

Appel à projets doctoraux 2016 Programme Doctoral SMART ED : EDITE

Titre de la thèse : Bio-processeur Optoélectronique matriciel pour l'analyse à haut débit des interactions biologiques

Laboratoire : Laboratoire d'Electronique et Electromagnétisme - Université Pierre et Marie Curie

Directeur de thèse : Aziz BENLARBI-DELAÏ

Mail de contact : Aziz.benlarbi_delai@upmc.fr

Codirection : Mohamed Ben Chouikha

Collaborations dans le cadre de la thèse : Pr. Guy GOROCHOV - Département APHP d'Immunologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière.

Axes thématiques du Labex correspondant au PRD :

- *La création de services et de technologies associées aux besoins de l'e-santé.
- *La compréhension de l'humain dans ses dimensions cognitives, neurophysiologiques et biomécaniques

Sujet développé

Contexte :

Avec le vieillissement de la population et l'évolution de maladies infectieuses, il devient urgent de développer de nouvelles approches thérapeutiques et préventives, ainsi que des dispositifs innovants pour un diagnostic avancé sur le lieu de soin ou de résidence.

Les bactéries de la flore commensale sont caractérisées par leur extrême diversité (plus de 2000 espèces), et par la variation de leur composition d'un sujet à l'autre. Certains types de flores bactériennes sont associés au risque métabolique ou aux maladies inflammatoires de l'intestin, pour ne citer que deux exemples. Par ailleurs, certains « pathobiontes » appartenant au microbiote intestinal normal sont fréquemment à l'origine de sepsis chez les sujets à risque (extrémités de la vie, immunodépression). Il serait donc nécessaire de disposer d'une banque d'anticorps monoclonaux (AcM) ciblant les différentes espèces bactériennes afin de pouvoir manipuler le microbiome dans un but thérapeutique ou préventif. De plus, les AcM thérapeutiques couramment utilisés sont généralement issus d'AcM de souris. L'utilisation d'AcM humains est nécessaire afin d'éviter que le système immunitaire génère des anticorps dirigés contre l'anticorps thérapeutique.

Le défi est énorme. *Premier problème (i)* ; comment cribler jusqu'à 10^6 (ordre de grandeur d'un répertoire humain) AcM humains de spécificité antibactérienne inconnue ? On ne dispose pas pour chaque bactérie d'une collection complète des cibles antigéniques possibles. Fabriquer une telle banque d'antigènes exhaustive représenterait des efforts et des coûts considérables. *Deuxième problème (ii)* ; La quantité d'AcM humains produite dans les phases initiales d'une recherche est forcément limitée, surtout si un grand nombre d'anticorps sont produit en parallèle. Comment tester un AcM de spécificité inconnue contre une grande diversité de cibles potentielles quand on ne dispose que de quelques nanogrammes de cet anticorps ?

Afin de relever ce défi, le laboratoire d'électronique et d'électromagnétisme L2E, et le département APHP d'Immunologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière associé au CIMI-Paris, mettent en place une nouvelle collaboration pour le développement d'une approche innovante de criblage de spécificité d'AcM humain ainsi que d'un dispositif de diagnostic miniature et performant. Nous souhaitons développer ce système, intitulé "Bio-processeur optoélectronique matriciel pour l'analyse à haut débit des interactions biologiques (MATRIX)", dans le cadre d'un contrat doctoral financé par le Labex SMART.

Positionnement par rapport à l'état de l'art :

Le département APHP d'Immunologie de l'Hôpital Pitié-Salpêtrière, associé au CIMI-Paris, est engagé dans la production d'AcM humains dirigés contre les bactéries de la flore commensale et contre des pathobiontes et des pathogènes [11,12]. Une méthode d'immortalisation des cellules B humaines (à partir du sang ou de la muqueuse digestive ou de tout autre tissu), permet l'expansion clonale (à partir d'une seule cellule) de cellules productrices d'anticorps a été récemment mise au point [1]. Cette technologie a été mise en place au laboratoire d'Immunologie à travers un accord de collaboration et de transfert technologique avec la société AIMM Therapeutics (Amsterdam). Le problème actuel est que ces anticorps sont produits en quantités très limitées alors que l'étude de leur spécificité, par des méthodes classiques, nécessite des volumes plus élevés. Une étude récente a montré la possibilité d'étudier la spécificité d'Ac recombinants humains dérivés de la muqueuse intestinale à l'aide de lysats bactériens [2]. Il est donc maintenant possible, d'une part : *i)* de produire des AcM en grand nombre, mais en petites quantités et d'autre part : *ii)* de déterminer leur cibles à l'aide de produits microbiens non purifiés, obtenus par des méthodes simples et peu coûteuses. D'une manière intéressante, il faut souligner que les cibles ainsi produites correspondent parfaitement à la réalité biologique et n'ont pas les désavantages des réactifs produits par synthèse *in vitro*, aboutissant souvent à l'obtention d'anticorps dépourvus d'activité biologique *in vivo*.

