

Résumé des Conférences de la 2^{ème} Journée Nationale « Puces à Protéines » 13 septembre 2007, Nantes

Perspectives biomédicales des puces à protéines.

Professeur Vehary SAKANYAN - Université de Nantes & PROTNETEOMIX

Les résultats de ces dernières années soulignent l'intérêt croissant que suscitent les puces à protéines pour répondre aux questions médicales urgentes. Cette technologie miniaturisée est parfaitement positionnée pour l'analyse des protéomes de différents organismes. De plus, étant donné qu'une faible quantité d'échantillons cliniques est nécessaire pour l'analyse, les puces à antigènes deviennent hautement attractives pour le développement des outils performants pour les applications médicales, en particulier pour le diagnostic et le pronostic des maladies infectieuses, auto-immunes et allergiques. Les puces à anticorps possèdent un potentiel important pour élucider la régulation globale et évaluer l'activité fonctionnelle des voies de signalisation dans les cellules et tissus cancéreux et d'autres pathologies sévères.

Les ProtoArray™ : des BioPuces de Protéines fonctionnelles.

Docteur Sylvie NURY – INVITROGEN

Les ProtoArrays™ sont des lames de verre sur lesquelles sont spottées plusieurs milliers de protéines fonctionnelles, produites en baculovirus et pures à plus de 80%.

Les applications liées à l'utilisation de ces BioPuces sont les suivantes :

1. Mise en évidence rapide d'interactions a/ Protéines/Protéines, b/ Protéines/Anticorps (étude de spécificité), c/ Protéines/Petites Molécules, d/ Protéines/Lipides, e/ Protéines/Acides Nucléiques
2. Identification rapide de substrats d'enzymes (ex. kinases) avec ou sans la présence d'un inhibiteur
3. Identification de bio-marqueurs, liés à la présence d'anticorps auto-immuns dans le sérum de malades.

Evaluation de la réponse immunitaire de type IgE de patients allergiques envers des allergènes du lait natifs et recombinants.

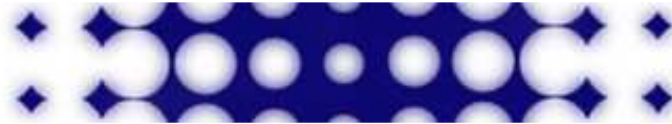
Docteur Jean Charles GAUDIN - INRA, Nantes

L'allergie ou hypersensibilité de type I est la plupart du temps associée à la présence d'immunoglobulines de type E (IgE) spécifiques d'allergènes dans le sérum des patients. Chez des patients allergiques au lait, la capacité de tels IgE à reconnaître les allergènes du lait natifs et recombinants a été recherchée en utilisant la technique des puces à protéines. Il a ainsi été montré que les caséines, protéines majoritaires du lait et allergènes majeurs, étaient reconnues aussi bien sous forme recombinante que sous forme native.

MAGYarray et Service de puces à protéines à façon.

Audrey BROSSARD - PROTNETEOMIX

Les micropuces à protéines ouvrent une nouvelle voie pour l'étude comparative et quantitative d'un grand nombre d'échantillons à intérêts médicales et agroalimentaires. Nous avons développé une puce à anticorps, MAGYarray, dédiée à l'évaluation des variations d'expression des protéines cibles impliquées dans le cycle cellulaire, la formation du cytosquelette, etc... L'application de la fluorescence, très particulièrement de l'infrarouge proche, et notre « savoir-faire » assurent une performance importante de cette nouvelle approche pour suivre le niveau d'expression des protéines dans différents échantillons biologiques tels que les lignées cellulaires, les biopsies, le sérum, etc... De plus, nous proposons des services pour la fabrication et l'analyse de différentes puces à protéines à façon (composées d'anticorps, d'antigènes, de protéines individuelles ou de lysat total) mais aussi l'analyse sur d'autres puces commerciales (recherche de biomarqueurs, évaluation des cytokines).



