CEA-related cellular adhesion molecules* ») [Beauchemin *et al.*, 1999] ou la glycoprotéine biliaire (BGP) [Svenberg *et al.*, 1979]. Ces molécules qui sont reconnues par les anticorps anti-CEA sont un paramètre limitant pour les techniques immunologiques. Il est impératif d'avoir des anticorps anti-CEA qui ne reconnaissent pas ces molécules.

Le projet « nanodiagnostic des micrométastases » a pour vocation la mise en place d'une plateforme multiparamétrique à sensibilité élevée pour la détection précoce du cancer du sein. Pour cela, il faut définir des biomarqueurs qui seront suivis à l'aide d'anticorps hautement spécifiques conjugués à des sondes fluorescentes très brillantes afin d'avoir le meilleur ratio signal sur bruit de fond possible. Ce projet vise aussi à permettre la détection de cellules tumorales circulantes et de cellules tumorales disséminées qui sont des cellules tumorales en circulation dans l'organisme d'un patient et qui sont les précurseurs des métastases. Leur sensibilité de détection permettra donc de traiter plus précocement les patientes et de réduire la probabilité d'apparition de métastases.

Ce projet s'appuie sur le caractère innovant et performant de conjuguer des anticorps simple domaine à des quantum dots. Leur utilisation sur des micropuces à protéines permettrait des analyses multiparamétriques en utilisant plusieurs biomarqueurs spécifiques du cancer du sein. Les quantum dots sont de très bons fluorochromes pour la détection multiparamétrique d'un panel de biomarqueurs [Rousserie *et al.*, 2010].

II) Les nanocristaux semi-conducteurs

1. Les quantum dots

Les boîtes quantiques ou « *quantum dots* » (QDs) sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents possédant d'intéressantes caractéristiques physico-chimiques telles que leur large spectre d'absorption et leur spectre d'émission étroit, symétrique dont la position du pic est dépendante de la taille du nanocristal. Les quantum dots sont des molécules à l'échelle du nanomètre, si bien qu'une fois dissous dans un solvant, on obtient une solution homogène dite colloïdale. Ces fluorochromes inorganiques ont été découverts au début des années 1980 par Alexey Ekimov dans une matrice de verre puis par Louis E. Brus dans les solutions colloïdales [Ekimov *et al.*, 1981].

Dans un souci d'employer le terme couramment utilisé au sein des laboratoires, les boîtes quantiques seront appelées par leur nom anglais : quantum dots (QDs).

a) La composition chimique des quantum dots

Les quantum dots sont des nanocristaux de forme sphérique formés d'un cœur semi-conducteur généralement composé de plusieurs éléments (le plus souvent deux) compris dans les groupes d'états électroniques I-VII (AgBr [Masumoto *et al.*, 1992 et Chen *et al.*, 1994]), II-VI (CdSe [Ai *et al.*, 2007, Sukhanova *et al.*, 2004 et Jasieniak *et al.* 2011]), III-V (InAs [Barik *et al.* 2010], GaAs) ou IV-VI (PbSe [Lewis *et al.* 2010 et Wang *et al.* 2010]) de la classification périodique des éléments (Table 1, page 31).

Groupe	Exemples d'élément	Exemples de quantum dot
I-VII	Argent, Brome	AgBr
II-VI	Cadmium, Zinc, Sélénium, Soufre, Tellure	CdS, CdSe, CdTe
III-V	Indium, Thallium, Gallium, Arsenic	InAs, GaAs
IV-VI	Plomb, Soufre, Sélénium	PbSe, PbS

Table 1. Exemples de couples d'éléments possibles pour former un cœur de quantum dot semi-conducteur.

Généralement, les nanocristaux semi-conducteurs sont recouverts d'une enveloppe protectrice, on parle alors d'un cœur et de son enveloppe. Cette enveloppe est aussi semi-conductrice, elle permet d'augmenter le rendement quantique du cœur et le protège aussi contre des agressions extérieures.

Les quantum dots les plus fréquemment utilisés sont composés d'un cœur en séléniure de cadmium (CdSe) et d'une enveloppe en sulfure de zinc (ZnS). De tels QDs sont notés CdSe/ZnS (composition du cœur/composition de l'enveloppe). Leur émission de fluorescence peut couvrir tout le spectre visible et leur synthèse est relativement bien optimisée [Reiss *et al.* 2009]. Les Qdot[®] commercialisés par Invitrogen[®] sont des nanocristaux semi-conducteurs composés de CdSe/ZnS exceptés ceux qui émettent à des longueurs d'ondes élevées (QD₇₀₅ et QD₈₀₀) qui sont des nanocristaux CdTe/ZnS.

La taille du cœur semi-conducteur, qui varie généralement entre 1,5 et 10 nm, est très importante car elle influence grandement les propriétés optiques des quantum dots. En effet le pic d'émission de fluorescence du quantum dot est dépendant de cette taille en raison des effets de confinement quantiques. Nous reviendrons plus en détail sur ces propriétés (cf. partie II) 2. c) page 41).

Selon le nombre de sondes fluorescentes à détecter de façon simultanée, ainsi que des restrictions du système de détection, des nanocristaux semi-conducteurs possédant différentes compositions chimiques seront sélectionnés. En effet, il est possible de couvrir tout le spectre visible avec des QD CdSe/ZnS mais d'autres compositions permettent de couvrir différentes

régions du spectre électromagnétique à savoir les ultra-violet (UV), le spectre visible et celui des rayonnements proches infrarouges (Figure 4, page 32).

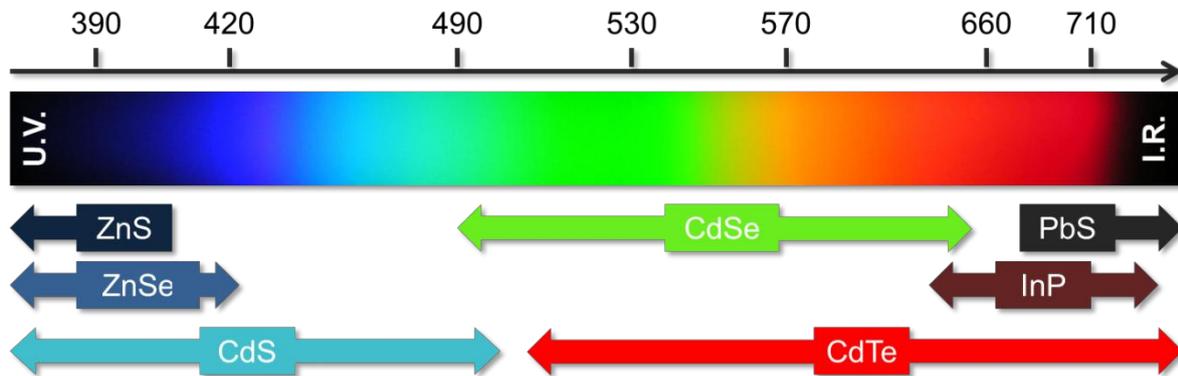


Figure 4 : Représentation schématique des possibilités de recouvrement du spectre visible selon la composition chimique du cœur des nanocristaux. La largeur de la plage couverte, pour une composition chimique du nanocristal donnée, représente la plage de longueurs d'onde d'émission possibles en modifiant la taille du nanocristal.

b) La synthèse des quantum dots

Un procédé fondé sur la lithographie a permis la synthèse des premiers quantum dots. Cette méthode permet la synthèse de quantum dots avec une seule dimension à l'échelle nanoscopique, les deux autres dimensions étant limitées par la résolution de la lithographie. Au début des années 1990, de nouveaux procédés ont permis la synthèse de QD en solution aqueuse avec l'utilisation d'agents stabilisateurs tels que l'oxyde de tri-*n*-octylphosphine (TOPO). Ces quantum dot, nanoscopiques dans les trois dimensions, présentaient une faible efficacité de fluorescence et de grandes variations de taille. Ce n'est qu'en 1993 que Murray et ses collaborateurs ont mis en place un procédé organométallique à haute température pour la synthèse des quantum dots [Murray *et al.* 1993]. Ce procédé réalisé sous atmosphère d'Argon permet d'avoir le contrôle sur la taille des nanocristaux formés et donc sur les caractéristiques optiques du QD en contrôlant la température, le temps de réaction et les espèces en présence. Les nanocristaux ainsi synthétisés présentent une structure cristalline parfaite et de très faibles variations de taille [Ghasemi *et al.*, 2009]. Malgré tout, leur rendement quantique est assez faible. L'ajout d'une enveloppe semi-conductrice composée de deux éléments et qui présente un « bandgap » plus élevé que le cœur du nanocristal permet d'accroître considérablement le rendement quantique du cœur du nanocristal [Grabolle *et al.* 2008 et Hines *et al.*, 1996]. La

notion de bandgap sera plus amplement détaillée dans la partie II) 2. b) (page 38). Cette enveloppe, si elle n'est pas trop épaisse, ne diminue pas les caractéristiques optiques du cœur et le protège des agressions extérieures (par exemple un pH acide ou la présence de radicaux libres) qui pourraient induire la dégradation, l'agrégation ou le photoblanchiment des quantum dots [Grabolle *et al.*, 2008]. Cette enveloppe protectrice confine également l'excitation lumineuse dans le cœur ce qui élimine les phénomènes de relaxation non radiative source du photoblanchiment des fluorochromes.

Le cœur et l'enveloppe des quantum dots sont hydrophobes et ne peuvent être solubilisés que dans des solvants apolaires. En dépit de leurs propriétés optiques, les QDs n'ont pas suscité un grand intérêt pour leur utilisation dans l'étude du monde vivant à cause de ces problèmes de solubilité en solution aqueuse. En 1998, deux études ont démontré qu'il est possible de solubiliser les quantum dots dans des solvants polaires [Bruchez *et al.*, 1998 et Chan *et al.*, 1998]. Ces deux études ont permis le développement de l'utilisation des QDs dans des applications biologiques si bien qu'aujourd'hui les quantum dots et leur utilisation représentent des thématiques de recherche parmi les plus dynamiques.

c) La solubilisation des quantum dots

La solubilisation des quantum dots dans des solvants aqueux a initialement été réalisée (i) par ajout d'une couche de silice, méthode inspirée par des traitements similaires pour solubiliser des particules d'or [Bruchez *et al.*, 1998] et (ii) par traitement à l'acide mercaptoacétique afin d'y ajouter une protéine à l'aide d'ethyl-3-diméthylaminopropyl carbodiimide [Chan *et al.*, 1998]. Aujourd'hui, d'autres méthodes permettent la solubilisation des quantum dots dans les solvants aqueux telles que l'ajout de ligands hydrophiles [Chan *et al.*, 1998], d'acide hydrolipoiq ue [Jaiswal *et al.*, 2003], de cystéine [Sukhanova *et al.*, 2004], la silanisation [Bruchez *et al.*, 1998], l'encapsulation dans des micelles [Dubertret *et al.*, 2002], l'ajout de polymères amphiphiliques [Wu *et al.*, 2003] de polymères amphiphiliques conjugués à du polyéthylène glycol (PEG) [Ballou *et al.*, 2004]. Toutes ces méthodes permettent de solubiliser de manière efficace des nanocristaux CdSe ou CdSe/ZnS dans des solvants aqueux.

Il est intéressant de noter que plusieurs méthodes de synthèse de quantum dots directement en phase aqueuse ont été mises en place [Gaponik *et al.*, 2002 et Rogach *et al.*, 2000] mais que

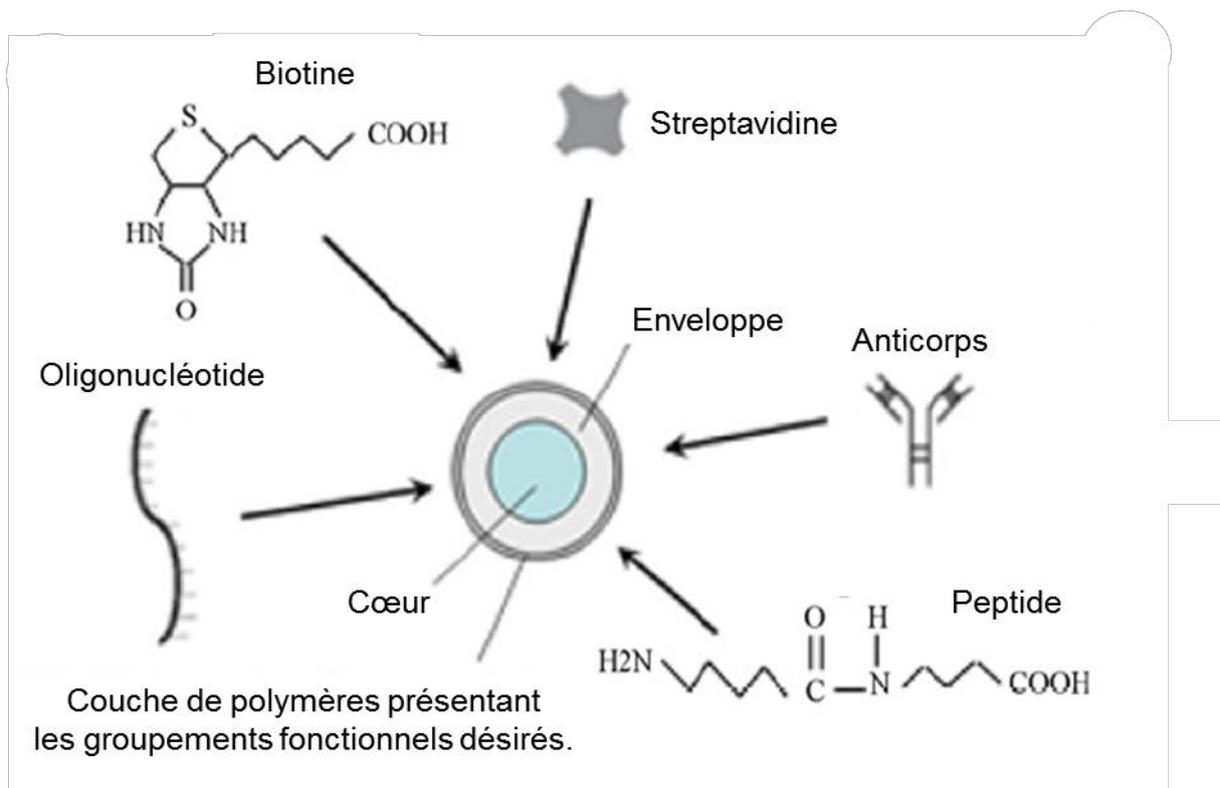
les nanocristaux semi-conducteurs ainsi synthétisés présentaient de larges différences de taille et leur rendement quantique n'atteignaient que rarement celui de QDs synthétisés par procédé organométallique à haute température.

d) La fonctionnalisation des quantum dots

Les quantum dots sont des fluorochromes qui, de façon native ne peuvent pas interagir spécifiquement avec leur environnement. Il est donc indispensable de les fonctionnaliser pour les utiliser dans des applications biologiques [Liz-Marzán *et al.*, 1996 et Correa-duarte *et al.*, 1998]. Plusieurs stratégies existent pour conjuguer une biomolécule à la surface de QDs hydrophiles. L'utilisation de groupements réactionnels tels que des acides carboxyliques, des amines primaires, des fonctions alcool ou thiol permet la mise en place de liaisons covalentes. Cette méthode de fonctionnalisation permet (i) d'ajouter différents groupements fonctionnels à la surface d'un même QD, (ii) de contrôler finement le nombre et la nature de ces groupements et (iii) de mettre en place des capacités de conjugaison précise afin d'adapter au mieux les QD pour leur utilisation en fonction de l'application biologique désirée. Il est aussi possible de conjuguer des biomolécules de façon non covalente à un quantum dot par adsorption. Par exemple, les quantum dots peuvent être fonctionnalisés pour présenter une charge nette négative ce qui permet l'ajout de biomolécules présentant une charge nette positive [Algar *et al.*, 2006]. Une autre méthode met en jeu une réaction d'échange de thiol avec des quantum dots traités avec de l'acide mercaptopropionique mis en contact avec des biomolécules qui présentent des groupements thiol tel que des brins d'ADN auxquels sont ajoutés des groupement alkyles-thiols aux extrémités 5' et 3' [Mitchell *et al.*, 1999]. L'échange se fait lentement jusqu'à obtenir un équilibre entre les thiols libres (ceux présents sur les biomolécules non conjuguées) et les thiols conjugués (ceux qui servent à la conjugaison de la biomolécule au quantum dot). Toutefois ces méthodes de conjugaison par adsorption présentent d'importants désavantages : une partie non négligeable du matériel mis en jeu ne réagit pas et ces méthodes impliquent des interactions électrostatiques ce qui limite la stabilité du complexe biomolécule-nanocristal au cours du temps. De plus, la solubilité initiale, intermédiaire et finale des réactifs (QDs et biomolécules) est un paramètre important dont il faut tenir compte [Mitchell *et al.*, 1999].

De plus les quantum dot possèdent un ratio volume/surface assez important. Ceci leur permet, indépendamment de la méthode de conjugaison choisie, d'être suffisamment gros pour que

plusieurs biomolécules puissent être conjuguées à leur surface. Par exemple, plusieurs études ont estimé que les conjugués commerciaux QD-streptavidine possèdent de quatre à dix streptavidines par nanocristal [Howarth *et al.*, 2008 et Lidke *et al.*, 2007] mais aussi qu'il est envisageable d'utiliser les QDs comme vecteur multiparamétrique [Ho *et al.*, 2009]. Plusieurs possibilités d'association de biomolécules à la surface d'un quantum dot sont représentées sur la Figure 5 (page 35). La méthode de conjugaison est importante car elle détermine la fonctionnalité de la biomolécule ainsi que son orientation.



e) Choix du quantum dot

Toutes ces différentes méthodes de synthèse, de solubilisation et de fonctionnalisation permettent d'obtenir une grande variété de nanocristaux semi-conducteurs selon leur composition chimique, leurs qualités optiques, l'éventuelle présence d'une enveloppe, la méthode de solubilisation dans des solvants aqueux, ainsi que leur fonctionnalisation. Les

quantum dots peuvent donc très largement varier en terme de qualité de fluorescence de rendement quantique, de longueur d'onde d'émission et de spectre d'absorbance. Leur comportement dans un milieu biologique peut lui aussi très grandement varier. Leur biofonctionnalisation permet au nanocristal semi-conducteur d'interagir avec son environnement et donc par exemple de détecter des molécules ou des cellules d'intérêt. De ce fait, le choix de la biomolécule ainsi que la méthode de biofonctionnalisation sont importants.

L'épaisseur de l'enveloppe d'un nanocristal est un paramètre à prendre aussi en compte. Si l'enveloppe dépasse les 0,8 nm d'épaisseur alors elle diminue les caractéristiques optiques du cœur du nanocristal [Grabolle *et al.*, 2008]. De plus, elle augmente la stabilité du nanocristal en protégeant son cœur des attaques extérieures. Cependant elle induit une augmentation de la taille du QD ainsi obtenu et peut altérer la qualité d'un marquage ou du suivi de la diffusion de la molécule cible principalement par des restrictions spatiales telles que des cavités qui ne peuvent pas être atteinte ou un encombrement stérique dû à une grande densité locale de ces nanosondes fluorescentes. Les effets de la taille peuvent donc être critiques lors de marquage de coupe de tissus ou du suivi de façon unique la diffusion des molécules dans leur environnement.

Lors de la synthèse de quantum dots, un compromis entre la taille, la stabilité et les propriétés optiques doit être trouvé.

2. La fluorescence des quantum dots

Les quantum dots sont des nanocristaux semi-conducteurs qui sont des fluorochromes inorganiques. De façon générale, un fluorochrome est une molécule qui possède la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer rapidement sous forme de fluorescence (lumière d'émission). La fluorescence est un phénomène radiatif (émission d'énergie lumineuse) consécutif à une excitation lumineuse, ce qui en fait une photoluminescence et se différencie donc par exemple de l'électroluminescence qui utilise un courant électrique comme source énergétique ou de la chimioluminescence qui utilise l'énergie apportée par une réaction chimique. La fluorescence et la phosphorescence sont les deux catégories de photoluminescence. Elles se distinguent par le temps nécessaire pour réémettre un photon : de l'ordre de la nanoseconde pour la fluorescence et de la seconde à plusieurs jours pour la phosphorescence.

a) Principes généraux de la fluorescence

Selon le diagramme de Jablonski, une fois l'énergie d'un photon absorbée par un électron, ce dernier se trouve dans un état électroniquement excité qui est instable. Avant de se désexciter, l'atome subit une relaxation vibrationnelle (perte d'énergie sous forme de chaleur, de vibration ou de rotation) qui l'amène à un état « relaxé » lui aussi instable puis le retour à l'état fondamental - qui lui est stable - se traduit par l'émission d'énergie sous forme de photon lors d'une relaxation radiative (Figure 6, page 38). Lors de l'excitation, un électron de l'orbitale d'énergie initiale (par exemple S_0) saute donc jusqu'à une orbitale d'énergie plus élevée (S_1) et la différence énergétique entre l'état fondamental et l'état excité est égale à l'énergie du photon absorbé. La relaxation vibrationnelle induit une perte d'énergie donc l'énergie émise par un électron est plus faible que l'énergie qu'il a absorbé.

L'énergie (E) d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde (λ) :

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

où h est la constante de Planck et c représente la vitesse de la lumière.

La relaxation vibrationnelle se traduit par une augmentation de la longueur d'onde d'émission par rapport à celle absorbée, ce qui crée un décalage vers les longueurs d'onde élevées entre les pics d'absorption et d'émission lors de la fluorescence. Ce décalage est appelé le déplacement de Stokes en hommage au physicien éponyme. Ce déplacement de Stokes facilite énormément l'utilisation de la fluorescence dans les applications biologiques en rendant possible la séparation et la différenciation de la lumière d'excitation et de la fluorescence émise par le fluorochrome à l'aide de filtres optiques et de miroirs dichroïques. Le déplacement de Stokes n'est pas défini de la même façon pour les quantum dot en raison de leur propriétés spectrales spécifiques, nous reviendrons sur ce point plus tard à la page 40.

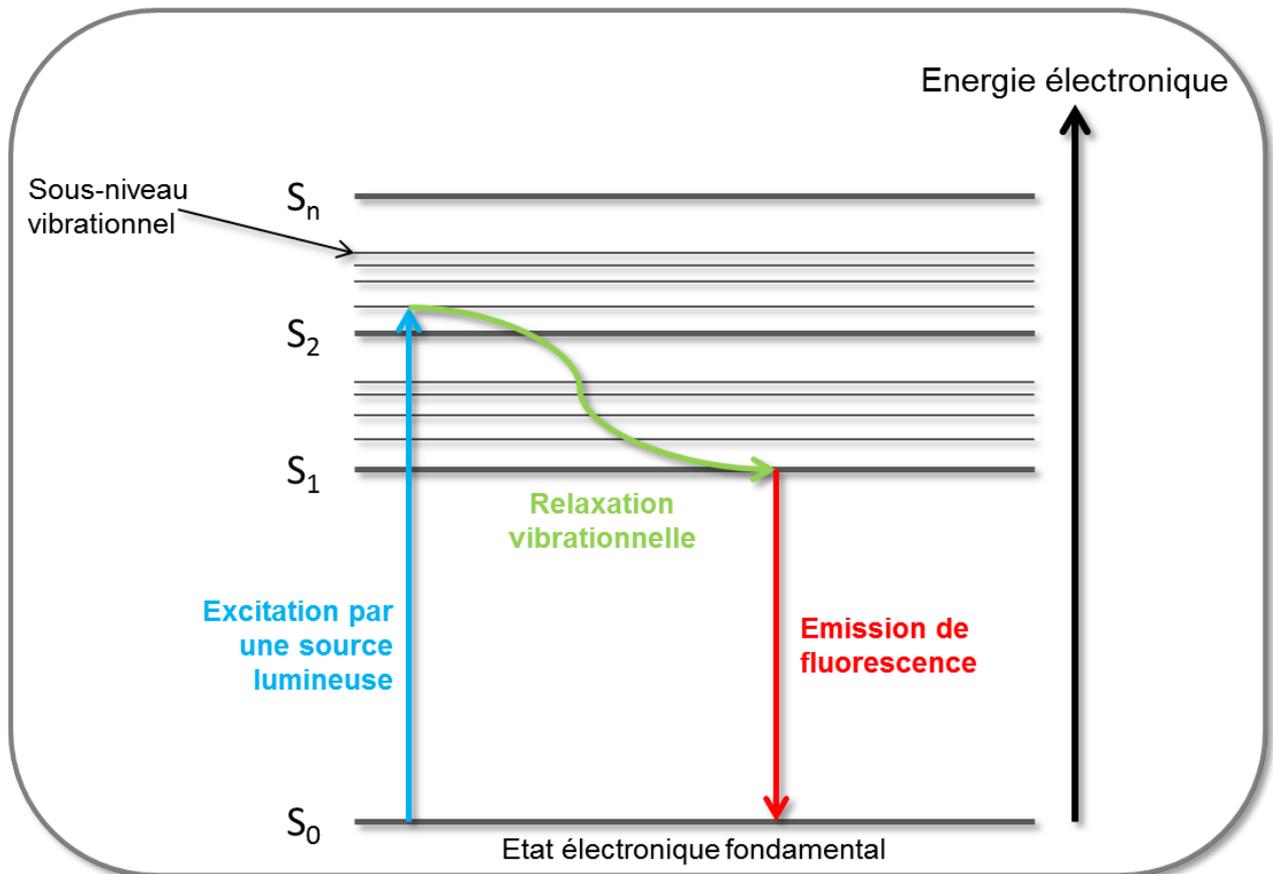


Figure 6 : Schématisation simple des changements électroniques d'un électron suite à son excitation selon le diagramme dit de Jablonski. Trois étapes sont nécessaires à l'émission de fluorescence par un fluorochrome. Tout d'abord un électron présent dans la bande de valence (S_0) est excité par une source lumineuse, ce qui va entraîner un changement de son état électronique. Cet électron va atteindre un des niveaux de la bande de conduction (S_2 par exemple) (**Flèche bleue**). Ensuite une relaxation vibrationnelle a lieu (**flèche verte**), durant laquelle l'électron va atteindre le niveau d'énergie le plus faible de la bande de conduction. Ce phénomène est non radiatif. Ensuite l'électron va retourner à l'état électronique fondamental en émettant cette fois un photon (**flèche rouge**). L'électron est ensuite ré-excitable par la source lumineuse.

b) Schématisation en bandes d'énergie

Ces phénomènes transitoires d'excitation d'un atome peuvent être schématisés par une modélisation en bandes d'énergie qui permet de définir la différence entre un conducteur, un semi-conducteur et un isolant. Les électrons ne peuvent avoir des énergies comprises que dans certaines bandes. Chacune de ces bandes correspond à un ensemble d'états quantiques discrets de l'électron. Dans un état fondamental, tous les électrons de faibles niveaux d'énergie remplissent les bandes les plus proches du noyau jusqu'à la dernière qui s'appelle la bande de valence. La première bande d'énergie vide ou partiellement remplie est appelé bande de conduction. Lorsqu'un fluorochrome est excité par une source lumineuse, les

électrons excités de la bande de valence « sautent » vers la bande de conduction créant ainsi un trou dans la bande de valence, créant ainsi une paire électron-trou, aussi appelée exciton. Cette paire électron-trou est faiblement liée par des forces de Coulomb [Colvin *et al.*, 1991]. L'énergie séparant les bandes de valence et de conduction s'appelle le « bandgap » et c'est un paramètre fondamental pour les caractéristiques optiques des nanocristaux semi-conducteurs. Autrement dit le « bandgap » représente la quantité d'énergie requise pour que l'électron passe de l'état fondamental à un état excité, phénomène requis pour l'émission de la fluorescence.

Selon la capacité d'un électron de passer de la bande de valence à la bande de conduction et selon la taille du « bandgap » d'énergie, on distingue trois cas de figure (schématisés dans la Figure 7 page 40) :

- Premier cas : la bande de conduction est partiellement remplie à l'état fondamental. Le solide contient donc, sans excitation extérieure, des électrons susceptibles de participer aux phénomènes de conduction électrique (absence de bandgap d'énergie), il est **conducteur**.
- Deuxième cas : à l'état fondamental, la bande de conduction est vide et le bandgap d'énergie est grand. Le solide ne contient alors virtuellement aucun électron capable de participer à la conduction même avec un apport d'énergie extérieur (le « bandgap » est trop grand). Le solide est un **isolant**.
- Troisième cas : à l'état fondamental, la bande de conduction est vide mais le bandgap est relativement faible. Le solide est donc isolant sans excitation extérieure, mais un apport d'énergie (par exemple sous forme de chaleur, ou de lumière) permet de faire passer des électrons de la bande de valence à la bande de conduction. Le solide est un **semi-conducteur**.

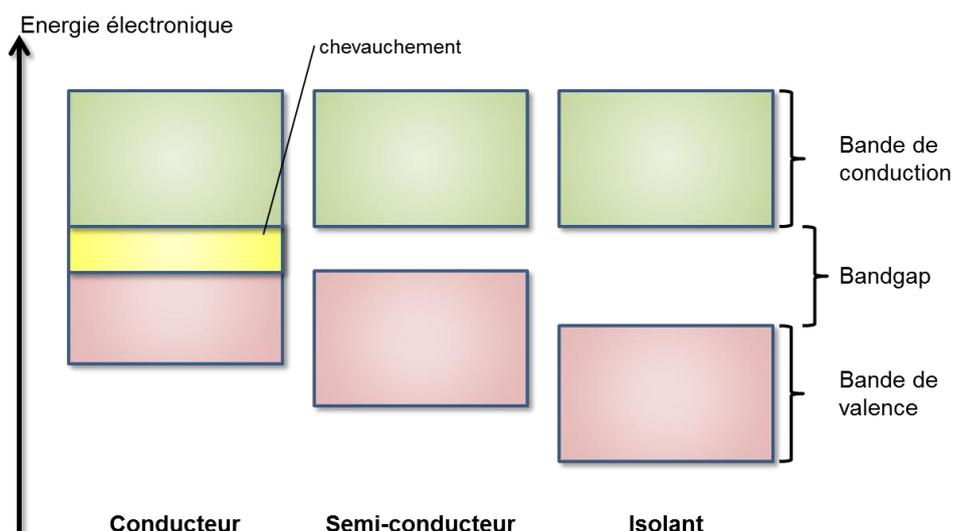


Figure 7 : Schématisation simple du bandgap, des bandes de valence et de conduction.

Les électrons de la bande de valence contribuent à la cohésion locale du solide (entre atomes voisins) et sont dans des états localisés. Ils ne peuvent pas participer aux phénomènes de conduction électrique. À l'inverse, les électrons de la bande de conduction sont délocalisés. Ce sont ces électrons qui participent à la conductivité électrique. Lorsqu'un électron de la bande de valence passe dans la bande de conduction, un trou se crée dans la bande de valence. Ces trous vont être bouchés soit par un électron de la bande de valence soit par un électron de la bande de conduction. Ce sont les déplacements des électrons de la bande de conduction et des trous de la bande de valence qui permettent la conductivité électrique.

Dans le cas d'un QD, l'énergie requise pour franchir le bandgap est apportée par la lumière d'excitation. L'énergie minimale pour qu'un exciton (paire électron-trou) soit généré au sein du nanocristal, suite à l'excitation d'un électron par une énergie lumineuse, correspond au premier pic excitonique du spectre d'absorbance d'un quantum dot. Ce pic excitonique correspond donc à la plus petite énergie suffisante pour qu'un électron puisse atteindre la bande de conduction. Cette énergie est donc supérieure à celle du bandgap et ce pic excitonique est dépendant du confinement quantique. Il est aussi intéressant de noter que le déplacement de Stokes pour les quantum dot se définit légèrement différemment que pour les fluorochromes organiques. En effet, le spectre d'absorption des quantum dot est assez spécifique, il est très large dans les U.V.. De ce fait, pour les quantum dots, le déplacement de Stokes se définit entre le premier pic excitonique et le pic de fluorescence émise. Ce faible

déplacement de Stokes pour les QDs n'est pas gênant puisqu'on peut mieux les exciter en utilisant des rayonnements à plus forte énergie.

c) Confinement quantique

Lors de son excitation, un électron de la couche de valence se délocalise vers la couche de conduction créant ainsi un trou dans la couche de valence. La distance qui sépare l'électron du trou ainsi créé est appelée le rayon de Bohr et son amplitude dépend de l'élément excité. La taille du cœur des quantum dots est comprise entre 1,5 et 10 nm et est plus petite que le rayon de Bohr de l'exciton. Par exemple le rayon de Bohr d'un nanocristal de CdSe est de 11,2 nm. Ceci permet l'apparition d'un phénomène, appelé confinement quantique, dans les trois dimensions spatiales. Ce confinement quantique génère une interdiction de niveau d'énergie qui peut être représentée dans la modélisation en bande d'énergie par un agrandissement du bandgap (Figure 8, page 42). Le confinement quantique implique que le bandgap augmente lorsque le diamètre du nanocristal diminue.

Dans un solide, l'énergie d'un électron peut avoir n'importe quelle valeur à l'intérieur de certains intervalles. Dans la modélisation en bandes, ces intervalles sont représentés par les bandes de valence et de conduction, donc un solide contient dans chaque bande d'énergie des niveaux d'énergie permis séparés par des niveaux d'énergie interdits. Dans le cas des semi-conducteurs, le bandgap représente l'énergie requise pour passer d'un niveau d'énergie de la bande de valence à un niveau d'énergie de la bande de conduction.

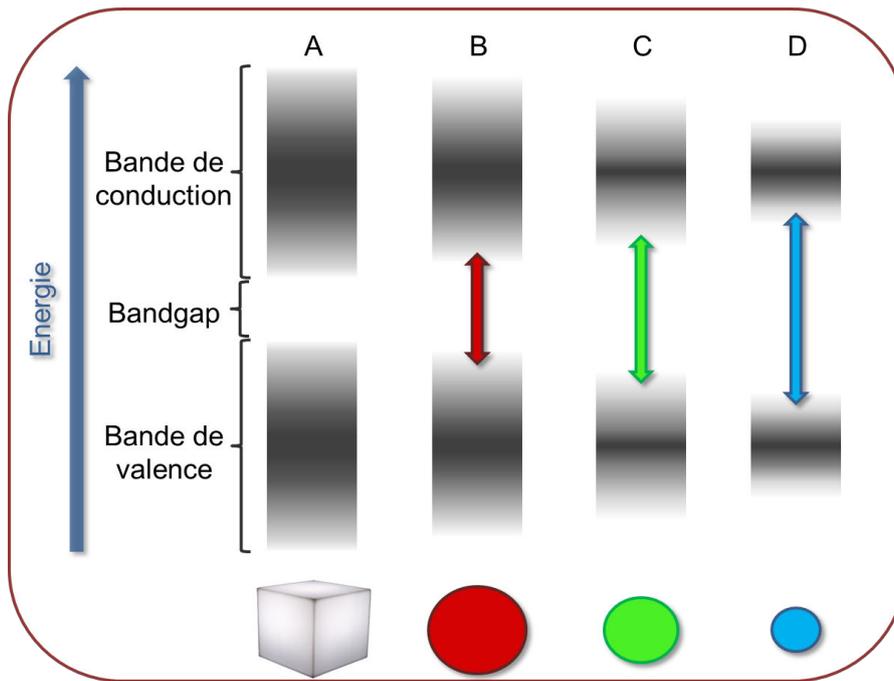


Figure 8 : Représentation schématique de l'effet du confinement quantique sur le bandgap. Un semi-conducteur qui présente une taille supérieure au rayon de Bohr n'est pas concerné par le confinement quantique (A). Si la taille du semi-conducteur est plus petite que le rayon de Bohr, alors le confinement quantique interdit certains niveaux d'énergie. Plus le confinement quantique est fort (c'est-à-dire plus le diamètre du semi-conducteur est petit) et plus le bandgap est grand. Il faudra donc un apport énergétique plus fort pour les exciter. Cet effet du confinement quantique sur le bandgap est schématisé dans les parties B, C et D.

- Cas d'un semi-conducteur non confiné

Un semi-conducteur non confiné est un solide dont le diamètre est plus important que le rayon de Bohr des éléments qui le composent. Les semi-conducteurs non confinés sont si gros que la distance séparant l'électron excité et le trou est continue. Donc à l'état fondamental, un électron est dans un état électronique compris dans un niveau d'énergie de la bande de valence, lors de son excitation, son énergie atteint un niveau d'énergie de la bande de conduction puis finit par revenir à son état fondamental à un niveau d'énergie de la bande de valence en libérant de l'énergie sous forme de photon (Figure 8A, page 42).

- Cas d'un semi-conducteur confiné

Le confinement quantique a pour effet d'interdire certains niveaux d'énergie entre les bandes de valence et de conduction, ce qui a pour effet d'augmenter le bandgap. Plus le diamètre du

semi-conducteur sera petit et plus le confinement quantique sera grand et plus le bandgap sera grand lui aussi. Ce confinement quantique entraîne donc que l'énergie d'excitation soit forte et que les petits nanocristaux absorbent et émettent à des longueurs d'ondes plus faibles (Figure 8B-D, page 42).

Ce phénomène de confinement quantique définit donc la plupart des propriétés optiques majeures des quantum dots :

- Tous les quantum dots sont très fortement excitables dans les UV qui sont des sources lumineuses très énergétiques. Ceci s'explique par un besoin important d'énergie pour qu'un électron de la bande de valence puisse se délocaliser pour atteindre un niveau électronique autorisé dans la bande de conduction.
- La taille d'un nanocristal de semi-conducteur influence directement leurs spectres d'absorption et d'émission. La longueur d'onde d'émission d'un quantum dot est dépendante de sa taille. En effet la taille du nanocristal influence le confinement quantique qui influence l'énergie du band gap et donc la quantité d'énergie nécessaire pour qu'un exciton apparaisse au sein du nanocristal. L'énergie réémise sous forme de fluorescence est dépendante de l'énergie du band gap et donc de la taille du nanocristal.
- Un changement de composition chimique d'un nanocristal semi-conducteur engendre un changement du rayon de Bohr. Le confinement quantique est donc plus ou moins fort et donc les caractéristiques spectrales changent elles aussi.
- Les quantum dots présentent des pics d'émission de fluorescence étroits et symétriques. La présence de niveaux d'énergie interdits délimite l'énergie réémise sous forme de photon dans un faible intervalle de valeurs possibles.

d) Effet de la composition chimique sur la fluorescence

Les quantum dots sont des nanocristaux semi-conducteurs composés d'éléments appartenant aux groupes II, III, V et VI de la classification périodiques [Peng *et al.* 1998]. Chaque couple d'élément possède son propre bandgap (par exemple 11,2 nm pour le couple CdSe). L'énergie réémise sous forme de photons dépend donc de la nature du semi-conducteur, en plus de son état de confinement quantique. La combinaison de ces deux paramètres permet d'obtenir des

quantum dots capables d'émettre de la fluorescence dans les ultraviolets, tout le spectre visible ainsi que les infrarouges proches (Figure 4, page 32).

e) Paramètres optiques des fluorochromes

Quelques molécules ainsi que tous les fluorochromes sont optiquement caractérisés par certains paramètres :

- **Le rendement quantique (ϕ)** Il représente le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. Cette valeur est comprise entre 0.05 et 1 et elle est généralement exprimée en %. Par exemple, si un fluorochrome possède un rendement quantique de 60%, cela signifie que sur 100 photons absorbés, 60 seront réémis. Certains paramètres tels que le pH, la concentration ou la polarité du solvant peuvent faire varier le rendement quantique.
- **Le coefficient d'extinction molaire (ϵ)** qui correspond au nombre de photons pouvant être absorbés par une mole de fluorochrome. L'unité est le $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$.
- **La brillance** qui est le produit du rendement quantique par le coefficient d'extinction molaire. Généralement les fluorochromes possédant la meilleure brillance sont préférés afin d'améliorer le ratio signal sur bruit de fond.
- **La durée de vie de la fluorescence (τ)** est le paramètre caractéristique de l'état physico-chimique du fluorochrome et correspond au temps moyen de vie de l'état excité. Il en est de l'ordre de la nanoseconde (ns) pour les fluorochromes. Plus la durée de vie de la fluorescence est courte, meilleur est la sensibilité du fluorochrome.
- **Leurs spectres d'excitation et d'émission.** En biologie les fluorochromes utilisés peuvent couvrir aussi bien les ultra-violets (UV), le spectre visible que les proches infrarouges. Chaque fluorochrome aura des spectres d'absorption et d'émission spécifiques, il est donc important de les connaître pour les exciter et détecter leur fluorescence correctement.

La table 2 (page 45) présente le coefficient d'extinction molaire, le rendement quantique et la brillance de plusieurs molécules et fluorochromes.

	Coefficient d'extinction molaire ϵ (cm ⁻¹ .M ⁻¹)	Rendement quantique ϕ (%)	Brillance
Fluorescéine	80 000	90	72 000
Cyanine 5	250 000	35	90 000
Tryptophane	6 000	10	600
Qdot [®] 605	1 000 000	55	550 000
Qdot [®] 655	3 000 000	60	1 800 000

Table 2 : Quelques paramètres optiques de plusieurs molécules.

3. Les avantages des QDs par rapport aux fluorochromes organiques

a) Utilisation actuelle des fluorochromes organiques

Du fait qu'ils peuvent être facilement associés à des molécules telles que de l'ADN, des anticorps, des médicaments ou des molécules actives, les fluorochromes sont largement répandus dans de nombreuses applications biologiques. Par exemple, des fluorochromes peuvent être couplés à l'ADN afin d'aider au diagnostic moléculaire de certaines pathologies virales, des mutations ponctuelles au sein d'un génome ou pour le contrôle d'une recombinaison [Hoek, 2007, Liang *et al.*, 2005 et Kuang *et al.*, 2011]. L'association des fluorochromes à des anticorps permet de détecter de façon spécifique la protéine cible de l'anticorps et de quantifier l'intensité de la fluorescence. C'est un système très utilisé dans les techniques immunologiques telles que la microscopie, les micropuces ou la cytométrie de flux [Liang *et al.*, 2005 et Nabiev *et al.*, 2007]. Ces différentes techniques sont utilisées afin d'identifier la localisation cellulaire d'une ou plusieurs protéines cibles, d'étudier les interactions entre différentes protéines ou bien d'établir des diagnostics médicaux.