Nous envisageons donc de surmonter l'obstacle représenté par la préparation de banques exhaustives de cibles en utilisant directement des lysats bactériens. La mise au point, ainsi que l'application de cette approche innovante pour manipuler le microbiome dans un but thérapeutique ou préventif, nécessite le développement d'un dispositif de diagnostic miniature et de performances élevées.

La miniaturisation des dispositifs de diagnostic par dosage immunologique est un domaine de recherche en plein développement [3]. Une grande partie des systèmes reportés dans la littérature utilise des méthodes optiques et repose sur le format ELISA pour détecter des protéines ou des agents biologiques (figure1). Le progrès réalisé dans les domaines des capteurs et des systèmes de mesure, ainsi que l'utilisation d'AcM et des nouvelles techniques de marquage, a permis d'atteindre des limites de détectivité (LOD pour Limit Of Detectivity) de l'ordre du pico-Mole[3,4]. Cependant, les photo-détecteurs usuels (photodiode, photorésistance, CCD) utilisés dans la plupart de ces systèmes délivrent un signal électrique proportionnel à l'intensité de lumière sans donner d'information sur sa couleur ni sur sa composition spectrale. Un système optique approprié (réseau de dispersion ou un jeu de filtres) est alors nécessaire pour réaliser le dosage immunologique. Cette approche n'est pas compatible avec la conception de systèmes compacts et à faible coût et peut générer des incertitudes faussant les mesures. Par ailleurs, une circulation microfluidique complexe est généralement nécessaire pour que ces systèmes puissent effectuer le diagnostic.

Nous envisageons d'apporter des améliorations substantielles aux performances de ces systèmes par le développement d'un capteur matriciel à base de détecteur de couleur à jonctions enterrées. Le développement de capteurs optiques miniatures, performants, à faible coût et à faible consommation est l'une des missions du L2E. Nous avons développé un détecteur de couleur à jonctions enterrées et défini une méthode de mesure améliorant le LOD des dispositifs de diagnostic. En effet, les détecteurs de couleur à base de deux jonctions enterrées offrent une mesure plus précise de la couleur d'une solution [5-6], par le biais du rapport des deux photo-courants. Ce rapport permet de s'affranchir du bruit et des fluctuations de la lumière incidente. Les résultats ont montré que notre système a un le LOD inférieur à 0.1 pMol pour un trajet optique de 1mm alors que la plus faible valeur reporté dans la littérature[4] est de 1pM pour un trajet optique de 2mm[4]. Par ailleurs le LOD de notre système est fort probablement limité par les réactifs utilisés [7]. Nous envisageons de pousser ce LOD au delà de 100 fMol par la réduction de courant d'obscurité du détecteur et par le développement d'une électronique de lecture rapide, faible bruit, basse consommation et de haute dynamique.

Objectifs et résultats attendus :

L'objectif de cette thèse est de mettre en place un système de criblage de spécificité à haut débit, miniaturisé permettant à terme l'étude de jusqu'à 10^6 d'AcM humains différents. La méthode de détection sera basée sur l'enzymo-immunos dosage qui produit un virage colorimétrique ou/et sur la fluorescence, dans un environnement micro-fluidique.

La stratégie que nous proposons pour atteindre cet objectif consiste à :

1) Concevoir, dans une technologie CMOS, un circuit (une puce) comprenant une matrice de détecteurs de couleur à base de jonctions enterrées ainsi que leur électronique de lecture et de commande. Les outils de modélisation et les techniques de conception que nous avons développés ultérieurement nous permettront de réduire, aux environs du pA/cm^2 , le courant d'obscurité du détecteur à jonctions enterrées. Nous envisageons d'atteindre une dynamique de 7 décades grâce à une architecture de lecture type pixel intégrant (basée sur un transistor fonctionnant dans le régime de faible inversion). Les techniques de conception développées au laboratoire[9,10] nous permettront de réduire le bruit du pixel au $nV/\sqrt{\text{Hz}}$. Nous pouvons ainsi améliorer la sensibilité du détecteur et pousser le LOD au delà de 100 fM.