Résumé des Conférences de la 2^{ème} Journée Nationale « Puces à Protéines » 13 septembre 2007, Nantes

Protein Arrays on FAST® Slides: From Research to Diagnostics.

Doctor Michael WALTHER - WHATMAN GmbH, Germany

Protein Microarrays are recognized as valuable tools in basic research since years. Scientists from various fields of research, from cancer research to autoimmunity, from microbiology and virology to immunology, have successfully used a wide variety of multiplex assays based on Protein Microarrays. Recently, Protein Microarrays have matured to serve also as a technology platform in routine clinical diagnostics. The first CE certified in-vitro diagnostic protein chips are now on the market. Whatman's FAST® Slide technology is the leading surface for production of Protein Microarrays. Here we will introduce FAST® Slide technology and show examples of research and diagnostic systems based on FAST® Slides indicating the enormous potential of Protein Microarrays.

Inhibition des voies PI(3)K/Akt et ERK kinase dans la dystrophie musculaire de Duchenne.

Docteur Laetitia GUEVEL - UMR CNRS 6204, Université de Nantes

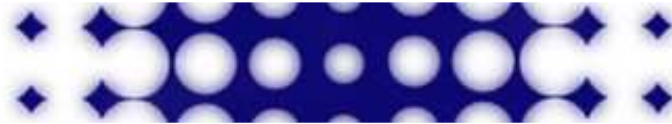
Des mutations dans le gène de la dystrophine sont à l'origine d'une pathologie neuromusculaire grave: la dystrophie musculaire de Duchenne. Il apparaît que les dérèglements affectant les voies de signalisation intracellulaires pourraient contribuer au phénotype dégénératif de cette maladie. Des expériences comparatives ont été réalisées sur des cellules dérivées du muscle de chiens, sain et GRMD, à l'aide d'une puce à anticorps dédiée aux voies MAP kinases et PI(3)K/Akt. Cette approche protéomique nous a permis d'évaluer à la fois le niveau d'expression et la phosphorylation des protéines des voies de signalisation et ce, sur un grand nombre

d'échantillons. Nos résultats, confirmés par Western Blot, révèlent une inhibition d'Akt, de GSK3 β , p70S6K et ERK1 et 2. L'identification de protéines-kinases des voies PI(3)K/Akt et ERK, dont la modulation de l'activité est importante pour la progression de la pathologie chez les chiens, permettrait de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques contre la maladie humaine.

Les nouveaux outils de profiling protéomique.

Docteur Frédéric DUBOR – TEBU-BIO

Les méthodes de quantification classique permettent d'avoir une analyse fine et précise d'un certain nombre de paramètres. Toutefois, les coûts et les temps expérimentaux ne permettent pas de développer ces analyses de manière exhaustive. Or l'évolution des connaissances sur les mécanismes qui régissent une réponse biologique implique maintenant de prendre en compte un nombre toujours croissant de facteurs. Les stratégies de recherche doivent dorénavant intégrer cette nouvelle dimension. Les outils de profiling protéomique offrent une opportunité unique de déterminer en une expérimentation les marqueurs essentiels impliqués dans une réponse biologique. L'analyse d'une étude de cas servira de support pour montrer l'intérêt de cette nouvelle approche. L'étude a porté sur la modification du profil d'expression de 162 cytokines et chémokines humaines après divers traitements de cellules MCF7. Les résultats obtenus sur surnageants de culture ainsi que sur lysats cellulaires seront présentés.



Résumé des Conférences de la 2^{ème} Journée Nationale « Puces à Protéines » 13 septembre 2007, Nantes

Une nouvelle approche de *protein array* pour la mesure d'interactions entre molécules en temps réel et sans marquage.