D'autres systèmes de sonde plus sensibles existent. Ils sont fondés sur la détection de la radioactivité, l'activité enzymatique de la peroxydase (HRP, « *horse radish peroxydase* ») ou par le nitrate d'argent par exemple. Mais ils ne permettent pas le suivi en parallèle de plusieurs molécules au sein d'une même analyse. L'avantage majeur de la fluorescence est cette capacité de faire des analyses multiplexées afin d'avoir une vision plus globale des systèmes étudiés ou de simplifier et d'affiner les diagnostics [Fahy *et al.*, 1997]. La table 3 (page 46) établit une comparaison de ces différents types de sonde.

Technologie	Sensibilité de la détection	Capacité d'analyses multiplexées	Stabilité dans le temps	Capacité de quantification
Fluorophore organique	+	+++	++	+++
Quantum dot	+++++	++++	+++++	++++
Enzymatique	+++++	+	++++	+++
Radioactivité	+++	+	+	+++

Table 3 : Comparaison des propriétés de différents types de sondes utilisées en biologie.

A l'heure actuelle, la majorité des fluorochromes utilisés sont d'origine organique. Le fait qu'ils soient déjà présents dans la nature dans des environnements généralement aqueux a facilité leur isolement et donc leur utilisation dans les méthodes biologiques. Par exemple, la fluorescéine a été découverte et synthétisée par Adolf Von Baeyer en 1871. Elle était jusque-là produite par des micro-organismes (*Pseudomonas*) et était connue sous le nom de « pyoverdine ». Le nom fluorescéine remonterait lui à 1878. Tandis que la GFP (« *green fluorescent protein* ») est une protéine fluorescente découverte chez la méduse *Aequorea victoria* et a été décrite pour la première fois en 1962. Puis l'ingénierie génétique a permis l'établissement de nombreuses variantes telles que l'eGFP (« *enhanced GFP* ») ou eCFP (« *enhanced cyan fluorescent protein* »). Malgré tout, les fluorochromes organiques présentent de nombreuses limites.

b) Les limites des fluorochromes organiques

- Brillance

Tout d'abord leur brillance est relativement faible. Ceci limite donc la qualité du rapport signal sur bruit de fond. En d'autre terme, les fluorochromes organiques ne se distinguent pas fortement du bruit de fond, ceci nous contraint à devoir les utiliser en forte concentration locale - souvent saturante - pour détecter un signal de fluorescence significatif. Ce paramètre est d'autant plus important que les applications biologiques sont sujettes à la présence d'un

bruit de fond généré par l'absorption des très nombreux composés biologiques qui émettent de la fluorescence tel que le tryptophane.

- Photostabilité

Les fluorochromes organiques subissent aussi un fort photoblanchiment, phénomène qui représente la perte de fluorescence d'une molécule. Lors de son excitation, un fluorochrome excité peut soit émettre un photon, soit être engagé dans une réaction photochimique qui va empêcher son retour à un état excitable par exemple avec l'oxygène sous forme de radicaux libres ou avec les molécules d'eau présentes autour du fluorochrome. L'émission de fluorescence est une relaxation radiative (émission d'un photon) tandis que le photoblanchiment fait suite à une relaxation non radiative. Lors d'une excitation continue, un même électron peut être excité plusieurs fois tant qu'il ne s'engage pas dans une réaction photochimique. Plus on excite une population de fluorochrome, plus la proportion de fluorochrome photoblanchi augmente, jusqu'à l'extinction totale de la fluorescence. Chaque fluorochrome présente une cinétique de photoblanchiment spécifique et de façon générale plus l'énergie d'excitation est grande et plus le photoblanchiment est rapide. Cette particularité est mise à profit dans certaines techniques - telle que la redistribution de la fluorescence après photoblanchiment (FRAP, « *fluorescence recovery after photobleaching* ») qui permet l'étude de la vitesse de diffusion ou de transport d'une molécule -, mais elle est généralement une limite aux techniques immunologiques. Le FRAP est fondé sur l'observation de la récupération de fluorescence afin d'étudier la dynamique de diffusion de molécules dans leur environnement [Ishikawa-Ankerhold *et al.*, 2012]. Pour cela, on excite fortement une partie de l'échantillon, les fluorochromes excités photoblanchissent très rapidement. Ensuite on observe comment les fluorochromes extérieurs à cette zone (qui n'ont pas été photoblanchis) pénètrent dans cette zone jusqu'à un état final de recouvrement de la zone.

Cependant, le photoblanchiment des fluorochromes est généralement un handicap pour les techniques immunologiques puisqu'il limite le temps d'acquisition d'un signal émis par ces fluorochromes organiques et rend donc difficile voire impossible de suivre en continu le devenir d'une molécule préalablement marquée au cours d'un temps dépassant plusieurs minutes. De plus, le temps de préparation à l'acquisition peut s'avérer crucial. Par exemple, en microscopie, selon le fluorochrome utilisé, une partie de celui-ci va subir du photoblanchiment le temps que l'expérimentateur observe l'échantillon et choisisse une zone d'acquisition représentative.

- Spectroscopie

Les fluorochromes organiques présentent des spectres d'absorption et d'émission qui varient d'un fluorochrome à l'autre. De plus, généralement le spectre d'absorption est assez étroit et le spectre d'émission plutôt large avec une « queue » dans l'infrarouge (Figure 9A et 9B, page 49). Ces deux aspects représentent une grosse limite dans les analyses multiplexées qui sont fondées sur l'utilisation de plusieurs fluorochromes pour suivre en parallèle plusieurs molécules. En effet, si on se place dans le cas d'une utilisation simultanée de trois fluorochromes usuels tels la fluorescéine (FITC), la phycoérythrine (PE) et le texas-red, on se retrouve avec des contraintes techniques lourdes puisqu'il faut plusieurs sources d'excitation différentes afin de pouvoir exciter de façon optimale ces trois fluorochromes (figure 9A, page 49). De plus, l'éventuelle détection des sources lumineuse d'excitation ainsi que les chevauchements entre les longueurs d'ondes d'émissions de fluorescence rendent ces analyses multiplexées très complexes car la détermination de l'origine de chaque longueur d'onde détectée n'est pas simple (Figure 9C, page 49). Bien évidemment, ces contraintes peuvent être moindres si on choisit bien les fluorochromes mais globalement les systèmes optiques restent assez complexes quand le nombre de fluorochromes organiques augmente. Les cytomètres en flux utilisent un système de compensation afin de faciliter les études multiplexées. Ces compensations sont réalisées par l'expérimentateur avec des échantillons contrôles qu'il aura préparé spécialement. Bien qu'elle soit très intéressante, cette approche est arbitraire et donc source d'erreurs. De plus elle est assez contraignante puisqu'elle nécessite un plus grand nombre de conditions de marquage et donc davantage d'échantillon. Ces compensations permettent de travailler avec un plus grand nombre de fluorochromes en parallèle mais souvent au détriment de la brillance des fluorochromes utilisés.

Les fluorochromes organiques présentent un déplacement de Stokes relativement faible ce qui, additionné au fait que leur spectre d'absorption est étroit, constitue une autre limite car les pics d'absorption et d'émission sont proches (environ 10nm pour la PE). Ce faible déplacement de Stokes requiert l'utilisation de sources d'excitation et de jeux de filtres qui ne permettent que rarement la meilleure excitation possible du fluorochrome ou une détection de toute la fluorescence émise.

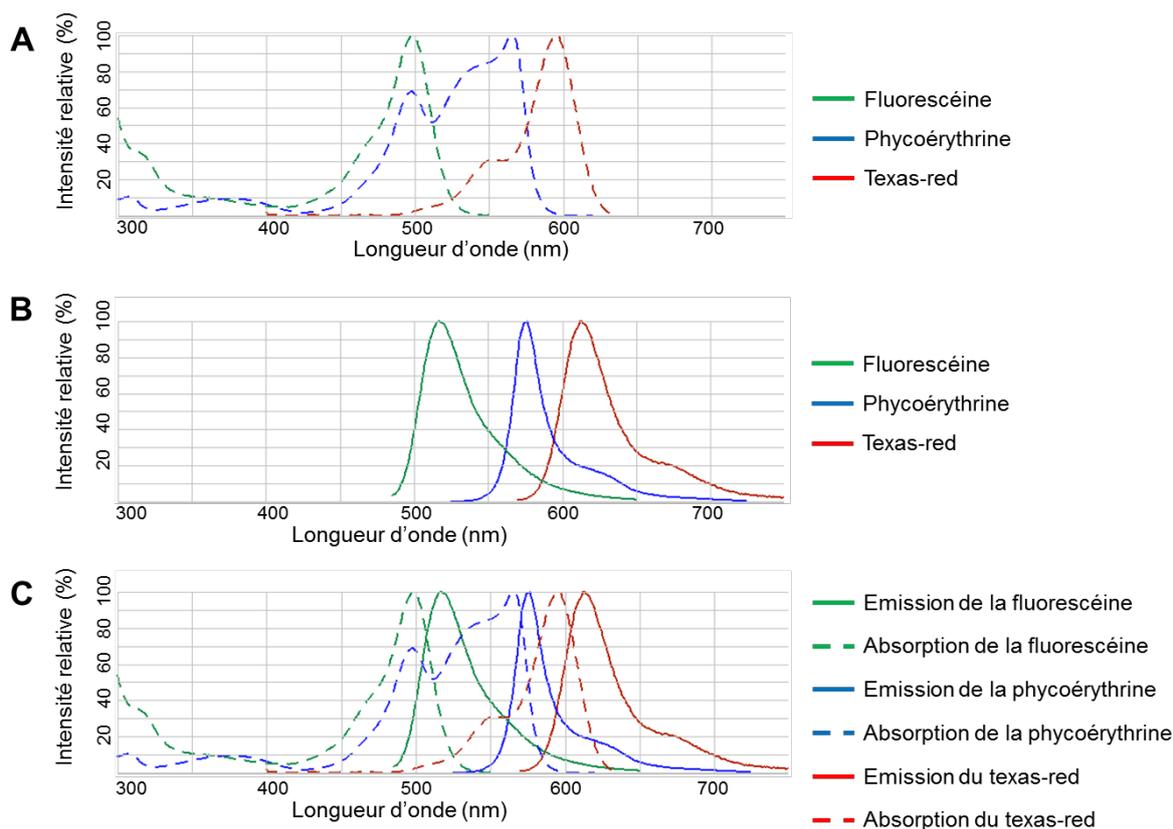


Figure 9 : Caractéristiques spectrales de la fluorescéine, de la phycoérythrine et du texas-red, fluorochromes organiques couramment utilisés. Présentation des spectres d'absorption (A) et d'émission (B) de ces trois fluorochromes organiques. Le panel C présente la superposition de ces spectres. Ces spectres sont issus de « Fluorescence spectraviewer » d'Invitrogen (<http://fr-fr.invitrogen.com/site/fr/fr/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>).

c) Les quantum dots repoussent les limites des fluorochromes organiques

- Brilliance

La brillance des quantum dots est très élevée comparée à celle des fluorochromes organiques. Si l'on compare le rendement quantique des quantum dots 605nm (55%) à celui de la fluorescéine (90%) par exemple, on se rend compte que la fluorescéine est nettement plus performante. Par contre la fluorescéine possède un coefficient d'extinction molaire à 488 nm de $80\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$, ce qui est nettement plus faible que celui des Qdot[®]605 commercialisés par Invitrogen ($1\,100\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$). Donc bien que les nanocristaux soient moins capables de réémettre un photon absorbé, le nombre total de photons qu'ils absorbent est tel que le nombre de photons réemis est nettement plus élevé avec les QD₆₀₅ (605 000) qu'avec la fluorescéine (72 000). Cette forte brillance facilite la détection de l'émission de la

fluorescence d'un quantum dot par rapport à l'autofluorescence environnante. L'acquisition mais aussi l'analyse des données est donc facilitée. De plus, cette brillance est tellement forte que l'étude par SPT (suivi de particule unique) est possible. En effet, il est possible de suivre chaque quantum dots individuellement en microscopie à fluorescence (d'une manière similaire qu'avec les particules d'or) afin de suivre individuellement le déplacement de chaque molécule marquée. L'utilisation de fluorochromes plutôt que des particules d'or pour ces études permet de diminuer la taille de la particule – une particule d'or est environ 10 fois plus grosse qu'un quantum dot – ce qui diminue son influence sur le déplacement de la molécule étudiée.

- Photostabilité

Les quantum dots présentent une photostabilité environ 100 fois supérieure à celle des fluorochromes organiques les plus photostables. Ceci permet, par exemple, leur utilisation dans le suivi d'évènements cellulaires assez long tels que l'internalisation d'un virus ou le déplacement d'un récepteur à la surface d'une cellule sujette à différentes stimulations ou de suivre l'interaction entre deux cellules au cours du temps. Tout ceci apporte une précision spatio-temporelle nécessaire pour bien comprendre les mécanismes cellulaires. L'utilisation des quantum dots permettrait donc d'étudier ces évènements de façon simplifiée et avec plus de précision. Un autre avantage de la grande photostabilité des QD est qu'une nouvelle acquisition de l'émission de leur fluorescence est possible plusieurs mois après.

- Spectroscopie

Enfin la possibilité de contrôler la longueur d'onde d'émission en jouant sur la taille du nanocrystal, sans modifier sa composition, offre de grandes possibilités dans les analyses multiplexées. Contrairement aux fluorochromes organiques, le spectre d'absorption des quantum dots est large et présente une forte capacité à absorber les UV tandis que le spectre d'émission est étroit et symétrique. Différents quantum dots vont présenter des spectres d'absorption similaires et leurs spectres d'émission respectifs seront spécifiques à une longueur d'onde qui dépend autant de la composition que de la taille du nanocrystal (Figure 10, page 51). Ces caractéristiques optiques réduisent le nombre de sources d'excitation à une lampe U.V. et la détection des différents quantum dots est facilitée car le chevauchement des différents signaux est moindre voire inexistant. Le déplacement de stokes pour les quantum dots est faible mais ce n'est pas gênant car le spectre d'absorption est très large dans les U.V.,

il est donc facile d'espacer la longueur d'onde d'excitation et celle à laquelle le quantum dot fluoresce.

Les analyses multiplexées sont ainsi considérablement simplifiées et cela diminue la complexité des systèmes de détection, limite les chevauchements des spectres d'absorption et d'émission entre différents quantum dots et facilite donc la discrimination de l'origine des photons détectés. L'utilisation des quantum dots dans les analyses multiplexées offre le potentiel de détecter davantage de sondes fluorescentes en parallèle et donc d'étudier un plus grand nombre de molécules en même temps. Des études plus globales de système sont donc permises.

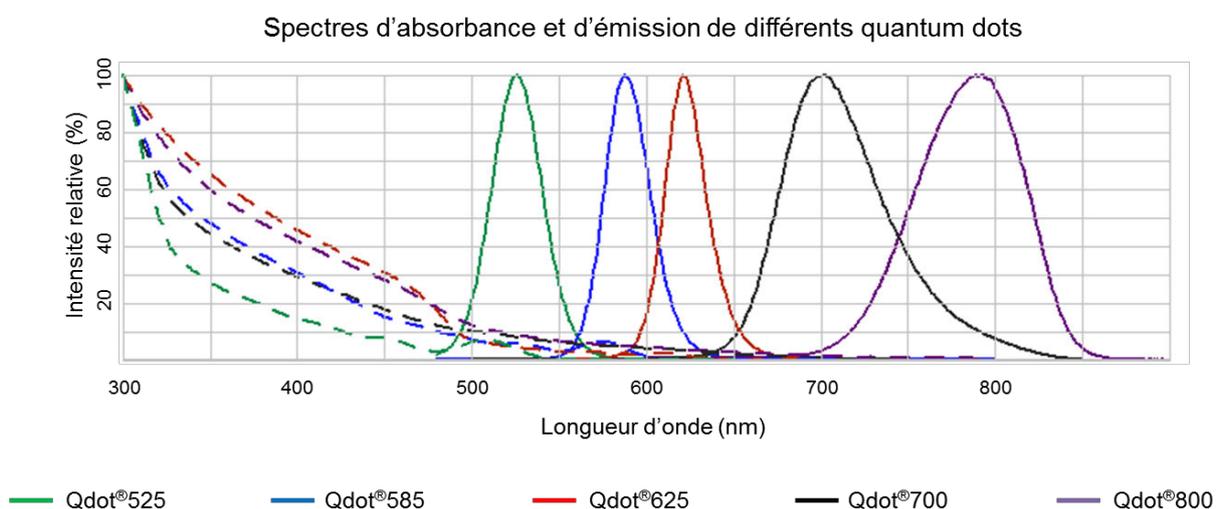


Figure 10 : Caractéristiques spectrales de plusieurs quantum dots. Présentation des spectres d'absorption et d'émission de plusieurs quantum dots (Qdot®) : Qdot®525, Qdot®585, Qdot®625, Qdot®700 et Qdot®800. Ces spectres sont issus de « Fluorescence spectraviewer » d'Invitrogen (<http://fr-fr.invitrogen.com/site/fr/fr/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>).

d) Les nouvelles applications possibles

Tous ces avantages font que les quantum dots présentent un énorme potentiel pour toutes les applications fondées sur la détection et le suivi de molécules par fluorescence. Ils offrent le potentiel de détecter des événements rares comme les cellules tumorales circulantes ou disséminées, ce qui rendrait possible la détermination de la probabilité de développement des métastases. Dans le cadre du cancer, les études seraient désormais davantage limitées par les

anticorps, le choix des antigènes à cibler et la méthode de détection des anticorps que par notre capacité à détecter des fluorochromes en faible concentration.

L'utilisation des QDs est aussi très prometteuse dans toutes les analyses plus globales d'évènements cellulaires qui impliquent un grand nombre de molécules. En effet, à titre d'exemple, l'identification des partenaires protéiques impliqués dans une voie de signalisation, le recrutement moléculaire mis en jeu lors d'une interaction entre deux cellules ou lors de la rencontre d'un virus peuvent être étudiés de façon simultanée.

Les quantum dots offrent aussi de nouvelles possibilités dans le suivi des interactions moléculaire au cours des évènements cellulaires. En effet, leur brillance et leur photostabilité permet de suivre en temps réel durant un temps relativement long la dynamique moléculaire de façon unique. En 2003, la dynamique des récepteurs à la glycine dans les sites synaptique a été mis en évidence grâce au suivi de QD de façon unique (chaque QD est suivi individuellement) à la surface de cellules placées dans des conditions physiologiques [Dahan *et al.*, 2003]. Le suivi de particule unique (SPT, « *single particle tracking* ») avec des quantum dots permet aussi d'étudier, par imagerie en temps réel, les voies d'entrée des virus dans les cellules [Liu *et al.*, 2011]. Le SPT est une des technique qui permet d'étudier la dynamique des membranes grâce au suivi individuel de centaines de QD au cours du temps, ce qui permet d'établir les trajectoires des molécules marquées à la surface des cellules en fonction des conditions biologiques appliquées [Sergé *et al.*, 2008].

e) Les limites actuelles des quantum dots

Malgré tous ces avantages, les quantum dots et leur utilisation restent encore très perfectibles. En effet, ils présentent plusieurs défauts : ils clignotent de façon aléatoire, leurs propriétés chimiques et optiques varient d'un lot à l'autre, leur cytotoxicité n'est pas encore réellement déterminée et les systèmes de détections actuels sont plutôt optimisés pour la détection des fluorochromes organiques.

- Le clignotement des quantum dots

Les quantum dots clignotent de façon aléatoire [Nirmal *et al.*, 1996 et Empedocles *et al.*, 1999]. Ce phénomène intrinsèque au nanocristal, se caractérise par des fluctuations de l'intensité de fluorescence émise entre deux états dits état brillant et état sombre. Ces deux

états ne se distinguent pas si plusieurs nanocristaux sont proches : l'état sombre d'un nanocristal va être masqué par la fluorescence des autres quantum dots proches. Cette caractéristique peut présenter l'intérêt d'être utilisée comme un contrôle rapide de détection de façon unique de chaque quantum dots. Ceci est particulièrement important dans le suivi de particule unique. Toutefois, ce clignotement perturbe l'analyse des données : la perte du signal fluorescent est une difficulté à contourner dans toutes les analyses qui sont fondées sur la détection de nanocristaux uniques. Par exemple, dans le suivi de particule unique, la reconstruction des trajectoires des nanocristaux est plus délicate car il est difficile de déterminer quel déplacement le QD a pu subir pendant sa phase sombre.

Plusieurs études ont permis de limiter ou de faire disparaître ce clignotement aléatoire des QDs. Des nanocristaux « géants » d'environ 20 nm ont été élaborés en augmentant l'épaisseur de l'enveloppe (en ajoutant des couches successives) [Chen *et al.*, 2007]. Environ 20% de ces QDs « géants » ne présente aucun clignotement. Bien que la plupart des caractéristiques optiques testées de ces QDs « géants » soient conservés par rapport à des QDs classiques, leur rendement quantique diminue considérablement, il est de 80 à 90% pour des QD cœur/enveloppe, 40% pour des QDs cœur uniquement et 10% pour ces QDs géants. Cette diminution du rendement quantique, couplé à l'augmentation significative de la taille du QD est un frein à l'utilisation de la technique développée par Chen et ses collaborateurs. Benoit Mahler et ses collaborateurs ont synthétisés des quantum dots CdSe/CdS avec une enveloppe très épaisse [Mahler *et al.*, 2008]. Ils ont déterminé que près de 70% de leur QDs CdSe/CdS ne clignotaient pas et que l'augmentation de l'épaisseur de l'enveloppe CdS permettait de réduire considérablement l'apparition de l'état sombre. Par contre, le rendement quantique de ces quantum dots n'a pas été déterminé par les auteurs.

Une autre stratégie pour limiter le clignotement des QDs est d'ajouter des fractions courtes de molécule contenant des groupements fonctionnels sulfhydryles à leur surface [Hohng *et al.*, 2003]. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces fractions de molécule contenant des groupements fonctionnels sulfhydryles s'insèrent dans les imperfections de surface des QDs, ce qui permettrait d'éviter la perte d'électrons excités.

- Synthèse des quantum dots

Les quantum dots sont généralement synthétisés par des procédés organométalliques à haute température [Murray *et al.*, 2000]. La taille des nanocristaux est contrôlable par la température - qui peut s'élever jusqu'à 300°C - ainsi que par la durée de la réaction (qui

s'étend de la minute à plusieurs heures selon la taille de la particule désirée). Dans un souci de reproductibilité des résultats, il est impératif que chaque lot d'un même type de quantum dots présente des caractéristiques chimiques et optiques identiques. Ceci implique une grande rigueur et une grande pureté chimique car la présence de très faibles impuretés peut entraîner de grands perturbations sur les propriétés chimiques et optiques des quantum dots. Les défauts de cristallinité sont les plus fréquents et ont de grandes répercussions et les nombreuses modifications post-synthèse altèrent leur stabilité dans le temps ainsi que leur capacité d'interaction avec le milieu environnant, si bien qu'à l'heure actuelle, on peut considérer que chaque lot de quantum dots est différent. Ceci limite la comparaison de résultats entre différentes équipes mais aussi du signal émis par différentes populations de quantum dots lors d'un marquage multiplexé. Les tests diagnostics médicaux qui doivent être rigoureusement reproductibles peuvent souffrir de cette irrégularité car la qualité du fluorochrome ne doit pas pouvoir biaiser notre capacité à déterminer le niveau d'expression de différents antigènes par exemple.

De plus lors de la synthèse, de nombreux choix se présentent selon l'utilisation désirée :

- La composition chimique du cœur afin que l'émission du nanocrystal couvre une certaine bande du spectre de lumière. La composition chimique a aussi un impact direct sur la toxicité des quantum dots dans le cas où ils se désagrègent.
- La taille et la forme du nanocrystal vont influencer la longueur d'onde d'émission mais aussi le devenir de cette sonde fluorescente. Selon la taille, les contraintes spatiales ne seront pas les mêmes dans une application *in vitro* et lors d'injection *in vivo*. *In vivo* le devenir de la sonde évolue selon sa capacité à être filtrée par les reins ou la capacité à passer au travers de barrières biologiques telles que la barrière intestinale ou la barrière hémato-encéphalique [kato *et al.*, 2006].
- L'épaisseur de l'enveloppe influence grandement la stabilité du quantum dot. Cette enveloppe permet de protéger le cœur du nanocrystal des attaques extérieures mais augmente sensiblement la taille de ce dernier. Il faut donc adapter au mieux l'équilibre entre la taille et la stabilité du nanocrystal.

- La fonctionnalisation et la charge nette du nanocrystal qui va servir à la conjugaison de biomolécules à sa surface. Ces charges ont aussi un impact sur la stabilité du nanocrystal au cours du temps.

Toutes ces possibilités génèrent une grande diversité de quantum dots afin de mieux répondre aux besoins de chaque type d'expérimentation. Cette diversité permet d'avoir des quantum dots de mieux en mieux adaptés à leur utilisation future mais il devient nécessaire de mettre en place des systèmes de caractérisation de leurs propriétés physico-chimiques et optiques. Ces nanocristaux présentent un tel potentiel que de nombreuses équipes travaillent sur de nouvelles méthodes de synthèse ou tentent d'améliorer la composition des couches externes afin d'obtenir les nanostructures les plus brillantes possibles, stables et qui offrent de bonnes capacités de conjugaison avec des biomolécules.

- Cytotoxicité

Des études ont démontré que chez la souris les quantum dots injectés par voie intraveineuse pouvaient circuler dans le sang et s'accumuler dans certains organes tel que le foie, le rein, la rate, les poumons [Hoshino *et al.*, 2004]. Ceci ouvre de grandes possibilités de diagnostics et de traitements localisés mais il faut d'abord connaître la réelle cytotoxicité des quantum dots. En effet, les quantum dots sont très souvent composés de métaux lourds qui sont toxiques tel que le cadmium ou le sélénium. De nombreuses études tentent de quantifier la cytotoxicité de quantum dots dans des milieux biologiques. Mais il est très difficile d'apporter une réponse simple à cette question car les protocoles de fabrication des quantum dots, leur enveloppe, leur solubilisation, leur biofonctionnalisation ainsi que le type cellulaire choisi pour l'étude varient. Cependant les premières études ont permis de mettre au jour que la cytotoxicité des quantum dots augmente en fonction de leur concentration et du temps d'exposition [Hoshino *et al.*, 2007 et Kirchner *et al.*, 2005]. L'étude réalisée par le groupe de Hoshino a démontré que des QD520 sont toxiques à partir de 100 nM lors d'une incubation de 12h sur les cellules à 37°C. Cette toxicité est plus rapide si la concentration en QD520 est augmentée [Hoshino *et al.*, 2005]. De plus, d'autres études ont démontrées que la cytotoxicité des QDs est fortement déterminée par la présence et la nature d'une enveloppe [Su *et al.*, 2009 et Li *et al.*, 2009]. Plusieurs équipes se sont aussi intéressées à l'influence d'une excitation des QDs en milieu cellulaire par des rayonnements U.V. ainsi que sur l'effet de la taille des quantum dots sur leur cytotoxicité cellulaire. Il est connu que la distribution des QDs à l'intérieur d'une cellule

varie en fonction sa taille [Nabiev *et al.*, 2007]; et leur utilisation *in vivo* dans de l'imagerie biomédicale implique forcément une exposition à des rayonnements U.V. (afin de pouvoir profiter pleinement des capacités offertes par les QDs). Dans une étude récente Chang et ses collaborateurs ont démontré que dans les conditions qu'ils ont testées, tous les QDs étaient cytotoxiques mais aussi que les plus petits quantum dots induisaient une plus grande mortalité cellulaire [Chang *et al.*, 2009]. De plus ils ont mis en évidence que l'excitation des QDs par une exposition à des UV augmente grandement leur cytotoxicité. Les voies impliquées dans la cytotoxicité des quantum dots ne sont pas bien connues mais plusieurs études ont mis en évidence une augmentation des quantités de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, « *reactive oxygen species* ») dans les cellules qui contenaient des quantum dot. De plus, le *N*-acétylcystéine (NAC) qui est un antioxydant réduit la toxicité cellulaire. Enfin le temps d'exposition aux UV semble avoir une influence sur la cytotoxicité des quantum dots.

Bien qu'il ait été démontré que les quantum dots sont cytotoxiques, ces nombreuses études suggèrent que cette cytotoxicité peut être limitée soit par la présence de l'enveloppe, soit d'antioxydants. Il faut mieux comprendre les phénomènes impliqués dans la dégradation des quantum dots ainsi que les phénomènes cellulaires qui mènent à la mort de la cellule dans le but de pouvoir synthétiser des quantum dots non cytotoxiques pour les futures applications *in vivo* ou les utiliser dans certaines situations bien particulières.

- Système de détection

Actuellement, la plupart des systèmes de détection utilisés pour les applications biologiques ne sont pas ou peu adaptés pour la détection des quantum dots. Le principal défaut est le système d'excitation qui très souvent excite à une longueur d'onde trop grande. Les quantum dots ne sont pas excités avec suffisamment d'énergie et leur absorption de photon et leur brillance en sont fortement diminuées. Si l'on compare un quantum dot à un fluorochrome organique dans un système parfaitement adapté pour chacun d'eux pour permettre la plus grande absorption de photon mais aussi pour une détection optimale de la fluorescence émise, alors la brillance du quantum dot peut être jusqu'à 100 fois plus grande que celle d'un fluorochrome organique. Par contre, si on compare les deux mêmes fluorophores dans un système seulement adapté au fluorochrome organique, il arrive que le quantum dot soit moins brillant. Il est donc impératif de rendre les systèmes de détection plus flexibles afin de profiter

pleinement de la brillance des quantum dots. L'importance de la longueur d'onde d'excitation pour la sensibilité de détection des quantum dots sera discuté plus tard (page 138).

III) Les anticorps

1. Les immunoglobulines

a) Généralités

Les anticorps (Ac) sont très largement utilisés dans la recherche en biologie pour leur grande spécificité de reconnaissance antigénique. Un anticorps est composé de deux régions différentes qui ont deux fonctions bien distinctes : la région variable et la région constante.

La région constante, comme son nom l'indique, ne présente pas de variabilité mais peut se présenter sous cinq formes différentes, qui correspondent aux cinq classes d'immunoglobuline (Ig) : les immunoglobulines G (IgG), les immunoglobulines A (IgA), les immunoglobulines D (IgD), les immunoglobulines E (IgE) et les immunoglobulines M (IgM). La région constante permet le recrutement de certains facteurs du complément et/ou l'activation de cellules effectrices du système immunitaire. Chez l'homme, ces cinq classes d'Ig se divisent en neuf isotypes : IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgE et IgD.

Dans tout le manuscrit, le terme anticorps ou immunoglobuline fera référence à une IgG. Les autres isotypes sont peu utilisés dans les méthodes immunologiques courantes, ils ne seront donc pas détaillés ici.

La région variable est variable d'une Ig à l'autre. C'est cette région qui est impliquée dans la reconnaissance antigénique. Sa variabilité est suffisamment élevée pour que les Ac, pris dans leur globalité, puissent reconnaître toutes les structures antigéniques rencontrées.

b) La structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines de la super famille des immunoglobulines qui sont composées de quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères qui correspondent respectivement à une masse moléculaire de 50 kDa et 25 kDa. Ils forment une structure qui ressemble à un Y et mesurent environ 14.5x8.5x4 nm [Amit *et al.*, 1986].

Deux ponts disulfures permettent la cohésion des deux chaînes lourdes tandis qu'un pont disulfure relie chaque chaîne légère à une chaîne lourde (Figure 11, page 58). Chacune de ces chaînes se divise en domaines constants et variables d'environ 110 acides aminés chacun. Une chaîne lourde est composée de trois domaines constants et un domaine variable ; une chaîne légère est composée d'un domaine constant et d'un domaine variable. De façon naturelle, les domaines variables d'un anticorps sont les mêmes d'une chaîne légère à l'autre et d'une chaîne lourde à l'autre. Le domaine variable de la chaîne lourde est noté V_H tandis que celui de la chaîne légère est noté V_L .

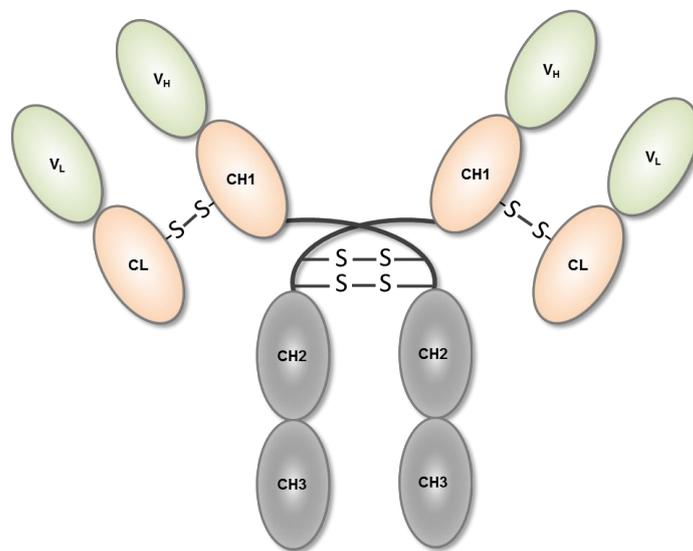


Figure 11 : Schéma d'une Immunoglobuline G. Les ponts disulfures inter chaînes sont annotés.

Une digestion enzymatique modérée de l'anticorps avec de la papaïne dissocie l'Ac en trois fragments distincts. Deux sont identiques et conservent la capacité de liaison à l'antigène, ces fragments sont appelés Fab pour « *fragment antigene binding* ». Le troisième fragment ne présente aucune capacité de liaison à l'antigène mais cristallise facilement, on l'appelle donc Fc pour « *fragment crystallisable* ». D'autres traitements enzymatiques peuvent être réalisés sur les anticorps pour obtenir différents fragments présentant différentes caractéristiques physico-chimiques mais tous ont une capacité de reconnaissance antigénique. Plusieurs formes de l'Ac sont donc possibles (Figure 12A-D, page 60) [Harmsen *et al.*, 2007] :

- **L'anticorps intact** : divalent et de masse moléculaire d'environ 150 kDa.
- **Les fragments Fab** : une forme réduite composée d'une chaîne légère entière ainsi que de deux domaines de la chaîne lourde (le variable et un constant). Cette forme présente la même affinité et spécificité de reconnaissance antigénique que l'anticorps intact mais il est monovalent et plus petit. Cette forme permet aussi de ne plus avoir le fragment Fc. Sa masse moléculaire est d'environ 50 kDa.
- **Les fragments F(ab)₂** : association de deux fragments Fab qui sont reliés par le bras polypeptidique appelé région charnière. Cette forme est donc divalente, elle possède la même avidité pour l'antigène que l'Ac intact et ne contient plus la partie Fc capable d'interagir avec des cellules de l'hôte. Sa masse moléculaire est environ 110 kDa.
- **Les fragments F_v ou scFv (« single chain variable fragment »)** : la plus petite forme fonctionnelle d'une IgG. Elle est composée du domaine variable de la chaîne lourde et de celui de la chaîne légère. Cette forme n'est pas naturelle et ne peut pas être obtenue par digestion enzymatique. Un scFv est monovalent et sa masse moléculaire est d'environ 25 kDa.

La reconnaissance antigénique est réalisée par l'association des domaines variables des chaînes lourde et légère. Le pont disulfure qui relie la chaîne légère à la chaîne lourde est donc primordial pour la reconnaissance antigénique, il est dit fonctionnel. Beaucoup d'acides aminés qui constituent un domaine variable sont conservés, ils sont utiles à la structure du domaine. On observe ainsi que la variabilité des acides aminés est limitée à des zones relativement précises : les régions hypervariables (HV). Elles sont séparées par des régions dites de charpentes (FR, « *framework* »). Il existe trois régions hypervariables : HV1, HV2 et HV3 ainsi que quatre régions charpentes : FR1, FR2, FR3 et FR4. La reconnaissance antigénique est assurée par les régions hypervariables, elles sont donc aussi appelées les régions déterminant la complémentarité (CDR, « *Complementary determining region* »).

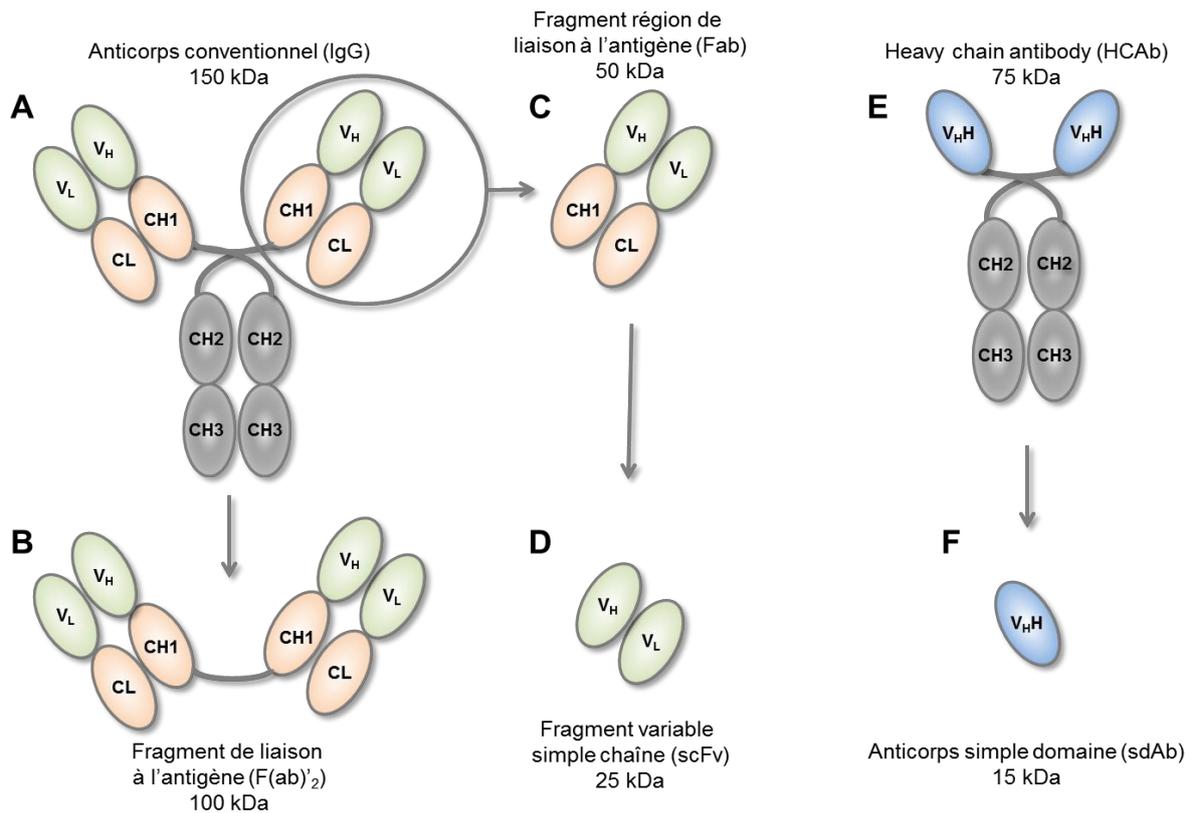


Figure 12 : Schémas de différentes formes d'anticorps. Schéma d'une immunoglobuline G (A) ainsi que de différents fragments : $F(ab)'_2$ (B), Fab (C), et scFv (D). Schéma des anticorps de lama à chaîne lourde (HCAb) (E) et schéma des anticorps à simple domaine (sdAb) (F).

c) La synthèse des anticorps

Les plasmocytes sont des lymphocytes B différenciés qui ont une durée de vie limitée et qui sécrètent de fortes concentrations d'anticorps. Chaque plasmocyte ne peut sécréter qu'un seul clone d'anticorps. *In vivo*, le pool des anticorps dirigés contre un antigène se compose d'anticorps sécrétés par différents plasmocytes. Les anticorps sont spécifiques de l'antigène mais peuvent être de différents isotypes ainsi que reconnaître et fixer différents épitopes de l'antigène. Dans ce cas, on parle d'anticorps polyclonaux (pAc). A l'inverse, quand on utilise des anticorps qui sont sécrétés par un seul plasmocyte, on parle d'anticorps monoclonaux (mAc), ils sont du même isotype et sont tous spécifiques du même épitope de l'antigène. Ce cas de figure ne se retrouve principalement qu'*in vitro*. Certaines maladies lymphoprolifératives humaines, telles que la maladie de Waldenström et la maladie de Kahler, entraînent l'apparition d'anticorps monoclonaux *in vivo*.

Depuis la fin des années 1970, la synthèse à grande échelle de mAc *in vitro* a été mise au point grâce aux travaux de Köhler et Milstein [Köhler *et al.*, 1975]. Leur technique est basée sur la fusion de lymphocytes B activés d'une souris immunisée avec des cellules de myélome de souris. Ces cellules de myélome ont été préalablement sélectionnées : elles ne doivent pas sécréter d'anticorps et n'expriment pas l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT). Après la fusion, les cellules hybrides sont sélectionnées : les lymphocytes B activés non fusionnés vont mourir à cause de leur durée de vie limitée tandis les cellules de myélomes non fusionnées mourront grâce à la mise en culture dans un milieu HAT (« *hypoxanthine-aminopterin-thymidine* »). Les seules cellules qui survivront seront les lignées de cellules myéломateuses hybrides aussi appelées hybridomes. Les cellules obtenues par cette fusion posséderont une capacité de prolifération infinie en culture et sécrèteront de fortes concentrations d'anticorps. Il faut ensuite réaliser une sélection par clonage afin d'isoler les cellules productrices de l'anticorps d'intérêt. Cette méthode permet après clonage, d'obtenir des clones qui sécrèteront un seul type d'anticorps dit monoclonal.

La production des anticorps monoclonaux, en utilisant des hybridomes, reste un processus long et coûteux qui nécessite de pouvoir avoir accès à une animalerie de laboratoire et avoir des connaissances en manipulation animale afin de procéder aux injections d'antigène en intra-péritonéal et en intraveineuse ainsi qu'au prélèvement de la rate. L'étape de fusion des lymphocytes B activés aux cellules du myélome est délicate, l'étape de sélection des hybridomes sécrétant les anticorps spécifiques de l'antigène d'intérêt est longue.

