



HAL
open science

Nanocapteurs olfactifs et leur application potentielle dans la détection non-invasive de pathologies

Edith Pajot

► **To cite this version:**

Edith Pajot. Nanocapteurs olfactifs et leur application potentielle dans la détection non-invasive de pathologies. 31. Journées Pédagogiques Scientifiques de l'AE2BM, Association des Enseignants de Biochimie et Biologie Moléculaire des Facultés de Pharmacie (AE2BM). FRA., Sep 2015, Nancy, France. hal-01344433

HAL Id: hal-01344433

<https://hal.science/hal-01344433>

Submitted on 5 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Nanocapteurs olfactifs et leur application potentielle dans la détection non-invasive de pathologies

Edith PAJOT-AUGY

INRA (Institut National de la Recherche Agronomique)

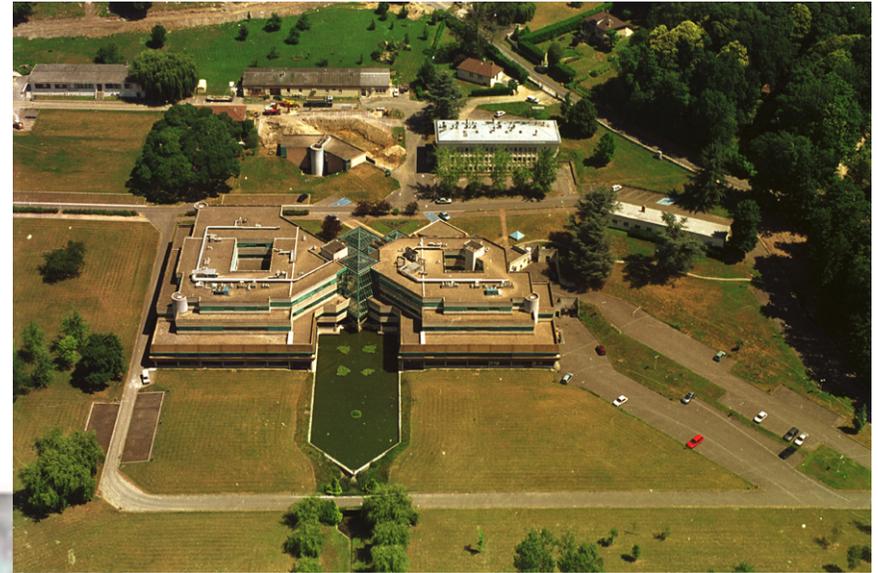
NeuroBiologie de l'Olfaction

Jouy-en-Josas

NBO



Jouy-en-Josas



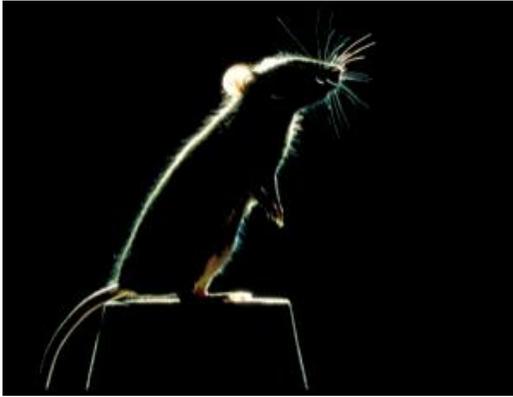
campus INRA





Les odeurs corporelles, issues de l'urine, des selles, du sang, de l'haleine, des sécrétions sont :

- > caractéristiques de chaque individu : elles dépendent à la fois du **profil génétique et de l'état physiopathologique**
- > elles constituaient des **indices cliniques** dans les **pratiques médicales traditionnelles**
- > le **diagnostic sensoriel olfactif** peut encore contribuer à la **détection/identification de certaines pathologies** (pas seulement infectieuses)



Détection d'une pathologie chez des **souris** par des congénères > changement de comportement via des indices odorants (Alves 2012)



Activation d'une réponse immunitaire chez **l'homme**
> odeur corporelle plus aversive : **la maladie a une odeur**