Docteur Nathalie LASSALLE – GENOPTICS

La Société GenOptics développe et commercialise des instruments SPRi (Surface Plasmon Resonance Imaging) lesquels, contrairement aux instruments SPR classiques, donnent accès au format « microarray ». En effet, la configuration optique originale couplée à une caméra CCD permet de visualiser la puce en temps réel et de suivre les modifications locales qui ont lieu en tout point de la puce. Ainsi, cette technologie innovante permet de créer des biopuces au format « microarray » sur lesquelles un grand nombre de molécules (jusqu'à 400) peuvent être greffées. Nous présenterons les résultats de MB Villiers (INSERM U823, équipe 8, Grenoble-France) concernant la réalisation d'une puce à peptides dans le but de détecter des anticorps circulants à partir de milieu complexe tel que le sérum humain. En conclusion, les domaines d'applications de la SPRi sont nombreux : diagnostic précoce, suivi clinique, biosécurité...

Panorama antibody microarrays.

Docteur Patrick CHOFARDET - SIGMA

La détermination d'un profil protéique d'un échantillon est une approche utile pour la recherche de bio-marqueurs ou l'étude des conséquences sur ou des implications de voies de signalisation dans un processus biologique normal ou en regard d'une pathologie ou en réponse à un effecteur (drogue, si/shRNA, ...). Les puces à anti-corps Panorama antibody microarrays sont une réponse à cette stratégie et une alternative à l'électrophorèse 2D couplée à la spectrométrie de masse. Pouvant s'apparenter à un western-blot multiplex, elles ont l'avantage de permettre une telle étude sur des protéines faiblement exprimées et leurs éventuels

variants phosphorylés, méthylés, ... selon un protocole accessible à tous.

Etude des adaptations fonctionnelles et épigénétiques du Système nerveux Central induites par la dénutrition périnatale.

*Docteur Francisco BOLANOS-JIMENEZ – INRA, UMR1280
Physiologie des Adaptations Nutritionnelles, Nantes*

La dénutrition périnatale induit des adaptations physiologiques chez le nouveau-né qui le prédisposent à développer obésité, du diabète et des maladies cardiovasculaires à l'âge adulte. Dans cette étude, nous avons examiné si ces adaptations métaboliques sont associées à des changements épigénétiques. Le criblage de puces à protéines avec des anticorps anti-histones a montré que la restriction protéique pendant le développement périnatal, modifie le niveau d'acétylation et de méthylation des histones H3 et H4 dans le cerveau. Ces modifications diffèrent d'une région cérébrale à une autre et sont associées soit à une augmentation soit à une inhibition de la transcription. La susceptibilité pathologique induite par la dénutrition périnatale pourrait être donc être due à une altération des mécanismes de régulation épigénétique de l'expression des gènes régulant la prise alimentaire au niveau cérébral.

Analyse des interactions biomoléculaires en temps réel par fluorescence.

Docteur Gordana CEROVIC – GENEWAVE

En dépit de l'utilisation très répandue des biopuces dans la communauté scientifique et depuis peu dans la recherche clinique, leur mise au point et leur optimisation constituent un obstacle important à la plupart de leurs applications. Jusqu'à présent, la



Résumé des Conférences de la 2^{ème} Journée Nationale « Puces à Protéines » 13 septembre 2007, Nantes

technologie des biopuces repose uniquement sur la mesure finale d'hybridation, ce qui contribue grandement à cette limitation. Afin de répondre à ce problème, nous avons développé un nouvel instrument de biopuces innovant, qui combine une station d'hybridation/lavages incluant un système de mélange efficace et un contrôle de température précis, couplée à un lecteur de fluorescence. Cet appareil hautement intégré, appelé HybLive™, permet de mesurer simultanément et en temps réel l'hybridation de molécules cibles à des centaines de molécules sondes fixées sur une lame. Il autorise ainsi un grand nombre d'expériences jusqu'à présent inenvisageables avec les outils à biopuces conventionnels, telles que la détermination des conditions optimales d'incubation anticorps-antigène ou la vérification et la validation de la synthèse des anticorps en une seule expérience, l'étude des interactions intermoléculaires sur lame... Afin d'illustrer les potentialités très prometteuses de HybLive™, nous présenterons une série de résultats expérimentaux obtenus dans nos laboratoires sur puces à ADN et à protéines.

Multiplexed diagnostics with fluorescent semiconductor nanocrystals: nano-detection on the liquid- and solid-state chips.