La production de fragments d'anticorps monoclonaux (Fab et scFv) peut aussi être réalisée par une méthode inspirée du « *phage display* » [Burton, 1995 et Schmitz *et al.*, 2000] dans des microorganismes tels que des bactéries : *Escherichia coli* [Plückthun, 1990, Plückthun, 1991 et Ward *et al.*, 1992], des champignons : *Aspergillus niger* [Ward *et al.*, 2004], des levures : *Pichia pastoris* [Ridder *et al.*, 1995] et des plants transgéniques de tabac [Cabanes-Macheteau *et al.*, 1999]. Cette approche permet la création de banque d'expression et a pour avantage d'être plus économique que la production d'anticorps par des hybridomes. Pour cela, des segments de gènes codant pour les parties variables des anticorps sont fusionnées avec des gènes codant pour la protéine d'enveloppe d'un bactériophage avant d'être utilisés pour infecter des bactéries. La bactérie va ainsi produire des phages recombinants qui présenteront le fragment d'anticorps à sa surface. Cette protéine recombinante présente la capacité de reconnaissance antigénique de l'anticorps et pourra donc être sélectionnée grâce à

un antigène purifié. Les phages qui exprimeront les régions variables désirées seront ensuite utilisés pour infecter des bactéries qui produiront à grande échelle des fragments Fab identiques. Cette approche permet de produire des fragments d'anticorps tels que les Fab ou les scFv beaucoup plus facilement qu'en réalisant des traitement enzymatiques sur des mAc entiers [Andersen *et al.*, 2004]. Cependant, contrairement aux cellules de mammifères, les microorganismes n'ont pas la capacité de mettre en place les modifications post-traductionnelles telle que la glycosylation complexe des anticorps et plus les fragments d'anticorps sont gros et plus il leur est difficile de les produire. Malgré les nombreux efforts réalisés pour repousser ces contraintes, les anticorps sont des protéines complexes et il est encore impossible de produire, avec des microorganismes, des anticorps monoclonaux entiers et glycosylés de la même manière que s'ils avaient été produits par des cellules de mammifères.

d) L'utilisation des anticorps dans les techniques immunologiques

Les anticorps monoclonaux sont énormément utilisés dans les laboratoires de recherche dans de nombreuses techniques immunologiques courantes telles que la cytométrie de flux, l'immunofluorescence, les western blots ou l'immunohistochimie où leur spécificité de reconnaissance et leur affinité pour l'antigène sont mises à profit. Les anticorps monoclonaux sont aussi très utilisés en médecine pour l'établissement de diagnostics tels que les tests de grossesse, la détection de tumeurs [Mikulska *et al.*, 2010] ou de micrométastases [Vagnoni *et al.*, 2012]. Ils sont aussi de plus en plus utilisés dans des buts thérapeutiques, généralement dans le cadre de maladies lourdes. Par exemple le Rituximab[®] est un anticorps monoclonal spécifique du CD20 (marqueur des lymphocytes B) utilisé dans la leucémie lymphoïde chronique ou dans certains troubles d'auto-immunité tel que la polyarthrite rhumatoïde ou dans le rejet de greffe rénale [Robak, 2012 et Barcellini *et al.*, 2011]. L'utilisation des anticorps monoclonaux en médecine est en pleine expansion à l'heure actuelle.

Lors d'un marquage immunologique classique, un anticorps monoclonal, dit primaire, est utilisé pour reconnaître spécifiquement l'antigène étudié. La détection de cet anticorps fixé à son antigène n'est possible qu'avec une sonde. Celle-ci est conjuguée à des anticorps polyclonaux, appelés anticorps secondaires, spécifiques des domaines constants des anticorps monoclonaux. Ce système de marquage en « double couche » permet d'utiliser une gamme

restreinte d'anticorps conjugués à une sonde fluorescente. En effet, cela évite d'avoir à conjuguer un fluorochrome à chaque anticorps utilisé pour reconnaître spécifiquement une protéine. De plus, ceci facilite les marquages immunologiques en offrant la possibilité de varier très facilement les couples d'anticorps pour soit étudier un antigène différent soit changer la sonde utilisée pour la détection. A titre d'exemple, l'immunisation d'une chèvre avec des anticorps de souris permet l'obtention d'un pool d'anticorps de chèvre spécifiques des domaines constants des anticorps de souris. Ces anticorps de chèvre seront ensuite conjugués à une sonde fluorescente et pourront dès lors être utilisés pour détecter des anticorps de souris spécifiques de n'importe quelle protéine étudiée.

La séquence des anticorps est suffisamment variable pour que le nombre et l'emplacement des groupements réactionnels tels que les amines primaires, les carboxyles soient inconnus. Ces groupements réactionnels sont ciblés pour conjuguer l'anticorps à une molécule. L'ajout d'une molécule sur un groupement réactionnel qui se trouve dans un des domaines variables de l'anticorps induit une perte de fonctionnalité de ce dernier. Les ponts disulfures qui relient les chaînes légères aux chaînes lourdes peuvent être détruits par des conditions réductrices ce qui engendre la perte de la capacité de reconnaissance de l'antigène.

Les anticorps sont très largement utilisés de nos jours grâce à la spécificité de reconnaissance de l'antigène qui est la base de toutes les techniques immunologiques. Pourtant les anticorps présentent de nombreuses limites qui peuvent être en partie être contournées. Les Ac sont volumineux (14.5x8.5x4 nm), ce qui implique qu'ils ne peuvent pas atteindre certains antigènes cibles dans des techniques où l'encombrement stérique est un paramètre important comme l'immunohistochimie. Les fragments d'anticorps (Fab, F(ab)₂ et scFv) permettent d'outre passer ces problèmes de taille, mais cela implique la mise en place de méthodes de synthèses de ces fragments et de contrôle de la spécificité de reconnaissance ainsi que l'affinité des fragments.

L'utilisation d'anticorps dans les techniques immunologiques implique plusieurs contrôles afin de s'assurer de la spécificité de la reconnaissance antigénique et aussi des expériences initiales de calibrage de quantité d'anticorps utilisés. En effet, des conditions de marquage inadéquates peuvent être à l'origine de signal non spécifique ou bien, à l'inverse, d'une incapacité à détecter le signal de la sonde.

Depuis le milieu des années 1990, un nouveau type d'anticorps a été découvert. Il possède le potentiel de faire reculer plusieurs de ces limites : les anticorps simple domaine (sdAb, « *single domain antibody* »).

2. Les anticorps simple domaine

a) Généralités sur les anticorps simple domaine

En 1993, les travaux de Hamers-Casterman ont permis de mettre en évidence, chez les camélidés, la présence d'un nouveau type d'Immunoglobuline G qui ne contient pas de chaîne légère et appelé anticorps à chaîne lourde (HCAb pour « *heavy chain antibody* ») (Figure 12E, page 60) [Hamers-Casterman *et al.*, 1993]. Les camélidés sont une famille de mammifères dont les représentants sont les lamas, chameaux, dromadaires et vigognes. Ces animaux possèdent à la fois des anticorps conventionnels qui sont des hétérodimères tétramériques de type IgG mais aussi des HCAb qui sont des homodimères de chaînes lourdes). La proportion de ces deux types d'anticorps varie d'une espèce à l'autre. Par exemple les HCAs représentent environ la moitié du répertoire des anticorps contenu dans du sérum de dromadaire [Hamers-Casterman *et al.*, 1993], alors que chez le lama, ils ne représentent que 25 à 45% du répertoire des anticorps [van der Linden *et al.*, 1999] Depuis la découverte de ces anticorps, de nombreuses équipes ont pu isoler le domaine variable de ces chaînes lourdes fonctionnelles et ainsi pu obtenir de petits anticorps fonctionnels appelés anticorps simple domaine (sdAb pour « *single domain antibody* » ou V_HH pour « *V_H domain of heavy chain antibodies* ») (Figure 12F, page 60) [Muyldermans, 2001, Vaneycken *et al.*, 2011 et Perruchini *et al.*, 2009]. Ces petits anticorps d'environ 15kDa présentent de nombreuses propriétés biochimiques qui les rendent très attractifs pour les techniques immunologiques dans le cadre de la recherche fondamentale et thérapeutique. En effet, malgré qu'ils sont les plus petites molécules présentant une fonction de reconnaissance antigénique, ils exhibent une affinité similaire à celle des anticorps monoclonaux et ils sont aussi capables de reconnaître et fixer de petits antigènes tels que les haptènes [Spinelli *et al.*, 2000 et Alvarez-Rueda *et al.*, 2007]. Malgré l'absence de la diversité combinatoire issue de l'association des domaines variables de la chaîne lourde et de la chaîne légère, ces HCAs possèdent un large répertoire antigénique grâce à l'agrandissement de leurs régions hypervariables [De Genst *et al.*, 2006, Muyldermans *et al.*, 2001 et Harmsen *et al.* 2007]. Les sdAb présentent d'intéressantes propriétés physico-chimiques qui en font de meilleures

molécules capables de reconnaissance antigénique que les dérivés des anticorps classiques (Fab, F(ab)₂, scFv). Les sdAb sont faciles à cloner et la sélection des clones est réalisée à partir d'anticorps ayant réalisé leur maturation *in vivo*. De plus, ils sont résistants, très solubles, faciles à produire à grande échelle et ils présentent une forte homologie avec les domaines V_H humains.

b) Structure des anticorps simple domaine

Les sdAb sont des anticorps de 15 kDa qui sont issus de l'extrémité N-terminale d'un HCab. Ces derniers sont des homodimères de chaînes lourdes qui ne possèdent pas de domaine CH1, l'extrémité C-terminale des V_HH est directement associée à région charnière.

Un domaine V_H humain et un domaine V_HH de camélidé présentent une grande homologie : ils possèdent quatre régions dites de charpentes (FR1, FR2, FR3 et FR4) ainsi que trois régions déterminantes de complémentarité (CDR1, CDR2 et CDR3). Les régions de charpentes sont vraiment très similaires (à plus de 80%), toutefois plusieurs mutations ont été observées dans les résidus du FR2, qui sont dans les anticorps conventionnels impliqués dans l'interaction entre le V_H et le V_L. En effet, les résidus V37, G44, L45 et W47, hydrophobes et hautement conservés chez la souris et l'homme sont substitués chez les camélidés par F37, E44, R45 et G47 (Figure 13, page 66) [De marco, 2011]. Ces substitutions n'induisent pas de changements conformationnels dans la structure de la molécule mais permettent une augmentation de la solubilité de l'anticorps. Ces substitutions sont nécessaires dans les HCAB où l'absence de la chaîne légère implique que les résidus de la FR2 soient directement exposés à des solvants aqueux.

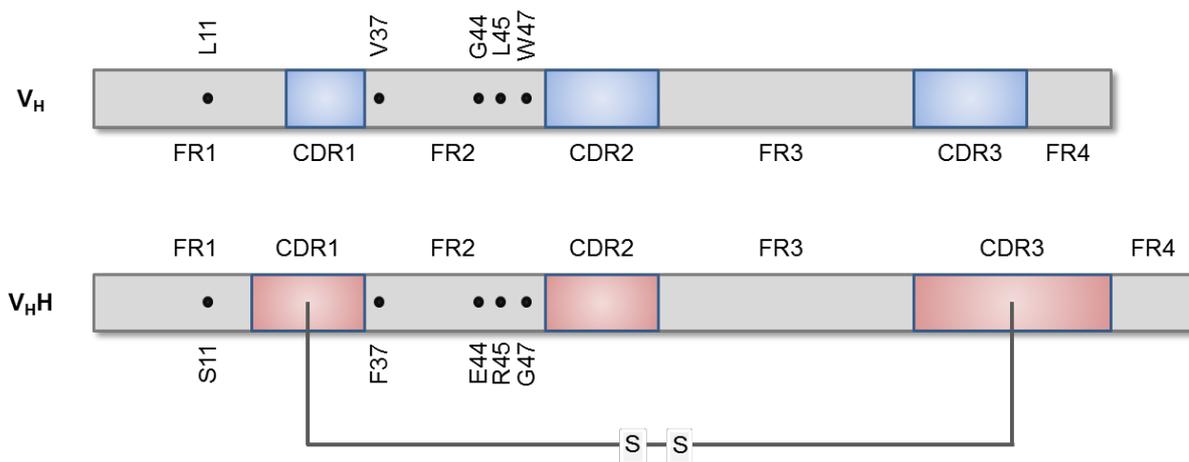


Figure 13 : Schéma des différentes régions qui composent un V_H (domaine variable de chaîne lourde d'une IgG) et un V_{HH} (domaine variable de chaîne lourde d'un HCAb). Les quatre régions de charpentes sont notées (FR1 à FR4), ainsi que les trois régions déterminantes de la complémentarité (CDR1 à CDR3). Les substitutions d'acides aminés dans ces domaines qui jouent certainement un rôle dans la stabilité de ces domaines dans les solvants aqueux sont notées. Un pont disulfure relie généralement le CDR1 au CDR3.

Par contre les CDR d'un V_H et d'un V_{HH} diffèrent : les CDR1 et CDR3 sont globalement plus longs dans les V_{HH} (Figure 13, page 66). La longueur moyenne de la région hypervariable (CDR3) chez la souris et chez l'homme est respectivement de neuf et douze acides aminés [Wu *et al.*, 1993], tandis qu'elle est de seize à dix-huit acides aminés chez le lama [Vu *et al.*, 1997 et Harmsen *et al.*, 2000]. La première région hypervariable (CDR1) qui implique les acides aminés 31 à 35 dans les V_H [Kabat *et al.*, 1991], implique les acides aminés 27 à 35 dans les V_{HH} de lamas ou de dromadaires. De plus, les CDR1 et CDR3 sont généralement reliés par un pont disulfure qui pourrait être l'une des raisons de la grande stabilité des sdAb [Muyldermans *et al.*, 2001].

c) Synthèse des anticorps simple domaine

Les sdAb peuvent être synthétisés avec un grand rendement (de 5 à 10 mg.L⁻¹) par des microorganismes tels que *Escherichia coli* [Rahbarizadeh *et al.*, 2005], *Saccharomyces cerevisiae* [Frenken *et al.*, 2000] ou *Pichia pastoris* [Rahbarizadeh *et al.*, 2006]. La synthèse est généralement réalisée par « phage display » comme pour les fragments d'anticorps mais avec beaucoup plus de facilité.

En effet, les fragments d'anticorps tels que les scFv sont composés d'un domaine V_H et d'un domaine V_L et ne sont fonctionnels que si ces deux domaines sont correctement assemblés. Cela implique deux synthèses indépendantes de ces domaines puis leur association qui est réalisée soit par un pont disulfure soit plus généralement grâce à un agent de liaison polypeptidique flexible.

Les fragments d'anticorps scFv nécessitent le clonage des deux domaines variables V_H et V_L . Les sdAb ne nécessitent eux le clonage que d'un seul domaine. Contrairement aux fragments d'anticorps, les sdAb ne requièrent pas l'assemblage des deux fragments synthétisés indépendamment. De plus, la région de charpente FR2 contient des substitutions d'acides aminés hydrophiles qui augmentent la solubilité des sdAb, alors que la présence d'acides aminés hydrophobes dans le FR2 des V_H et V_L et qui sont exposés au solvant aqueux engendrent une agrégation des fragments V_H et V_L tant qu'ils ne sont pas assemblés. Enfin les sdAb sont issus de banques d'expression qui ont déjà subi une maturation envers l'antigène *in vivo*. Ceci permet d'obtenir des anticorps qui présenteront une meilleure affinité pour l'antigène.

d) Autres avantages des sdAb sur les Ig conventionnelles

En plus des différences et avantages déjà détaillés ci-dessus, les sdAb présentent une très grande stabilité. En effet plusieurs études ont démontrées leur grande résistance aux températures. Ghahroubi et ses collaborateurs ont démontrés que les sdAb conservent leur fonction de reconnaissance antigénique après une incubation d'une semaine à 37°C [Arbadi Ghahroubi *et al.*, 1997]. Van Der Linden a démontré que les sdAbs testés sont toujours fonctionnels après avoir été incubé à 90°C pendant 2h [van der Linden *et al.*, 1999]. Une autre étude a étudié les effets de la dénaturation chimique sur la fonctionnalité des sdAb. Il a été démontré qu'après une telle dénaturation, les sdAb était capables de retrouver leur structure [Dumoulin *et al.*, 2002].

La petite taille des sdAb leur permet d'atteindre des antigènes inaccessibles pour les anticorps conventionnels. Perruchini et ses collaborateurs ont démontrés que les sdAb ont une meilleure capacité de diffusion que des anticorps monoclonaux lors d'un marquage en immunohistochimie [Perruchini *et al.*, 2009].

Enfin, les sdAb ne reconnaissent pas le même site que les anticorps conventionnels. En effet, les anticorps conventionnel reconnaissent et fixent des épitopes qui sont globalement plans alors que les sdAb eux reconnaissent et fixent des épitopes qui forment des cavités. L'absence de compétition entre les sdAb et les IgG pour la reconnaissance antigénique a été démontré en utilisant un large panel d'anticorps conventionnels et de sdAb tous spécifiques du même antigène [Behar *et al.*, 2009]. Les sdAb utilisés dans l'étude réalisée par Behar, étaient spécifiques au CEA et contrairement aux anticorps conventionnels anti-CEA testés, ne reconnaissait pas le NCA. Cette meilleure spécificité de reconnaissance antigénique peut être très intéressante lors de l'utilisation du CEA pour aider au diagnostic moléculaire de nombreuses tumeurs. De plus il a été démontré qu'en immunisant des dromadaires avec des enzymes, une proportion significative de HCAB avait des capacités inhibitrices pour ces enzymes en interagissant avec les cavités des sites actifs de ces enzymes [Lauwereys *et al.*, 1998 et Desmyter *et al.*1996].

IV) Association des anticorps aux quantum dots

1. Nécessité de fonctionnaliser les QDs avec des biomolécules

L'utilisation des quantum dots en tant que sondes fluorescentes dans des applications biologiques implique qu'ils soient solubles dans les milieux aqueux mais aussi que des molécules biologiques soient présentes à leur surface qui vont permettre l'interaction des quantum dots avec leur environnement biologiques. On parle donc de biofonctionnalisation des quantum dots. Les interactions ainsi rendues possibles peuvent être d'ordres antigène-anticorps, enzymatique ou complémentaire (hybridation d'acides nucléiques). De nombreuses méthodes existent pour biofonctionnaliser les QDs avec plus ou moins de facilité. Plusieurs stratégies seront détaillées, dont celles qui ont été utilisées pour associer les anticorps aux quantum dots.

Afin d'éviter toute confusion, le terme conjugaison fera référence à l'association de des anticorps aux quantum dot en impliquant des liaisons covalentes, tandis que le terme couplage désignera l'association non covalente des anticorps aux quantum dots.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour associer une biomolécule à un quantum dot dont certaines sont représentées dans la figure 14 (page 69).

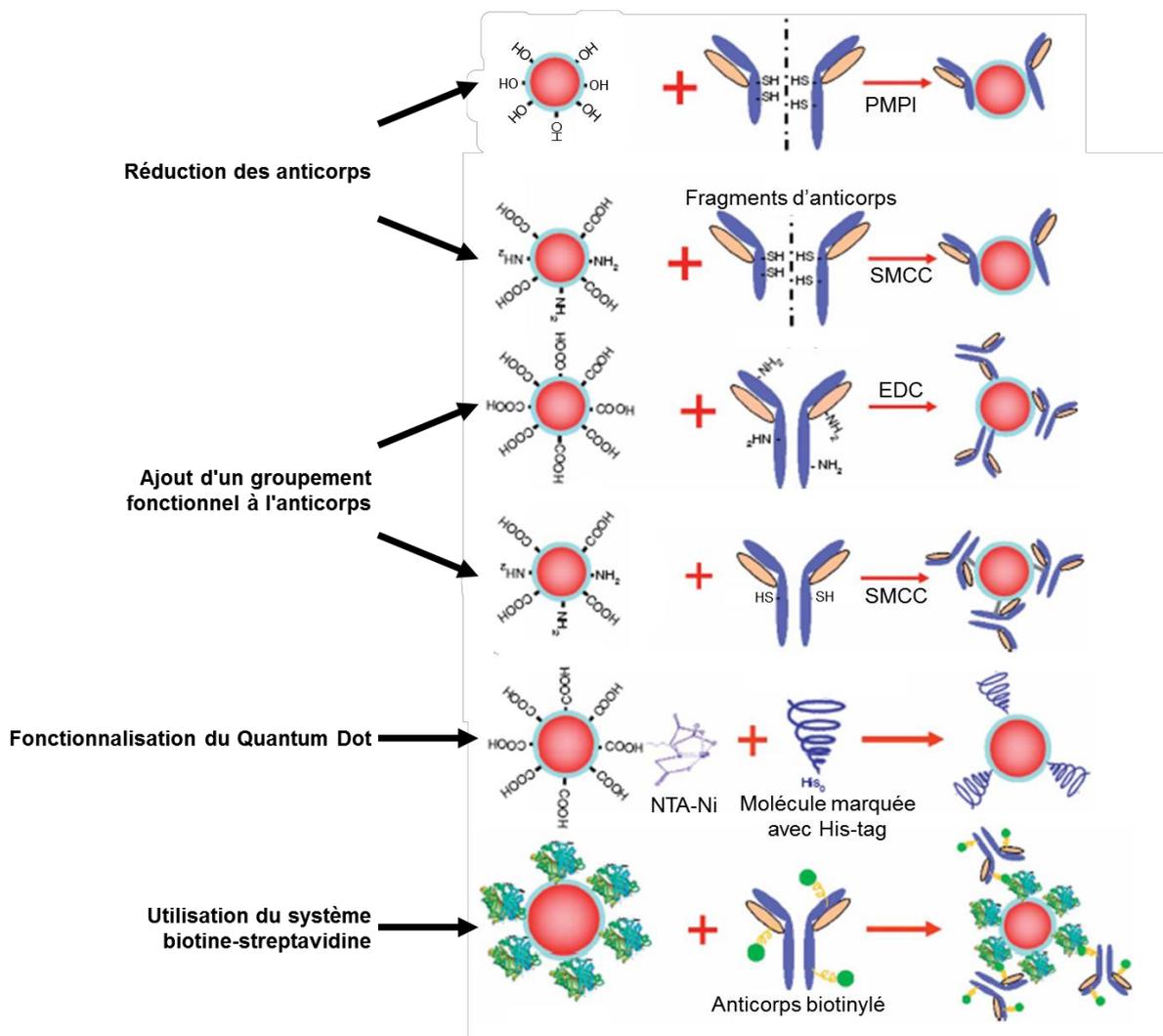


Figure 14 : Schéma présentant quelques approches possibles pour l'association de biomolécules aux quantum dots. Des anticorps peuvent être réduits avant d'être conjugués aux quantum dots à l'aide du PMPI ou du SMCC. Des groupements fonctionnels peuvent aussi être ajoutés sur des biomolécules afin de les conjuguer aux quantum dots en utilisant des agents de liaisons adaptés tel que l'EDC, le PMPI ou le SMCC. La capacité de conjugaison des marqueurs-His avec certains ions de métaux tel que le NTA-Ni est aussi utilisée pour conjuguer des biomolécules à des quantum dots. Enfin le système biotine/streptavidine permet de coupler des biomolécules biotinylées à des conjugués streptavidine-quantum dots. Ce dernier cas ne permet pas une interaction covalente entre la biomolécule et le quantum dot donc on parle de couplage plutôt que de conjugaison.

2. Utilisation d'agents chimiques hétérobifonctionnels

Des agents chimiques de liaisons hétérobifonctionnels peuvent être utilisés pour conjuguer des biomolécule à des quantum dots. Ces différents agents utilisent les groupement

fonctionnels présents à la surface des quantum dots tels que les amines, les carboxyles ou les sulfhydriles ainsi que d'autres groupements fonctionnels présents sur la biomolécule à conjuguer. Le choix de l'agent hétérobifonctionnel de conjugaison est donc principalement guidé par la nature des biomolécules à conjuguer et par les groupements présents à la surface des quantum dots. Les anticorps sont de grosses molécules qui présentent des groupements de types amines primaires ou carboxyles à leur surface. Il est aussi possible de leur ajouter des groupements fonctionnels plus spécifiques tels que des sulfhydriles ou des marqueurs tag-His en vue de leur conjugaison. Généralement les agents de liaisons hétérobifonctionnels possèdent deux groupements réactionnels bien distincts reliés par une petite chaîne carbonée. Ce sont ces groupements réactionnels qui interagissent avec les groupements fonctionnels présents sur la biomolécule et le quantum dot pour les conjuguer.

a) Le carbodiimide

L'EDC (1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride ou EDAC) est l'agent carbodiimide le plus commun. Les carbodiimides permettent de conjuguer deux molécules en interagissant avec un groupement carboxylique et une amine primaire (Figure 15, page 71). L'EDC permet la conjugaison des deux molécules sans qu'une partie de l'EDC soit incluse dans le complexe final, il est donc considéré comme un agent de liaison « *zero-length* ». L'EDC réagit d'abord avec le groupement carboxylique pour former un intermédiaire appelé « *O*-acylisourée ». Cet intermédiaire est facilement remplacé par une amine primaire présente sur l'anticorps. Ceci permet la création d'une liaison peptidique entre l'amine primaire et le groupement carboxylique et le réactif de l'EDC est libéré sous forme de dérivé soluble d'urée. L'intermédiaire « *O*-acylisourée » est instable et s'hydrolyse rapidement s'il n'est pas remplacé par une amine primaire. Cette hydrolyse entraîne la dégradation de l' « *O*-acylisourée » et le groupement carboxylique est régénéré.

Il est donc nécessaire de mettre les anticorps et les quantum dots ensemble en solution avant d'ajouter l'EDC. Les anticorps possèdent plusieurs amines primaires et aussi des groupements carboxyliques, cet agent de conjugaison n'est donc pas réellement adapté pour conjuguer des anticorps à des quantum dots car des anticorps peuvent aussi être conjugués entre eux. La conjugaison d'anticorps à des quantum dots en utilisant l'EDC peut engendrer la formation de grands complexes contenant un nombre variable d'anticorps et de quantum dots.

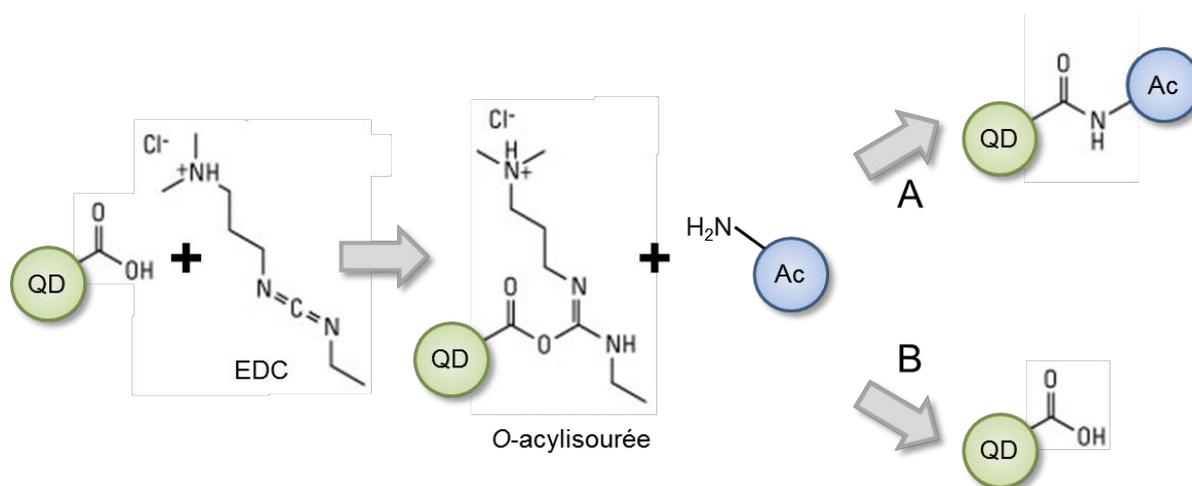


Figure 15 : Schéma réactionnel de l'EDC avec le groupement carboxylique présent sur les quantum dots (QD) puis l'amine primaire de l'anticorps (Ac). L'intermédiaire O-acylisourea est instable, s'il ne réagit pas rapidement avec une amine primaire (A), il s'hydrolyse et le groupement carboxylique est régénéré (B).

b) Le SMCC

Le SMCC (Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) et le sulfo-SMCC (SMCC rendu soluble dans les solvants aqueux) est un agent de conjugaison couramment utilisé qui contient un groupement NHS-ester et un groupement réactionnel maleimide séparé par un bras espaceur de 0,83 nm composé d'une cyclohexane. Le groupement NHS-ester est capable d'interagir avec les amines primaires tandis que le groupement réactionnel maleimide est capable d'interagir avec les groupements fonctionnels sulfhydriles (Figure 16, page 72). La stabilité du SMCC permet de faire la conjugaison en deux étapes distinctes. En effet, le groupement NHS ester du SMCC interagit avec une amine primaire présente sur une molécule. L'intermédiaire ainsi créé est stable durant plus de 50h dans une solution aqueuse à pH neutre à 4°C. Cette grande stabilité est très pratique car elle permet d'enlever l'excès de SMCC avant de faire la seconde étape où le groupement maleimide interagira avec un groupement fonctionnel sulfhydrile.

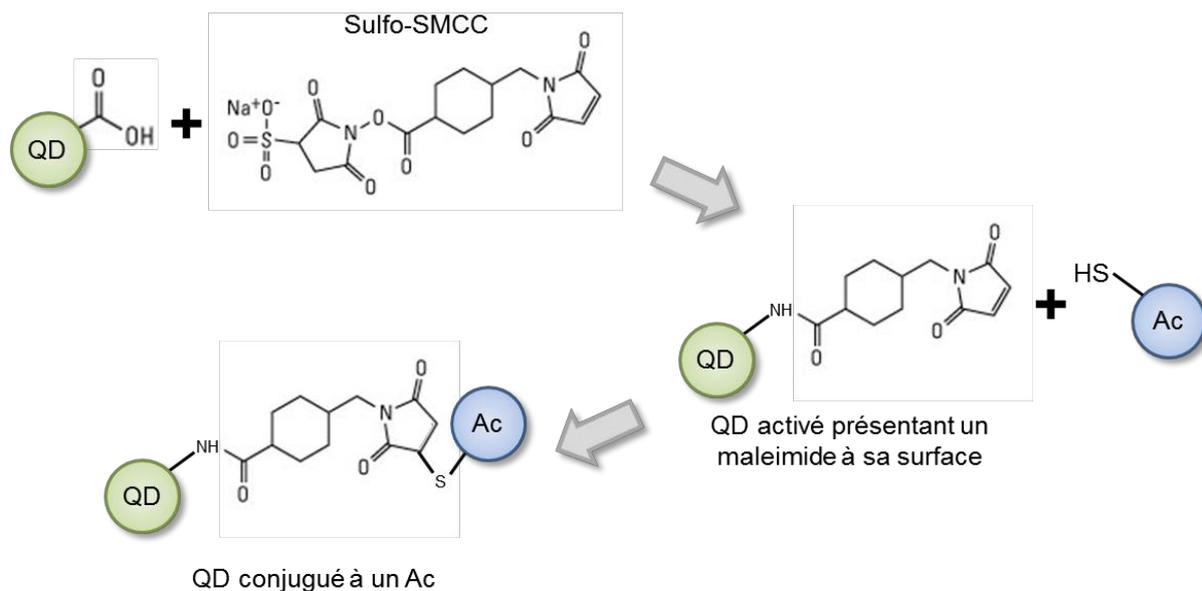


Figure 16 : Schéma réactionnel du sulfo-SMCC avec l'amine primaire présente sur les quantum dots (QD) puis avec un groupement fonctionnel sulfhydryle de l'anticorps (Ac).

Les anticorps possèdent des amines primaires donc il faut d'abord faire réagir le SMCC avec les amines primaires. Le groupement NHS ester du SMCC interagit avec une amine primaire présente sur les QDs. Ceci permet de créer des QD « activés » qui présentent des groupes maleimides à leur surface. L'anticorps possédant des groupements fonctionnels sulfhydriles à sa surface est alors ajouté à la solution. Le groupement maleimide à la surface des QD va interagir avec un groupement fonctionnel sulfhydryle et l'anticorps sera conjugué au QD. Le bras espaceur ne sera pas libéré durant cette réaction et sera donc présent dans le conjugué. Le SMCC est donc considéré comme un agent « *medium length* ». Le schéma réactionnel en deux étapes et l'absence de groupements fonctionnels sulfhydriles sur les QDs permettent d'optimiser le rendement de la conjugaison Ac-QD en évitant la formation de complexes QD-QD ou Ac-Ac. Le SMCC est l'agent de conjugaison recommandé par Invitrogen dans leur kit de conjugaison des protéines aux QDs.

c) Le PMPI

Le PMPI (*N*-(*p*-Maleimidophenyl)isocyanate) est un autre agent de conjugaison qui contient un groupement maleimide et un groupement isocyanate séparés par un cyclohexane de 0,86 nm. Le groupement réactionnel maleimide est capable d'interagir avec les groupements fonctionnels sulfhydriles tandis que le groupement isocyanate est capable d'interagir avec un

groupement hydroxyle (Figure 17, page 73). Cet agent de conjugaison hétérobifonctionnel permet la réalisation de la conjugaison en deux étapes et il conjugue les molécules en laissant un bras espaceur, il est donc considéré comme un agent « *medium length* ».

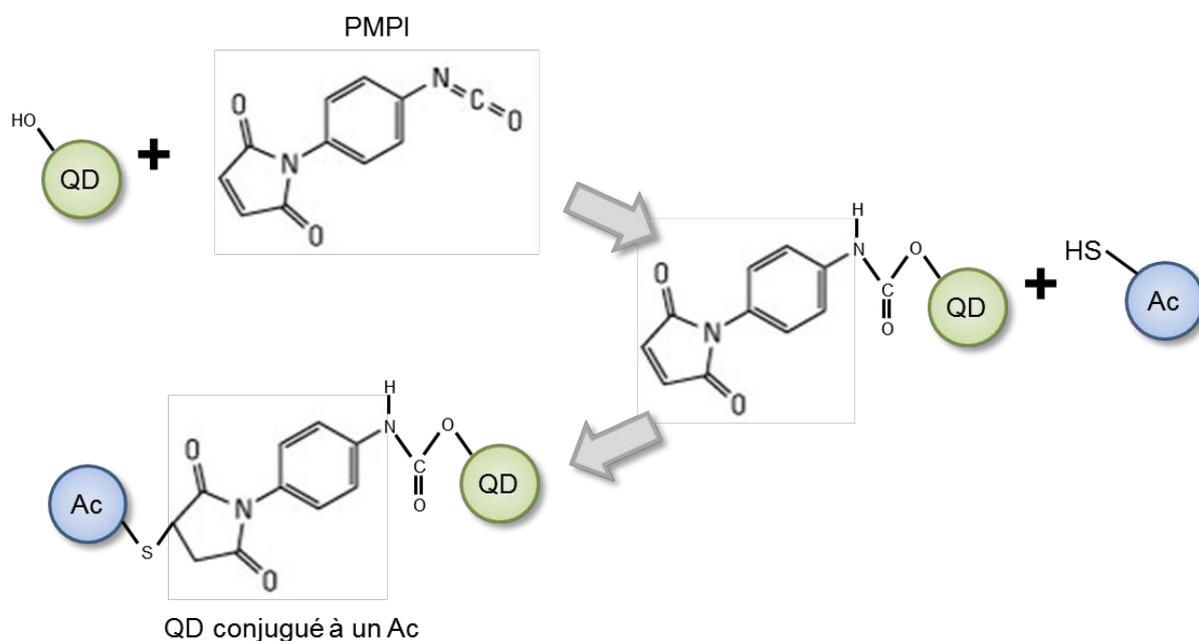


Figure 17 : Schéma réactionnel du PMPI avec l'hydroxyle présent sur les quantum dots (QD) puis avec un groupement fonctionnel sulfhydryle de l'anticorps (Ac).

3. Couplage via le système biotine/streptavidine

Le système biotine/streptavidine est très souvent utilisé dans les méthodes d'analyses biologiques pour sa stabilité. Ce système de couplage utilise la très forte affinité de la streptavidine pour la biotine qui est d'environ 10^{-15} M [Green, 1990], ce qui représente l'une des liaisons non-covalentes les plus fortes qui existe dans le monde du vivant. Ce couple est souvent utilisé pour réaliser des marquages immunologiques en utilisant un anticorps biotinylé qui sera détecté par de la streptavidine conjuguée à une sonde telles que des sondes radioactives, fluorescentes ou enzymatiques. Ce système permet d'utiliser n'importe quelle combinaison d'anticorps biotinylé reconnu par n'importe quel conjugué streptavidine-sonde. Ce système est donc très souple et s'adapte facilement aux méthodes utilisées. Une multitude d'anticorps biotinylés et de conjugués streptavidine-sonde différents sont commercialisés.

Le principal inconvénient de cette méthode est l'augmentation de la taille du complexe. La streptavidine est un tétramère où chaque sous-unité peut lier une biotine avec la même affinité. La streptavidine est une protéine d'environ 60 kDa purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*. Plusieurs études ont permis de déterminer qu'un conjugué streptavidine-quantum dot commercialisé par Invitrogen possède entre quatre et vingt-cinq streptavidines à la surface d'un seul quantum dot [Lidke et al., Young *et al.*, 2005 et Howarth *et al.*, 2008]. Ces conjugués sont donc assez volumineux d'autant plus que le volume occupé par la streptavidine se rajoute à ceux occupés par le quantum dot et par la biomolécule d'intérêt (pour nous des anticorps).

Malgré l'augmentation de la taille du complexe final, la simplicité, la stabilité et la souplesse de ce système le rends très intéressant et couramment utilisé.

Problématique

Dans les pays développés, la mortalité liée au cancer du sein est principalement due à la présence de métastases. La sensibilité de la détection est un paramètre clef afin de détecter de façon précoce la présence de métastases ou de micrométastases (CTD et CTC). Les marquages immunologiques en utilisant des conjugués anticorps-quantum dots permettent de cibler spécifiquement les cellules exprimant la molécule étudiée.

Deux approches ont été abordées dans ce travail :

- La conjugaison d'anticorps polyclonaux à des quantum dots.
- Le couplage d'anticorps simple domaine à des quantum dots via l'utilisation du système biotine/streptavidine.

Les principales étapes de ces approches sont schématisées dans la figure 18 (page 77). Il est important de souligner que les anticorps polyclonaux ont été conjugués aux quantum dots, c'est-à-dire que leurs liaisons sont covalentes. Tandis que les anticorps simple domaine ont été couplés aux quantum dot via le système biotine/streptavidine, leur liaison sera forte mais non covalente.

La conjugaison des anticorps polyclonaux aux quantum dots a été réalisée avec le SMCC (Succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) qui permet de lier une molécule qui possède un groupement fonctionnel sulfhydrile (l'anticorps) à une autre molécule qui possède des amines primaires (le QD). Pour cette conjugaison, l'anticorps a dû être préparé afin que des groupements fonctionnels sulfhydriles soient accessibles. Deux méthodes ont été développées : **i**) la réduction de l'anticorps par le DTT et le 2-MEA qui engendrent tous deux la coupure des ponts disulfure (Figure 18B, page 77) **ii**) l'addition par voie chimique de groupements fonctionnels sulfhydriles grâce au SATA (figure 18C, page 77). Les conditions de réduction ménagées de l'anticorps par les deux agents réducteurs ont été développées et comparées à celle proposée par le fabricant des QDs qui est trop forte et qui réduit totalement les anticorps (Figure 18A, page 77). Une telle réduction engendre une séparation des chaînes lourdes et légères et donc une destruction du site de reconnaissance antigénique. La conjugaison a été réalisée selon le même mode opératoire que les anticorps polyclonaux soient réduits ou bien qu'ils aient subi l'ajout de groupement thiols.

Le couplage d'anticorps simple domaine anti-CEA a été réalisé suite à deux méthodes de biotinylation de ces anticorps : une biotinylation chimique réalisée *in vitro* et une biotinylation enzymatique réalisée *in vivo* (Figure 18D, page 77). La comparaison de la

sensibilité de la détection du CEA à la surface de lignées cellulaires murines en utilisant des sdAb *in vivo*, des sdAb biotinylés *in vitro* et des anticorps monoclonaux biotinylés *in vitro* par cytométrie en flux.

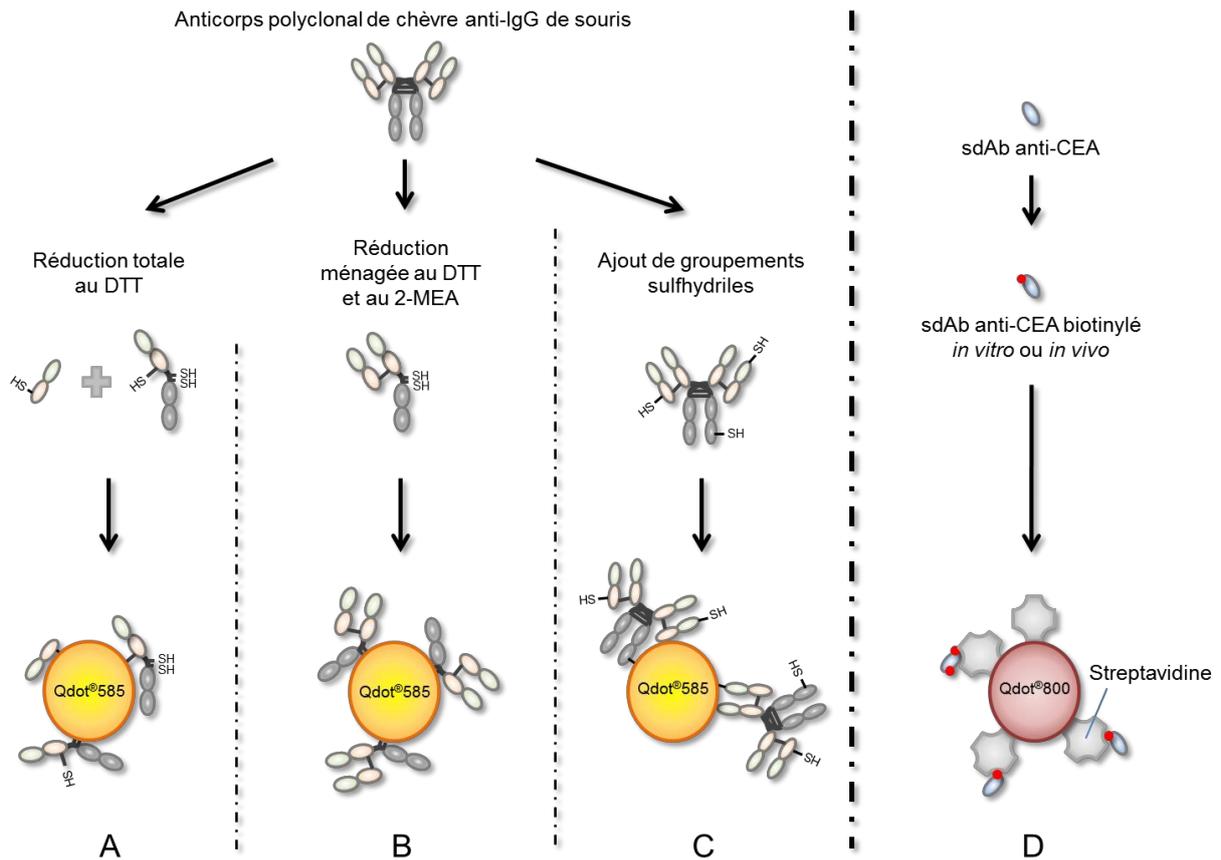


Figure 18 : Diagramme des différentes approches développées pour la conjugaison des différents anticorps aux quantum dots.