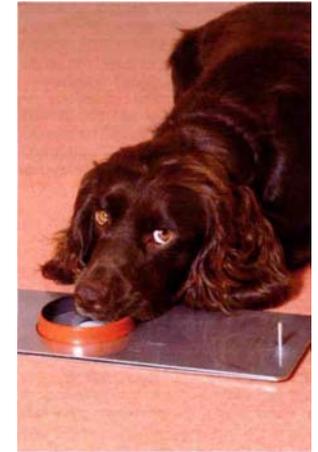


et elle **modifie les comportements d'interaction entre individus**, en protégeant les personnes saines des personnes malades (Olsson 2014)



"Dognoseis" : Diagnostic de divers cancers par des chiens, par des odeurs associées (urine, sang, haleine)

- anecdotique depuis 1989 : **mélanome** (Williams & Pembroke British Med. J. 1989, Church & Williams The Lancet 2001), **cancer du sein** (Welsh et al. Community Oncology 2005)



- présence des odeurs confirmée depuis 1999 dans diverses études :

> **vessie / prostate** : détection dans l'urine (formaldéhyde) (Spanel Rapid Comm. Mass Spectrom. 1999, Willis et al. British Med. J. 2004, Cornu et al. Europ. Urol. 2011), métabolites identifiés dans l'urine par GC-MS (Jobu 2012)

> **colorectal** : détection dans l'haleine ou les selles (Sonoda et al. Gut 2011)

> **poumon** : odorants dans le sang (Deng et al. J. Chromatogr. B. 1999), et l'haleine (isoprène, benzène et dérivés : Phillips et al. Chest 2003)

> **sein** : odorants dans l'haleine (Phillips et al. The Breast J. 2003)

> **autres** : **lymphome, leucémie**, ... (Yazdanpanah et al. Free Radical Biol. & Medicine 1997)



> mélanome

- **odorants dans le sang, l'urine** (Pickel et al. Appl. Animal Behav. 2004)

- **odeurs identifiées sur la peau (carcinome basocellulaire)** (Gallagher et al. ACS Meeting, Philadelphia, PA, USA, August 2008, Gallagher et al. British J. Dermatol. 2008, patent submitted)

- **selon les types de cancers, les profils odorants diffèrent par la quantité relative de certaines odeurs**

> **applications potentielles pour le diagnostic rapide et non-invasif du cancer de la peau?**



> **carcinome ovarien** (mortalité élevée de 50% en cas de diagnostic tardif) : **odeur spécifique dans les tissus et le sang , détectée par des chiens entraînés, pour un criblage précoce non-invasif** (Horvath et al. Integrated Cancer Therapeutics 2008, Horvath BMC Cancer 2010), et même pour un pronostic de survie (Horvath et al. BMC Cancer 2013)



Diagnostic de la tuberculose par des rats à partir d'expectorations (2003)

<http://www.apopo.org/en/tuberculosis-detection/about>

- > rats de Gambie (rats Africains géants) entraînés à discriminer des échantillons TB+ / -
- > **évaluation rapide** : 40 échantillons / 7 minutes (1 jour pour un technicien en labo)
- > **sensibilité 86%, spécificité 89%**
 - > utilisé en Tanzanie et Mozambique, où la tuberculose est une cause majeure de maladie et décès
 - > implémenté dans des **programmes de criblage de première instance**, ou en complément de tests de microscopie



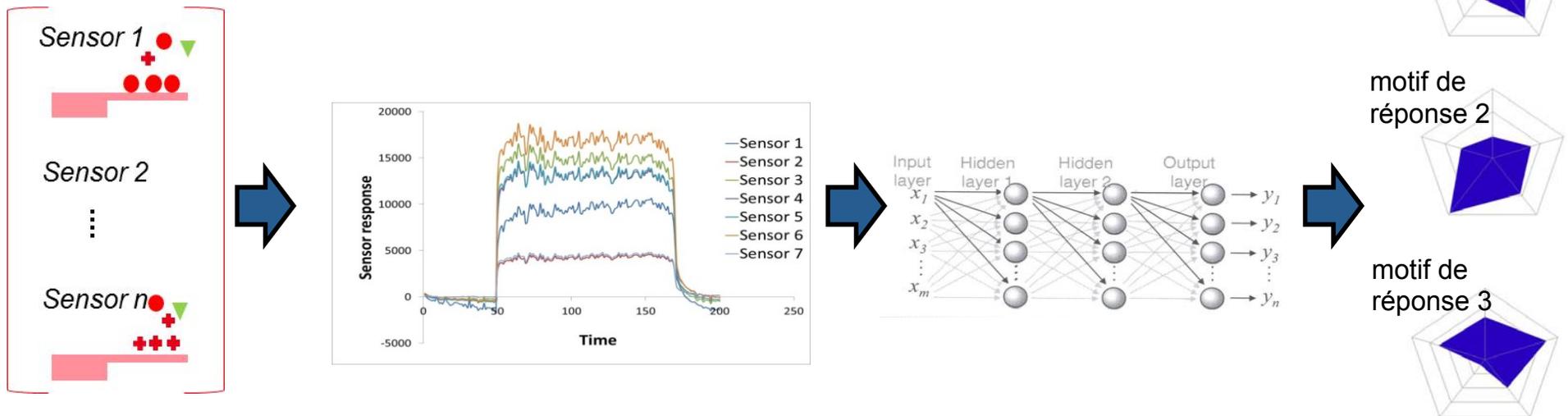
> **phénylcétonurie** (phénylcétones d'odeur caractéristique dans les urines et l'haleine dûes à un défaut génétique de dégradation de la phénylalanine, Burke et al. Clin Chem 1983, Jousserand et al. J. Neurology 2010)