Ce circuit sera ensuite intégré dans un système embarqué, qui sera conçu et réalisé dans le cadre de la thèse. Le système permettra de traiter et d'analyser les mesures issues des différents pixels de la matrice, d'établir le diagnostic à partir d'un algorithme embarqué, et d'afficher les résultats. L'architecture du système embarqué sera conçue afin de permettre la communication le transfert des données avec un ordinateur et avec un Smartphone. Nous envisageons de développer une application sur Smartphone permettant d'afficher le diagnostic voir de mettre à jour une base de donnée.

2) Lier sur la puce (dans des micro-puits) du lysat bactérien. Les AcM humains provenant de cultures cellulaires seront ensuite déposés dans les micro-puits. Après lavage, les anticorps spécifiques resteront fixés sur le Lysat bactérien dans les micro-puits. Leur détection sera possible à l'aide d'un anti-anticorps humain « standard » marqué par HRP ou par une molécule fluorescente. Le test repose donc sur un format type « sandwich Elisa » modifié. Les étapes de lavages peuvent être réalisées manuellement ou à l'aide d'un système micro-fluidique simple. L'avantage de lier ainsi sur une puce des fragments d'organismes vivants, non purifiés, permet à la fois de réduire les coûts, d'augmenter dans de très grandes proportions le nombre de tests pouvant être réalisés en temps réel, tout en restant au plus près de la réalité biologique, dans le cas présent cette stratégie permettra de détecter des anticorps qui reconnaissent des bactéries vivantes, non modifiées. On s'attend à que de tels anticorps aient une réelle activité biologique, ce qui n'est pas toujours le cas d'anticorps caractérisés à l'aide de protéines recombinantes ou de tout autres réactifs de synthèse, comme souligné plus haut.

Nous pensons que les résultats de cette thèse nous permettront de progresser à terme vers la construction de micro-puces présentant 10^6 micro-puits d'une part et, d'autre part, vers la construction d'une banque d'AcM d'intérêt pour le diagnostic microbiologique dans le contexte de l'urgence, au lit du malade.

Références :

- [1] Kwakkenbos MJ et al. , Genetic manipulation of B cells for the isolation of rare therapeutic antibodies from the human repertoire., *Methods*. 2014 Jan 1; 65(1):38-43.
- [2] Julia Benckert et al. The majority of intestinal IgA^+ and IgG^+ plasmablasts in the human gut are antigen-specific, *J Clin Invest*. 2011 May 2; 121(5): 1946–1955.
- [3] [L Gervais, N De Rooij](#), E Delamarche, *Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnosics*, *Advanced materials*. 2011 ; Vol. 23, pg :H151 - H176
- [4] A. Gouvêa & al., Colorimetric detection of molecular recognition reactions with an enzyme biolabel using thin-film amorphous silicon photodiode on a glass substrate, *Sensors and Actuators B* 135 (2008) 102-107.
- [5] M. Ben Chouikha et al., A Photodetector Based on Buried Junctions and a Corresponding Method of Manufacture, USA Patent N° US005883421A, 16 mars 1999.
- [6] G.N LU et al. , Colour detection using a buried double P-N junction structure implemented on a CMOS process, *Electronics Letters*. Mars 1996, Vol. 32 N°6, pp 594-596.
- [7] <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-biology/antibodies/antibody-products.html?TablePage=9679284>.
- [9] Céline Delporte, *Système d'imagerie peropérateur**, these de doctorat, 12 juillet 2013.
- [10] Sana Hamdaoui, *Conception d'une puce colorimétrique pour la détection des allergènes**, these de doctorat, 7 janvier 2015.
- [11] Patent application "Method for determining cellular polyfunctionality", Larsen M, Sauce D, Arnaud L, Appay V, Gorochov G, Filed, 2012 by Inserm.
- [12] Larsen M, Arnaud L, Hié M, Parizot C, Dorgham K, Shoukry M, Kemula M, Barete S, Derai D, Sauce D, Amoura Z, Pène J, Yssel H, Gorochov G., Multiparameter grouping delineates heterogeneous populations of human IL-17 and/or IL- 22 T-cell producers that share antigen specificities with other T-cell subsets. *Eur J Immunol*. 2011 Sep;41(9):2596-605.