Matériel et méthode

Culture cellulaire

Les cellules MC38 sont une lignée cellulaire murine issue d'un adénocarcinome du côlon. Les cellules MC38-CEA sont la même lignée cellulaire qui a été transfectée de façon stable pour exprimer le CEA humain à leur surface [Robbins *et al.*, 1991].

Les cellules de type MC38 et MC38-CEA ont été mises en culture dans un milieu DMEM (Gibco) qui a été supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau décomplémenté (FCS, «*fœtal calf serum*») (Lonza), 2% de glutamine (Gibco) et un antibiotique-antimycotique (Gibco – référence 15240-062). De plus, de la généticine (G-418) (Sigma) à 0,5 mg.mL⁻¹ a été ajoutée au milieu des cellules MC38-CEA afin de maintenir la sélection des cellules exprimant le CEA et le gène de résistance.

Les cellules MC38 et MC38CEA ont été gracieusement donné par l'équipe du Dr. Daniel Baty, notre collaborateur dans le cadre de ce projet à Marseille. Ces cellules sont divisées tous les deux jours. Environ tous les trois mois, la culture de ces deux lignées cellulaires ont été renouvelées à partir de nouveaux aliquots.

Isolement des PBMC humaines

Les cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMC, «*peripheral blood mononuclear cells*») ont été isolées à partir de prélèvement sanguins d'un donneur sain volontaire du laboratoire sur gradient de Ficoll de densité 1,077 (PAA – «*The cell culture company*»). Les PBMC ont ensuite été lavées trois fois successives avec du PBS («*phosphate buffer saline*») (Sigma) avant d'être finalement placées dans du PBS-1% BSA (Fluka) en vue de leur marquage immunologique.

Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris

L'optimisation des conditions de réduction a été réalisée sur un anticorps polyclonal de chèvre anti-immunoglobuline de souris (M 8019) (Sigma-Aldrich). Cet anticorps polyclonal était sous forme lyophilisée et a été dissous dans de l'eau ultra pure, comme préconisé par le fournisseur, afin d'obtenir le volume et la concentration désirés.

Réduction des anticorps par le dithiothreitol

Les différentes réductions de l'anticorps polyclonal ont été réalisées dans le tampon de réduction : 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,2 ; 150 mM NaCl et 10 mM EDTA (« *ethylenediaminetetraacetic acid* ») (Sigma).

La réduction standard de cet anticorps polyclonal à 1 mg.mL^{-1} par du dithiothreitol (DTT) a été réalisée selon le protocole préconisée par le fabricant du kit de conjugaison des quantum dots aux anticorps (fiche MP 19010, « Qdot[®] *antibody conjugation kits* », Invitrogen). Ce protocole préconise une réduction des anticorps avec environ 20 mM de DTT pendant trente minutes à température ambiante dans un volume total de 1 mL de milieu de réduction. Les anticorps réduits ont été purifiés par chromatographie d'exclusion par gravité à l'aide de colonne PD MiniTrap G-25 (GE Healthcare) afin d'enlever l'excès de DTT selon le protocole commercial. L'équilibrage de la colonne et l'éluion des anticorps réduits ont été fait avec du tampon de réduction.

Plusieurs autres conditions de réduction ménagée de cet anticorps avec du DTT (Sigma) ont été testées afin de préserver l'intégralité du site de reconnaissance de l'antigène. Une large gamme de concentration finale en DTT allant de 0,01 à 20 mM a été testée. La réduction de 300 μg d'anticorps a été réalisée à 37°C pendant trente minutes dans un volume total de 300 μL de tampon de réduction. Puis les anticorps réduits ont été purifiés de la même façon que décrite précédemment.

Réduction des anticorps par le 2-mercaptoéthylamine

Un second agent de réduction a été utilisé pour réduire l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris : 2-mercaptoéthylamine (2-MEA) (Pierce). Cette réduction par le 2-MEA a été réalisée selon le protocole fournit par le fabricant. Pour cela une large gamme de concentration finale de 2-MEA allant de 0.606 à 60.6 mM a été testée. La réduction de 200 μg d'anticorps polyclonal a été réalisée à 37°C pendant 90 minutes dans un volume total de 220 μL de tampon de réduction. Les anticorps ainsi réduits ont été purifiés par chromatographie d'exclusion par gravité à l'aide de colonne PD MiniTrap G-25 afin d'enlever l'excès de 2-MEA selon le protocole commercial. L'équilibrage de la colonne et l'éluion des anticorps réduits ont été fait avec du tampon de réduction.

Protection des groupements fonctionnels sulfhydriles

Dès que les anticorps réduits ont été purifiés de l'agent réducteur, les groupements fonctionnels sulfhydriles ont été bloqués afin d'éviter que les ponts disulfures ne se reforment. La protection de ces groupements fonctionnels sulfhydriles libres a été réalisée à l'aide de l'agent alkylant *N*-Ethylmaleimide (NEM) (Pierce) dissous dans du PBS. Le ratio molaire anticorps : NEM est de 1 : 10. La réaction dure 2 h à température ambiante puis l'anticorps est purifié à l'aide de nouvelles colonnes PD MiniTrap G-25 afin de retirer le NEM en excès. Les anticorps ainsi réduits et bloqués sont stables et ont été conservés à 4°C.

Détermination du profil de réduction des anticorps

Le profil de la réduction chimique de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris est déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE, « *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis* ») à l'aide du kit Mini-Protean[®] tetra cell (Bio-rad) avec des gels de 8 ou 12%. Les différents fragments issus de la réduction de l'anticorps sont révélés soit avec une coloration au bleu de Coomassie, soit par « western-blot ». Les gels de polyacrylamide sont préparés le jour même.

Electrophrèse en gel polyacrylamide

Les migrations en gel polyacrylamide ont été réalisées dans des gels réalisés au sein du laboratoire de concentrations variables d'acrylamide/bisacrylamide allant de 8 à 12%. Les gels ont été préparés juste avant d'être utilisés pour la migration de type SDS-PAGE. Ces gels étaient composés de deux parties distinctes : un gel de séparation dont la concentration en polyacrylamide varié de 8 à 12% et un gel de concentration qui lui présentait une concentration en polyacrylamide de 3%. Le gel de concentration permet de concentrer toutes les protéines en solution en une bande très fine ç l'interface des deux gels. Le gel de séparation permet lui de séparer les différentes protéines en fonction de leur poids moléculaire. La migration des protéines au sein du gel est orientée grâce à un courant électrique.

Western-blot

Les différents fragments issus de la réduction de l'anticorps ont été séparés par SDS-PAGE avant d'avoir été transférés sur une membrane PVDF 0,45µm (GE Healthcare) en transfert

semi-sec à l'aide du « *Trans-blot[®] SD semi-dry transfer cell* » (Bio-rad) pendant une heure à 25V avec du tampon 80% eau ultra pure, 10% méthanol et 10% TAE (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA, pH 8,3). Après saturation de la membrane avec du PBS-5% lait, le marquage des anticorps réduit a pu être réalisé avec un anticorps de lapin anti-IgG de chèvre biotinylé (Jackson Immunoresearch) reconnu par des conjugués streptavidine-peroxydase (Amersham Biosciences). L'activité enzymatique de la peroxydase est détectée sur film chimio luminescent haute performance (Amersham hyperfilm[™] ECL) (GE Healthcare) avec de l'« *ECL plus western blotting detection system* » (GE Healthcare) comme substrat.

Purification par affinité des fragments d'anticorps réduits fonctionnels

Les anticorps réduits selon les conditions fournies par Invitrogen (20 mM de DTT) et ceux réduits selon nos conditions de réduction ménagées (0.075 mM de DTT et 6 mM de 2-MEA) ont été immunopurifiés. Pour cela, une colonne « *NHS-activated sepharose* » (GE Healthcare) a été chargée d'anticorps de souris. Ce type de milieu permet de lier facilement des protéines qui possèdent des amines primaires à la colonne. Ensuite, les anticorps polyclonaux de chèvre anti-IgG de souris réduits ont été passés par gravité à travers la colonne. Cette procédure a été réalisée dix fois consécutivement afin de fixer le maximum de fragments d'anticorps fonctionnels sur la colonne. La colonne a été ensuite lavée avec 200 mL PBS avant que les fragments d'anticorps soient élués avec 10 mL de tampon d'éluion (500 mL NaCl, 100 mM glycine-HCl pH 2,7). Immédiatement 80 µL de tampon de neutralisation (5 M NaOH, 10 mM EDTA) a été ajouté afin de rééquilibrer le pH et aussi d'éviter la reformation des ponts disulfures. Chaque échantillon a ensuite été concentré à l'aide de filtre de concentration « *Amicon Ultra-15 centrifuge filter* » (Millipore) avec un seuil de filtration à 30 kDa.

Les profils de ces anticorps réduits purifiés ont été comparés aux profils des mêmes anticorps réduits non purifiés par « western-blot » selon la procédure détaillée précédemment.

Conjugaison des fragments d'anticorps aux quantum dots

La conjugaison de 300 µg d'anticorps réduits à 250 µL de Qdot[®]585 nm à 4 µM a été réalisée selon les recommandations du kit de conjugaison fourni par Invitrogen (fiche MP 19010, « *Qdot[®] antibody conjugation kits* », Invitrogen). Dès la fin de leur purification par affinité, la

conjugaison des fragments d'anticorps aux Qdot[®] a été réalisée. Les Qdots ont été préalablement activés pendant une heure avec 1 mM de SMCC (succinimidyl 4-[N-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate) (Pierce) à température ambiante. Les Qdots[®]585-SMCC sont purifiés sur des colonnes d'exclusion PD MiniTrap G-25. Puis 500 µL d'anticorps réduits sont alors ajoutés à 500 µL de Qdot[®]585-SMCC pour l'étape de conjugaison qui dure 1h à température ambiante. Les conjugués ont été traités avec 0,1 mM de 2-mercaptoéthanol (Sigma) durant trente minutes à température ambiante. Les conjugués ainsi obtenus ont ensuite été concentrés à l'aide de filtre de concentration Nanosep 100-MWCO (VWR) qui ont un seuil de filtration à 100 kDa jusqu'à un volume final de 40 µL avant d'être purifiés par chromatographie d'exclusion à l'aide d'une colonne Superdex 200 (GE Healthcare). L'élution a été réalisée avec du PBS (solution tampon de phosphate) pH 7,2. Pour cela, seules les dix premières gouttes colorées (l'émission de fluorescence des Qdot[®]585 est visible à l'œil nu) ont été récupérées, permettant ainsi de limiter la présence de Qdot[®]585 non conjugués dans la solution finale.

Purification des conjugués anticorps-Qdot[®]585

La purification des conjugués anticorps-Qdot[®]585 a été réalisée par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5%. Cette purification permet de séparer les conjugués des fragments d'anticorps non conjugués et des Qdot[®]585 libres. Pour cela, 30 µg de chaque échantillon de conjugués (préparés avec des anticorps réduits par DTT 20 mM, DTT 0.075 mM ou 2-MEA 6 mM) ont été déposés dans le gel. L'avancement de la migration des conjugués et des Qdot[®]585 seuls a été suivie par la fluorescence émise par les Qdot[®]585 suite à leur excitation rapide avec une lampe U.V. Une fois que les deux bandes contenant des Qdot[®] ont été suffisamment séparées, la migration est arrêtée et le gel a été délicatement incisé pour former un petit puits juste devant la bande correspondante aux conjugués. Ce petit puits ne doit absolument pas traverser le gel sinon les conjugués s'échapperaient dans la cuve. La migration a ensuite été poursuivie pour que les conjugués sortent du gel au niveau de l'incision et s'accumulent dans le puits où ils seront pipetés. Ces conjugués ont été lavés et concentrés à l'aide de filtre de concentration Nanosep 100-MWCO avec du PBS pH 7,2. Ensuite, un spectre d'absorption des différents conjugués anticorps-Qdot[®] a été enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre (Jasco) dans les ultraviolet et le spectre visible. Ces spectres ont été utilisés pour déterminer la concentration des conjugués anticorps-Qdot[®]585 grâce aux coefficients d'extinction molaire fournis par Invitrogen avant d'être ajustés à 10 µg.mL⁻¹.

Seule la concentration des Qdot[®] est prise en compte, car à 280 nm, l'absorbance des quantum dots est plus élevée que celle des fragments d'anticorps qui en devient négligeable.

Des gels d'agarose à 1,5% ont été ensuite réalisés pour contrôler l'efficacité de la purification. La présence des Qdot[®]585 (conjugués ou non) a été acquise à l'aide d'un Chemidoc[®] (Bio-rad) sous une excitation par lampe U.V.. Ensuite le gel d'agarose a été coloré dans une solution de bleu de Coomassie afin de révéler les anticorps (conjugués ou non). La superposition de ces révélations permet l'identification des conjugués Ac-Qdot[®]585. L'efficacité de cette étape de purification est déterminée en comparant les deux profils de migration (coloration en U.V. et au bleu de Coomassie) avant et après celle-ci.

Addition de groupements fonctionnels sulfhydriles aux anticorps

Des groupements fonctionnels sulfhydriles ont été ajoutés sur l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris via l'utilisation de *N*-succinimidyl-S-acetylthioacetate (SATA) selon le protocole fourni par le fabricant (Pierce). Cette molécule permet d'insérer des groupements fonctionnels sulfhydriles protégés sur les amines primaires. La protection par un groupement acétate permet d'éviter que des ponts disulfures ne se forment spontanément.

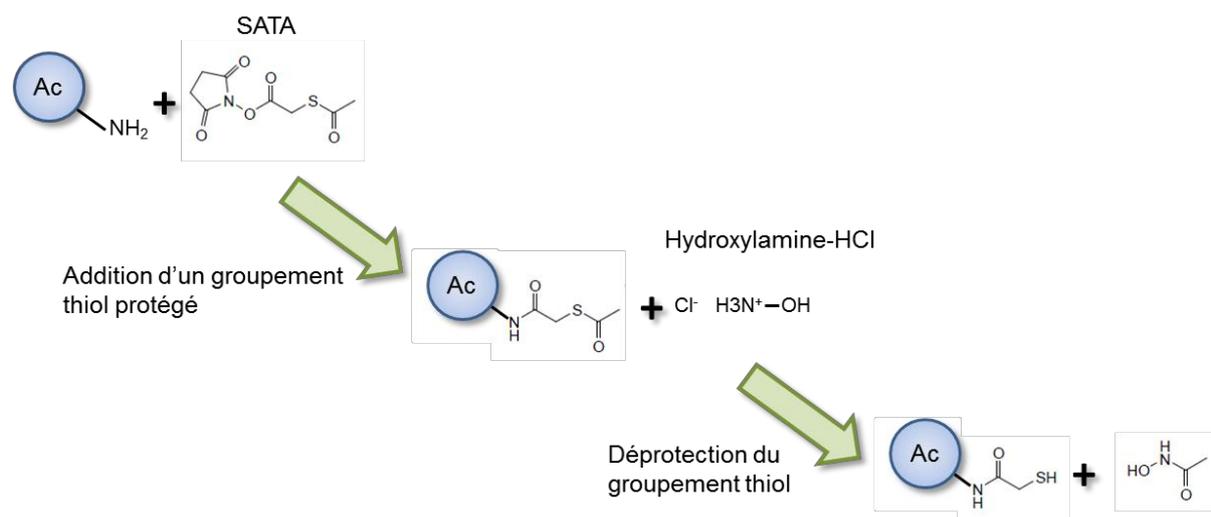


Schéma de la réaction chimique permettant l'ajout de groupement thiol sur une amine primaire de l'anticorps.

L'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles a été réalisé dans du PBS (100 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4). Juste avant la réaction, le SATA est dissous dans du DMSO (diméthyl sulfoxyde) (Sigma) à une concentration de 55 mM. Plusieurs ratios molaires de SATA : Ac ont été testés, ils sont répertoriés dans le tableau ci-dessous avec le

volume correspondant de la solution de SATA à ajouter à la solution d'anticorps. Pour chaque condition il a été utilisé 1 mg d'anticorps à 4 mg.mL⁻¹. Le volume réactionnel était de 250 µL.

Ratio molaire SATA : Ac	0	2	4	6	8	10
Volume de SATA ajouté (µL)	-	3,3	6,6	9,9	13,2	16,5

L'ajout de SATA à la solution d'anticorps a été réalisé sous agitation afin que la réaction soit la plus homogène possible. Ensuite, le tube est placé sous agitation constante pendant trente minutes à température ambiante. L'excès de SATA a ensuite été retiré par chromatographie d'exclusion sur des colonnes PD MiniTrap G-25. Les anticorps-SH ainsi obtenus ont été conservés à 4°C puisque les groupements fonctionnels sulfhydriles sont protégés.

Activation des groupements fonctionnels sulfhydriles

L'activation de ces groupements fonctionnels sulfhydriles protégés a été réalisée grâce à l'hydroxylamine (Pierce) qui permet d'enlever le groupement acétate laissant ainsi libre le groupement fonctionnel sulfhydrile. Cette réaction a été réalisée dans du PBS supplémenté par 10 mM d'EDTA afin de limiter la formation spontanée de ponts disulfures. Pour cela 41 mg d'hydroxylamine a été dissous dans 300 µL de PBS, puis 100 µL de cette solution a été ajouté à 1 mL d'anticorps à 1 g.L⁻¹. La réaction dure 2 h à température ambiante sous agitation constante avant que les Ac-SH déprotégés soit purifiés par chromatographie d'exclusion avec des colonnes PD MiniTrap G-25.

Quantification du nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles ajoutés

Le réactif d'Ellman (DNTB, 5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid]) commercialisé par Pierce permet de quantifier le nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles libres sur une protéine. Le réactif d'Ellman prend une couleur jaune lorsqu'il se lie à un groupement fonctionnel sulfhydrile libre. Le nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles par anticorps est ensuite déterminé par rapport à une courbe étalon réalisée avec une gamme de cystéine allant de 0 mg.mL⁻¹ à 0,05 mg.mL⁻¹. 20 µL de chaque concentration de la gamme de cystéine est déposée en triplicata dans une plaque 96 puits, 200 µL de réactif d'Ellman sont

ensuite ajoutés dans chaque condition (cystéine et anticorps). 20 µL des échantillons d'Ac-SH déprotégés sont ajoutés à 200µL de réactif d'Ellman immédiatement après leur purification, en triplicata aussi. Le changement de couleur du réactif d'Ellman est quantifié par absorbance à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque Victor 3V 1420-040 (PerkinElmer). La courbe étalon de la cystéine a ensuite été tracée et le nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles libres par anticorps a été déterminé pour chaque ratio molaire SATA : Ac.

Test de fonctionnalité des anticorps-SH anti-IgG de souris

Des anticorps monoclonaux de souris anti-CD4 humain (100 µg dans 50 µL) (clone BL4, préparés au sein du laboratoire) ont été incubés à 4°C pendant toute la nuit dans une plaque 96 puits MaxiSorp™ à fond plat (NUNC – Thermo Scientific). Des anticorps de lapin anti-CD4 ont été incubés de la même façon afin d'être utilisés comme contrôle négatif. Après trois lavages successifs avec du PBS-BSA 1%, les puits de la plaque ont été saturés avec du PBS-BSA 5% pendant 2 h à 37°C. Puis nos différents anticorps-SH de chèvre anti-IgG de souris ont été ajoutés dans les puits en réalisant une gamme de quantité d'anticorps : 0,03, 0,15, 0,6, 2,5, 9, 39, 156, 625, 2500, 10000 ng. Cette étape du marquage a été réalisée dans 100 µL de solution et a duré 1 h à 37°C. Ensuite, un anticorps biotinylé de lapin anti-IgG de chèvre (Jackson ImmunoResearch) a été utilisé pendant 1 h à 37°C et celui-ci fut révélé par des conjugués streptavidine-peroxydase (Amersham). Cette dernière étape a duré 1 h à 37°C. L'activité enzymatique de la peroxydase est suivie par dégradation de *o*-Phénylènediamine dihydrochloride (OPD commercialisé sous forme de comprimé SIGMAFAST™ OPD (Sigma). L'acquisition de la dégradation de l'OPD par la peroxydase a été réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque (lecture de l'absorbance à 490 nm corrigée par celle à 630 nm).

Conjugaison des anticorps-SH aux Qdot®585

La conjugaison de ces anticorps-SH à des Qdot®585 a été réalisée en s'inspirant de la méthode proposée par Invitrogen, déjà décrite plus haut (pour la conjugaison d'anticorps réduits). La seule différence entre ces deux conjugaisons provient de la préparation de l'anticorps, qui dans ce cas, n'ont pas été réduits mais traités au SATA pour posséder des groupements fonctionnels sulfhydriles libres. Deux conditions de ratio molaire SATA : Ac utilisées lors de l'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles par le SATA sur des amines primaires de l'Ac ont été retenues : 6 : 1 et 10 : 1. Les conjugués issus de cette conjugaison

seront notés Ac(SATA)-Qdot[®]585 afin de bien les différencier des autres conjugués obtenus par réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris.

Marquage immunologique des PBMC

Chaque étape du marquage immunologique des PBMC en vue de leur analyse par cytométrie en flux a été réalisée dans du PBS-BSA 1% à 4°C pendant 45 minutes dans l'obscurité. Après chaque étape de marquage, trois lavages successifs ont été réalisés avec du PBS-BSA 1%.

Les marquages anti CD4 (cluster de différenciation 4) ont été réalisés sur 500 000 PBMC fraîchement isolées. L'anticorps primaire est un anticorps monoclonal de souris anti-CD4 humain produit et purifié au sein de l'équipe dilué au 1/50 (clone BL4) soit 1µg par test. Cet anticorps est ensuite marqué à l'aide de nos différents conjugués ou avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-immunoglobuline de souris commercial couplé à de la phycoérythrine (PE) (Dako) dilué au 1/100 comme contrôle positif du marquage primaire ainsi que de l'expression de CD4 par les cellules. La fonctionnalité des conjugués anticorps-Qdot[®]585 a été testée à l'aide d'une gamme de dilution du 1/10 au 1/10000 (ce qui correspond à une gamme allant de 1 µg.mL⁻¹ à 1 ng.mL⁻¹ de conjugués Ac-Qdot[®]585).

Marquage immunologique des cellules MC38 et MC38-CEA

Chaque étape du marquage immunologique est réalisé sur 100 000 cellules issues des lignées cellulaires MC38 et MC38-CEA en vue de leur analyse par cytométrie en flux. Les marquages ont été réalisés dans du PBS-BSA 1% à 4°C pendant 45 minutes dans l'obscurité. Après chaque étape de marquage, trois lavages successifs ont été réalisés avec du PBS-BSA 1%.

Les marquages dirigés contre l'antigène carcino-embryonnaire (CEA) sont réalisés avec 100 000 cellules de souris MC38 ou MC38CEA dans des plaques 96 puits à fond en V (Greiner bio-one). Une gamme de dilution est réalisée avec les sdAb anti CEA (clone 17) biotinylés *in vitro* ou *in vivo* allant de 100 ng à 0,01 ng (soit de 5,55 pmol à 0,6 fmol). Cet anticorps est ensuite détecté à l'aide de conjugués commerciaux streptavidine-Qdot[®]800 (SA-Qdot[®]800) (Invitrogen) dilués au 1/2000 soit 0.5 nM.

Cytométrie en flux

L'émission de la fluorescence par les conjugués Qdot[®]585-anticorps de chèvre anti-IgG de souris a été enregistrée avec le cytomètre en flux BD FACSCalibur[™] (Becton Dickinson) à l'aide du canal FL2 (585/42 nm). Les caractéristiques des différents canaux de ce cytomètre en flux sont détaillés dans la table 4 (page 87). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Cellquest[™] fourni par le fabricant.

	Bande passante du filtre (nm)	Plage de longueur d'onde (nm)
FL1	530/30	515 - 545
FL2	585/42	564 – 606
FL3	670 LP	670 →
FL4	661/16	653 - 669

Table 4 : Détail des filtres du BD FACSCalibur[™]. Les données optiques des filtres sont les informations données par le fabricant.

L'émission de la fluorescence par les conjugués commerciaux streptavidine-Qdot[®]800 a été enregistrée avec le cytomètre en flux Guava[®] easycyte[™] plus (Millipore). Ce cytomètre en flux permet de faire l'acquisition en plaque de 96 puits. Les caractéristiques des différents canaux de ce cytomètre en flux sont détaillés dans la table 5 (page 88). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel CytoSoft[™] 5.2 fourni par le fabricant.

	Bande passante du filtre (nm)	Plage de longueur d'onde (nm)
FL1	525/30	510 - 540
FL2	583/26	570 – 596
FL3	680/30	665 – 695
FL4	785/70	740 - 810

Table 5 : Détail des filtres du Guava[®] easycyte[™] plus. Les données optiques des filtres sont les informations données par le fabricant.

Dot-blot

Les dot-blot ont été réalisés en utilisant des membranes pour western-blot de type PVDF. Différentes quantités d'anticorps de souris anti-CD4 humain ont été déposés sur la membrane : 100 ng, 50 ng, 10 ng, 5 ng, 1 ng et 0,1 ng. Une fois que ces dépôts ont été secs, la membrane a été saturée dans un bain de PBS-lait 5%. Enfin ces membranes ont été incubées dans différentes solutions de conjugués Qdot[®]-Ac afin de détecter de façon spécifique l'anticorps de souris. L'émission de la fluorescence par les Qdot[®] a été détectée à l'aide d'un Chemidoc[®].

Purification de l'anticorps monoclonal anti-CEA

L'anticorps monoclonal choisit est un anticorps de souris anti-CEA (CLB 139), commercialisé par Abcam sous forme liquide avec de la BSA pour une meilleure conservation (<http://www.abcam.com/Carcino-Embryonic-Antigen-CEA-antibody-CLB-139-ab23793.html>). Deux cycles successifs de purification sur des colonnes de sépharose-protéine G (GE Healthcare) ont été réalisés pour séparer l'Ac de la BSA. Toutes les étapes sont réalisées sous un flux continu généré grâce à une pompe péristaltique (flux à environ 0,33 mL par minute). Les colonnes ont d'abord été équilibrées par trois lavages successifs avec un tampon PBS 100 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH 7,2. Ce tampon ne contient pas de potassium (ce qui est important pour la quantification du nombre de moles de biotine par mole d'anticorps). Ensuite l'anticorps a été passé sur la colonne avant que celle-ci ne soit lavée trois fois avec le même tampon PBS. L'élution des anticorps a été réalisée grâce à un changement de pH, pour cela un tampon 500 mM NaCl et 100 mM glycine-HCl pH 2,7 a été utilisé.

Biotinylation in vitro des anticorps

La biotinylation des anticorps monoclonaux et des anticorps simple domaine a été réalisée en utilisant trois agents de biotinylation différents : sulfo-NHS-biotine, sulfo-NHS-LC-biotine et sulfo-NHS-LCLC-biotine selon le protocole recommandé par le fabricant (Pierce). Ces trois agents de biotinylation permettent l'ajout de biotine sur les amines primaires et diffèrent par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs chaînes carbonées (LC). L'agent de biotinylation qui est stocké à -20°C doit être équilibré à température ambiante avant d'être ouvert (il

s'hydrolyse très facilement). Ensuite une solution à 10 mM de l'agent de biotinylation est préparée dans de l'eau ultra pure. Le volume adéquat (calculé selon la formule donnée dans le protocole commercial) de cette solution d'agent de biotinylation est ajouté à la solution contenant les anticorps sous agitation pour homogénéiser la réaction qui dure 30 minutes à température ambiante.

Les biotinylations des anticorps monoclonaux ont été réalisées avec 250 µg d'anticorps par condition de biotinylation avec des ratios molaires Ac : agent de biotinylation allant de 1 : 10 à 1 : 100. Pour les sdAb, seulement 100 µg étaient utilisés par condition de biotinylation avec des ratios molaires Ac : agent de biotinylation allant de 1 : 20 à 1 : 50.

L'excès de biotine est enlevé par chromatographie d'exclusion sur des PD SpinTrap™ G-25 (GE Healthcare) selon le protocole commercial. Ces colonnes s'utilisent avec une centrifugeuse. Tous les cycles sont réalisés à 4°C pendant une minute à 800 g sauf l'élution qui elle, dure deux minutes. Les colonnes sont d'abord équilibrées avec du tampon PBS 100 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH 7,2 sans potassium. Ensuite la solution d'anticorps biotinylé est appliquée sur la colonne avant d'être éluée avec le même tampon PBS.

Quantification du nombre de biotines

La quantification du nombre de biotines est réalisée à l'aide du kit « *Pierce biotin quantitation kit* » commercialisé par Pierce qui permet de quantifier le nombre de biotines sur une protéine. Ce kit utilise des complexes HABA (4'-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid)-avidine qui se dissocient lorsque des molécules de biotines sont en solution. Cette séparation de l'HABA de l'avidine induit la perte de la capacité d'absorbance de la lumière à 500 nm. La quantification a été réalisée selon le protocole en microplaque proposé par le fabricant. 160 µL de tampon PBS sont placés dans un puits d'une microplaque 96 puits (Nunc). Après sa dissolution dans 100 µL d'eau ultra pure, 20 µL du complexe HABA-avidine sont rajoutés au PBS avant que l'absorbance à 490 nm soit déterminée sur un lecteur à microplaque Victor 3V 1420-040 (PerkinElmer). 20 µL de l'échantillon biotinylé, ainsi que des contrôles positifs du kit et des contrôles négatifs (tampon PBS avec et sans même anticorps non biotinylé) sont ajoutés dans les différents puits. Après homogénéisation, l'absorbance à 490 nm est à nouveau mesurée. Le nombre de moles de biotine pour le nombre de moles d'anticorps biotinylés est ensuite déterminé grâce au « *HABA calculator* » (<http://www.piercenet.com/haba/>).

Préparation des complexes sdAb biotinylés *in vivo* avec les conjugués SA-Qdot[®]

Le couplage des sdAb anti-CEA biotinylés *in vivo* à des conjugués SA-Qdot[®]800 a été réalisé dans un volume minimal (1-5 μ L) durant 1h à température ambiante, selon les quantités de sdAb et de conjugués SA-Qdot[®]800 mis en jeu. Puis cette solution a été diluée dans un tampon salin PBS 100 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH 7,2 pour atteindre un volume final de 400 μ L avant d'être filtré sur membrane au seuil de séparation de 100 kDa (Millipore). Ensuite ces complexes sont quantifiés par spectroscopie (absorbance des Qdot[®]800) en utilisant les coefficients d'extinction molaires donnés par le fabricant à plusieurs longueurs d'ondes.

Immunomarquage des cellules avec les complexes sdAb-Qdot[®]

100 000 cellules MC38 et MC38-CEA ont été immunomarcuées avec les complexes sdAb anti-CEA-Qdot[®]800 précédemment préparés durant 1h à 4°C avant d'être lavées trois fois avec du tampon PBS 100 mM phosphate, 150 mM NaCl à pH 7,2. Les cellules sont ensuite fixées au formaldéhyde 0,37% (Sigma).

Préparation des cellules MC38 et MC38-CEA pour la microscopie confocale

Les cellules MC38 et MC38-CEA ont été cultivées sur des lamelles de verres traitées pour la culture cellulaire avant d'être fixées au paraformaldéhyde à 3% (Sigma). Puis, ces cellules ont été immunomarcuées avec des sdAb anti-CEA humain biotinylés *in vivo* ou *in vitro* ou des mAb anti-CEA humain biotinylé *in vitro*. Ces anticorps biotinylés sont révélés par des conjugués SA-Qdot[®]565. Les lamelles sont ensuite fixées à des lames porte objets en verre grâce à du milieu de montage Aqua-poly/mount (Polysciences). La détection de la fluorescence est réalisée sur un microscope confocal LSM 710 NLO (Zeiss) en utilisant un objectif 63x à immersion (huile). L'excitation des Qdot[®]800 a été réalisée soit avec un laser émettant à 488 nm, soit une excitation biphotonique émettant à 740 nm (ce qui correspond à environ 370 nm dans un système monophotonique) à l'aide d'un laser IR pulsé CHAMELEON (Coherent).

Résultats et discussion

I) Conjugaison d'anticorps polyclonaux aux quantum dots

1. Kits commercial

a) Présentation des conjugués QD-Ac commerciaux

Beaucoup d'équipes travaillent avec des quantum dots commercialisés par Invitrogen (Qdot[®]). Ce fabricant propose une large gamme de Qdot[®] présentant des pics d'émission de fluorescence allant de 525 à 800 nm. La plupart de ces Qdot[®] sont composés de CdSe/ZnS, exceptés ceux présentant un pic de fluorescence à 705 et 800 nm qui sont des nanocristaux CdTe/ZnS. De plus, Invitrogen propose plusieurs fonctionnalisations chimiques de surface possible tels que des QDs présentant des groupements amines ou carboxyliques. Ce fabricant propose aussi des quantum dots conjugués à des biomolécules tels que des anticorps, des fragments Fab ou encore de la streptavidine. Ces conjugués commerciaux sont suffisamment utilisés pour que plusieurs équipes caractérisent certaines de leurs propriétés tels que le nombre de molécules fonctionnelles à leur surface ou bien le nombre de sites d'interactions disponibles pour une molécule donnée.

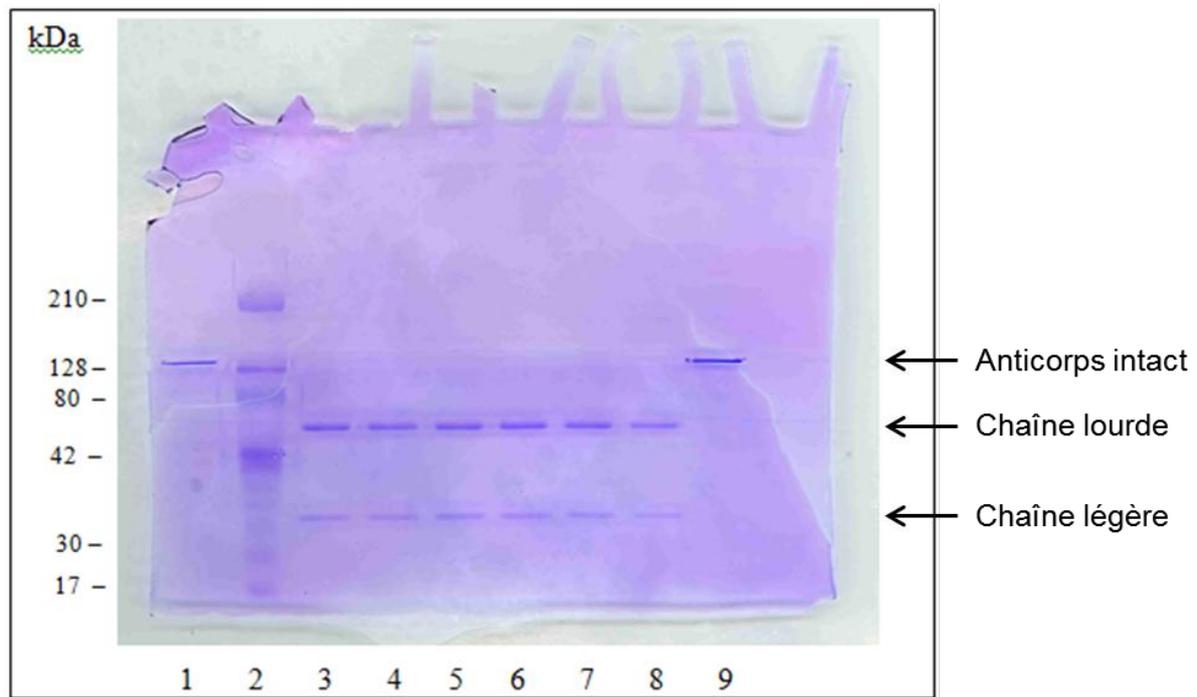
En 2007, Pathak et ses collaborateurs ont publié leurs travaux sur la détermination du nombre d'anticorps fonctionnel à la surface de conjugués Ac-QD [Pahtak *et al.*, 2007]. Leur étude se focalise sur deux méthodes : la conjugaison covalente d'anticorps réduits à des QD et l'utilisation de conjugués streptavidine-Qdot[®] pour détecter des anticorps biotinylés. Leurs résultats démontrent que le nombre d'anticorps fonctionnel est très faible pour ces deux approches. En effet, ils déterminent que des conjugués réalisés selon le protocole du kit de conjugaison Ac-QD fournis par Invitrogen ne possèdent que 0,076 +/- 0,014 fragment d'anticorps fonctionnel à la surface d'un QD, alors que les complexes Ac-QD réalisés grâce au système biotine/streptavidine permettent d'avoir 0,6 +/- 0,14 anticorps fonctionnels par QD si on les utilise de façon équimolaire et 1,3 +/- 0,35 anticorps fonctionnel si on utilise un ratio molaire Ac : QD de 2 : 1. Ces résultats sont concordants avec une étude réalisée par Zajac et ses collaborateurs qui compare l'activité de reconnaissance antigénique de ces deux modèles (conjugaison covalente ou couplage via le système biotine/streptavidine) et démontrent que le système biotine/streptavidine permet un meilleur marquage (la sensibilité est environ 25 fois supérieure) que si les anticorps sont conjugués au quantum dot [Zajac *et al.*, 2007]. Zajac et ses collaborateurs avaient conjugué des anticorps anti-IL10 (interleukine 10) en utilisant le protocole de conjugaison fournis par Invitrogen.

La fonctionnalité des anticorps présents à la surface des QDs est un paramètre clef pour les capacités de reconnaissance de l'antigène par ces nanosondes fluorescentes. Il est donc très important d'améliorer ces conditions de conjugaison des Acs à des QDs. Deux étapes du protocole de conjugaison peuvent engendrer ce faible nombre d'anticorps fonctionnels. Soit l'étape de conjugaison via le succinimidyl 4-[N-maleimidométhyl]cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) présente un très mauvais rendement, soit l'étape de réduction des anticorps est trop forte. Cette seconde hypothèse semble plus probable car le protocole préconise une réduction des anticorps avec 20 mM de Dithiothreitol (DTT), ce qui est une condition réductrice forte. Idéalement, la réduction des anticorps doit couper les ponts disulfures qui relient les deux chaînes lourdes ensemble mais doit conserver intact celui qui relie la chaîne légère à la chaîne lourde. Si ce pont disulfure est réduit, alors le site de reconnaissance de l'antigène sera déstructuré et l'anticorps perdra sa capacité de reconnaissance antigénique (Figure 18A, page 77). Donc des conditions de réduction de l'anticorps trop fortes entraînent une conjugaison au QD de chaînes lourdes et de chaînes légères isolées et donc non fonctionnelles.

b) Conditions de réduction de l'Ac selon le kit d'Invitrogen

Mes travaux ont porté sur l'optimisation des conditions de préparation de l'anticorps pour ensuite réaliser des conjugués dont la capacité de détection de la protéine cible sera comparée à celle de conjugués faits en suivant le protocole d'Invitrogen. Pour cela, un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris a été utilisé. Ce choix d'utiliser un anticorps polyclonal permet la mise en place de conjugués qui seront utilisés en tant qu'anticorps secondaire, cas le plus fréquent de conjugués anticorps-fluorochrome.

En premier lieu, l'hypothèse que les anticorps sont totalement réduits avec les conditions de réduction du kit a été testée. L'anticorps de chèvre anti-IgG de souris a donc été réduit avec 20 mM de DTT, puis deux électrophorèses (SDS-PAGE) en condition non réductrices ont permis la mise en évidence du profil de réduction. Les protéines d'un gel ont été colorées au bleu de Coomassie, tandis que les protéines du second gel ont été transférées sur une membrane PVDF pour pouvoir réaliser un western blot. Les résultats confirment bien que ces conditions de réduction sont trop fortes et l'anticorps était totalement réduit (Figure 19-pistes 8 et 9, page 94). Ceci explique le faible nombre d'anticorps fonctionnels présents à la surface des QDs. Nous avons donc choisi d'optimiser cette étape de réduction des anticorps pour ensuite conjuguer ces anticorps partiellement réduits à des Qdots[®] en utilisant les conditions de conjugaison d'Invitrogen (Figure 18B, page 77).