> **triméthylurie** (syndrome de l'odeur de poisson, dû à une faible oxydation de la triméthylamine dans les sécrétions corporelles, Mitchell & Smith Drug Metab Dispos 2001)

Les nez **électroniques** fournissent des résultats intéressants :

- > Réseau de senseurs à large spectre
- > Génération d'une signature caractéristique ("empreinte")
- > Comparaison avec une **base de données** de signatures odorantes



Surfaces sensibles : polymères conducteurs, polymères à empreinte moléculaire, oxydes métalliques, nanotubes de carbone et hybrides, monocouches auto-assemblées fonctionnalisées...

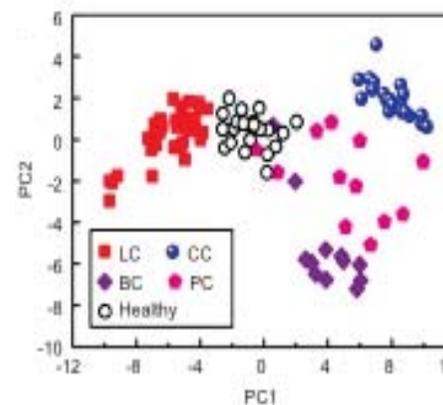
Transducteur : électrochimique, optique, électrique, gravimétrique...

Nanoparticules métalliques recouvertes d'une monocouche (MCNPs) pour le test de l'haleine

> différents ligands de propriétés chimiques et physiques variées

Le réseau différencie l'haleine des patients diagnostiqués avec les 4 cancers primaires les plus fréquents et celle d'individus sains

Peng, G., et al., Br J Cancer, 2010. 103(4): p. 542-551
Tisch, U & Haick, H, Rev Chem Eng 26 (2010): 171-179

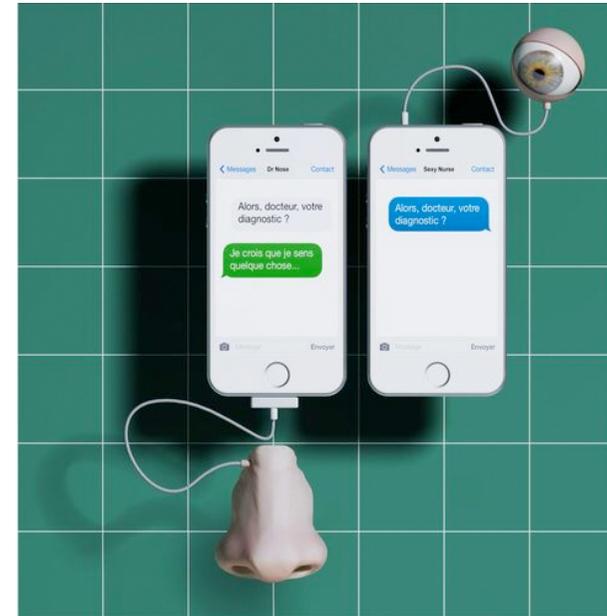


LC-cancer poumon
BC-cancer sein
CC-cancer colon
PC-cancer prostate
O-contrôle sain

> mais **des chiens sont encore utilisés** pour un diagnostic du cancer du poumon sur les odeurs dans l'haleine (Boedeker Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2012)

7 septembre 2015
La recherche a du nez

En Israël, l'**institut Technion** développe un nez électronique capable de détecter les prémices d'un cancer. Des milliers de chercheurs dans le monde planchent sur le potentiel étonnant de l'odorat...