Professeur Igor NABIEV - Université de Reims

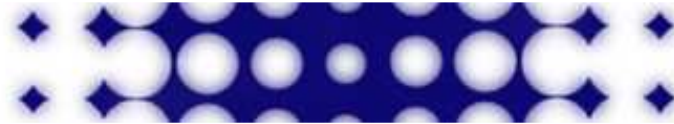
First application of fluorescent semiconductor nanocrystals (NCs) to clinical proteomics is demonstrated by multiplexed detection and profiling of circulating auto-antibodies. NCs fluorescent signals exhibit narrow distribution without the need of any fluorescence compensation – a parameter determining the limit of detection sensitivity. In single NC-encoded microbead measurements, < 10 dye-labelled antibodies interacting with the surface of a bead have been detected by the emission of dye excited through the FRET from NCs. In this format, the antibody-bead interaction reaction

turns specifically the fluorescence signal from dye label off and on, additionally increasing detection sensitivity. The perspectives of fluorescent NCs applications to the solid-state chips multiplexed detection and diagnostics are discussed.

Détection et Quantification des protéines avec l'imageur de fluorescence infrarouge Odyssey.

Daniel ANDRE – SCIENCETEC

La détection et la quantification de protéines endogènes présentes en faibles quantités est toujours un challenge. Les méthodes traditionnelles de détection : radioactivité, chimiluminescence et mesure de la fluorescence dans le visible, présentent des inconvénients de mise en oeuvre, de sensibilité ou de quantification. LI-COR propose un imageur de fluorescence infrarouge, l' ODYSSEY ainsi que des marqueurs fluorescents à 700 et 800 nm. Mesurer la fluorescence à des longueurs plus élevées permet de s'affranchir des fluorescences parasites venant des échantillons, des plastiques et des membranes et d'obtenir des limites de détection équivalentes ou supérieure à la chimiluminescence sans en avoir les inconvénients. L' ODYSSEY, mesurant à deux longueurs d'ondes permet de quantifier simultanément deux cibles : par exemple, dans l'étude des voies de signalisation, une protéine totale et sa partie phosphorylée. De nombreuses références bibliographiques existent maintenant sur les différentes applications possibles de l'ODYSSEY : western blot, western in cell, biopuces, gels retards, études in-vivo, imagerie de sections d'organes, dosages de protéases, etc....Le choix d'un seul marqueur infrarouge pour toutes étapes d'une recherche permet d'avoir simplement et rapidement les meilleurs résultats.



Résumé des Conférences de la 2^{ème} Journée Nationale « Puces à Protéines » 13 septembre 2007, Nantes

Interêt des nanoparticules magnétiques dans la chromatine immunoprécipitation.

Docteur Benoît GRILLET - ADEMTECH

Ademtech commercializes an innovative kit dedicated to chromatin immunoprecipitation (ChIP) in order to offer a competitive tool to the scientific community carrying out ChIP. On the basis of protein A or G grafted magnetic nanoparticles, Ademtech has developed a complete kit and a protocol with no need of preclearing step, and which leads to the recovery of large quantities of specific genomic material compared to other systems.

Puces à petites molécules : criblage de chimiothèques.

Marie ANGELINI - PROTNETEOMIX

Nous avons développé une méthode de criblage à haut-débit des petites molécules et des peptides, synthétisés par voie chimique, qui interagissent avec des protéines d'intérêt. La méthode élaborée consiste à immobiliser de façon non-covalente les composés sur un support particulier et à détecter leurs interactions avec une cible protéique en utilisant la fluorescence dans l'infra-rouge proche assurant une sensibilité très élevée. Sa faisabilité a été prouvée en criblant des agents antibactériens provenant de plusieurs chimiothèques. De nouveaux inhibiteurs, dirigés contre les « Penicillin Binding Proteins » et différents des antibiotiques connus, ont été découverts. Cette méthode universelle est aussi applicable pour la recherche de médicaments potentiels contre le cancer et d'autres pathologies humaines.