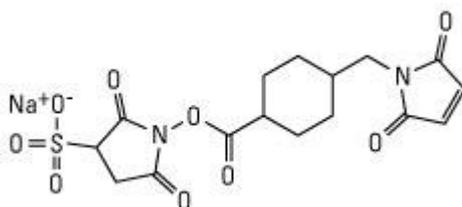
1. Anticorps réduit par 60,6 mM de 2-MEA
2. Marqueurs de poids moléculaires
3. Anticorps réduit par 1 mM de DTT
4. Anticorps réduit par 2 mM de DTT
5. Anticorps réduit par 5 mM de DTT
6. Anticorps réduit par 7,5 mM de DTT
7. Anticorps réduit par 10 mM de DTT
8. Anticorps réduit par 20 mM de DTT (Recommandation du fabricant)
9. Anticorps non réduit

Figure 19 : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de DTT. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec la gamme de concentration de DTT a été déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (gel à 12%) coloré au bleu de Coomassie.

c) Conjugaison des Acs aux QDs via des groupements thiol-esters

Le protocole d'Invitrogen utilise un agent de liaison bivalent : le SMCC. Il contient un groupement *N*-hydroxysuccinimide qui réagit de façon stable avec les amines primaires de pH 7 à 9 et un groupement maleimide qui réagit de façon stable avec les groupements fonctionnels sulfhydriles de pH 6,5 à 7,5. Ces deux groupements actifs sont séparés par un bras espaceur qui mesure 0,83 nm. Le SMCC permet donc la conjugaison entre une molécule qui contient une amine primaire (-NH₂) et une autre molécule présentant un groupement

fonctionnel sulfhydrile libre (-SH). Voici la molécule du sulfo-SMCC (molécule SMCC directement soluble dans les solvants aqueux) :



Le protocole d'Invitrogen utilise donc des Qdots[®] qui présentent des amines primaires à leur surface pour les conjuguer à des fragments d'anticorps qui présenteront des groupements fonctionnels sulfhydriles libres. Cette méthode de conjugaison implique plusieurs contraintes. Il est nécessaire de faire réagir le SMCC avec les Qdots[®] aminés et de retirer l'excès de SMCC avant de les mettre en présence des anticorps, sinon des liaisons entre anticorps peuvent se créer entre les groupements fonctionnels sulfhydriles d'un fragment d'Ac et les amines primaires d'un autre fragment d'Ac. En effet, les anticorps possèdent à la fois des amines primaires et des ponts disulfures. De plus le groupement fonctionnel sulfhydrile doit soit être ajouté chimiquement sur l'Ac, soit provenir de la réduction de pont disulfure. Nous avons testé ces deux approches : ajout de groupement fonctionnels sulfhydriles à la surface des anticorps ou réduction ménagée de l'anticorps.

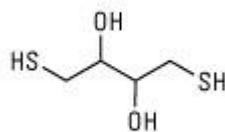
2. Préparation de l'Ac avant sa conjugaison aux QDs

a) Présentation des méthodes choisies

- Réduction des anticorps

La réduction des anticorps est utilisée entre autre pour la conjugaison de fragments d'anticorps à d'autres molécules tels que des enzymes ou des QDs. Pour que les anticorps restent fonctionnels, il est nécessaire que les ponts disulfures reliant les chaînes légères aux chaînes lourdes restent intacts, seuls les deux ponts disulfures inter-chaînes lourdes doivent être réduits. Cette méthode doit donc être calibrée pour éviter la perte de fonction de reconnaissance antigénique de l'anticorps. Elle permet la conjugaison de deux demi-anticorps capables de reconnaître l'antigène et qui auront un poids moléculaire d'environ 75 kDa.

Le DTT est un agent réducteur qui ne présente aucune spécificité quant au pont disulfure qu'il va réduire. Voici la molécule de DTT :



Le 2-mercaptoéthylamine-hydrochlorique (2-MEA) est un agent réducteur plus doux que le DTT utilisé pour réduire sélectivement les deux ponts disulfures entre les deux chaînes lourdes des anticorps. Voici la molécule de 2-MEA :



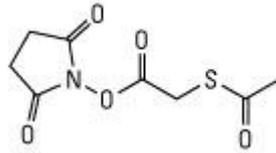
Ces différentes conditions de réduction doivent permettre l'obtention de différentes formes d'anticorps : l'anticorps intact, l'hémi-anticorps (hétérodimère composé de chaîne lourde et légère) ainsi que probablement des chaînes lourdes et légères dissociées. Le rendement attendu de ces réductions est qu'une majorité de fragments d'anticorps obtenus soit des hémi-anticorps (Figure 18B, page 77).

L'excès d'agent réducteur doit être éliminé par chromatographie d'exclusion avant que les groupements fonctionnels sulfhydriles ne soient bloqués de façon stable par le *N*-Ethylmaleimide (NEM). Le groupement maleimide du NEM va interagir avec le groupement fonctionnel sulfhydrile libre pour former un pont thioester. Ce blocage du groupement fonctionnel sulfhydrile est irréversible. Il a donc été réalisé uniquement pour l'optimisation des conditions de réduction de l'Ac, permettant ainsi d'éviter toute formation spontanée de pont disulfure. Lors de la conjugaison des Ac aux Qdot[®], cette étape n'a pas été réalisée.

- Ajout de groupements thiols sur les anticorps

L'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles sur un anticorps peut être réalisé grâce au *N*-succinimidyl-S-acetyltioacetate (SATA). Ce réactif contient un groupement *N*-hydroxysuccinimide (NHS) capable d'interagir avec les amines primaires (-NH₂) pour y accrocher de façon covalente un bras espaceur et un groupement fonctionnel sulfhydrile (-SH) protégé par un groupement acétate (-CH₂-COOH). Cette protection permet d'éviter la

formation spontanée de ponts disulfures et donc l'anticorps auquel on aura rajouté des –SH pourra être conservé avant sa conjugaison (Figure 18C, page 77). Voici la molécule du SATA :



Cette méthode permet la conjugaison d'anticorps entiers qui posséderont donc leur fonction de reconnaissance antigénique, si le site de reconnaissance de l'antigène n'est pas le siège de l'ajout des groupements thiol.

b) Préparation de l'Ac afin d'avoir des groupements thiols libres

Trois approches vont être testées pour avoir des groupements fonctionnels sulfhydriles libres à la surface des anticorps : (i) la réduction par le DTT, (ii) la réduction par le 2-MEA et (iii) l'ajout de ces groupements avec le SATA. Les anticorps réduits requièrent des étapes de purification qui seront aussi détaillées. Ensuite l'étape de conjugaison de ces anticorps aux quantum dots sera réalisée grâce au SMCC qui permet de lier de façon covalente les QDs aminés et les anticorps qui présentent des thiols.

i. Réduction de l'anticorps par le DTT

Le premier paramètre testé pour la réduction de l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris par le DTT a été la concentration de DTT à utiliser. Le protocole d'Invitrogen utilise 20 mM tandis que Pierce préconise entre 1 et 10 mM pour des protéines et entre 0,1 et 1 mM pour des protéines qui possèdent des ponts disulfures fonctionnels. Nous avons donc réalisé une gamme de concentration de DTT allant de 1 et 20 mM (20 mM étant un contrôle des conditions commerciales). Le profil de réduction de l'anticorps a été mis en évidence par électrophorèse (SDS-PAGE) en condition non-réductrices révélée par une coloration des protéines au bleu de Coomassie. Les résultats démontrent clairement que ces conditions de réduction sont elle aussi trop fortes (Figure 19, page 94).

Nous avons donc réalisé une gamme plus faible de concentration allant de 0,01 à 0,5 mM de DTT. Les profils de réduction ont été mis en évidence de la même façon par une coloration au bleu de Coomassie (Figure 20A, page 98) et par western blot grâce à un marquage fait avec

un anticorps de rat anti-IgG de chèvre biotinylé détecté par des conjugués streptavidine-peroxydase (Figure 20B, page 98). Cette gamme de DTT permet d'avoir des profils de réduction de l'anticorps variés. Les concentrations les plus fortes (1 mM, 0,5 mM et 0,2 mM) en DTT entraînent une réduction totale de l'anticorps et sont donc à proscrire. A l'inverse, la concentration 0,01 mM de DTT ne réduit pas l'anticorps tandis que 0,025 mM de DTT, réduit partiellement l'anticorps mais il semblerait que seule une chaîne légère soit séparée. Enfin 0,1mM, 0,075 mM et 0,5mM semblent permettre la dissociation des deux chaînes lourdes puisque ces trois conditions permettent l'apparition d'une bande d'anticorps à 75 kDa. Le rendement de cette réduction est assez faible. Lorsqu'on observe le gel de haut en bas, on distingue clairement six bandes issues de la réduction de l'anticorps. D'après leurs poids moléculaires (PM) respectifs, on peut supposer que l'on a (de PM élevé à PM faible) : l'anticorps intact (150 kDa), l'anticorps sans une chaîne légère (125 kDa), l'anticorps sans les deux chaînes légères (100 kDa), le demi-anticorps (75 kDa), la chaîne lourde seule (50 kDa), la chaîne légère seule (25 kDa).

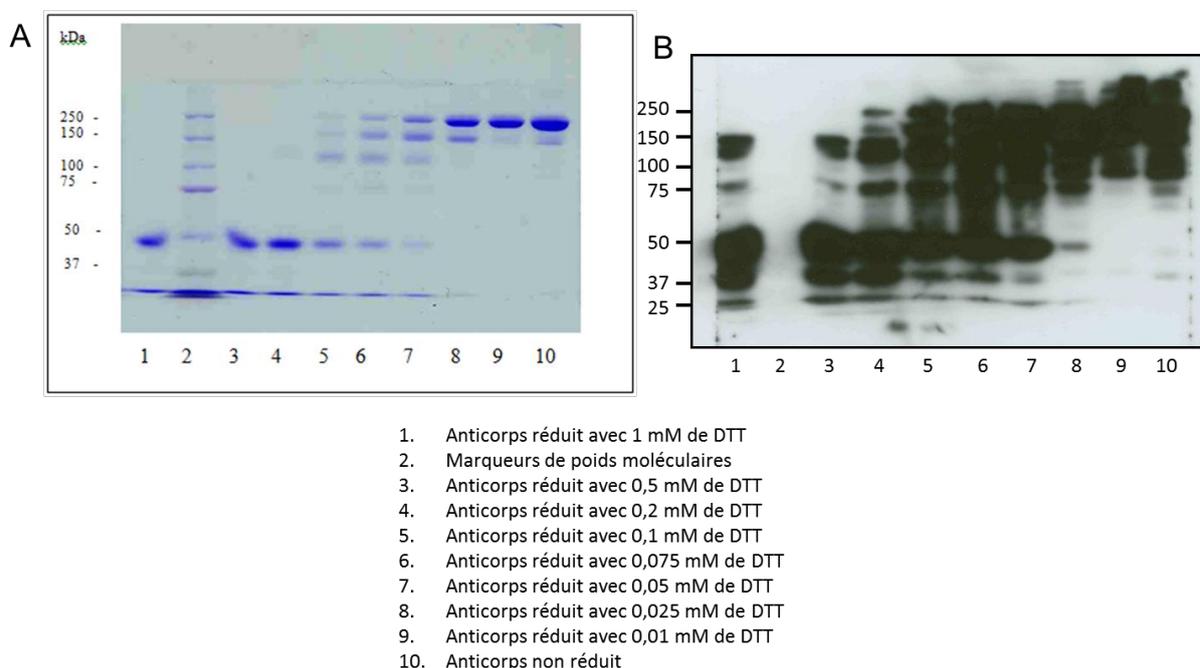


Figure 20 : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de DTT. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec la gamme de concentration de DTT a été déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (gel à 10%) coloré au bleu de Coomassie (A) et par western blot révélatrice avec un marquage anti-IgG de chèvre (B).

Pour déterminer la nature des fragments d'anticorps observés après la réduction, nous avons réalisé un western blot de ce profil de réduction afin de marquer spécifiquement les chaînes légères (Figure 21B, page 100), permettant ainsi d'identifier les bandes qui ne correspondent qu'à des chaînes légères. La comparaison de ce western blot avec celui réalisé avec un anticorps dirigé contre les IgG de chèvre (Figure 21A, page 100) et les chaînes légères (Figure 21B, page 100) permet de confirmer la nature des bandes (des PM élevés aux PM faibles) : l'anticorps intact qui est visible sur les deux western blots (150 kDa – bande notée 1), l'anticorps qui a perdu une chaîne légère (125kDa - bande notée 2), l'anticorps qui a perdu ses deux chaînes légères et qui n'est plus visible sur le western blot spécifique des chaînes légères (100 kDa - bande notée 3), la molécule d'intérêt le demi-anticorps (75 kDa - bande notée 4), la chaîne lourde qui disparaît sur le western blot spécifique aux chaînes légères (50 kDa - bande notée 5) et enfin la chaîne légère seule (25 kDa - bande notée 6). Par contre, une bande d'environ 37 kDa apparaît sur les deux western blots. La nature de cette bande est inconnue, l'anticorps polyclonal de chèvre étant purifié et commercialisé sans ajout de BSA, peut-être résulte-t-elle de la dégradation non spécifique de l'anticorps ?

La réduction de l'anticorps par 0,075 mM de DTT permet d'obtenir deux fragments distincts capables d'être conjugué et qui conserve sa fonction de reconnaissance de l'antigène : le fragment qui a perdu une chaîne légère et le demi-anticorps. L'anticorps intact, lui est bien fonctionnel mais ne pourra pas être conjugué car il ne présente pas de groupement fonctionnel sulfhydrile libre.

Des cinétiques de réduction de l'anticorps par le DTT ont été réalisées ainsi que des essais de changement de température, sans aucune influence notable sur le profil de réduction.

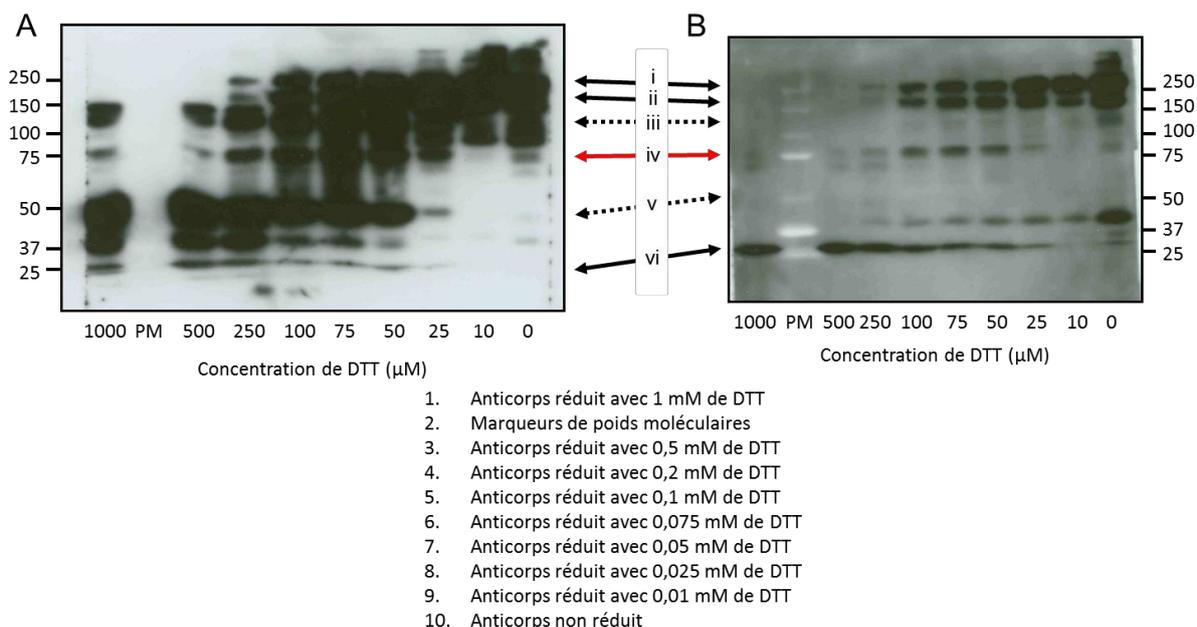


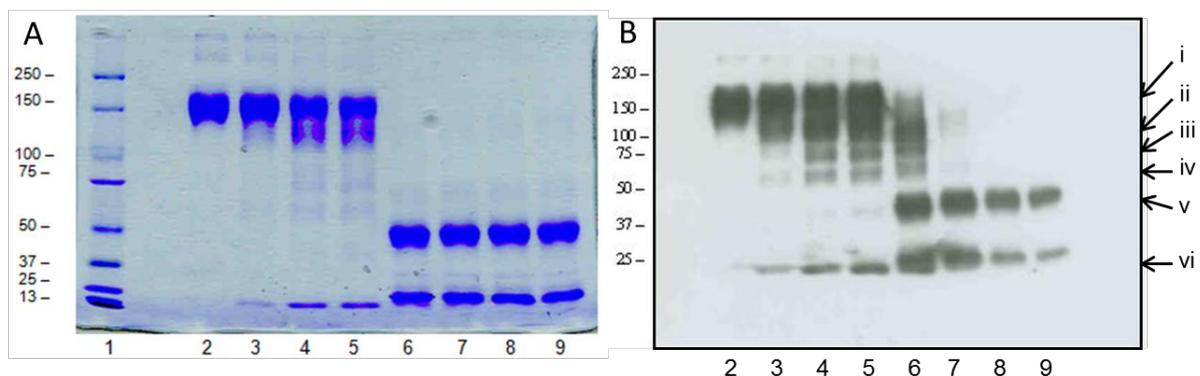
Figure 21 : Détermination de la nature des bandes du profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenues avec différentes concentrations de DTT. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec la gamme de concentration de DTT a été déterminé grâce à des western blots révélés avec soit un marquage anti-IgG de chèvre (A), soit un marquage anti-chaîne légère de chèvre (B). La migration des SDS-PAGE a été réalisée avec des gels à 10%. La comparaison de ces westerns blot permet de conclure sur la nature des fragments d'anticorps : l'anticorps entier (i), l'anticorps qui a perdu une chaîne légère (ii), l'anticorps qui a perdu ses deux chaînes légères (iii), l'hémi-anticorps (iv), la chaîne lourde seule (v) et la chaîne légère seule (vi).

ii. Réduction de l'anticorps par le 2-MEA

Le 2-MEA est commercialisé par Pierce comme un agent réducteur qui permet de réduire préférentiellement les ponts disulfures reliant les deux chaînes lourdes. Nous avons donc réalisé une réduction selon les conditions du protocole à savoir 90 minutes de réaction à 37°C avec 50 mM de 2-MEA. Le profil de réduction a été mis en évidence grâce à une coloration au bleu de Coomassie d'un gel d'électrophorèse SDA-PAGE ainsi qu'un second gel révélé par un western blot anti-IgG de chèvre (Figure 22 pistes 8, page 101). La réduction de l'anticorps avec 50 mM de 2-MEA est totale, les conditions réductrices sont donc trop fortes.

Comme pour le DTT, une gamme de concentration de 2-MEA allant de 0,606 mM à 60,6 mM a été réalisée. Le profil de réduction a été mis en évidence par une coloration au bleu de Coomassie d'un gel d'électrophorèse (Figure 22, page 101). Cette gamme de concentration de 2-MEA permet de voir, comme pour la réduction avec le DTT, plusieurs profils bien distincts.

Les concentrations les plus fortes en 2-MEA (60,6 mM, 30,3 mM et 15,15 mM) engendrent une réduction totale de l'anticorps. A l'inverse, 0,606 mM de 2-MEA ne permet pas d'avoir une réduction de l'anticorps ou alors elle est tellement faible que l'on ne la détecte pas. Malgré le faible rendement observable, les concentrations en 2-MEA de 4,545 mM et 6,06 mM semblent intéressantes pour réduire l'anticorps, elles permettent toutes les deux d'obtenir une bande visible à 75 kDa qui doit correspondre à l'hémi-anticorps. Le marquage anti-IgG de chèvre réalisé par western blot laisse suggérer que parmi ces deux conditions de réduction, 6,06 mM de 2-MEA semble présenter un meilleur rendement. Elle sera donc choisie pour les futures réductions de l'anticorps.



1. Marqueurs de poids moléculaires
2. Anticorps non réduit
3. Anticorps réduit avec 0,606 mM de 2-MEA
4. Anticorps réduit avec 4,545 mM de 2-MEA
5. Anticorps réduit avec 6,06 mM de 2-MEA
6. Anticorps réduit avec 15,15 mM de 2-MEA
7. Anticorps réduit avec 30,3 mM de 2-MEA
8. Anticorps réduit avec 50 mM de 2-MEA
9. Anticorps réduit avec 60,6 mM de 2-MEA

Figure 22 : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus avec différentes concentrations de 2-MEA. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec la gamme de concentration de 2-MEA a été déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (gel à 8%) coloré au bleu de Coomassie (A) et par western blot révélaté avec un marquage anti-IgG de chèvre (B). La nature des fragments est la même qu'avec la réduction de l'anticorps avec du DTT : l'anticorps entier (i), l'anticorps qui a perdu une chaîne légère (ii), l'anticorps qui a perdu ses deux chaînes légères (iii), l'hémi-anticorps (iv), la chaîne lourde seule (v) et la chaîne légère seule (vi).

La concentration de 2-MEA, qui permet de réduire partiellement l'anticorps, a été trouvée, toutefois le rendement est assez faible. En effet, la présence de bandes de forte intensité correspondantes à la chaîne lourde et la chaîne légère isolées indique que la majorité des anticorps a été totalement réduit et la bande d'intérêt de 75 kDa est assez faiblement représentée. Cette concentration de 2-MEA (6,06 mM) a donc été utilisée pour la réalisation d'une cinétique de la réduction de l'Ac polyclonal de chèvre. Les différents temps choisis pour cette cinétique sont : 0, 2, 5, 15, 30, 60, 90 et 120 minutes (90 minutes étant la condition proposée dans le protocole commercial). Pour la réalisation de cette gamme, un seul tube a été utilisé et au moment voulu, un petit volume était prélevé et tout de suite bloqué par le NEM. Cette méthode permet de limiter des variations expérimentales possibles. Puis, tous les profils de réduction ont été mis en évidence par électrophorèse suivi comme précédemment d'une coloration des fragments d'anticorps au bleu de Coomassie (Figure 23, page 102). De façon surprenante, aucune différence de réduction n'apparaît au cours du temps, deux minutes de réaction semblent suffisantes pour obtenir le même profil de réduction de l'Ac obtenu en suivant le protocole commercial.

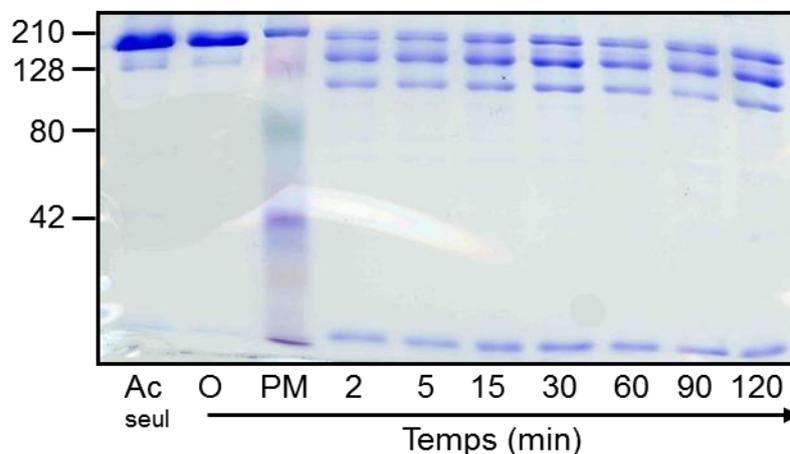


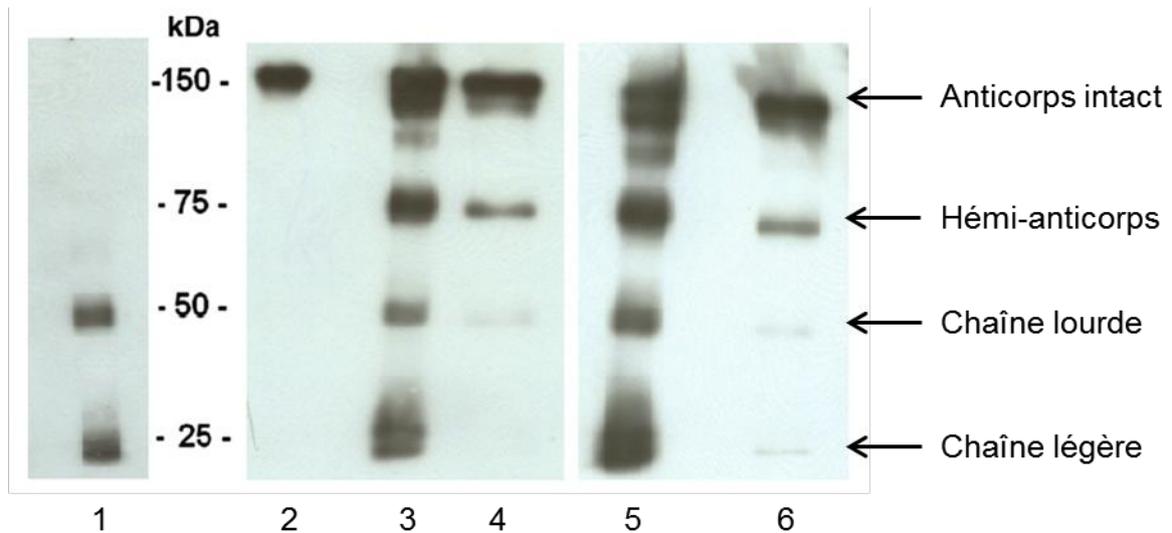
Figure 23 : Profils de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris obtenus durant une cinétique de réduction avec 6,06 mM de 2-MEA. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec 6,06 mM de 2-MEA au cours du temps a été déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (gel à 8%) coloré au bleu de Coomassie.

Des essais de réduction de l'anticorps avec le 2-MEA à différentes températures ont été réalisés, sans aucune influence sur le profil de réduction.

Les conditions optimales de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris par le DTT ou le 2-MEA ont été définies : 30 minutes à température ambiante avec 0,075 mM de DTT ou 90 minutes à température ambiante avec 6,06 mM de 2-MEA. Ces deux conditions permettent d'obtenir trois entités supposées fonctionnelles : l'anticorps intact, l'anticorps qui a perdu une seule chaîne légère et le demi-anticorps. Seules les deux dernières pourront être conjuguées au quantum dot car l'Ac intact ne présente pas de groupement fonctionnel sulfhydryle libre. Il faut maintenant purifier les entités fonctionnelles de l'anticorps de toutes celles qui ne le sont pas avant de pouvoir réaliser la conjugaison au QD.

Une étape de purification permettrait d'améliorer la fonctionnalité des fragments d'anticorps réduits qui seront conjugués au nanocristaux. La meilleure méthode pour purifier les fragments fonctionnels d'anticorps réduits est d'utiliser une chromatographie d'affinité. Celle-ci permettra d'isoler toutes les entités d'anticorps fonctionnelles : l'anticorps entier, l'anticorps qui a perdu une chaîne légère ainsi que le demi-anticorps. Cette étape de purification n'est pas prévue dans le protocole de conjugaison d'Ac au QDs fournit par Invitrogen, pourtant elle paraît essentielle.

Une chromatographie d'affinité a donc été réalisée sur une colonne de « *NHS-activated sepharose 4 fast flow* » couplée à des anticorps de souris anti-CD4. La spécificité de l'anticorps de souris importe peu tant que celui-ci n'est pas un anticorps anti-IgG de chèvre. Les anticorps préalablement réduits ont ensuite été passés plusieurs fois au travers de cette colonne. Les fragments présentant une fonction de reconnaissance de l'anticorps de souris y sont restés accrochés puis ont été élués. Cette étape de purification a été réalisée pour les deux conditions de réduction ménagées : 0,075 mM de DTT et 6,06 mM de 2-MEA. Puis, l'efficacité de la purification a été contrôlée par une électrophorèse SDS-PAGE révélée par western blot en anti-IgG de chèvre. Ce western blot confirme l'efficacité de la purification (Figure 24, page 104). En effet, la grande majorité des chaînes lourdes et légères isolées ont disparues, ainsi que les dimères de chaînes lourdes.



1. Anticorps réduit avec 20 mM de DTT
2. Anticorps non réduit
3. Anticorps réduit avec 6,06 mM de 2-MEA non purifié
4. Anticorps réduit avec 6,06 mM de 2-MEA après purification par affinité
5. Anticorps réduit avec 0,075 mM de DTT non purifié
6. Anticorps réduit avec 0,075 mM de DTT après purification par affinité

Figure 24 : Efficacité de la purification par affinité des fragments fonctionnels de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris réduit. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec 6,06 mM de 2-MEA avant (piste 3) et après la purification par affinité (piste 4) est déterminé grâce à un western blot anti-IgG de chèvre. Le profil de réduction de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris avec 0,075 mM de DTT avant (piste 5) et après la purification par affinité (piste 6) est déterminé grâce à un western blot anti-IgG de chèvre. Les fragments fonctionnels issus de la réduction de l'anticorps avec 20 mM de DTT n'ont pas été purifiés, car cette réduction est totale et que les chaînes lourdes et légères ne sont pas fonctionnelles si elles sont isolées, Les migrations SDS-PAGE ont été réalisées avec des gels à 10%.

iii. Ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles

L'ajout de groupement fonctionnels sulfhydriles (-SH) à la surface des anticorps permet de limiter la perte de fonction de reconnaissance de l'antigène en conservant l'intégrité des ponts disulfures par rapport aux techniques de réduction de l'anticorps. Toutefois, cette méthode lie de façon covalente des groupements -SH à des amines primaires présentes sur l'anticorps. Le site de reconnaissance antigénique peut contenir des amines primaire, il faut donc être vigilant quant au nombre de groupements -SH ajouté par anticorps afin de limiter les risques qu'un de ces groupement soit dans le site de reconnaissance antigénique. La présence d'un tel

groupement gênerait à la fois la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, mais aussi l'orientation de l'anticorps à la surface du QD, une fois la conjugaison à ce dernier réalisée.

- Utilisation de différents ratios molaires Ac : SATA

Il est important d'optimiser les conditions d'ajout de groupement fonctionnels –SH afin de conserver la fonction de reconnaissance antigénique de l'anticorps. Pour cela différents ratios molaires Ac : SATA ont été utilisés : 1 : 0 ; 1 : 2 ; 1 : 4 ; 1 : 6 ; 1 : 8 et 1 : 10. Puis le nombre moyen de groupements fonctionnels sulfhydriles ajouté par anticorps a été déterminé grâce à une méthode de quantification du nombre de –SH libre présent à la surface d'une protéine en utilisant le réactif d'Ellman (5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid] ou DTNB). Lorsque ce réactif réagit avec un groupement fonctionnel sulfhydrile sous la forme –S⁻, un pont disulfure se crée et le TNB²⁻ est libéré. Ce dernier absorbe la lumière à 412 nm. Grâce à une courbe d'étalonnage qui a été réalisée avec une gamme de concentration de cystéine, on peut déterminer la concentration des groupements fonctionnels sulfhydriles libres en solution et donc le nombre moyen de –SH présent à la surface de l'anticorps (Figure 25, page 105).

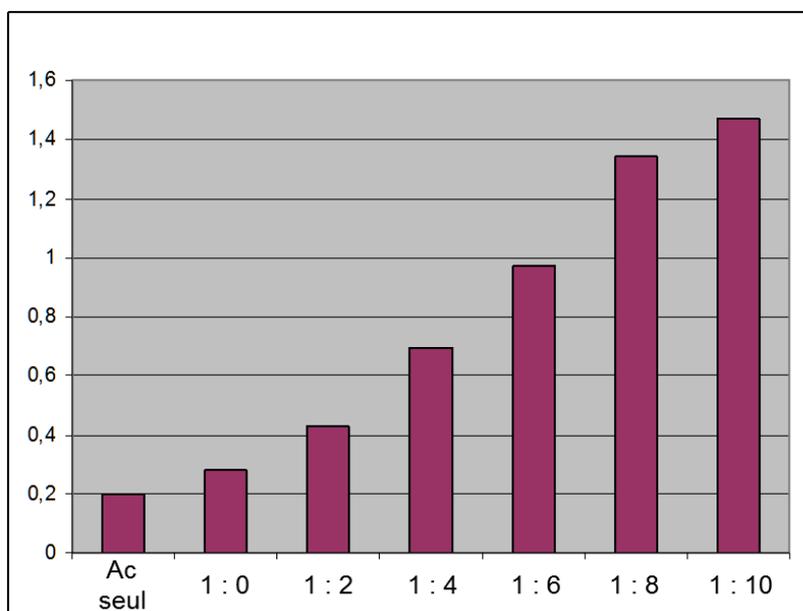


Figure 25 : Détermination du nombre de groupements fonctionnels sulfhydriles ajoutés à l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris en fonction du ratio molaire Ac : SATA utilisé. La condition notée Ac seul correspond à l'anticorps qui n'a rien subi, tandis que le ratio molaire 1 : 0 correspond à l'anticorps qui a subi toutes les étapes de la réaction utilisée pour l'ajout de groupement fonctionnels sulfhydriles mais sans SATA.

Pour limiter l'impact de la présence de ces groupements fonctionnels –SH sur la fonction de reconnaissance antigénique de l'anticorps, il est préférable de se placer dans des conditions où il y aura peu de groupements fonctionnels –SH ajoutés par anticorps. L'idéal étant de se limiter à un voire deux groupements fonctionnels –SH par anticorps. Les ratios molaires Ac : SATA de 1 : 6 et 1 : 8 semblent les plus intéressants. Les anticorps auxquels ont été rajouté des groupements fonctionnels –SH seront notés Ac-SH.

- Détermination de la fonctionnalité de l'Ac après rajout de –SH

Des tests de fonctionnalité de l'Ac-SH ainsi obtenus ont été réalisés afin de déterminer l'influence de l'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles sur la fonction de reconnaissance antigénique pour chacun des ratios molaires Ac : SATA testés. Pour cela, un test ELISA est réalisé : on a incubé pendant une nuit 100 µg d'anticorps de souris anti-CD4 sur une plaque de type MaxiSorp™. La plaque a ensuite été saturée avec de sérum albumine bovine (BSA, « *bovine serum albumin* ») puis les différents Ac-SH de chèvre anti-IgG de souris sont ajoutés. On a ensuite réalisé un marquage avec des anticorps biotinylés de lapin anti-IgG de chèvre qui ont été révélés grâce à des conjugués streptavidine-peroxydase. La lecture de l'activité enzymatique démontre que dans la gamme de ratios molaires Ac : SATA testés, l'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles n'influence peu la fonction de reconnaissance antigénique de l'Ac (Figure 26A, page 107). Ce panel représente l'activité enzymatique en fonction de la quantité d'anticorps traité avec le SATA utilisée. La différence d'activité enzymatique détectée empêche de bien discerner les différences entre les différents ratios molaires anticorps : SATA. L'activité enzymatique a donc été rationalisée par rapport à celle obtenue par l'anticorps non traité (qui représente le 100%) (Figure 26B, page 107). Cela permet de mieux discerner les différences d'activité enzymatique. Deux ratios molaires Ac : SATA ont été choisis pour être conjugués aux QDs : 1 : 6 et 1 : 10. Le ratio molaire 1 : 6 a été choisi car il ajoute en moyenne un groupement fonctionnel sulfhydrile par Ac, tandis que le ratio 1 : 10 permet, lui, d'en ajouter entre un et deux. Cela permettra de déterminer si un seul groupement fonctionnel sulfhydrile présent à la surface de l'Ac est suffisant pour une conjugaison efficace au QD.

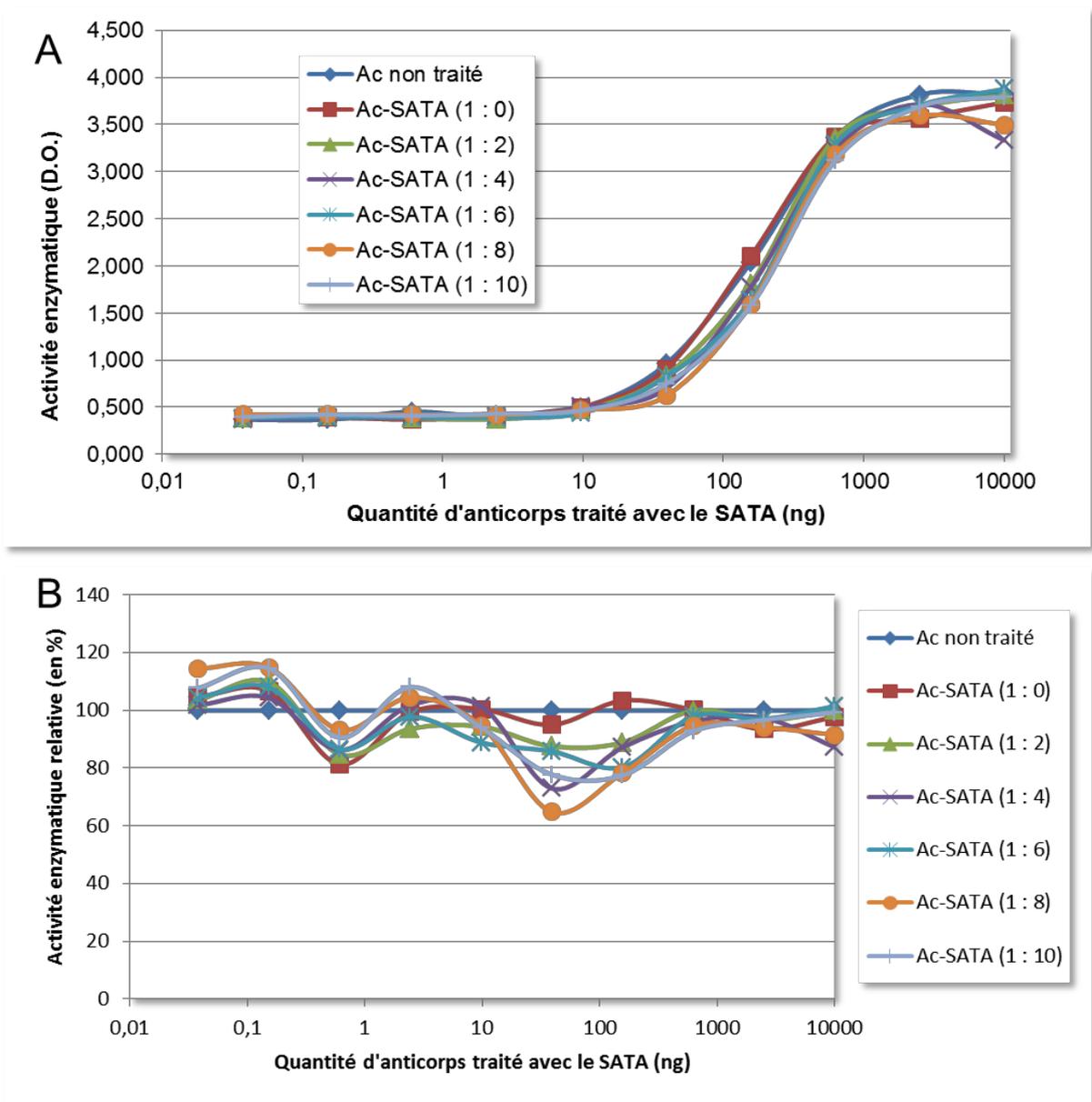


Figure 26 : Influence du nombre de groupement -SH ajouté aux anticorps grâce au SATA par ELISA. Le marquage de 100 µg d'anticorps murin anti-CD4 avec les différents anticorps de chèvre anti-IgG de souris (de 0,03 à 10000 ng) traité avec différents ratio molaire Ac : SATA : 1 : 0 ; 1 : 2 ; 1 : 4 ; 1 : 6 ; 1 : 8 et 1 : 10. L'activité enzymatique est permise par un marquage des anticorps de chèvre traité au SATA par des anticorps de lapin anti-IgG de chèvre biotinylé révélé par des conjugués streptavidine-peroxydase. La partie **A** représente l'activité enzymatique en densité optique (D.O.) en fonction de la quantité d'anticorps traité avec le SATA pour chaque ratio molaire anticorps : SATA. La partie **B** représente cette même activité mais en pourcentage par rapport à l'activité des anticorps non traités.