Na-Nose > Sniffphone, combinaison du nez électronique et du Smartphone : un capteur dans lequel on souffle se greffe sur le téléphone, avant analyse et affichage du diagnostic sur l'écran

- **les Composés Volatils Odorants constituent des marqueurs non-invasifs** de lésions néoplasiques du côlon. Des senseurs ciblant spécifiquement ces composés peuvent être développés pour le dépistage **du cancer colorectal et le suivi non-invasif de la réponse à la thérapie**, et pourraient révolutionner les pratiques pour ce cancer et les **pathologies gastrointestinales comme le Syndrôme de l'Intestin Irritable** (de Boer Clinic Gastroenterol Hepatol 2014, Westenbrink Biosens Bioelectron 2015)

- **cancers du tractus urinaire** : corrélés à la présence d'odeurs dans l'urine, détectées par des nez électroniques (Bernabei et al. Sensors & Actuators B, 2008)

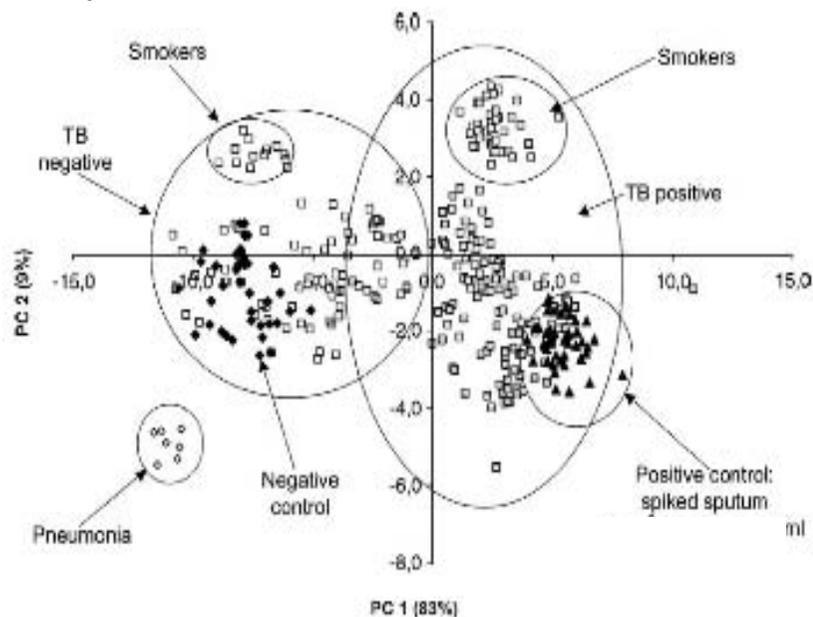
- **un réseau de senseurs de gaz permet de distinguer entre névus bénin et mélanome malin** des mélanocytes (D'Amico et al. Skin Res. Technol. 2008)

- **carcinome ovarien** : une **odeur spécifique dans le sang** est détectée par des nez électroniques, pour un criblage précoce non-invasif (Horvath et al. Future Oncology 2010)



Réseau de senseurs de gaz pour la détection de la tuberculose humaine / expectorations

- > prélèvement d'un espace de tête
- > 14 **senseurs à polymères conducteurs**
- > analyse en composantes principales (PCA)

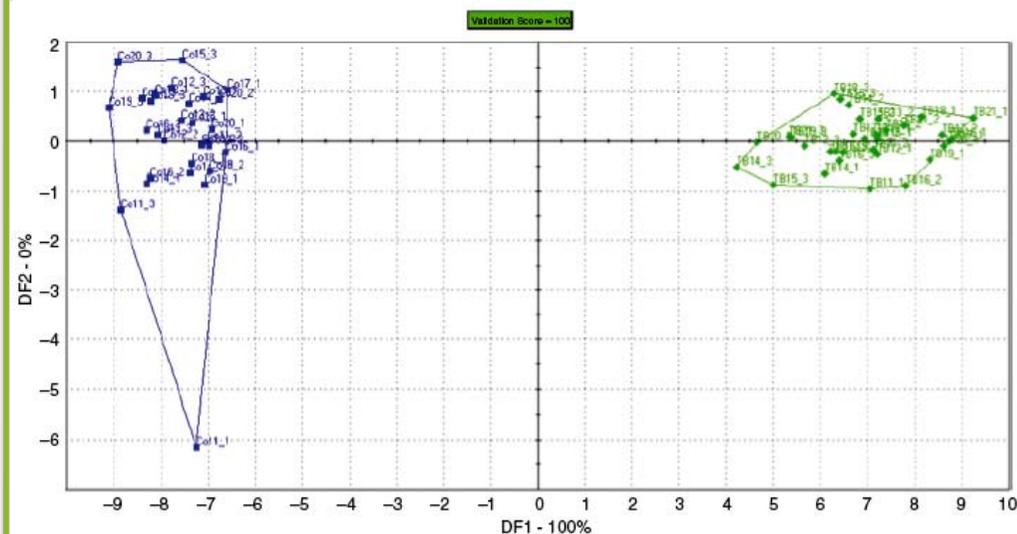


Bonne discrimination, même si incomplète
diagnostics corrects TB+ : 88%, TB- : 92%

(Fend et al. J Clin. Microbiol. 2006, Pavlou et al. Biosensors & Bioelectronics 2004)

Réseau de senseurs pour la détection de la tuberculose bovine / serum

- > espace de tête
- > 9 **senseurs à oxydes métalliques** (α Fox 3000, Alpha MOS), dont 4 sélectionnés
- > analyse en composantes principales (PCA) ou analyse factorielle discriminante (FDA)



- méthode rapide et automatique de pré-criblage
- criblage en parallèle d'autres maladies infectieuses

(Cho et al. 2015, Lett Appl Microbiol)

- **pathologies infectieuses (bactéries, levures)** : des nez électroniques permettent d'identifier des profils de Composés Volatiles Odorants (COV), pour un diagnostic différentiel d'infections dans des blessures (Persaud et al. Chemical Senses 2009)

> *S. aureus*

> *Streptococcus pyogenes*

> *Pseudomonas aeruginosa* : prolifère sur le mucus hypervisqueux des patients atteints de mucoviscidose (biomarqueur : 2-aminoacetophénone, Scott-Thomas et al. BMC Pulmonary Medicine 2010)

- **détection et discrimination des souches bactériennes d'infections urinaires** (Roine PlosOne 2014) (ChemPro 100i), sensibilité 95%, spécificité 96%

- les nez électroniques offrent la possibilité de **diagnostics rapides et non-invasifs sur place dans le domaine ORL** (sinusites et otites), avec identification des bactéries présentes (Charaklias J Laryngol Otol 2010)



- les COVs présents dans l'haleine sont des biomarqueurs de plusieurs pathologies :
 - > **diabète** (acétone, Yu et al. Sensors & Actuators 2005)
 - > **asthme** (Dragonieri et al. J. Allergy and Clinical Immunol. 2007)
 - > **pathologies hépatiques ou rénales, halitose, triméthylaminurie** (Calenic Bioanal 2014)
 - > pathologies pulmonaires (Hattesoehl Respirology 2011)
 - > infection (Wilson Metabolites 2015)
 - > trouble génétique
 - > **maladies neurodégénératives** (Alzheimer, Parkinson) (Bach PlosOne 2015)

- > **technologies émergentes** pour la détection, le suivi et la prévention de maladies
- > **nécessitent encore des adaptations** pour être applicables au chevet du patient
- > **innovation et réduction des coûts nécessaire** pour améliorer l'impact sur la santé (Fung Lab Automation 2014)
- > les résultats doivent être confirmés. Ces **sujets sont prometteurs et devraient "être classés plus prioritairement en termes d'effort et de financement de recherche"** (Bijland Netherland J Med 2013)

- > la **détection par les animaux est très performante**, il est difficile pour les nez électroniques de concurrencer ce que **l'évolution a optimisé pendant des billions d'années** (Teodoro-Morrison Clini Chem 2014)