3. Conjugaison et purification des anticorps ainsi préparés aux QDs

La conjugaison de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris à des Qdots[®] 585 a été réalisée selon les conditions proposées par Invitrogen. Ces Qdot[®]585 ont été choisis en fonction des filtres présents sur le BD FACSCalibur sur le canal FL2 (585/42 nm) (Table 4, page 87), ce cytomètre ayant été utilisé pour détecter nos conjugués Ac-Qdot[®]. Cinq conjugués différents ont été réalisés (selon les cinq conditions de préparation de l'anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de souris) :

- Qdot[®]585 + Ac réduit par 20 mM de DTT
- Qdot[®]585 + Ac réduit par 0,075 mM de DTT
- Qdot[®]585 + Ac réduit par 6,06 mM de 2-MEA
- Qdot[®]585 + Ac-SH avec le ratio molaire Ac : SATA de 1 : 6
- Qdot[®]585 + Ac-SH avec le ratio molaire Ac : SATA de 1 : 10

L'efficacité de la conjugaison de ces différentes préparations d'anticorps a été vérifiée par électrophorèse dans un gel d'agarose 1,5%. Ce gel a ensuite été exposé à des U.V. afin de déterminer l'emplacement des bandes de Qdots[®] 585. Comme on pouvait s'y attendre, deux bandes de Qdots[®] 585 sont apparues. La bande de Qdot[®] qui a migré le plus rapidement correspond aux Qdots[®] 585 non conjugués, tandis que la seconde bande correspond aux conjugués Ac-Qdot[®] 585. Puis, le même gel d'agarose a été coloré dans une solution de bleu de Coomassie afin de marquer toutes les protéines. Cette coloration fait apparaître également plusieurs bandes dont une, commune à toute les conditions de réduction, qui se superpose à celle identifiée comme des conjugués ; tandis que les autres correspondent à des anticorps non conjugués plus ou moins réduits selon les conditions de réductions utilisées pour préparer les anticorps (Figure 27A, page 109). De la même manière, un gel d'agarose permet la détermination d'un profil de conjugaison similaire avec les conjugués Ac-Qdot[®] réalisés avec les Ac traités au SATA (Figure 28, page 109)

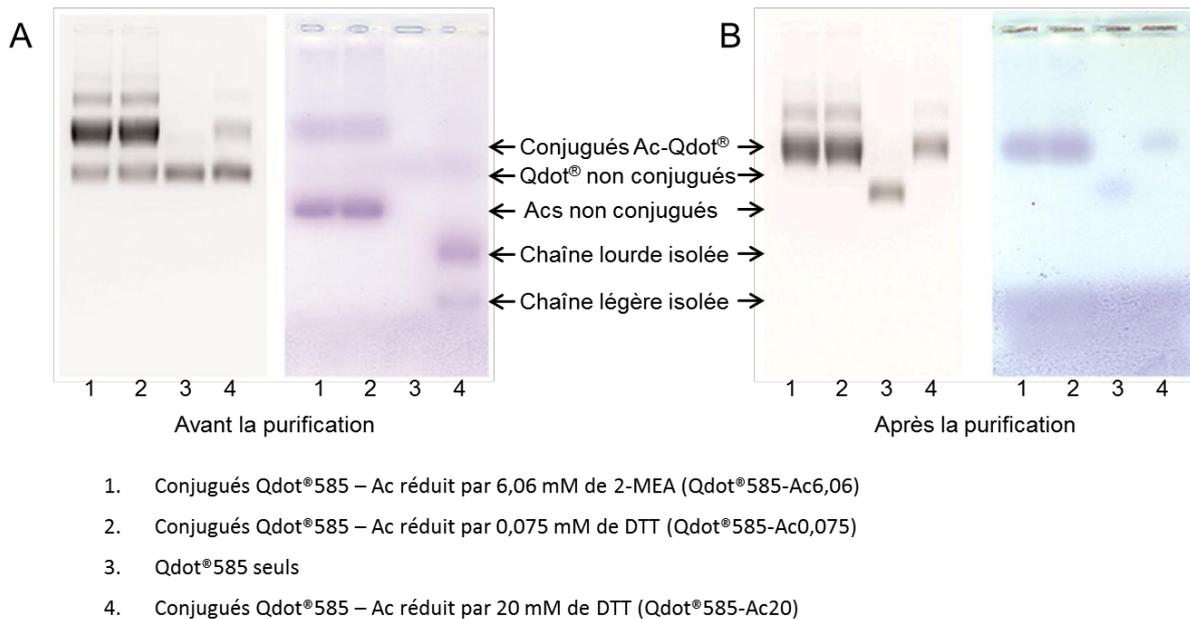
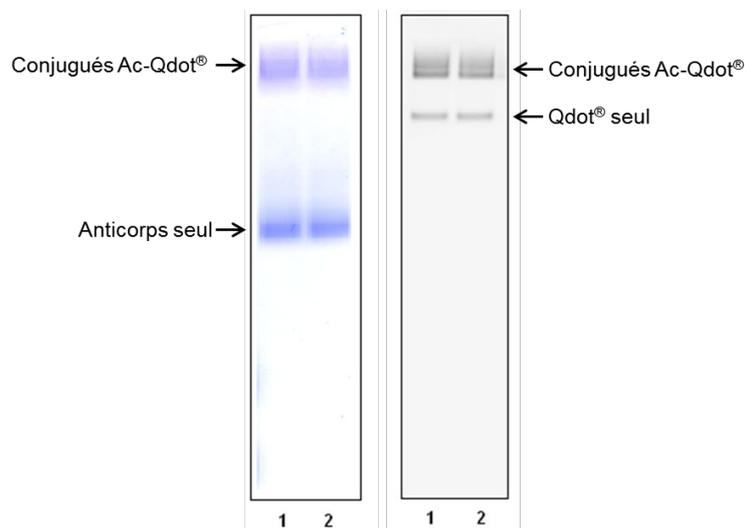


Figure 27 : Efficacité de la conjugaison des Ac aux Qdot® et de la purification des conjugués déterminées par migration dans un gel d'agarose 1,5%. Les conjugués Ac-Qdot®585 ont migré dans un gel d'agarose afin de déterminer le rendement de la conjugaison avant la purification des conjugués (A) et après (B). Pour chacune de ces parties (A et B), les panels de droite sont des colorations de l'anticorps au bleu de Coomassie et les panels de gauche sont des clichés de la fluorescence émise par les Qdot®585 suite à une excitation par lampe U.V. pris avec un chemidoc®.



1. Qdot®585- Ac-SH avec le ratio molaire Ac : SATA de 1 : 6 (notés Qdot®585-Ac-SH6)
2. Qdot®585- Ac-SH avec le ratio molaire Ac : SATA de 1 : 10 (notés Qdot®585-Ac-SH10)

Figure 28 : Profil des conjugués Ac-Qdot® réalisés avec les anticorps traités au SATA déterminé par migration dans un gel d'agarose 1,5%. Les conjugués Ac-Qdot®585 ont migré dans un gel d'agarose afin de déterminer le rendement de la conjugaison. La partie de gauche est une coloration de l'anticorps au bleu de Coomassie et la partie de droite est un cliché de la fluorescence émise par les Qdot®585 suite à une excitation par lampe U.V. pris avec un chemidoc®.

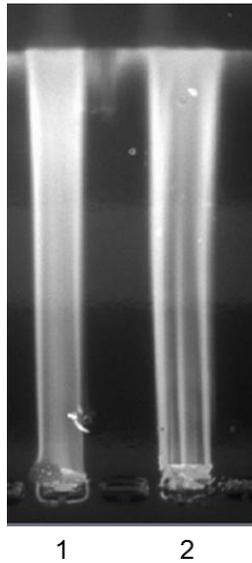
Tous les conjugués ainsi réalisés ont ensuite été purifiés grâce à une migration dans un gel d'agarose 1,5%. Cette purification, simple sur le principe, est assez délicate à réaliser et n'est pas très conventionnelle. La migration en gel d'agarose permet de séparer les différentes espèces en présence après la conjugaison. Dès que la migration est suffisante (lorsque les bandes sont suffisamment séparées), le gel est légèrement incisé pour y créer un petit puits. Ce puits doit être réalisé juste devant la bande d'intérêt correspondante aux conjugués. La migration est poursuivie jusqu'à ce que ces conjugués soient dans le puits, d'où ils vont être pipetés, l'incision du gel étant l'étape la plus délicate de cette étape de purification.

Nous avons donc obtenu de cette manière différents conjugués purifiés :

- Qdot[®]585-Ac réduit par 20 mM de DTT (notés Qdot[®]585-Ac20)
- Qdot[®]585-Ac réduit par 0,075 mM de DTT (notés Qdot[®]585-Ac0,075)
- Qdot[®]585-Ac réduit par 6,06 mM de 2-MEA (notés Qdot[®]585-Ac6,06)

Par contre pour les conjugués réalisés avec les Ac-SH, cette étape de purification n'a pas pu être réalisée car lors de la migration dans le gel d'agarose, une « *trainée* » de Qdot[®]585 est apparue, ce qui laisse suggérer que le nombre d'Ac par Qdot était vraiment trop variable et que des agrégats avaient pu se former. Ces conjugués seront donc testés sans avoir été purifiés (Figure 29, page 111).

Une nouvelle migration dans un gel d'agarose a été réalisée avec ces conjugués purifiés afin de contrôler l'efficacité de la purification. De même, le gel a d'abord été exposé à des U.V. afin de mettre en évidence les Qdot[®]585 avant d'être coloré dans une solution de bleu de Coomassie pour colorer les fragments d'anticorps (Figure 27B, page 109). Les résultats démontrent que la purification a été efficace.



1. Qdot[®]585- Ac-SH avec le ratio molaire
Ac : SATA de 1 : 6 (notés Qdot[®]585-Ac-SH6)
2. Qdot[®]585- Ac-SH avec le ratio molaire
Ac : SATA de 1 : 10 (notés Qdot[®]585-Ac-SH10)

Figure 29 : Profil des conjugués Ac-Qdot[®] réalisés avec les anticorps traités au SATA par migration dans un gel d'agarose 1,5% après l'essai de la purification. Les conjugués Ac-Qdot[®]585 ont migré dans un gel d'agarose afin de pouvoir les séparer des autres espèces en présence, de la même manière que les conjugués Ac-Qdot[®] réalisés avec les Ac réduits. Cliché de la fluorescence émise par les Qdot[®]585 suite à une excitation par lampe U.V. pris avec un chemidoc[®].

Cette étape de purification est très importante car il y aurait compétition entre les fragments d'anticorps libres et les fragments d'anticorps conjugués aux Qdots[®]585 lors de leur utilisation pour le marquage de l'antigène.

4. Tests fonctionnels des différents conjugués Ac-Qdot[®]

La fonctionnalité de ces cinq conjugués Ac-Qdot[®] a été testée par un immunomarquage des cellules T CD4⁺ du sang d'un sujet sain en utilisant 500 000 cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été fraîchement isolées à l'aide d'un gradient de Ficoll, puis ces cellules ont été marquées avec un anticorps de souris anti-CD4 qui a été détecté grâce à des gammes de concentration de nos différents conjugués Qdot[®]585-Ac de chèvre anti-IgG de souris. La fluorescence associée aux cellules a ensuite été mesurée par cytométrie en flux. Les conjugués Ac-Qdot[®]585 ont été excités avec un laser émettant à 488 nm et le filtre utilisé dans le canal FL2 possède une bande passante de 585/42 nm donc toute la fluorescence émise par les nanocristaux est acquise (Table 4, page 87). Un tel marquage va permettre de mettre en évidence deux niveaux d'expression de CD4 par les PBMC : l'un correspond aux lymphocytes T exprimant le CD4 à leur surface et l'autre correspond aux autres cellules qui ne l'expriment pas. A noter qu'une partie des monocytes expriment aussi le CD4 à leur

surface mais ces cellules sont exclues de l'analyse grâce à une sélection des cellules par leur taille et leur granulosité. Ces tests fonctionnels ont été réalisés avec les conjugués avant et après l'étape de purification par migration dans le gel d'agarose à 1,5%.

Lorsque le marquage des cellules est réalisé en utilisant les conjugués non purifiés, on observe un signal de fluorescence qui est bien spécifique. Les conjugués Qdot[®]585-Ac20, malgré le peu d'anticorps fonctionnels qui doivent se trouver à leur surface, permettent un marquage des cellules avec une intensité de fluorescence de 800 U.A. (unité arbitraire) en utilisant 1 µg.mL⁻¹ de conjugués (Figure 30A, page 112). Toutefois, le marquage des cellules grâce aux conjugués réalisés avec des anticorps dont la réduction a été optimisée (les conjugués Qdot[®]585-Ac0,075 et les Qdot[®]585-Ac6,06) présente une sensibilité nettement meilleure. Ces deux conjugués semblent assez similaires au niveau de leur capacité à marquer l'anticorps de souris. L'intensité de fluorescence de ces deux marquages est d'environ 2000 U.A. pour 1 µg.mL⁻¹ de conjugués Ac-Qdot[®] utilisé.

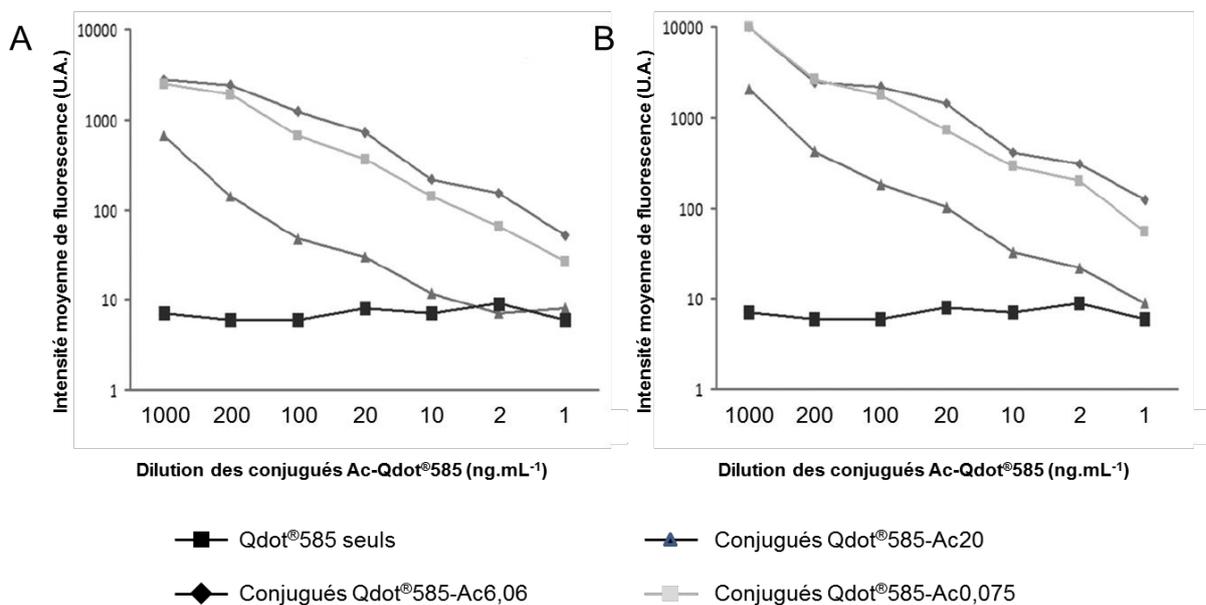


Figure 30 : Efficacité de la détection de CD4 à la surface des cellules en fonction des différents conjugués Ac-Qdot[®] par cytométrie en flux. Les cellules ont été immunomarkées avec un anticorps de souris anti-CD4 qui est détecté par nos différents conjugués quantum dot-anticorps de chèvre anti-souris avant la purification en gel d'agarose (A) et après la purification (B).

Lorsque les mêmes marquages sont réalisés avec des conjugués purifiés, on constate que l'intensité des marquages à $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est meilleure (Figure 30B, page 112). Les intensités de fluorescence détectées sont d'environ 1500 U.A. pour les conjugués Qdot[®]585-Ac20, et de 10000 pour les deux autres conjugués. L'étape de purification permet donc d'améliorer la sensibilité du marquage.

Ces marquages démontrent qu'en optimisant les conditions de réduction de l'anticorps avant sa conjugaison à des QDs via le SMCC, on augmente la sensibilité du marquage par 6, ce qui est très intéressant dans le développement de méthodes à haute sensibilité.

Les marquages de PBMC réalisés avec les différents conjugués Ac-Qdot[®]585 préparés avec les Ac traités avec le SATA ne permettent pas de détecter l'antigène avec une sensibilité suffisante (Figure 31 page 113). Cette faible sensibilité de détection de l'antigène est très certainement due à la présence d'Ac-SH restés libres qui entrent en compétition avec les Ac présents sur les Qdot[®]585. Malgré le nombre contrôlé de groupements fonctionnels sulfhydryles ajoutés aux anticorps, cette stratégie est abandonnée.

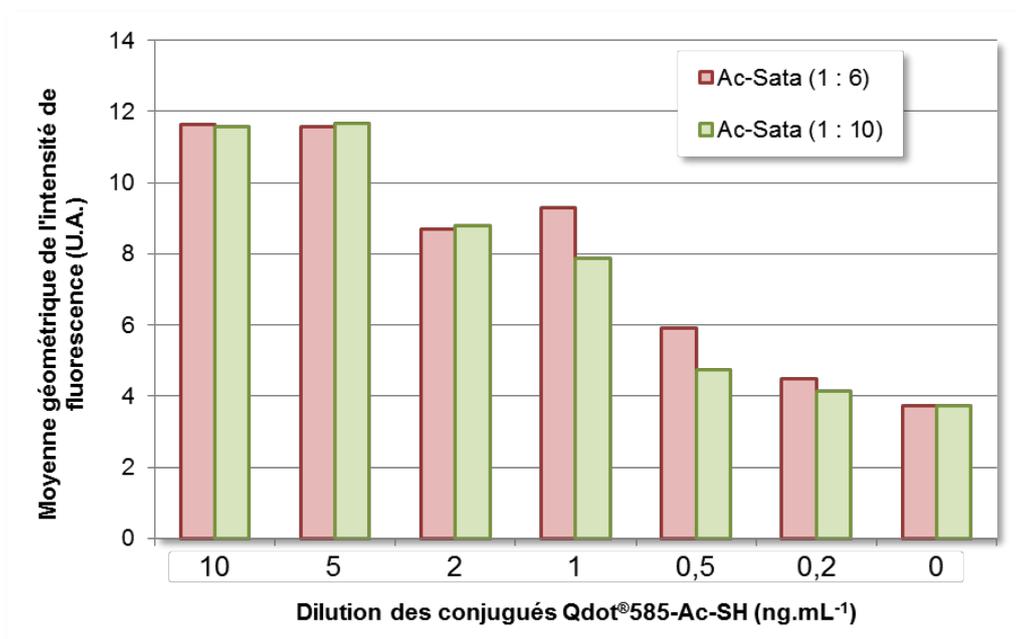


Figure 31 : Test fonctionnel des différents conjugués Qdot[®]-Ac-SH préparés avec le SATA par cytométrie en flux. Marquage de CD4 à la surface de cellules par un anticorps de souris anti-CD4 détecté par les conjugués Qdot[®]-Ac préparés à partir d'anticorps traités au SATA, avec les deux ratios molaires anticorps : SATA de 1 : 6 et 1 : 10.

5. Limite de détection de ces différents conjugués

La limite de détection présentée par les trois conjugués Qdot[®]-Ac de chèvre anti-IgG de souris a été testée par Dot-blot. Pour cela, plusieurs quantités d'anticorps de souris ont été déposées sur une membrane de type PVDF, puis les différentes membranes ont été incubées dans une solution contenant un de nos trois conjugués Qdot[®]-Ac. Cette méthode simple permet de déterminer la quantité minimale détectable par les conjugués Qdot[®]-Ac. L'émission de fluorescence a ensuite été détectée à l'aide du Chemidoc[®]. Les résultats présentés dans la figure 32 (Page 115) permet de déterminer que les conjugués Qdot[®]-Ac réalisés avec des réduction ménagées de l'anticorps présentent une limite de détection de 1 ng, ce qui est environ 100 fois meilleur que celle observée pour les conjugués réalisés selon le protocole commercial (100 ng).

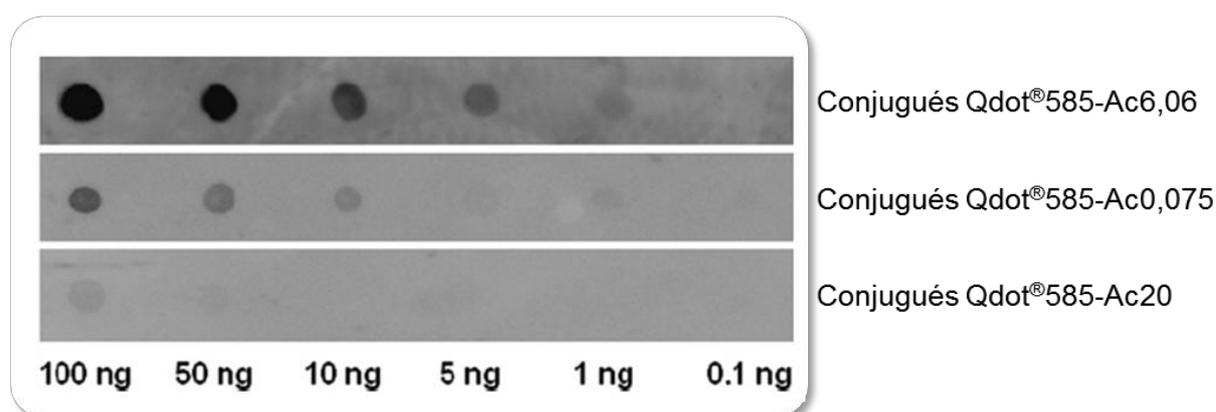


Figure 32 : Détermination de la limite de détection des conjugués Qdot[®]-Ac. Les trois conjugués réalisés avec des anticorps de chèvre anti-IgG de souris réduits ont été utilisés pour détecter une gamme de quantités d'anticorps de souris anti-CD4 humain.

II) Utilisation conjointe de QD et de sdAb

La suite du travail réalisé porte sur la mise en place de conditions d'utilisation d'anticorps simple domaines (sdAb) biotinylés détectés par des conjugués streptavidine-QD commerciaux (SA-Qdot[®]) pour réaliser des marquages de lignées cellulaires en cytométrie de flux. Malgré tous les avantages des sdAb et des QDs, très peu d'études rapportent leur utilisation conjointes [Zaman et al., 2011, Sukhanova et al., 2011 et Zaman *et al.*, 2009]. Ce travail a pour but de permettre la détection avec une très grande sensibilité de l'antigène. De ce fait, les marquages immunologiques ont été réalisés en utilisant des gammes de concentration d'anticorps afin de pouvoir observer l'évolution de la sensibilité de détection de

l'antigène lorsque l'anticorps n'est plus en condition saturante. Le caractère innovant de cette approche est particulièrement intéressant.

Pour cette étude, nous avons travaillé avec des sdAb anti-antigène carcino-embryonnaire (CEA, « *carcinoembryonic antigen* »). Le marquage immunologique a été réalisé sur deux lignées cellulaires de souris différentes : MC38 et MC38-CEA. Les cellules MC38 est une lignée cellulaire murine issue d'un adénocarcinome d'un cancer du côlon et n'expriment pas le CEA à leur surface et sont utilisées en tant que contrôle négatif. Les cellules MC38-CEA sont des cellules MC38 transfectées de manière stable pour exprimer le CEA humain à leur surface [Robbins *et al.*, 1991]. Le choix de ces cellules a été motivé par l'opportunité de travailler sur deux modèles cellulaires faciles à produire et quasiment identiques. Le marquage immunologique sera donc bien spécifique au CEA, il ne s'agira donc pas d'un marquage aspécifique dû à une autre molécule exprimée par les cellules. Ces cellules nous ont été gracieusement données par l'équipe du Pr. Daniel Baty, notre collaborateur à Marseille tout comme les sdAb anti-CEA (clone 17).

1. Choix de l'utilisation du système biotine/streptavidine

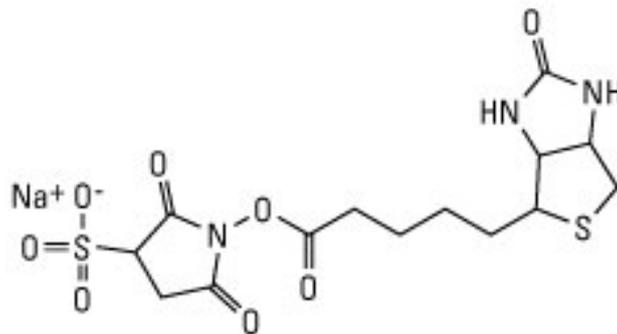
La stratégie choisie pour lier des sdAb et des QDs consiste en l'utilisation du système biotine/streptavidine. L'affinité de la streptavidine pour la biotine étant d'environ 10^{-15} M [Green, 1990], cela implique que l'utilisation de ce système permet de lier de façon très stable, et presque de manière irréversible, la molécule biotinylée aux conjugués SA-Qdot[®]. De plus, l'utilisation de ce système est très souple puisque n'importe quel anticorps peut être biotinylé et donc elle peut s'adapter très facilement à tout autre antigène étudié. De la même manière, les conjugués SA-Qdot[®] peuvent être adaptés aux appareils de détection de signal fluorescent dont on dispose ou ces conjugués peuvent être réalisés soi-même si on préfère utiliser des QD possédant des caractéristiques différentes que ceux synthétisés par Invitrogen. Ce système couramment utilisé présente donc de nombreux avantages mais aussi quelques inconvénients dont le principal réside dans l'augmentation de la taille de la sonde fluorescente. En effet la présence de plusieurs streptavidines à la surface du QD augmente la taille de la sonde. Cette augmentation de taille ne perturbe pas trop un marquage de lignées cellulaire en phase liquide, mais peut vite être un facteur limitant lors de marquages en immunohistochimie ou plus simplement en support solide où l'encombrement stérique joue un rôle plus important.

2. Méthodes de biotinylation envisagées

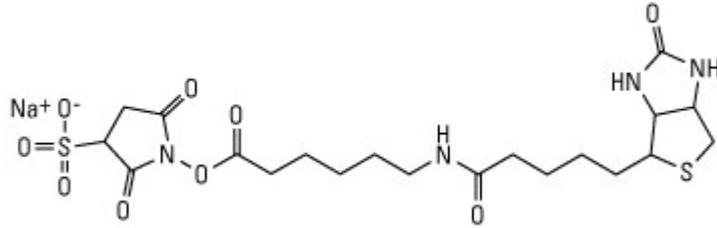
Deux méthodes de biotinylation ont été testées dans notre approche : une biotinylation chimique des sdAbs par des agents de biotinylation et une biotinylation enzymatique réalisée par une enzyme lors de la production des sdAb par *E. coli*. Ces deux approches présentent des caractéristiques différentes.

a) Biotinylation chimique *in vitro*

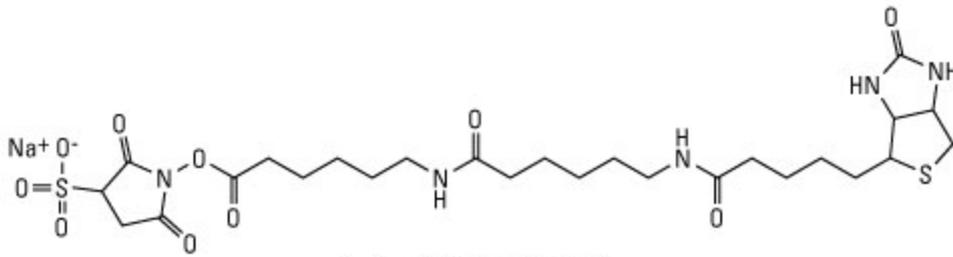
La biotinylation chimique a été réalisée *in vitro* et permet d'ajouter une ou plusieurs biotines par sdAb. Pour cela nous avons choisi trois agents de biotinylation différents : le sulfo-NHS-biotine, le sulfo-NHS-LC-biotine et le sulfo-NHS-LCLC-biotine. Ces trois agents de biotinylation possèdent un groupement NHS (*N*-hydroxysuccinimide) qui interagit avec les amines primaires pour y accrocher un bras espaceur et la biotine. Ils se différencient par la présence de la chaîne carbonée, appelée par le fabricant LC, qui influence la longueur du bras espaceur reliant l'amine primaire à la biotine. La longueur séparant le sdAb de la biotine peut avoir un impact sur la capacité de reconnaissance de la biotine par les conjugués SA-Qdot[®] lorsque le sdAb biotinylé sera fixé à l'antigène cible. L'ajout de biotine sur les amines primaires est la technique de biotinylation la plus courante. Comme pour l'ajout de groupements fonctionnels sulfhydriles sur les anticorps, on peut contrôler le nombre de biotines ajoutées en modifiant le ratio molaire sdAb : agent de biotinylation utilisé. Cette méthode de biotinylation sera appelée biotinylation *in vitro*. Les formules de ces trois agents de biotinylation sont présentées ci-dessous :



Sulfo-NHS-biotine (le bras espaceur mesure 1,35 nm)



Sulfo-NHS-LC-biotine (le bras espaceur mesure 2,24 nm)



Sulfo-NHS-LCLC-biotine (le bras espaceur mesure 3,05 nm)

La présence du groupement NHS permet de lier de façon covalente la biotine sur les amines primaires. Le détail de la réaction entre un anticorps et l'agent de biotinylation sulfo-NHS-biotine est schématisé dans la Figure 32 (page 117).

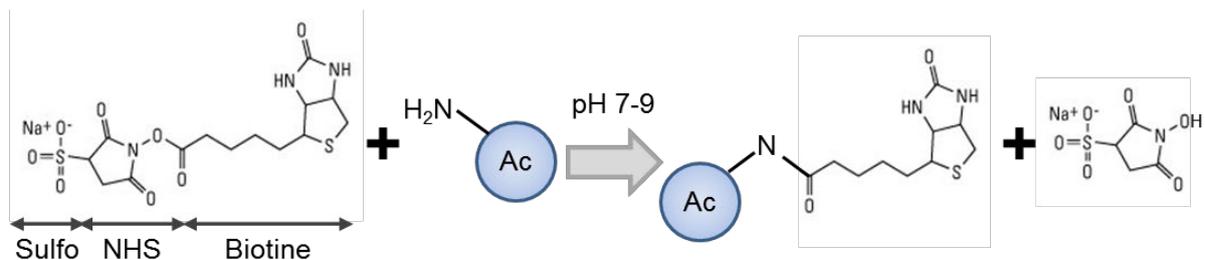


Figure 33 : Schéma de la réaction entre les amines primaire de l'anticorps et l'agent de biotinylation sulfo-NHS-biotine. Les autres agents de biotinylation (sulfo-NHS-LC biotine et sulfo-NHS-LCLC-biotine) suivent la même réaction mais possèdent une chaîne carbonée (LC) présente un ou deux fois entre le groupement NHS et la biotine. Cette chaîne LC sera donc au final entre l'amine primaire de l'anticorps biotinylé et la biotine.

b) Biotinylation enzymatique *in vivo*

La biotinylation enzymatique des sdAb anti-CEA par l'enzyme BirA a lieu lors de leur synthèse dans des bactéries *E. coli*. Ces bactéries ont été transformées pour produire les sdAb d'intérêt mais aussi l'enzyme BirA. Brièvement, la séquence qui code pour le sdAb anti-CEA clone 17, a été modifiée pour qu'une séquence polypeptidique spéciale soit présente à l'extrémité C-terminale du sdAb. Cette séquence ajoutée est spécifique à l'enzyme BirA qui va y lier la biotine. Cette méthode de biotinylation sera appelée biotinylation *in vivo*.

Cette méthode permet d'avoir une seule biotine par sdAb, positionnée en C-terminale. La position de la biotine est optimale pour être reconnue par les conjugués SA-Qdots que l'on va utiliser pour détecter les sdAb liés au CEA.

Cette biotinylation a été développée et réalisée par le Docteur Klervi Even-Desrumeaux au sein de l'équipe du Professeur Daniel Baty et a fait l'objet d'une publication [Even-Desrumeaux *et al.*, 2010].

3. Choix du conjugué commercial streptavidine-Qdot®

La fluorescence associée aux cellules MC38 et MC38-CEA marquées successivement par les sdAb biotinylés puis les conjugués SA-Qdot® a été enregistrée grâce à un cytomètre en flux Guava® esaycyte™ plus, développé par Millipore. Celui-ci permet de faire l'acquisition de la fluorescence associée aux cellules qui seront distribuées dans des microplaques 96 puits. Cet appareil permet, comme le BD FACSCalibur d'exciter les fluorochromes avec un laser émettant à 488 nm et possède quatre canaux différents capables de capter un signal fluorescent, les bandes passantes de ces différents canaux sont présentées dans la table 5 (page 88). Plusieurs marquages immunologiques des cellules MC38 et MC38-CEA ont été réalisés en utilisant 100 ng de sdAb biotinylés *in vitro* détectés par différents types de conjugués commerciaux : des SA-Qdot®525, des SA-Qdot®565 et des SA-Qdot®800. La sensibilité des trois conditions de marquage a été comparée afin de déterminer le meilleur conjugué pour cet appareil (qui excite qu'à 488 nm, ce qui n'est pas du tout optimal pour les QDs). Théoriquement, les conjugués émettant leur pic de fluorescence à 800 nm doivent permettre une meilleure sensibilité car ce sont ceux qui absorbent le plus de photons à 488 nm. Les coefficients d'extinction molaire de ces différents SA-Qdot® commercialisés par

Invitrogen (d'après l'appendice 3 de la notice des conjugués SA-Qdot[®]) sont répertoriés dans la table ci-dessous.

	350 nm	405 nm	488 nm	532 nm
Qdot [®] 525	710 000	360 000	130 000	-
Qdot [®] 565	1 900 000	1 100 000	290 000	139 000
Qdot [®] 585	3 500 000	2 200 000	530 000	305 000
Qdot [®] 800	12 600 000	8 000 000	3 000 000	2 000 000

Table 6 : Coefficients d'extinction molaires de différents Qdot[®] en fonction de la longueur d'onde d'excitation. L'unité est le $cm^{-1}.M^{-1}$. Les données sont fournies par Invitrogen. Les coefficients d'extinction molaire à 488 nm sont grisés.

Les résultats démontrent clairement que la sensibilité du marquage est nettement meilleure avec les conjugués SA-Qdot[®]800 (Figure 33, page 119). La différence de la sensibilité du marquage du CEA en utilisant ces trois conjugués SA-Qdot[®] commerciaux est sans doute due aux coefficients d'extinction molaire. Pour la suite des immunomarquages, les sdAb anti-CEA biotinylés seront donc détectés grâce à des conjugués streptavidine-Qdot[®] émettant à 800 nm (SA-QD[®]800). La présence d'un faible signal de fluorescence détecté sur les cellules en absence d'anticorps permet de constater que la concentration conseillée par Invitrogen (entre 10 nM et 40 nM) pour ces marquages de ces cellules est trop forte (nous avons utilisé 10 nM de conjugués pour cette expérience).

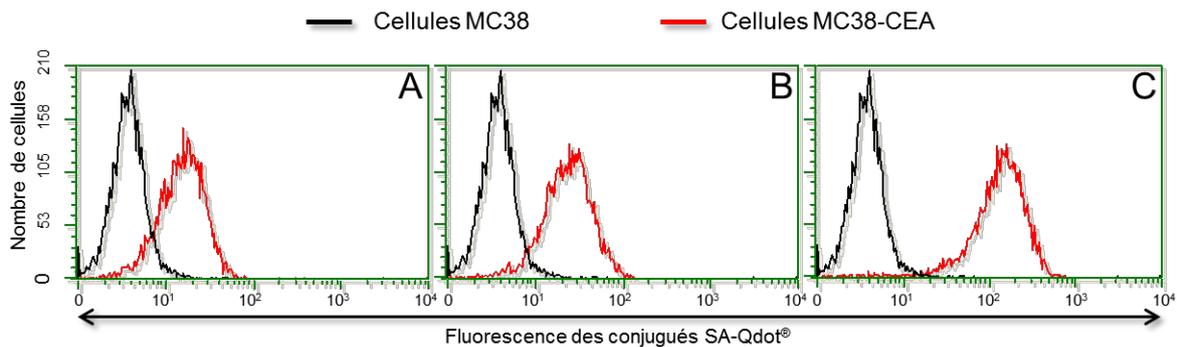
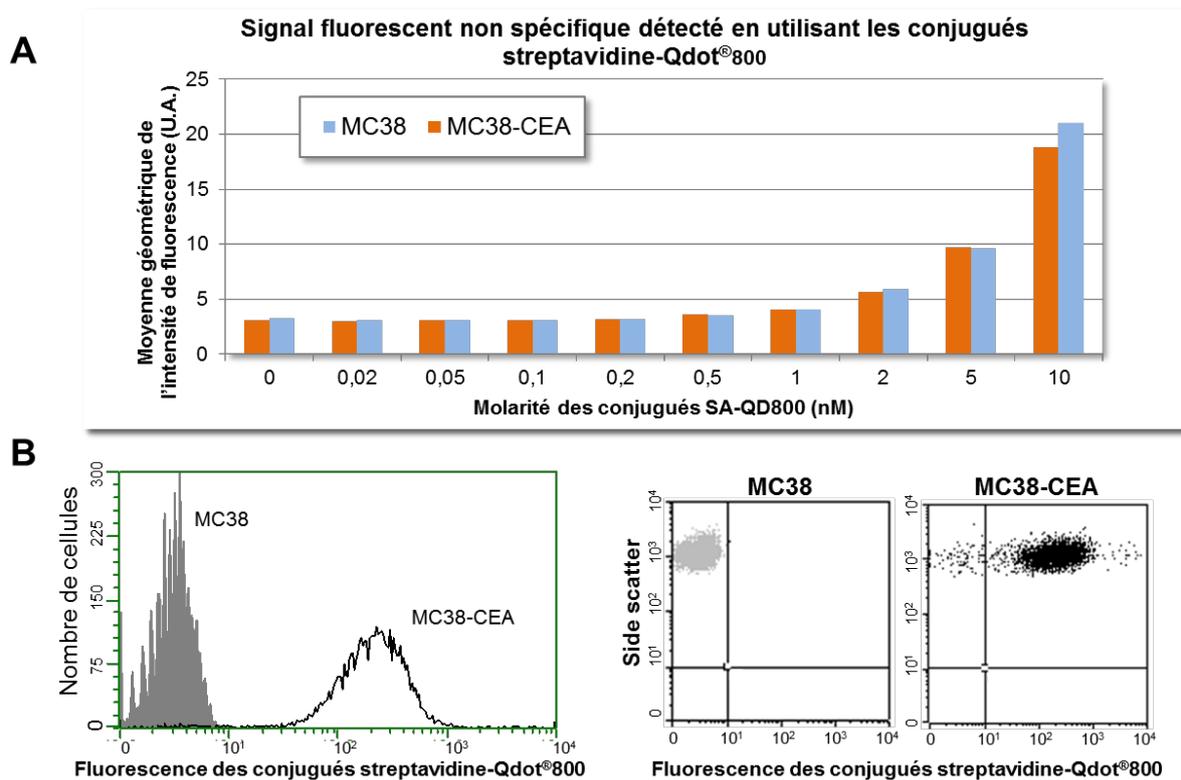


Figure 34 : Détermination par cytométrie en flux du meilleur conjugué streptavidine-Qdot[®] pour le marquage du CEA. 100 000 cellules MC38 et MC38-CEA ont été marquées avec 100 ng d'anticorps simple domaine anti-CEA puis avec 1 nM de trois conjugués streptavidine-Qdot[®] : SA-Qdot[®] 525 (A), SA-Qdot[®] 565 (B) et SA-Qdot[®] 800 (C).

4. Détermination de la concentration optimale des conjugués SA-Qdot[®] 800

Une gamme de concentration des conjugués SA-Qdot[®] 800 de 0,02 nM à 10 nM a été réalisée afin de déterminer la meilleure concentration (celle qui ne présentera pas de fixation non spécifique) à utiliser sur les cellules MC38 et MC38-CEA. Les conjugués ont été incubés avec les cellules sans qu'aucun anticorps ne soit présent. Les résultats présentés dans la figure 34A (page 120) démontrent que la meilleure concentration de conjugués SA-Qdot[®] 800 sur les lignées cellulaires utilisées est 1 nM que les cellules expriment ou non le CEA à leur surface. Cette concentration de conjugués sera utilisée pour les prochains marquages immunologiques réalisés sur les lignées cellulaires.

Des marquages des cellules MC38 et MC38-CEA ont ensuite été réalisés afin de contrôler la qualité du marquage en utilisant 100 ng d'anticorps simple domaine biotinylé détecté par 1 nM de conjugués SA-Qdot[®] 800. Aucune fluorescence n'est détectable pour les cellules MC38, qui n'expriment pas le CEA, tandis que les cellules MC38-CEA, qui expriment le CEA, permettent la détection d'un signal de fluorescence (Figure 34B, page 120). Le marquage des cellules MC38-CEA permet de constater que toute la population de cellule est marquée, ce qui est attendu puisque les cellules sont sélectionnées pour co-exprimer le CEA et le gène de résistance à la généticine. Dans de telles conditions le ratio signal/bruit de fond (fluorescence détectée pour les cellules MC38-CEA/fluorescence détectée pour les cellules MC38) est d'environ 40.



5. Optimisation de la biotinylation *in vitro*

a) Comparaison des différents agents de biotinylation

La première étape de l'optimisation de la biotinylation *in vitro* a consisté à déterminer quel agent de biotinylation permettait la détection la plus sensible du CEA à la surface des cellules. Pour cela les sdAb anti-CEA ont été biotinylés parallèlement avec trois agents de biotinylation : le sulfo-NHS-biotine, le sulfo-NHS-LC-biotine et le sulfo-NHS-LCLC-biotine, en utilisant le protocole conseillé par le fabricant. Les biotynylations ont été réalisées en utilisant un ratio molaire sdAb : agent de biotinylation de 1 : 20. Puis des gammes de quantité de ces différents anticorps biotinylés ont été réalisées sur un nombre fixe de cellules MC38 et MC38-CEA. Cette gamme utilise de 0,01 ng à 100 ng de sdAb biotinylés pour marquer

100 000 cellules (ce qui correspond à une gamme de concentration de 0,56 fmol à 5,56 pmol). Les sdAb biotinylés avec le sulfo-NHS-biotine sont annotés sdAb-biotine, ceux biotinylés avec le sulfo-NHS-LC-biotine sont annotés sdAb-LC-biotine et enfin ceux biotinylés avec le sulfo-NHS-LCLC-biotine sont annotés sdAb-LCLC-biotine. La comparaison de ces trois gammes démontre que la présence de la chaîne carbonée n'influence que légèrement la capacité d'interaction de la biotine avec les conjugués streptavidine-Qdot® (Figure 35, page 121). De plus, ces trois gammes permettent de constater que la quantité minimale de sdAb biotinylés à utiliser semble être de 1 ng soit 56 fmol. Pour les futures biotinylation du sdAb anti-CEA, l'agent de biotinylation sulfo-NHS-LCLC-biotine sera utilisé.