- > **utiliser des récepteurs olfactifs (ROs) comme éléments sensibles de biosenseurs olfactifs pour détecter dans les fluides biologiques ou l'haleine le profil de COVs spécifique à une pathologie : dispositifs bioinspirés**
- > **contrairement aux surfaces sensibles, c'est la fonction intrinsèque des ROs de lier et discriminer les odorants à très faibles concentrations**
- > **rechercher le(s) récepteur(s) olfactif(s) répondant le mieux à un odorant donné**

SPOT-NOSED Single PrOTein NanObioSEnsor griD array [2003-2006]
BOND Bioelectronic Olfactory Neuron Device [2009-2012]



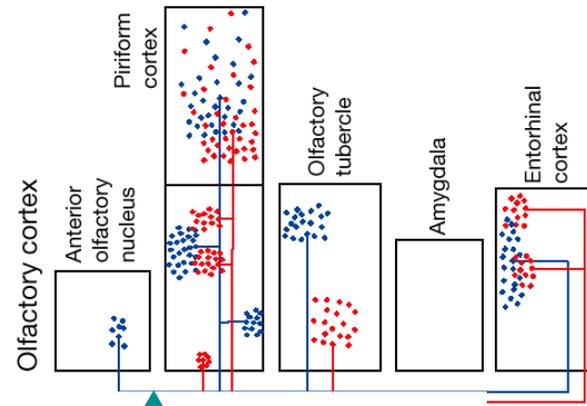
www.bondproject.org

★ Consortium Européen BOND

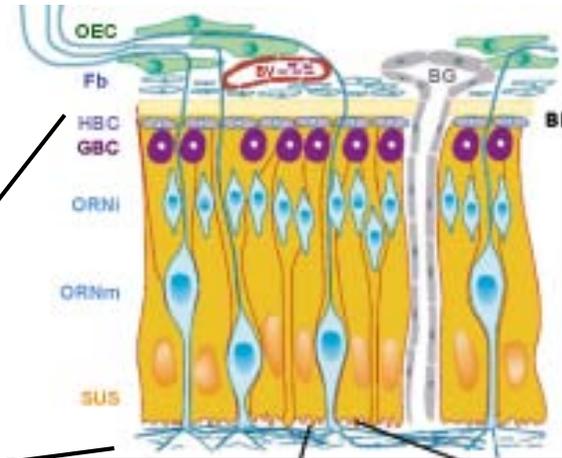
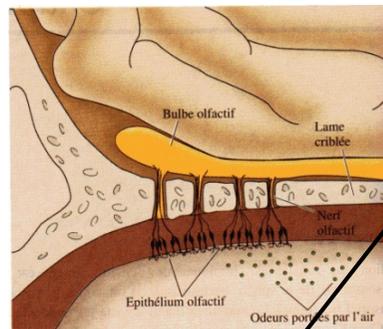


Détection olfactive

cortex olfactif



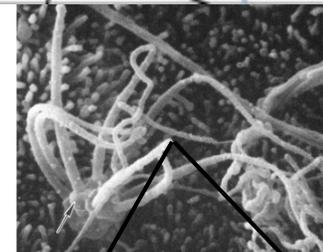
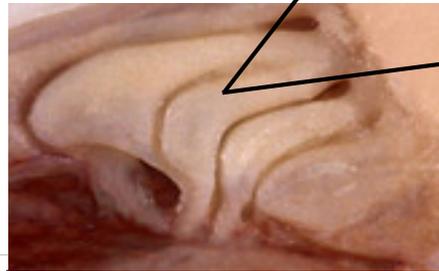
bulbe olfactif



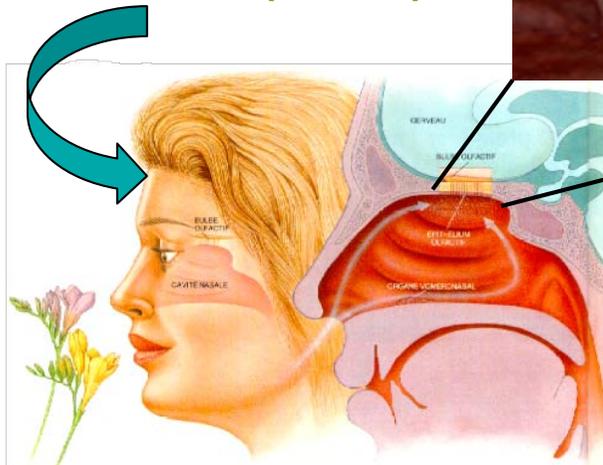
~ 10⁷ neurones sensoriels olfactifs

épithélium olfactif

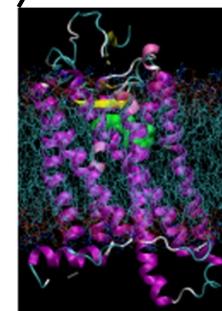
Composés Volatiles Odorants (COVs)



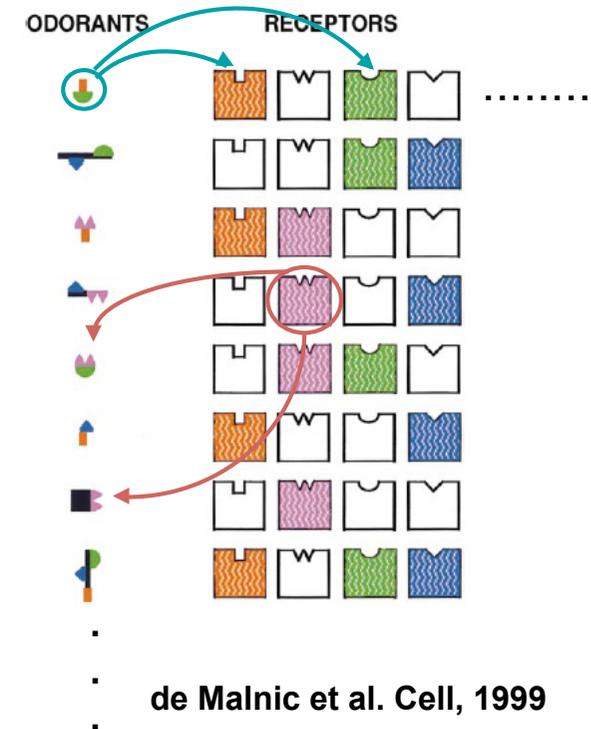
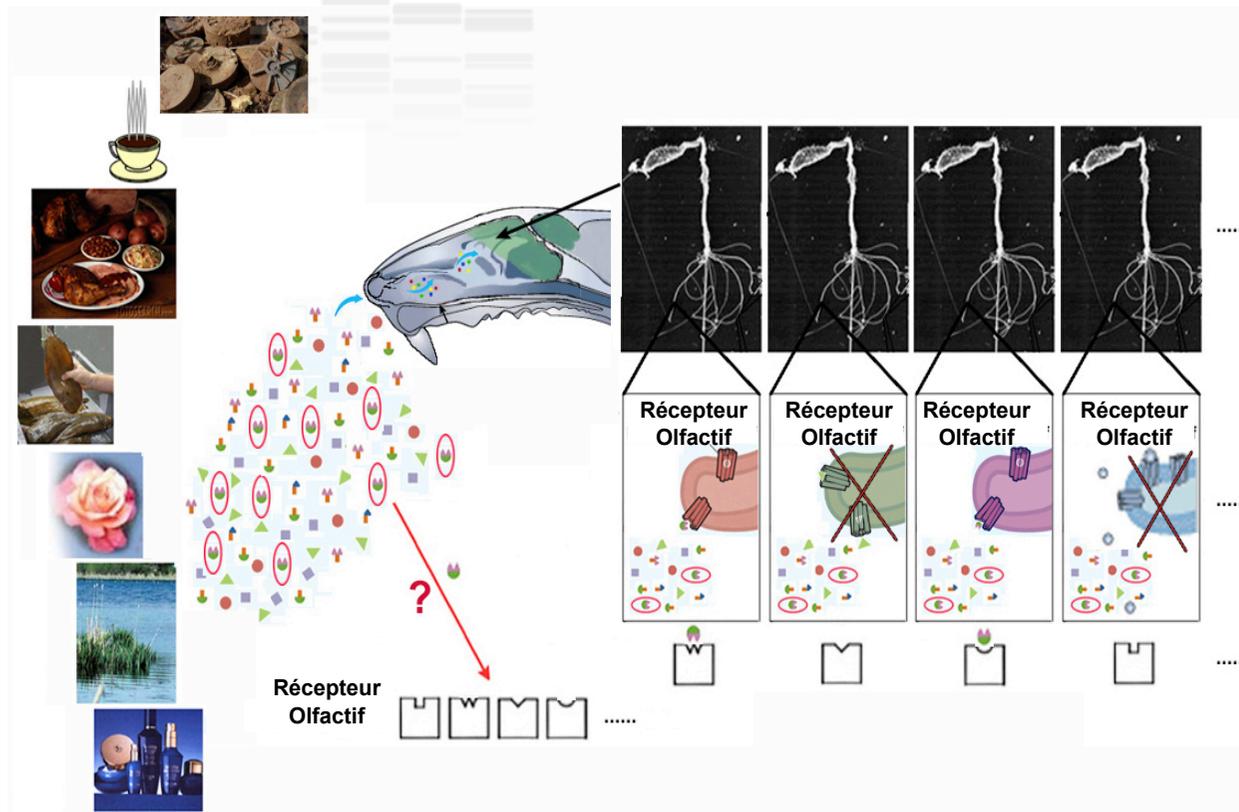
chaque neurone exprime 1 seul type de RO