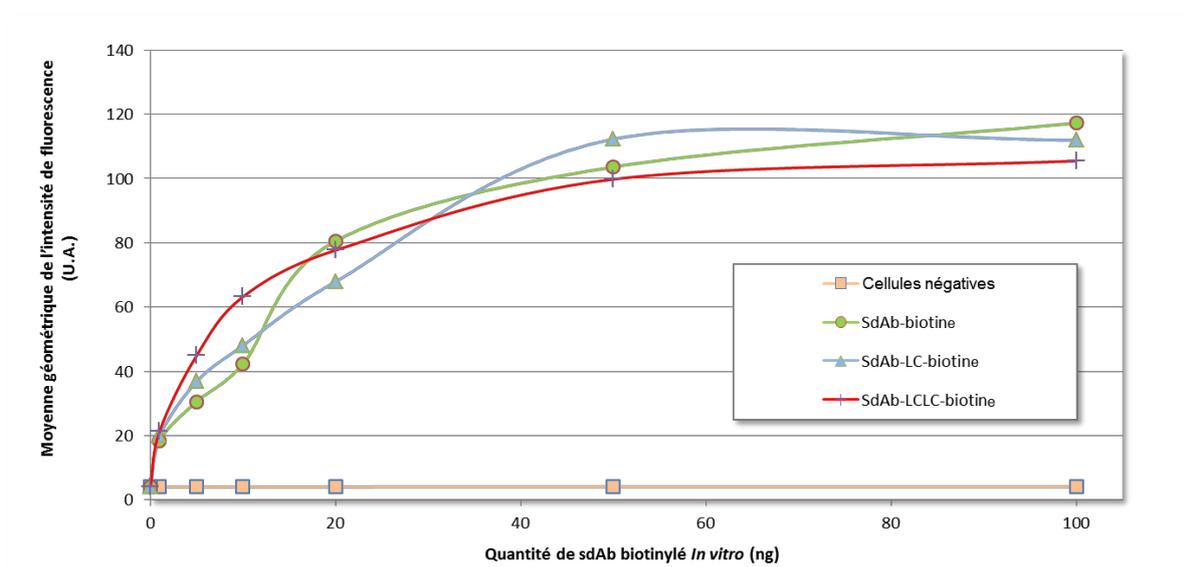


Figure 36 : Détermination par cytométrie en flux du meilleur agent de biotinylation des anticorps simple domaine. L'anticorps simple domaine anti-CEA a été biotinylé chimiquement *in vitro* grâce à plusieurs agents de biotinylation : sulfo-NHS-biotine, sulfo-NHS-LC-biotine et sulfo-NHS-LCLC-biotine puis révélés par les conjugués SA-Qdot®800. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

b) Nombre de biotines ajoutées par sdAb

Lors de la biotinylation *in vitro*, le nombre de biotines ajoutées est contrôlable en faisant varier le ratio molaire sdAb : agent de biotinylation utilisé. La séquence peptidique du sdAb

anti-CEA (clone 17) a été déterminée et publiée [Behar *et al.*, 2009], si bien que le nombre et l'emplacement des amines primaires est lui aussi connu (Figure 36, page 122).

```

/          FR1          /   CDR1   /          FR2          /   CDR2
1          10          20          30          40          50          60
12345678901234567890123456 789012345678 901234567890123456 7890123456
EVQLVESGG.GFVQAGESLTLSTSS TLTFL...TPY RMAWYRQAPGKQRDLVAD ISSGDGRIT.

/          FR3          /   CDR3   /   FR4   /
70          80          90          100          110          120
789012345678901234567890123456789012345 6789012345678 90123456789
NYADFAK.GRFTISRDNIKNTVFLRMTNLIKPEDTAVYYC NTFVSF.VGIARS WGQGTQVTVSS

```

Figure 37 : Séquence peptidique de l'anticorps simple domaine anti-CEA (clone 17). La numérotation est celle de l'IMGT® (« International immunogenetic information system ») [Lefranc]. La localisation des régions de charpente (FR1 à FR4) et des régions déterminantes de la complémentarité (CDR1 à CDR3) sont indiquées. L'emplacement des quatre lysines (K) est noté en rouge.

Le sdAb anti-CEA utilisé possède quatre lysines dont aucune n'est présente dans les régions déterminantes de complémentarité (CDR). Ceci est très important car la biotinylation de ce sdAb a permis l'ajout de une à cinq biotines (les quatre lysines + l'extrémité N-terminale) et théoriquement aucune des biotines ajoutées ne devrait pas gêner la reconnaissance du CEA par le sdAb. Toutefois, plusieurs ratios molaires sdAb : agent de biotinylation ont été testés afin de vérifier que l'ajout de biotine ne perturbe pas la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps. Les ratios molaires sdAb : sulfo-NHS-LCLC-biotine testés sont 1 : 20 ; 1 : 30 et 1 : 50. Le nombre moyen de biotines ajoutées par sdAb a ensuite été déterminé grâce à un kit commercialisé par Pierce. Ce kit utilise un complexe HABA-avidine. L'avidine est comme la streptavidine, une molécule qui présente une forte affinité pour la biotine. De ce fait, lorsque les sdAb biotinylés sont ajoutés à la solution de HABA-avidine, l'HABA (acide 4'-hydroxyazobenzène-2-carboxylique) va être chassé par la biotine. Une fois libre la molécule HABA perd sa capacité à absorber la lumière à 500 nm. Ce kit permet donc, grâce au suivi de l'absorbance à 500 nm (avant et après l'ajout du sdAb biotinylé), de déterminer le nombre de mole de biotine présent dans l'échantillon. Le nombre de mole de sdAb ajouté est lui connu, on peut donc déterminer le nombre de mole de biotine pour le nombre de sdAb et donc le

nombre moyen de biotine par anticorps. Les ratios molaires sdAb : sulfo-NHS-LCLC-biotine testés permettent l'ajout d'environ : 1,6 biotines par sdAb avec le ratio molaire 1 : 20 ; 2,6 biotines par sdAb avec le ratio molaire 1 : 30 et 4,1 biotines par sdAb avec le ratio molaire 1 : 50 (Table 7, page 123). Ces résultats sont des nombres moyens de biotines ajoutées par anticorps. Dans le cas où 1,2 biotine sont ajoutées par anticorps, la majorité des anticorps n'auront qu'une seule biotine tandis que d'autres en auront deux (et peut être une minorité ne seront pas biotinylés).

Ratio molaires anticorps : sulfo-NHS-LCLC-biotine	1 : 20	1 : 30	1 : 50
Nombre de biotines ajoutées par sdAb (clone 17)	1,2	2,6	4,1

Table 7 : Estimation du nombre moyen de biotines ajoutées par anticorps simple domaine anti-CEA. Plusieurs ratios molaires, anticorps simple domaine : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont été utilisés pour la biotinylation des anticorps simple domaines anti-CEA : 1 : 20 ; 1 : 30 et 1 : 50. le nombre moyen de biotine par anticorps simple domaine a été estimé grâce au kit de quantification des biotines commercialisé par Pierce (« Pierce® biotin quantitation kit ») et calculé grâce au « HABA-calculator » (www.piercenet.com/aba/habacalc.cfm). Les valeurs sont la moyenne de trois mesures.

La fonctionnalité de ces sdAb différemment biotinylés a été étudiée en cytométrie en flux sur les lignées cellulaire MC38 et MC38-CEA. Ceci permet à la fois de comparer la conservation de la fonction de reconnaissance antigénique des sdAb et la capacité des conjugués à reconnaître les sdAbs biotinylés fixés au CEA. En effet, les sdAb biotinylés sont de toutes petites molécules comparé aux conjugués streptavidine-Qdot®800, donc ils peuvent atteindre et fixer des antigènes difficilement accessible aux conjugués SA-Qdot®800. La comparaison de ces trois ratios molaires utilisés démontre que le nombre de biotine présent à la surface du sdAb n'influence pas la sensibilité de la détection (Figure 37, page 124). Ceci laisse suggérer que le nombre de biotines présentes sur le sdAb ne limite pas la fonction de reconnaissance antigénique et qu'une seule biotine sur le sdAb est suffisante pour que les conjugués SA-Qdot®800 se lient au sdAb. Pour la suite, les sdAb seront biotinylés avec un ratio molaire sdAb : sulfo-NHS-LCLC-biotine de 1 : 50.

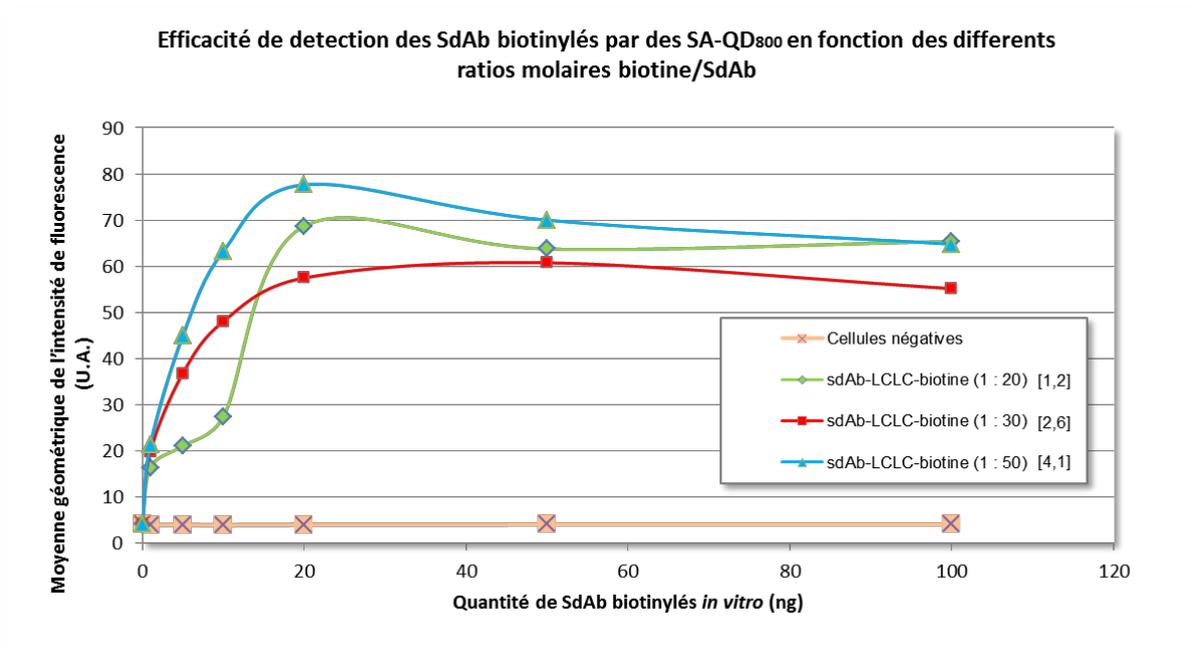


Figure 38 : Détermination par cytométrie en flux de l'influence du nombre de biotine ajouté à l'anticorps simple domaine sur la sensibilité de détection du CEA. Plusieurs ratios molaires, anticorps simple domaine : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont été utilisés pour la biotinylation des anticorps simple domaines anti-CEA : 1 : 20 ; 1 : 30 et 1 : 50. La sensibilité de la détection du CEA sur les cellules MC38 et MC38-CEA a été déterminé par cytométrie en flux. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Le nombre moyen de biotine ajoutée par anticorps monoclonal selon les ratios molaires est indiqué entre crochets.

6. Comparaison fonctionnelle des deux méthodes de biotinylation

Des marquages immunologiques ont été réalisés sur les cellules MC38 et MC38-CEA avec les sdAb anti-CEA biotinylés soit *in vivo*, soit *in vitro* détectés par des conjugués SA-Qdot[®]800. Une gamme de concentration des sdAb allant de 0,6 fmol à 5,55 pmol a été utilisée lors de ces marquages, le but étant de comparer la sensibilité maximale des deux méthodes mais aussi de mettre en évidence d'éventuelles différences lorsque l'on n'est pas dans des conditions saturantes en anticorps. Dans des conditions saturantes en sdAb biotinylés, on observe que le marquage réalisé avec ceux biotinylés *in vivo* est plus sensible que le marquage réalisé avec les sdAb biotinylés *in vitro* (Figure 38, page 125). En effet, pour 5,55 pmol de sdAb utilisé, l'intensité de fluorescence moyenne du marquage avec les sdAb biotinylés *in vivo* est de 150 U.A. alors qu'avec les sdAb biotinylés *in vitro*, l'intensité de fluorescence moyenne est de 111 U.A.. Toutefois, cette différence s'amenuise très rapidement

lorsque l'on diminue la quantité d'anticorps utilisés pour marquer le CEA à la surface des cellules. Lorsque la molarité des sdAb biotinylés est faible, les deux méthodes de biotinylation sont équivalentes et présentent toutes les deux un seuil de détection de 0,6 fmol d'anticorps utilisés. Le signal de fluorescence détecté pour ces valeurs d'anticorps a été défini comme spécifique dès que la valeur de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence dépasse celle mesurée sans anticorps additionnée de trois fois l'écart type. Les valeurs des moyennes géométriques de la fluorescence détectée ainsi que l'écart type des conditions sans anticorps sont données dans la Table 8 (page 126).

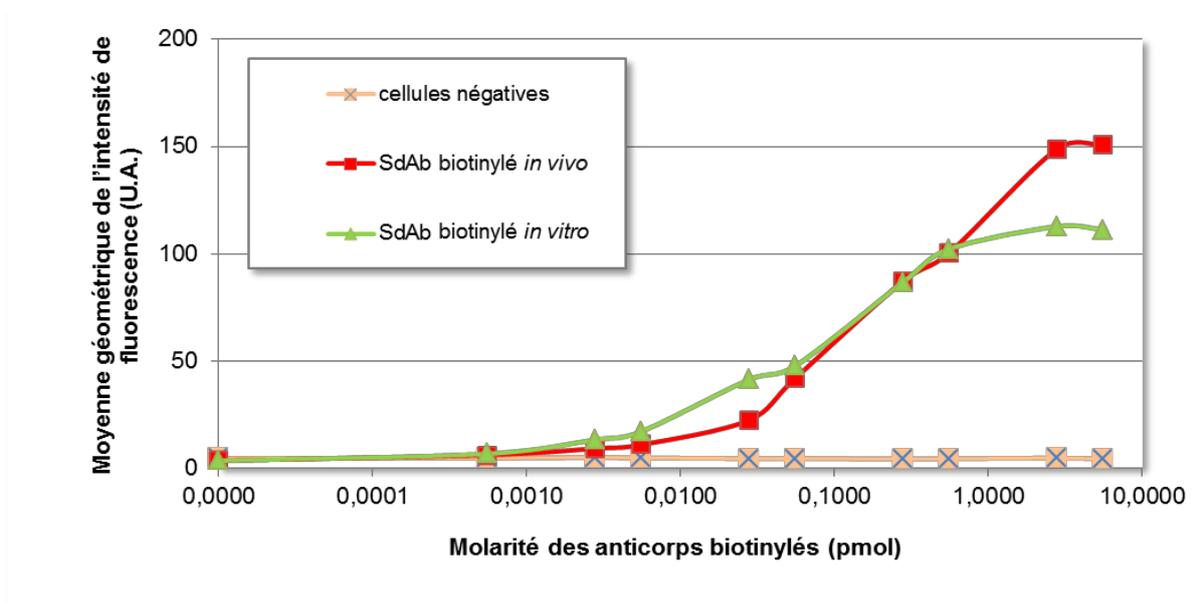


Figure 39 : Comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés in vivo ou in vitro. Les cellules MC38 et MC38-CEA ont été immunomarkées avec des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés in vitro ou in vivo. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de onze expériences indépendantes.

Molarité des anticorps (pmol)	5,549	2,775	0,5549	0,2775	0,0555	0,0277	0,0055	0,0028	0,0006	0
Cellules négatives	3,78	3,96	3,86	3,77	3,88	3,73	3,88	4,05	3,88	3,65 (+/- 0,38)
sdAb-biotine <i>in vivo</i>	150,75	148,85	100,53	87,27	42,11	22,52	11,13	9,37	6,30 (+/- 1,02)	3,76 (+/- 0,52)
sdAb-biotine <i>in vitro</i>	111,28	112,81	102,30	86,79	47,82	41,46	17,30	13,44	6,92 (+/- 0,84)	3,70 (+/- 0,78)

Table 8 : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés *in vivo* ou *in vitro*. Les cellules MC38 et MC38-CEA ont été immunomarquées avec des anticorps simple domaine anti-CEA biotinylés *in vitro* ou *in vivo*. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de onze expériences indépendantes. L'écart type est noté entre parenthèses pour les valeurs des marquages sans anticorps car il est utilisé pour déterminer la limite de sensibilité ; ainsi que pour les seuils de sensibilité déterminés. Les cases grisées correspondent aux limites de détection pour chaque type de biotinylation déterminée selon nos critères.

7. Biotinylation *in vitro* d'un anticorps monoclonal anti-CEA

L'utilisation conjointe d'anticorps simple domaine et de quantum dot est innovante. Seules trois publications ont été publiées à ce jour [Zaman *et al.*, 2011, Sukhanova *et al.*, 2012 et Zaman *et al.*, 2009]. La comparaison entre des marquages immunologiques réalisés avec des sdAb anti-CEA biotinylé *in vitro*, des sdAb anti-CEA biotinylés *in vivo* et des anticorps monoclonaux de souris anti-CEA semble pertinente malgré la différence d'affinité de ces anticorps pour le CEA et qu'un anticorps monoclonal est divalent.

L'anticorps monoclonal (mAc) de souris anti-CEA (CLB 139) est commercialisé en solution supplémenté avec de la BSA. Il a dû être purifié sur une colonne de protéine-G avant d'être biotinylé pour éliminer toute trace de BSA qui contient des amines primaires et perturberait la réaction de biotinylation. La qualité de la purification a été contrôlée à chaque fois par électrophorèse SDS-PAGE pour comparer le contenu protéique de la solution avant et après purification. L'affinité de cet anticorps pour le CEA n'a pas été déterminée. Le sdAb anti-CEA a, quant à lui, une affinité de 8,3 nM et est monovalent [Behar *et al.*, 2009]. Avant de

pouvoir comparer les marquages réalisés avec ces trois anticorps biotinylés différents, la biotinylation *in vitro* du mAc a été optimisée.

a) Comparaison des différents agents de biotinylation

Les mêmes agents de biotinylation ont été utilisés pour biotinyler le mAc que ceux utilisés pour biotinyler le sdAb. La première étape de l'optimisation de la biotinylation du mAc a été de déterminer si la longueur du bras espaceur influence la fonction de reconnaissance antigénique de l'Ac. La comparaison de la sensibilité de la détection du CEA par les Acs monoclonaux biotinylés avec les trois agents de biotinylation révélés par des conjugués SA-Qdot[®]800 a été réalisée sur des cellules MC38 et MC38-CEA avec une gamme de quantité d'Ac biotinylé. Les résultats démontrent que ni la présence et ni la longueur de la chaîne LC n'influence pas la sensibilité de la détection du CEA (Figure 39 page 128). Donc l'agent de biotinylation retenu est le sulfo-NHS-LCLC-biotine qui nous a déjà servi à biotinyler le sdAb anti-CEA.

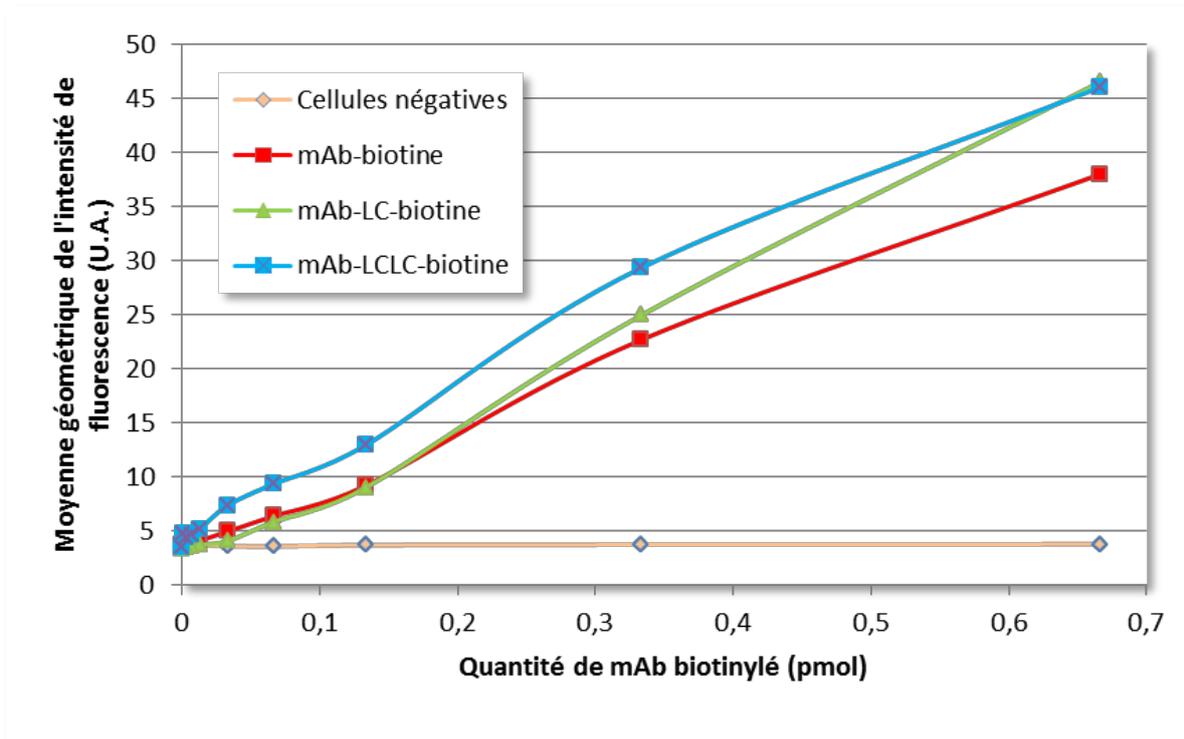


Figure 40 : Détermination par cytométrie en flux du meilleur agent de biotinylation des anticorps monoclonaux. L'anticorps monoclonal anti-CEA a été biotinyllé chimiquement in vitro grâce à plusieurs agents de biotinylation : sulfo-NHS-biotine, sulfo-NHS-LC-biotine et sulfo-NHS-LCLC-biotine puis révélés par les conjugués SA-Qdot®800. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

b) Nombre de biotine par mAc

Pour l'Ac monoclonal anti-CEA, la séquence peptidique est inconnue donc on ne connaît ni le nombre, ni l'emplacement des amines primaires à la différence du sdAb précédemment utilisé. Les amines primaires peuvent être présentes dans les domaines variables des chaînes lourdes et légères. Bien qu'un anticorps conventionnel (de type IgG) soit divalent, l'ajout d'une biotine sur un site de reconnaissance antigénique limite cette fonction de l'anticorps. Le nombre de biotine ajouté à un Ac monoclonal est donc un paramètre important qui doit être contrôlé. Plusieurs ratios molaires mAc : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont donc été testés pour la biotinylation de l'Ac monoclonal anti-CEA : 1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 30 ; 1 : 50 et 1 : 100. Puis comme pour les sdAb biotinyllés, le nombre de biotine par anticorps a été déterminé à l'aide du kit de quantification des biotines utilisant le complexe HABA-avidine (Table 9, page 129).

Cette quantification démontre que le nombre moyen de biotines sur l'Ac monoclonal varie beaucoup en fonction du ratio molaire Ac : sulfo-NHS-LCLC-biotine utilisé. Par exemple, pour un ratio molaire mAc : sulfo-NHS-LCLC-biotine de 1 : 100, on incorpore onze biotines par anticorps, ce qui est très important. Comme pour les sdAb, ces valeurs sont arrondies et reflètent l'état de biotinylation moyen de l'anticorps.

Ratio molaires anticorps : sulfo-NHS-LCLC-biotine	1 : 10	1 : 20	1 : 30	1 : 50	1 : 100
Nombre de biotines ajoutées par mAb (CLB-139)	3,9	5,2	6,3	7,6	11,3

Table 9 : Estimation du nombre moyen de biotines ajoutées par anticorps monoclonal anti-CEA. Plusieurs ratios molaires, anticorps monoclonal : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont été utilisés pour la biotinylation des anticorps monoclonaux anti-CEA : 1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 30 ; 1 : 50 et 1 : 100. le nombre moyen de biotine par anticorps monoclonal a été estimé grâce au kit de quantification des biotines commercialisé par Pierce (« Pierce® biotin quantitation kit ») et calculé grâce au « HABA-calculator » (www.piercenet.com/haba/habacalc.cfm). Les valeurs sont la moyenne de trois mesures.

La conservation de la fonction de reconnaissance antigénique de ces anticorps biotinylés *in vitro* a été testée grâce à un marquage immunologique du CEA sur les lignées cellulaires MC38 et MC38-CEA. Ce marquage immunologique a été réalisé avec une gamme de quantité d'Acs monoclonaux biotinylés détectés par des conjugués SA-Qdot®800. Les résultats démontrent que le nombre de biotine par anticorps monoclonal influence assez fortement la sensibilité de la détection. En effet, plus le nombre de biotine par anticorps est important, plus la sensibilité de la détection du CEA est grande. Ce résultat contraste avec celui obtenu pour les sdAb biotinylés. Malgré le fait que l'augmentation du nombre de biotine par anticorps augmente la probabilité que des biotines bloquent le site de reconnaissance de l'antigène, cette augmentation du nombre de biotine par Ac semble favoriser la reconnaissance de la biotine par les conjugués streptavidine-Qdot®800 (Figure 40, page 130). Par contre, la quantité d'anticorps monoclonal biotinylé nécessaire pour avoir un signal spécifique est assez élevée : 67 fmol pour tous les ratios molaires testés lors de la biotinylation excepté pour le ratio molaire 1 : 100 où 33 fmol sont suffisants. Comme précédemment, le signal de fluorescence détecté pour ces valeurs d'anticorps a été défini comme spécifique dès que la valeur de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence dépasse celle mesurée sans

anticorps additionnée de trois fois l'écart type. Les valeurs des moyennes géométriques de la fluorescence détectée ainsi que l'écart type des conditions sans anticorps sont données dans le Table 10 (page 131).

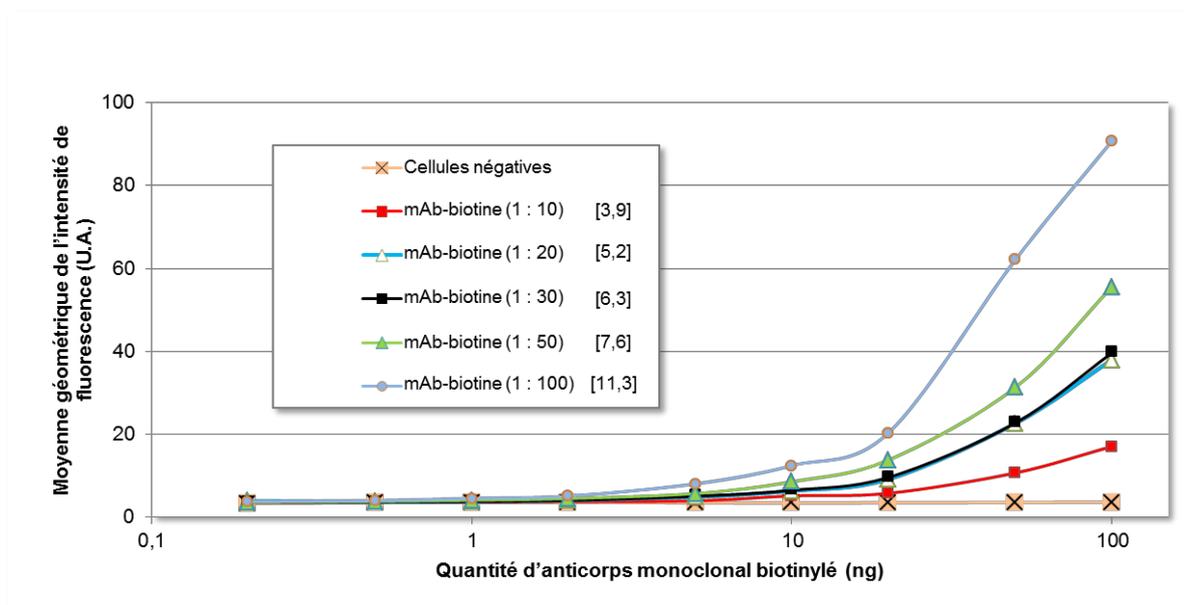


Figure 41 : Détermination par cytométrie en flux de l'influence du nombre de biotines ajoutées à l'anticorps monoclonal sur la sensibilité de détection du CEA. Plusieurs ratios molaires anticorps monoclonal : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont été utilisés pour la biotinylation des anticorps monoclonaux anti-CEA : 1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 30 ; 1 : 50 et 1 : 100. La sensibilité de la détection du CEA sur les cellules MC38 et MC38-CEA a été déterminé par cytométrie en flux. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Le nombre moyen de biotines ajoutées par anticorps monoclonal selon les ratios molaires est indiqué entre crochet.

Quantité d'anticorps monoclonaux utilisée (pmol)	0,666	0,333	0,133	0,067	0,033	0,013	0,006	0,003	0,001
Cellules négatives	3,49	3,49	3,43	3,45	3,42	3,48	3,51	3,44	3,50 (+/- 0,22)
mAb-biotin (1 : 10) Soit 3,9 biotines par anticorps	17,07	10,73	5,80	5,19 (+/- 1,19)	3,99	3,76	3,63	3,61	3,50 (+/- 0,21)
mAb-biotin (1 : 20) Soit 5,2 biotines par anticorps	37,99	22,67	9,19	6,39 (+/- 0,99)	4,97	4,12	3,81	3,72	3,91 (+/- 0,79)
mAb-biotin (1 : 30) Soit 6,3 biotines par anticorps	39,63	22,77	9,61	6,53 (+/- 1,06)	5,09	4,12	3,80	3,67	3,59 (+/- 0,73)
mAb-biotin (1 : 50) Soit 7,6 biotines par anticorps	55,52	31,33	13,79	8,58 (+/- 1,25)	5,74	4,53	4,13	3,87	3,62 (+/- 0,73)
mAb-biotin (1 : 100) Soit 11,3 biotines par anticorps	90,75	62,15	20,28	12,48	8,07 (+/- 0,74)	5,15	4,56	4,04	3,78 (+/- 0,58)

Table 10 : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux l'influence du nombre de biotine ajouté à l'anticorps monoclonal sur la sensibilité de détection du CEA. Plusieurs ratios molaires anticorps monoclonal : sulfo-NHS-LCLC-biotine ont été utilisés pour la biotinylation des anticorps monoclonaux anti-CEA : 1 : 10 ; 1 : 20 ; 1 : 30 et 1 : 50 et 1 : 100. La sensibilité de la détection du CEA sur les cellules MC38 et MC38-CEA a été déterminé par cytométrie en flux. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de trois expériences indépendantes. L'écart type est noté entre parenthèses pour les valeurs des marquages sans anticorps car il est utilisé pour déterminer la limite de sensibilité ; ainsi que pour les seuils de sensibilité déterminés. Les cases grisées correspondent aux limites de détection pour chaque type de biotinylation déterminée selon nos critères.

8. Comparaison de la fonctionnalité des différents anticorps biotinylés.

La sensibilité de détection de l'anticorps monoclonal anti-CEA biotinylé a été comparée à celle obtenue avec les sdAb biotinylés *in vivo* ou *in vitro*. Pour cela, les meilleures conditions de biotinylation préalablement établies (en termes de sensibilité de détection du CEA) ont été utilisées :

- Le sdAb anti-CEA biotinylé *in vivo*
- Le sdAb anti-CEA biotinylé *in vitro* avec le sulfo-NHS-LCLC-biotine en utilisant un ratio molaire de 1 : 50.

- Le mAb anti-CEA biotinylé *in vitro* avec le sulfo-NHS-LCLC-biotine en utilisant un ratio molaire de 1 : 100.

Les gammes de quantité d'anticorps mis en jeu diffèrent selon le type d'anticorps biotinylé utilisé : de 0,6 fmol à 0.555 pmol pour les sdAb et de 0.667 fmol à 0.667 pmol pour les mAb. Le marquage du CEA sur les cellules MC38-CEA est environ cinquante fois plus sensible avec les sdAb anti-CEA biotinylés qu'avec l'anticorps monoclonal anti-CEA biotinylé (Figure 41, page 132). En effet, la quantité minimale d'anticorps nécessaire pour pouvoir détecter un marquage spécifique est de 0,6 fmol pour les sdAb anti-CEA (indépendamment de la méthode de biotinylation) alors qu'il faut 33 fmol d'anticorps monoclonal anti-CEA biotinylé. Comme précédemment, le signal de fluorescence détecté pour ces valeurs d'anticorps a été défini comme spécifique dès que la valeur de la moyenne géométrique de l'intensité de fluorescence dépasse celle mesurée sans anticorps additionnée de trois fois l'écart type. Les valeurs des moyennes géométriques de la fluorescence détectée ainsi que l'écart type des conditions sans anticorps sont données dans le Table 11 (page 133).

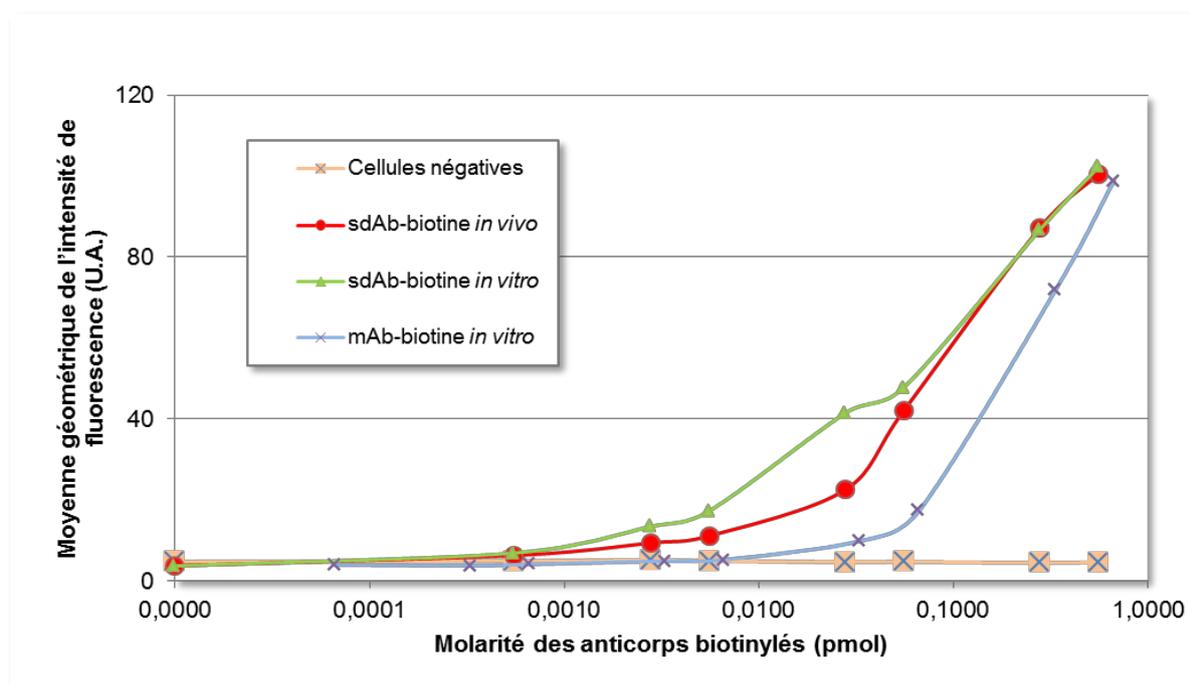


Figure 42 : Comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection de CEA en utilisant différents anticorps biotinylés. Les cellules MC38 et MC38-CEA ont été immunomarquées avec soit les anticorps monoclonaux biotinylés *in vitro*, soit les anticorps simple domaine biotinylés *in vitro*, soit les anticorps simple domaine biotinylés *in vivo*. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'exprime pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de neuf expériences indépendantes.

Molarité des anticorps simple domaine (pmol)	0,5549	0,2775	0,0555	0,0277	0,0055	0,0028	0,0006	0
Cellules négatives	3,86	3,77	3,88	3,73	3,88	4,05	3,88	3,65 (+/- 0,38)
sdAb-biotine in vivo	100,53	87,27	42,11	22,52	11,13	9,37	6,30 (+/- 1,02)	3,76 (+/- 0,52)
sdAb-biotine in vitro	102,30	86,79	47,82	41,46	17,30	13,44	6,92 (+/- 0,84)	3,70 (+/- 0,78)
Molarité des anticorps monoclonaux (pmol)	0,66667	0,33333	0,06667	0,03333	0,00667	0,00333	0,00067	0
Cellules négatives	3,57	3,48	3,47	3,40	3,46	3,51	3,48	3,22 (+/- 0,15)
mAc-biotine in vitro	98,88	71,82	17,45	9,91 (+/- 2,20)	5,26	4,93	4,14	4 (+/- 0,78)

Table 11 : Valeurs des moyennes géométriques de l'intensité de fluorescence utilisées pour la comparaison par cytométrie en flux de la sensibilité de la détection du CEA des différents anticorps biotinylés. Les cellules MC38 et MC38-CEA ont été immunomarquées avec soit les anticorps simple domaine biotinylés in vitro, soit les anticorps simple domaine biotinylés in vivo (panel du haut), soit les anticorps monoclonaux biotinylés in vitro (panel du bas). Les gammes d'anticorps utilisées diffèrent selon la nature de l'anticorps. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'expriment pas le CEA, les autres marquages montrés ont été réalisés sur des cellules qui expriment le CEA (lignée MC38-CEA). Les valeurs sont la moyenne de neuf expériences indépendantes. L'écart type est noté entre parenthèses pour les valeurs des marquages sans anticorps car il est utilisé pour déterminer la limite de sensibilité ; ainsi que pour les seuils de sensibilité déterminés. Les cases grisées correspondent aux limites de détection pour chaque type de biotinylation déterminée selon nos critères.

Conclusion et perspectives

Durant ma thèse j'ai développé deux méthodes de conjugaison d'anticorps à des nanocristaux semi-conducteurs qui permettent d'améliorer la sensibilité de détection de ces bionanosondes anticorps-quantum dots.

La première méthode de conjugaison est une amélioration du protocole de conjugaison d'anticorps aux quantum dot proposé par le principal fabricant de quantum dots. Le principal défaut de ce protocole commercial est l'étape de réduction des anticorps avant leur conjugaison aux QDs. Le travail réalisé démontre que ces conditions de réductions sont trop fortes et définit que les réductions de l'anticorps réalisées avec soit 0,075 mM de DTT, soit 6,06 mM de 2-MEA permettent d'améliorer la sensibilité de détection de la protéine cible. Ce travail permet aussi de mettre en évidence l'intérêt de purifier les anticorps fonctionnels suite à la réduction et de purifier les conjugués anticorps-quantum dots à l'aide d'un gel d'agarose à 1,5%. La sensibilité de ces nouveaux conjugués est environ six fois supérieure à celle observée en utilisant le protocole du fabricant.

La seconde méthode développée est plus innovante puisqu'elle associe des anticorps simple domaine à des quantum dots. Le couplage de ces anticorps simple domaine aux quantum dots a été réalisé grâce au système biotine/streptavidine. Deux méthodes de biotinylation ont été utilisées : une biotinylation chimique réalisée *in vitro* et une biotinylation enzymatique réalisée *in vivo*. La biotinylation *in vivo* permet d'avoir une seule biotine idéalement positionnée à l'extrémité C-terminale. La biotinylation *in vitro* nécessite un peu plus d'optimisation. Ces deux méthodes de biotinylation ont une limite de détection similaire : 0,6 fmol d'anticorps biotinylés est nécessaires pour détecter de façon spécifique le CEA à la surface de cellules transfectées. Par contre les sdAb biotinylés *in vivo* permettent une détection du CEA plus sensible que ceux biotinylés *in vitro* lorsqu'on les utilise dans des conditions saturantes. De plus, la sensibilité de détection du CEA en utilisant ces anticorps simple domaine biotinylés a été comparée à celle obtenue en utilisant un anticorps monoclonal biotinylé. Cette comparaison démontre que la limite de détection du CEA par des anticorps simple domaine biotinylés (0,6 fmol d'anticorps est nécessaires) est environ cinquante fois meilleure que celle des anticorps monoclonaux biotinylés (33 fmol d'anticorps sont nécessaires).

Ce travail s'inscrit dans un projet visant à l'établissement d'une plateforme diagnostique utilisant des nanoparticules fluorescentes permettant la détection multiparamétrique des cellules tumorales chez des patientes atteintes de cancer du sein. Le développement de

quantum dots biofonctionnalisés avec des anticorps spécifiques de ces biomarqueurs en utilisant ces méthodes de conjugaison présente donc un fort potentiel pour la détection précoce de CTC dans le sang ou de CTD dans la moelle osseuse. Les anticorps simple domaine semblent permettre de repousser la limite de détection mais ces anticorps sont moins communs et à l'heure actuelle le choix de cibles antigénique est assez restreint. Ce travail représente une étape importante pour établir une telle plateforme. Les techniques développées pour l'utilisation de quantum dots biofonctionnalisés avec des anticorps permettent une amélioration de la sensibilité de détection de la molécule cible. Dans le futur, il faut appliquer ces méthodes en utilisant des anticorps qui permettent de détecter des biomarqueurs du cancer du sein. Dans ce sens, plusieurs protéines sont intéressantes : HER2, Ki-67 et les récepteurs hormonaux à la progestérone et aux œstrogènes [Jotwani *et al.*, 2009]. HER2 est une molécule transmembranaire surexprimée chez 25 à 30% des patientes atteintes du cancer du sein, son pronostic clinique est généralement mauvais car il est associé aux formes de cancer les plus agressives. Ki-67 qui est une protéine nucléaire associée à la prolifération cellulaire qui permet de suivre la fraction de cellules en croissance au sein d'une population. Les récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone sont des protéines nucléaires et représentent les meilleurs éléments prédictifs sur l'efficacité de l'hormonothérapie. Environ 75 à 80% des cancers du sein présentent une expression des récepteur hormonaux dont 5 à 10% co-expriment HER2. Le choix de ces biomarqueurs tumoraux est fondamental, car le niveau d'expression de HER2 et des récepteurs hormonaux déterminent le pronostic clinique de la maladie et permettent la mise en place de stratégies de traitements adéquates. De plus, la détermination de leur niveau d'expression est réalisée en immunohistochimie. L'absence de ces trois biomarqueurs tumoraux est un signe que la tumeur est relativement agressive et est considéré comme de mauvais pronostic clinique par absence de traitement adapté [Dawson *et al.*, 2009]. Aussi, la recherche d'autres spécificités antigéniques d'expression membranaire est nécessaire. Les marquages en immunohistochimie et sur des cellules en suspension n'ont pas les mêmes contraintes. En effet, ces dernières doivent être perméabilisées pour que les anticorps puissent atteindre les antigènes intracellulaires, ce qui est difficilement réalisable à grande échelle avec du sang. Le CEA pourrait ainsi devenir très intéressant pour la détection du cancer du sein grâce aux anticorps simple domaine anti-CEA qui sont réellement spécifiques au CEA, contrairement aux anticorps monoclonaux anti-CEA qui reconnaissent aussi d'autres antigènes présents dans le sang et qui ne sont pas spécifiques des cellules tumorales circulantes [Behar *et al.*, 2007].

Il faudrait donc adapter le choix de l'anticorps (et donc de la méthode de biofonctionnalisation des quantum dots) en fonction de l'antigène choisi. Récemment, l'équipe du Docteur Daniel Baty a isolé et produit un anticorps simple domaine anti-HER2 [Even-Desrumeaux *et al.*, 2012]. Il serait donc très intéressant de biotinyler *in vivo* cet anticorps simple domaine et d'analyser la sensibilité de la détection d'un marquage immunologique anti-HER2 en utilisant des conjugués streptavidine-quantum dots. L'optimisation des méthodes de biotinylation *in vitro* est nécessaire avant de comparer la sensibilité de la détection de HER2 à la surface de cellules en cytométrie en flux en utilisant ces sdAb biotinylés selon différentes approches ainsi qu'avec des anticorps monoclonaux actuellement utilisés. Ceci permettra de valider la méthode de détection de HER2 qui soit la plus sensible.

L'utilisation d'un panel d'anticorps biotinylés marqués par différents conjugués streptavidine-Qdot[®] implique que le couplage des anticorps avec des QDs soit réalisé au préalable du marquage des cellules. En effet, l'interaction biotine-streptavidine est spécifique mais elle se fait de la même façon entre n'importe quel anticorps biotinylé et n'importe quel conjugué streptavidine-QD ; toutefois, lorsque cette interaction est réalisée, elle est très stable dans des conditions physiologiques. Il est donc tout à fait possible d'utiliser par exemple les sdAb anti-CEA et le sdAb anti-HER2 tous deux biotinylés et de les coupler séparément à des conjugués streptavidine-Qdot[®]800 et streptavidine-Qdot[®]565 pour détecter de façon simultanée le niveau d'expression de CEA et de HER2 par des cellules. Des essais préliminaires montrent la faisabilité de cette approche ainsi que l'importance de la séparation des sdAb libres des complexes sdAb-QD. Par exemple, un tel couplage de sdAb anti-CEA biotinylés *in vivo* avec des conjugués SA-Qdot[®]800 a été réalisé selon différentes quantités de sdAb (de 0,02 à 1000 ng) couplés à différentes concentrations de conjugués SA-Qdot[®]800 (de 2 nM à 2 pM) permettant d'optimiser les quantités à utiliser pour avoir le meilleur marquage. Avant utilisation, chaque couplage est purifié sur une unité de filtration au seuil de 100 kDa afin d'éliminer la majorité de sdAb non couplés. Les résultats démontrent assez clairement que les meilleures conditions sont un couplage de 100 ng de sdAb anti-CEA biotinylé *in vivo* à des conjugués à 2 mM de SA-Qdot[®]800 (Figure 42, page 138). De plus, ces résultats démontrent qu'une trop grande quantité de sdAb diminue fortement la capacité des complexes à détecter le CEA. Ceci est très certainement dû à la présence de sdAb non couplés qui entrent en compétition avec les complexes sdAb-QDs malgré la purification préalable des complexes par filtration. Ces résultats préliminaires seront utiles pour l'établissement de conditions

adéquates pour des marquages multiplexés dirigés contre plusieurs biomarqueurs en utilisant le système biotine/streptavidine. Toutefois, il faudra s'assurer que ces complexes sdAb-QDs soient stables. En effet, il ne faut pas que ce complexe se dissocie et que le sdAb anti-CEA biotinylé soit reconnu par des conjugués streptavidine-Qdot[®] associés à un autre anticorps. Ceci pourra être testé par des essais de chasse du conjugués SA-Qdot[®]800 couplé au sdAb anti-CEA biotinylé par d'autres conjugués SA-Qdot[®].

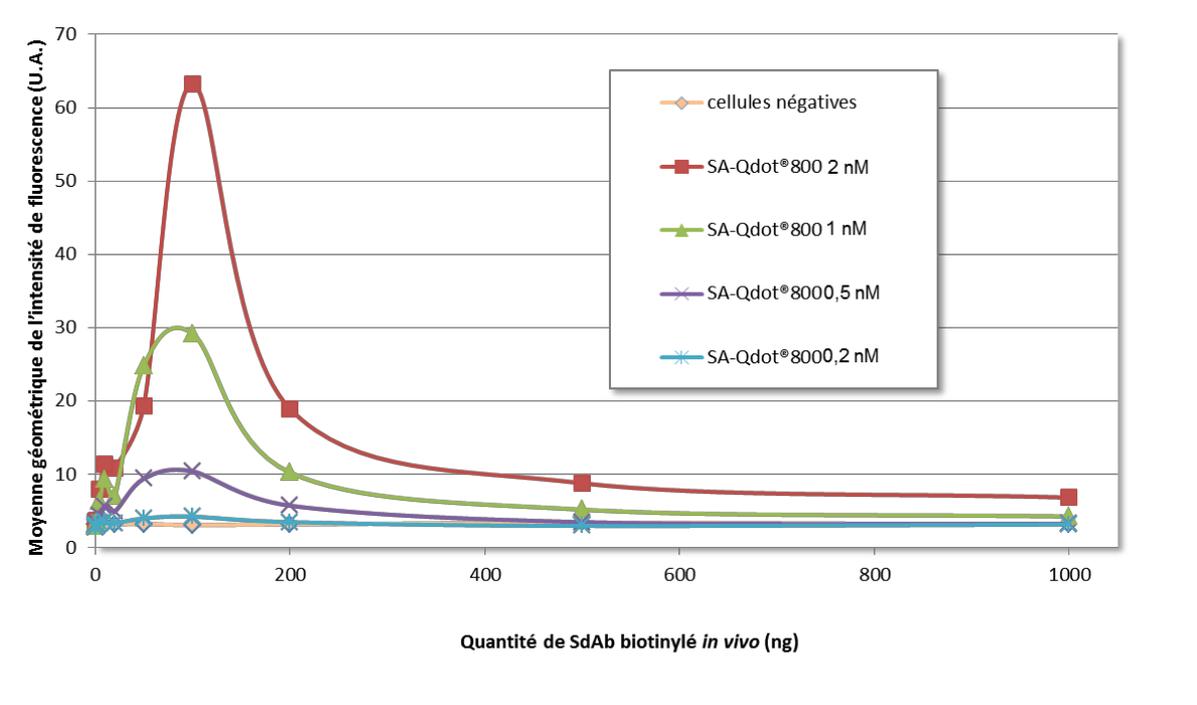
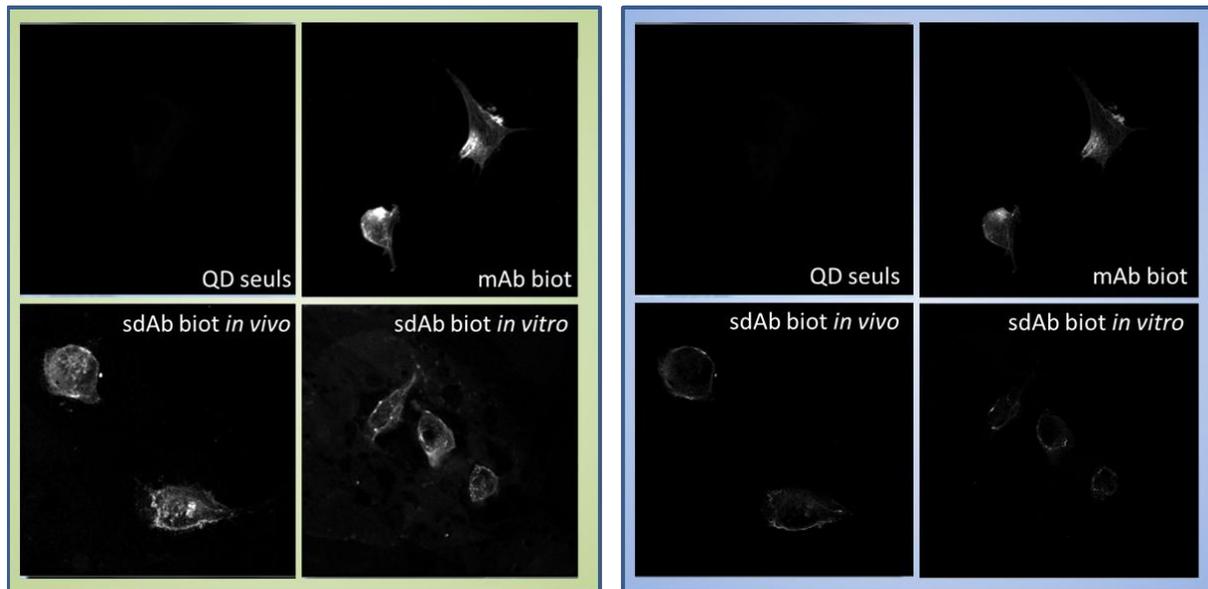


Figure 43 : Sensibilité de la détection du CEA selon les quantités de sdAb anti-CEA biotinylés in vivo et des conjugués SA-Qdot[®]800 utilisés pour le couplage des conjugués sdAb-Qdot[®] préalable à la réaction de marquage des cellules par cytométrie de flux. Les cellules négatives sont la lignée cellulaire MC38 qui n'exprime pas le CEA, les autres marquages sont réalisés avec la lignée cellulaire MC38-CEA.

Comme déjà évoqué dans l'introduction, la plupart des systèmes de détection de la fluorescence utilisés dans les laboratoires biologiques sont optimisés pour exciter correctement les fluorochromes organiques et ne sont pas adaptés à l'utilisation de quantum dots comme fluorochromes. Ceci remet en cause leur utilisation pour leur brillance élevée. En effet, en utilisant les cytomètre décrits (BD FACSCalibur[®] et Guava[®] Easycyte[™] plus), le ratio signal/bruit de fond était plus élevée en utilisant la phycoérythrine (PE) qu'en utilisant

les quantum dots. La raison principale est que ces appareils ne sont équipés que d'un seul laser d'excitation qui émet à 488 nm, longueur d'onde à laquelle la PE est excitée à 53% de son maximum, tandis que les Qdot[®]800 ne le sont qu'à 16% de leur maximum (données d'Invitrogen). Si le rendement quantique des quantum dots est plus faible que celui de la PE, le coefficient d'extinction molaire des QD est nettement plus important. Si on les excite mal, on perd l'avantage d'utiliser des quantum dots. Ce problème majeur peut être illustré par exemple en microscopie confocale où l'excitation des fluorochromes peut être réalisée soit avec un laser émettant à 488 nm, soit un système d'excitation bi-photonique avec des « *pulse* » de photons à 740 nm (ce qui représente une excitation d'environ 370nm en se plaçant dans un système monophotonique). La brillance obtenue avec une même cellule immunomarquée selon le mode d'excitation des Qdot peut être facilement comparée. Un marquage de lignée cellulaire MC38-CEA avec des sdAb anti-CEA biotinylés révélés avec des conjugués SA-Qdot[®]565 a été excité avec les deux sources d'excitation disponibles. Les résultats démontrent clairement que le système d'excitation bi-photonique permet une meilleure détection des quantum dots et permet de mieux profiter de leur brillance élevée (Figure 43, page 140). Les QDs absorbent fortement dans les U.V., la table 6 (page 118) répertorie les coefficients d'extinction molaires de plusieurs Qdot[®].

Il est donc nécessaire de faire évoluer les systèmes d'excitation et de détection si on veut développer des plateformes très sensibles de diagnostic moléculaires précoce des cellules tumorales en utilisant des conjugués anticorps-quantum dots.



Excitation des SA-Qdot®565 avec un système bi-photonique (740 nm)

Excitation des SA-Qdot®565 avec un laser émettant à 488 nm

Figure 44 : Mise en évidence de l'importance de la source d'excitation pour un marquage haute sensibilité par immunohistochimie analysée en microscopie confocale. Marquage de cellules MC39-CEA par différents anticorps anti-CEA biotinylés révélés par des conjugués SA-Qdot®565. L'image en haut à gauche des deux parties montre l'absence de bruit de fond dû aux marquage non spécifique des conjugués SA-Qdot®565 sur les cellules MC38-CEA en absence d'anticorps anti-CEA biotinylé.

Le travail réalisé peut aussi être étendu à d'autres domaines dont le suivi de particules uniques. La biotinylation *in vivo* des anticorps simple domaine est très intéressante pour les analyses fondées sur le suivi individuel des quantum dots. En effet, cette méthode de biotinylation permet d'avoir un contrôle parfait du nombre et de l'emplacement de biotine rajouté par l'enzyme BirA sur l'anticorps. Cette approche permet donc d'avoir un meilleur contrôle de la valence entre la molécule cible étudiée et le quantum dot en plus de s'assurer de la bonne orientation de l'anticorps sur le quantum dot. Le suivi de particule unique est une technique qui permet, grâce à la sensibilité de détection offerte par les quantum dot, de suivre les déplacements moléculaires à l'échelle d'une seule cellule. Le suivi d'une seule molécule grâce au suivi individuel d'un seul quantum dot n'est possible que si la valence entre la molécule d'intérêt et le quantum dot est unique. En effet, si un quantum dot possède à sa surface une IgG fonctionnelle, divalente, qui a reconnu et fixé deux molécules cibles différentes, alors leurs mouvements seront entravés l'une à l'autre via la présence de l'anticorps. Du fait que les conjugués streptavidine-QD possèdent plusieurs streptavidine à

leur surface, des molécules de biotines seules seront utilisées pour saturer des sites de reconnaissance de la streptavidine et permettent de n'avoir en moyenne qu'un seul anticorps par QD. La monovalence des anticorps simple domaine ainsi que la présence d'une seule biotine par anticorps permet donc de mieux maîtriser la valence globale du complexe protéine étudiée-anticorps-quantum dot.

Références bibliographiques

AI X, XU Q, JONES M, SONG Q, DING SY, ELLINGSON RJ *ET AL.*

Photophysics of (CdSe)ZnS colloidal quantum dots in an aqueous environment stabilized with amino acids and genetically-modified proteins.

Photochem Photobiol Sci 2007 ; 6(9) : 1027-33.

ALGAR WR, KRULL UJ.

Adsorption and hybridization of oligonucleotides on mercaptoacetic acid-capped CdSe/ZnS quantum dots and quantum dot-oligonucleotide conjugates.

Langmuir 2006 ; 22(26) : 11346-52.

ALI AM, UENO T, TANAKA S, TAKADA M, ISHIGURO H, ABDELLAH AZ *ET AL.*

Determining circulating endothelial cells using CellSearch system during preoperative systemic chemotherapy in breast cancer patients.

Eur J Cancer 2011 ; 47(15) : 2265-72.

ALIX-PANABIÈRES C, MÜLLER V, PANTEL K.

Current status in human breast cancer micrometastasis.

Curr Opin Oncol 2007 ; 19(6) : 558-63.

ALIX-PANABIÈRES C, VENDRELL JP, SLIJPER M, PELLÉ O, BARBOTTE E, MERCIER G *ET AL.*

Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer.

Breast Cancer Res 2009 ; 11(3) : R39.

ALIX-PANABIÈRES C.

EPISPOT assay: detection of viable DTCs/CTCs in solid tumor patients.

Recent Results Cancer Res 2012 ; 195 : 69-76.

ALVAREZ-RUEDA N, BEHAR G, FERRÉ V, PUGNIÈRE M, ROQUET F, GASTINEL L *ET AL.*

Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten.

Mol Immunol 2007 ; 44(7) : 1680-90.

AMIT AG, MARIUZZA RA, PHILLIPS SE, POLJAK RJ.
Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution.
Science 1986 ; 233(4765) : 747-53.

ANDERSEN DC, REILLY DE.
Production technologies for monoclonal antibodies and their fragments.
Curr Opin Biotechnol 2004 ; 15(5) : 456-62.

ARBABI GHAHROUDI M, DESMYTER A, WYNS L, HAMERS R, MUYLDERMANS S.
Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.
FEBS Lett 1997 ; 414(3) : 521-6.

ARTEAGA CL, SLIWKOWSKI MX, OSBORNE CK, PEREZ EA, PUGLISI F, GIANNI L.
Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives.
Nat Rev Clin Oncol 2011 ; 9(1) : 16-32.

BALLOU B, LAGERHOLM BC, ERNST LA, BRUCHEZ MP, WAGGONER AS.
Noninvasive imaging of quantum dots in mice.
Bioconjug Chem 2004 ; 15(1) : 79-86.

BARCELLINI W, ZANELLA A.
Rituximab therapy for autoimmune haematological diseases.
Eur J Intern Med 2011 ; 22(3) : 220-9.

BARIK S, TAN HH, WONG-LEUNG J, JAGADISH C.
Growth and characterization of self-assembled InAs/InP quantum dot structures.
J Nanosci Nanotechnol 2010 ; 10(3) : 1525-36.

BEAUCHEMIN N, DRABER P, DVEKSLER G, GOLD P, GRAY-OWEN S, GRUNERT F
ET AL.

Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family.

Exp Cell Res 1999 ; 252(2) : 243-9.

BEHAR G, CHAMES P, TEULON I, CORNILLON A, ALSHOUKR F, ROQUET F *ET AL.*

Llama single-domain antibodies directed against nonconventional epitopes of tumor-associated carcinoembryonic antigen absent from nonspecific cross-reacting antigen.

FEBS J 2009 ; 276(14) : 3881-93.

BIJU V, MUNDAYOOR S, OMKUMAR RV, ANAS A, ISHIKAWA M.

Bioconjugated quantum dots for cancer research: present status, prospects and remaining issues.

Biotechnol Adv 2010 Mar-Apr ; 28(2) : 199-213.

BOGINA G, BORTESI L, MARCONI M, VENTURINI M, LUNARDI G, COATI F *ET AL.*

Comparison of hormonal receptor and HER-2 status between breast primary tumours and relapsing tumours: clinical implications of progesterone receptor loss.

Virchows Arch 2011 ; 459(1) : 1-10.

BRAUN S, VOGL FD, NAUME B, JANNI W, OSBORNE MP, COOMBES RC *ET AL.*

A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer.

N Engl J Med 2005 ; 353(8) : 793-802.

BRUCHEZ M JR, MORONNE M, GIN P, WEISS S, ALIVISATOS AP.

Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels.

Science 1998 ; 281(5385) : 2013-6.

BURTON DR.

Phage display.

Immunotechnology 1995 ; 1(2) : 87-94.

CABANES-MACHETEAU M, FITCHETTE-LAINÉ AC, LOUTELIER-BOURHIS C, LANGE C, VINE ND, MA JK *ET AL.*

N-Glycosylation of a mouse IgG expressed in transgenic tobacco plants.
Glycobiology 1999 ; 9(4) : 365-72.

CHAN WC, NIE S.

Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection.
Science 1998 ; 281(5385) : 2016-8.

CHANG SQ, DAI YD, KANG B, HAN W, MAO L, CHEN D.

UV-enhanced cytotoxicity of thiol-capped CdTe quantum dots in human pancreatic carcinoma cells.
Toxicol Lett 2009 ; 188(2) : 104-11.

CHEN W, MCLENDON G, MARCHETTI A, REHM JM, FREEDHOFF MI AND MYERS C.

Size dependence of radiative rates in the indirect band gap material AgBr.
J Am Chem Soc 1994 ; 116 : 1585-6.

CHEN Y, VELA J, HTOON H, CASSON JL, WERDER DJ, BUSSIAN DA *ET AL.*

"Giant" multishell CdSe nanocrystal quantum dots with suppressed blinking.
J Am Chem Soc 2008 ; 130(15) : 5026-7.

CHEN H, XUE J, ZHANG Y, ZHU X, GAO J, YU B.

Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray.
J Mol Histol 2009 ; 40(4) : 261-8.

COLVIN VL, ALIVISATOS AP, TOBIN JG.

Valence-band photoemission from a quantum-dot system.
Phys Rev Lett 1991 ; 66(21) : 2786-9.

CORCORAN C, FRIEL AM, DUFFY MJ, CROWN J, O'DRISCOLL L.

Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer.

Clin Chem 2011 ; 57(1) : 18-32.

CORREA-DUARTE MA, GIERSIG M AND LIZ-MARZÁN LM.

Stabilization of CdS semiconductor nanoparticles against photodegradation by a silica coating procedure.

Chemical Physics Letters 1998 ; 286 : 497-501.

DAHAN M, LEVI S, LUCCARDINI C, ROSTAING P, RIVEAU B, TRILLER A.

Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking.

Science 2003 ; 302 : 442-5.

DAWSON SJ, PROVENZANO E, CALDAS C.

Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications.

Eur J Cancer 2009 ; 45 Suppl 1 : 27-40.

DE GENST E, SAERENS D, MUYLDERMANS S, CONRATH K.

Antibody repertoire development in camelids.

Dev Comp Immunol 2006 ; 30(1-2) : 187-98.

DE VRIES EF, ROTS MG, HOSPERS GA.

Nuclear imaging of hormonal receptor status in breast cancer: a tool for guiding endocrine treatment and drug development.

Curr Cancer Drug Targets 2007 ; 7(6) : 510-9.

DESMYTER A, TRANSUE TR, GHAHROUDI MA, THI MH, POORTMANS F, HAMERS R *ET AL.*

Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme.

Nat Struct Biol 1996 ; 3(9) : 803-11.

DUBERTRET B, SKOURIDES P, NORRIS DJ, NOIREAUX V, BRIVANLOU AH, LIBCHABER A.

In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles.

Science 2002 ; 298(5599) : 1759-62.

DUMOULIN M, CONRATH K, VAN MEIRHAEGHE A, MEERSMAN F, HEREMANS K, FRENKEN LG *ET AL.*

Single-domain antibody fragments with high conformational stability.

Protein Sci 2002 ; 11(3) : 500-15.

EKIMOV AI AND ONUSHCHENKO AA.

Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals.

Piz'ma Zh Eksp Teor Fiz 1981 ; 34(6) : 363-6.

EMPEDOCLES SA, NEUHAUSER R, SHIMIZU K AND BAWENDI MG.

Photoluminescence from single semiconductor nanostructures.

Adv Mater 1999 ; 15(11) : 243-56.

ESTEVA FJ, SAHIN AA, CRISTOFANILLI M, ARUN B, HORTOBAGYI GN.

Molecular prognostic factors for breast cancer metastasis and survival.

Semin Radia Oncol 2002 ; 12(4) : 319-28.

EVEN-DESRUMEAUX K, BATY D, CHAMES P.

Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation.

Mol Biosyst 2010 ; 6(11) : 2241-8.

EVEN-DESRUMEAUX K, FOURQUET P, SECQ V, BATY D, CHAMES P.

Single-domain antibodies: a versatile and rich source of binders for breast cancer diagnostic approaches.

Mol Biosyst 2012 ; 8(9) : 2385-94.

FAHY E, NAZARBAGHI R, ZOMORRODI M, HERRNSTADT C, PARKER WD, DAVIS RE *ET AL.*

Multiplex fluorescence-based primer extension method for quantitative mutation analysis of mitochondrial DNA and its diagnostic application for Alzheimer's disease.

Nucleic Acids Res 1997 ; 25(15) : 3102-9.

FEHM T, BRAUN S, MULLER V, JANNI W, GEBAUER G, MARTH C *ET AL.*

A concept for the standardized detection of disseminated tumor cells in bone marrow from patients with primary breast cancer and its clinical implementation.

Cancer 2006 ; 107(5) : 885-92.

FERRARI M.

Cancer nanotechnology: opportunities and challenges.

Nat Rev Cancer 2005 ; 5(3) : 161-71.

FRENKEN LG, VAN DER LINDEN RH, HERMANS PW, BOS JW, RUULS RC, DE GEUS B *ET AL.*

Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*.

J Biotechnol 2000 ; 78(1) : 11-21.

GAPONIK N, TALAPIN DV, ROGACH AL, HOPPE K, SHEVCHENKO EV, KORNOWSKI A *ET AL.*

Thiol-capping of CdTe nanocrystals: an alternative to organometallic synthetic routes.

J Phys Chem B 2002 ; 106 : 7177-85.

GHASEMI Y, PEYMANI P, AFIFI S.

Quantum dot: magic nanoparticle for imaging, detection and targeting.

Acta Biomed 2009 ; 80(2) : 156-65.

GRABOLLE M, ZIEGLER J, MERKULOV A, NANN T, RESCH-GENGER U.

Stability and fluorescence quantum yield of CdSe-ZnS quantum dots--influence of the thickness of the ZnS shell.

Ann N Y Acad Sci 2008 ; 1130 : 235-41.

GREEN NM.

Avidin and streptavidin

Methods in Enzymology 1990 ; 184 : 51-67

HAMERS-CASTERMAN C, ATARHOUCHE T, MUYLDERMANS S, ROBINSON G, HAMERS C, SONGA EB *ET AL.*

Naturally occurring antibodies devoid of light chains.

Nature 1993 ; 363(6428) : 446-8.

HAMMARSTRÖM S.

The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues.

Semin Cancer Biol 1999 ; 9(2) : 67-81.

HARMSSEN MM, RUULS RC, NIJMAN IJ, NIEWOLD TA, FRENKEN LG, DE GEUS B.

Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features.

Mol Immunol 2000 ; 37(10) : 579-90.

HARMSSEN MM, DE HAARD HJ.

Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.

Appl Microbiol Biotechnol 2007 ; 77(1) : 13-22.

HINES MA AND GUYOT-SIONNEST P.

Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS-capped CdSe nanocrystals.

J Phys Chem 1996 ; 100 : 468-71.

HO YP, LEONG KW.

Quantum dot-based theranostics.

Nanoscale 2010 ; 2(1) : 60-8.

HOEK KS.

DNA microarray analyses of melanoma gene expression: a decade in the mines.

Pigment Cell Res 2007 ; 20(6) : 466-84.

HOHNG S, HA T.

Near-complete suppression of quantum dot blinking in ambient conditions.

J Am Chem Soc 2004 ; 126(5) : 1324-5.

HOSHINO A, HANAKI K, SUZUKI K, YAMAMOTO K.

Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body.

Biochem Biophys Res Commun 2004 ; 314(1) : 46-53.

HOSHINO A, MANABE N, FUJIOKA K, SUZUKI K, YASUHARA M, YAMAMOTO K.

Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity.

J Artif Organs 2007 ; 10(3) : 149-57.

HOWARTH M, LIU W, PUTHENVEETIL S, ZHENG Y, MARSHALL LF, SCHMIDT MM
ET AL.

Monovalent, reduced-size quantum dots for imaging receptors on living cells.

Nat Methods 2008 ; 5(5) : 397-9.

ISHIKAWA-ANKERHOLD HC, ANKERHOLD R, DRUMMEN GP.

Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM.

Molecules 2012 ; 17(4) : 4047-132.

JAISWAL JK, MATTOUSSI H, MAURO JM, SIMON SM.

Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates.

Nat Biotechnol 2003 ; 21(1) : 47-51.

JASIENIAK J, CALIFANO M, WATKINS SE.

Size-dependent valence and conduction band-edge energies of semiconductor nanocrystals.

ACS Nano 2011 ; 5(7) : 5888-902.

JOTWANI AC, GRALOW JR.

Early detection of breast cancer: new biomarker tests on the horizon?

Mol Diagn Ther 2009 ; 13(6) : 349-57.

KATO S, ITOH K, YAOI T, TOZAWA T, YOSHIKAWA Y, YASUI H *ET AL.*

Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain.

Nanotechnology 2010 ; 21(33) : 335103.

US PUBLIC HEALTH SERVICES. KABAT E, WU TT, PERRY HM, GOTTESMAN KS, FOELLER C.

Sequence of proteins of immunological interest. 5ème éd. 1991 [consulté le 03/10/2012]

Disponible à partir de URL :

<http://books.google.fr/books?id=3jMvZYW2ZtwC&pg=PA2180-IA2&lpg=PA2180-IA2&dq=US+public+health+service,+NIH+bethesda,+MD,+publication+N%C2%B0.+91-3242&source=bl&ots=PdLGLQDq0y&sig=66NdkuecPfSSbHZXqM7HR8GE2A8&hl=fr#v=onepage&q=US%20public%20health%20service%2C%20NIH%20bethesda%2C%20MD%2C%20publication%20N%C2%B0.%2091-3242&f=false>.

KIRCHNER C, LIEDL T, KUDERA S, PELLEGRINO T, MUÑOZ JAVIER A, GAUB HE *ET AL.*

Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles.

Nano Lett 2005 ; 5(2) : 331-8.

KÖHLER G, MILSTEIN C.

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.

Nature 1975 ; 256(5517) : 495-7.

KUANG H, ZHAO S, CHEN W, MA W, YONG Q, XU L *ET AL.*

Rapid DNA detection by interface PCR on nanoparticles.

Biosens Bioelectron 2011 ; 26(5) : 2495-9.

KUMAKI N, UMEMURA S, TANG X, SAITO Y, SUZUKI Y, TOKUDA Y.

Alteration of immunohistochemical biomarkers between pre- and post-chemotherapy: hormone receptors, HER2 and Ki-67.

Breast Cancer 2011 ; 18(2) : 98-102.

LAUWEREYS M, ARBABI GHARROUDI M, DESMYTER A, KINNE J, HÖLZER W, DE GENST E *ET AL.*

Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies.

EMBO J 1998 ; 17(13) : 3512-20.

LEWIS JE, WU S, JIANG XJ.

Unconventional gap state of trapped exciton in lead sulfide quantum dots.

Nanotechnology 2010 ; 21(45) : 455402.

LI KG, CHEN JT, BAI SS, WEN X, SONG SY, YU Q *ET AL.*

Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots.

Toxicol In Vitro 2009 ; 23(6) : 1007-13.

LIANG RQ, LI W, LI Y, TAN CY, LI JX, JIN YX *ET AL.*

An oligonucleotide microarray for microRNA expression analysis based on labeling RNA with quantum dot and nanogold probe.

Nucleic Acids Res 2005 ; 33(2) : e17.

LIDKE DS, NAGY P, JOVIN TM, ARNDT-JOVIN DJ.

Biotin-ligand complexes with streptavidin quantum dots for in vivo cell labeling of membrane receptors.

Methods Mol Biol 2007 ; 374 : 69-79.

LIU SL, ZHANG ZL, TIAN ZQ, ZHAO HS, LIU H, SUN EZ *ET AL.*

Effectively and efficiently dissecting the infection of influenza virus by quantum-dot-based single-particle tracking.

ACS Nano 2012 ; 6(1) : 141-50.

LIZ-MARZÁN LM, GIERSIG M, MULVANEY P.

Synthesis of nanosized gold-silica core-shell particles.

Langmuir 1996 ; 12 : 4329-35.

LLOYD MC, ALLAM-NANDYALA P, PUROHIT CN, BURKE N, COPPOLA D, BUI MM.

Using image analysis as a tool for assessment of prognostic and predictive biomarkers for breast cancer: how reliable is it?

J Pathol Inform 2010 ; 1 : 29.

LUCCI A, HALL CS, LODHI AK, BHATTACHARYYA A, ANDERSON AE, XIAO L *ET AL.*

Circulating tumour cells in non-metastatic breast cancer: a prospective study.

Lancet Oncol 2012 ; 13(7) : 688-95.

LUPORSI E, ANDRÉ F, SPYRATOS F, MARTIN PM, JACQUEMIER J, PENAULT-LLORCA F *ET AL.*

Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review.

Breast Cancer Res Treat 2012 ; 132(3) : 895-915.

MAHLER B, SPINICELLI P, BUIL S, QUELIN X, HERMIER JP, DUBERTRET B.

Towards non-blinking colloidal quantum dots.

Nat Mater 2008 ; 7(8) : 659-64.

MAHMOUD W, SUKHANOVA A, OLEINIKOV V, RAKOVICH YP, DONEGAN JF, PLUOT M *ET AL.*

Emerging applications of fluorescent nanocrystals quantum dots for micrometastases detection.

Proteomics 2010 ; 10(4) : 700-16.

MAHMOUD W, ROUSSERIE G, REVEIL B, TABARY T, MILLOT JM, ARTEMYEV M *ET AL.*

Advanced procedures for labeling of antibodies with quantum dots.

Anal Biochem 2011 ; 416(2) : 180-5.

DE MARCO A.

Biotechnological applications of recombinant single-domain antibody fragments.

Microb Cell Fact 2011 ; 10 : 44.

MASUMOTO Y, KAWAMURA T, OHZEKI T, URABE S.

Lifetime of indirect excitons in AgBr quantum dots.

Phys Rev B Condens Matter 1992 ; 46(3) : 1827-1830.

MIKULSKA M, CALANDRA T, SANGUINETTI M, POULAIN D, VISCOLI C;

Third European Conference on Infections in Leukemia Group. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia.

Crit Care 2010 ; 14(6) : R222.

MITTAL R, BRUCHEZ MP.

Biotin-4-fluorescein based fluorescence quenching assay for determination of biotin binding capacity of streptavidin conjugated quantum dots.

Bioconjug Chem 2011 ; 22(3) : 362-8.

MITCHELL GP, MIRKIN CA, LETSINGER RL.

Programmed assembly of DNA functionalizes quantum dots.

J Am Chem Soc 1999 ; 121 : 8122-3.

MURRAY CB, NORRIS DJ AND BAWENDI MG.

Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = S, SE, TE) semiconductor nanocrystallites.

J Am Chem Soc 1993 ; 115 : 8706-15.

MURRAY CB, KAGAN CR, BAWENDI MG.

Synthesis and Characterization of Monodisperse Nanocrystals and Close-Packed Nanocrystal Assemblies.

Ann Rev Mater Research 2000 ; 30(1) : 545–610.

MUYLDERMANS S.

Single domain camel antibodies: current status.

J Biotechnol 2001 ; 74(4) : 277-302.

NABIEV I, MITCHELL S, DAVIES A, WILLIAMS Y, KELLEHER D, MOORE R *ET AL.*

Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartments.

Nano Lett 2007 ; 7(11) : 3452-61.

NIRMAL M, DABBOUSI BO, BAWENDI MG, MACKLIN JJ, TRAUTMAN JK, HARRIS TD *ET AL.*

Fluorescence intermittency in single cadmium selenide nanocrystals.

Nature 1996 ; 383 : 802-4.

OMS (Organisation mondiale de la santé) et IARC (Agence internationale pour la recherche sur le cancer) – Globocan 2008. [consulté le 13/09/2012].

Disponible à partir de URL :

<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>

OMS (Organisation mondiale de la santé) – NCD country profile - France. [consulté le 13/09/2012].

Disponible à partir de URL :

<http://www.euro.who.int/en/where-we-work/member-states/france/publications3/ncd-country-profile-2011-france>

OMS (Organisation mondiale de la santé) et IARC (Agence internationale pour la recherche sur le cancer) - World cancer report 2008. [consulté le 13/09/2012].

Disponible à partir de URL :

<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>

PATHAK S, DAVIDSON MC, SILVA GA.

Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots. Nano Lett 2007 ; 7(7) : 1839-45.

PENG X, WICKHAM J AND ALIVISATOS AP.

Kinetics of II-VI and III-V colloidal semiconductor nanocrystal growth: “Focusing” of size distributions.

J Am Chem Soc 1998 ; 120 : 5343-4.

PERRUCHINI C, PECORARI F, BOURGEOIS JP, DUYCKAERTS C, ROUGEON F, LAFAYE P.

Llama VHH antibody fragments against GFAP: better diffusion in fixed tissues than classical monoclonal antibodies.

Acta Neuropathol 2009 ; 118(5) : 685-95.

PLÜCKTHUN A.

Antibodies from *Escherichia coli*.

Nature 1990 ; 347(6292) : 497-8.

PLÜCKTHUN A.

Antibody engineering: advances from the use of *Escherichia coli* expression systems.

Biotechnology (N Y) 1991 ; 9(6) : 545-51.

RAHBARIZADEH F, RASAEI MJ, FOROUZANDEH-MOGHADAM M, ALLAMEH AA.

High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in *Escherichia coli*.

Protein Expr Purif 2005 ; 44(1) : 32-8.

RAHBARIZADEH F, RASAEI MJ, FOROUZANDEH M, ALLAMEH AA.

Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast *Pichia pastoris*.

Mol Immunol 2006 ; 43(5) : 426-35.

REISS P, PROTIÈRE M, LI L.

Core/Shell semiconductor nanocrystals.

Small 2009 ; 5(2) : 154-68.

RIDDER R, SCHMITZ R, LEGAY F, GRAM H.

Generation of rabbit monoclonal antibody fragments from a combinatorial phage display library and their production in the yeast *Pichia pastoris*.

Biotechnology (N Y) 1995 ; 13(3) : 255-60.

ROBAK T.

Rituximab for chronic lymphocytic leukemia.

Expert Opin Biol Ther 2012 ; 12(4) : 503-15.

ROBBINS PF, KANTOR JA, SALGALLER M, HAND PH, FERNSTEN PD, SCHLOM J.

Transduction and expression of the human carcinoembryonic antigen gene in a murine colon carcinoma cell line.

Cancer Research 1991 ; 51 : 3657-62.

ROGACH AL, NAGESHA D, OSTRANDER JW, GIERSIG M, KOTOV NA.

“Raisin Bun”-type composite spheres of silica and semiconductor nanocrystals.

Chem Mater 2000 ; 12 : 1276-85.

ROUSSERIE G, SUKHANOVA A, EVEN-DESRUMEAUX K, FLEURY F, CHAMES P, BATY D *ET AL.*

Semiconductor quantum dots for multiplexed bio-detection on solid-state microarrays.

Crit Rev Oncol Hematol 2010 ; 74(1) : 1-15.

SCHMITZ U, VERSMOLD A, KAUFMANN P, FRANK HG.

Phage display: a molecular tool for the generation of antibodies--a review.

Placenta 2000 ; 21 Suppl A : S106-12.

SERGE A, BERTAUX N, RIGNEAULT H, MARGUET D.

Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes.

Nat Methods 2008 ; 5(8) : 687-94.

SHIOHARA A, HOSHINO A, HANAKI K, SUZUKI K, YAMAMOTO K.

On the cyto-toxicity caused by quantum dots.

Microbiol Immunol 2004 ; 48(9) : 669-75.

SPECTRAVIEWER – INVITROGEN (LOGICIEL DE VISUALISATION DE PROPRIETES SPECTRALES DE PLUSIEURS FLUOROCHROMES). [Consulté le 20/09/2012].

Disponible à partir de URL :

<http://fr-fr.invitrogen.com/site/fr/fr/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html>).

SPINELLI S, FRENKEN LG, HERMANS P, VERRIPS T, BROWN K, TEGONI M *ET AL.*

Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens.

Biochemistry 2000 ; 39(6) : 1217-22.

SU Y, HE Y, LU H, SAI L, LI Q, LI W *ET AL.*

The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase - synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating.

Biomaterials 2009 ; 30(1) : 19-25.

SUKHANOVA A, DEVY J, VENTEO L, KAPLAN H, ARTEMYEV M, OLEINIKOV V *ET AL.*

Biocompatible fluorescent nanocrystals for immunolabeling of membrane proteins and cells.
Anal Biochem 2004 ; 324(1) : 60-7.

SUKHANOVA A, EVEN-DESRUMEAUX K, KISSERLI A, TABARY T, REVEIL B, MILLOT JM *ET AL.*

Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe.

Nanomedicine 2012 ; 8(4) : 516-25.

SVENBERG T, HAMMARSTRÖM S, HEDIN A.

Purification and properties of biliary glycoprotein I (BGP I). Immunochemical relationship to carcinoembryonic antigen.

Mol Immunol 1979 ; 16(4) : 245-52.

VAGNONI V, SCHIAVINA R, ROMAGNOLI D, BORGHESI M, PASSARETTI G, DABABNEH H *ET AL.*

Molecular diagnostic tools for the detection of nodal micrometastases in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy with extended pelvic lymph node dissection: a prospective study.

Urologia 2012 Jul 20. [Epub ahead of print]

VAN DER LINDEN RH, FRENKEN LG, DE GEUS B, HARMSSEN MM, RUULS RC, STOK W *ET AL.*

Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies.

Biochim Biophys Acta 1999 ; 1431(1) : 37-46.

VANEYCKEN I, D'HUYVETTER M, HERNOT S, DE VOS J, XAVIER C, DEVOOGDT N *ET AL.*

Immuno-imaging using nanobodies.

Curr Opin Biotechnol 2011 ; 22(6) : 877-81.

VON KLEIST S, CHAVANEL G, BURTIN P.

Identification of an antigen from normal human tissue that crossreacts with the carcinoembryonic antigen.

Proc Natl Acad Sci U S A 1972 ; 69(9) : 2492-4.

VU KB, GHARROUDI MA, WYNS L, MUYLDERMANS S.

Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies.

Mol Immunol 1997 ; 34(16-17) : 1121-31.

WANG C, JIANG Y, ZHANG Z, LIU X, LI S, CHEN Y *ET AL.*

Synthesis of size- and shape-controlled monodisperse PbSe quantum dots via a green approach.

J Nanosci Nanotechnol 2010 ; 10(8) : 5036-41.

WARD E.S.

Antibody engineering: the use of *Escherichia coli* as an expression host.

FASEB J 1992 ; 6 : 2422-7.

WARD M, LIN C, VICTORIA DC, FOX BP, FOX JA, WONG DL *ET AL.*

Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*.

Appl Environ Microbiol 2004 ; 70(5) : 2567-76.

WONG NS, KAHN HJ, ZHANG L, OLDFIELD S, YANG LY, MARKS A *ET AL.*

Prognostic significance of circulating tumour cells enumerated after filtration enrichment in early and metastatic breast cancer patients.

Breast Cancer Res Treat 2006 ; 99(1) : 63-9.

WU TT, JOHNSON G, KABAT EA.

Length distribution of CDRH3 in antibodies.

Proteins 1993 ; 16(1) : 1-7.

WU X, LIU H, LIU J, HALEY KN, TREADWAY JA, LARSON JP *ET AL.*

Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots.

Nat Biotechnol 2003 ; 21(1) : 41-6.

YOUNG SH, ROZENGURT E.

Qdot nanocrystal conjugates conjugated to bombesin or ANG II label the cognate G protein-coupled receptor in living cells.

Am J Physiol Cell Physiol 2006 ; 290(3) : C728-32.

ZACH O, LUTZ D.

Tumor cell detection in peripheral blood and bone marrow.

Curr Opin Oncol 2006 ; 18(1) : 48-56.

ZAJAC A, SONG D, QIAN W, ZHUKOV T.

Protein microarrays and quantum dot probes for early cancer detection.

Colloids Surf B Biointerfaces 2007 ; 58(2) : 309-14.

ZAMAN MB, BARAL TN, ZHANG J, WHITFIELD D, YU K.

Single-Domain Antibody Functionalized CdSe/ZnS Quantum Dots for Cellular Imaging of Cancer Cells.

J Phys Chem C 2009 ; 113 (2) : 496-9

ZAMAN MB, BARAL TN, JAKUBEK ZJ, ZHANG J, WU X, LAI E *ET AL.*

Single-domain antibody bioconjugated near-IR quantum dots for targeted cellular imaging of pancreatic cancer.

J Nanosci Nanotechnol 2011 ; 11(5) : 3757-63.

Annexes