~ 10³ types de ROs



Identification des ROs répondant à un odorant cible

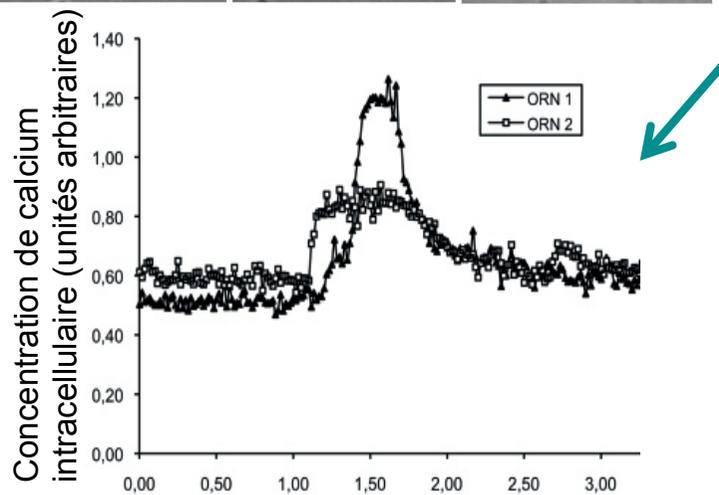
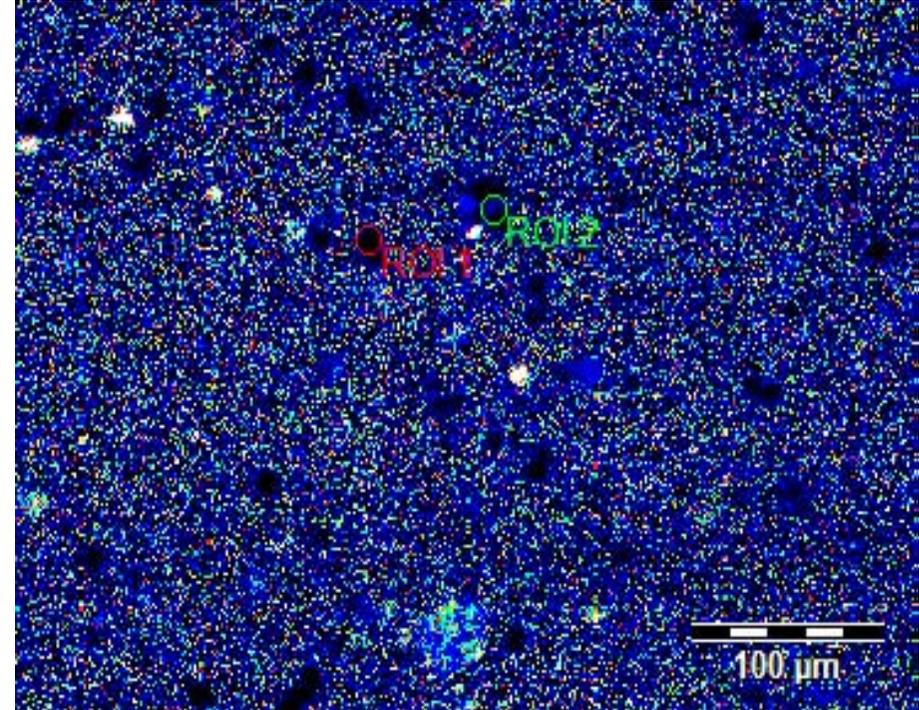
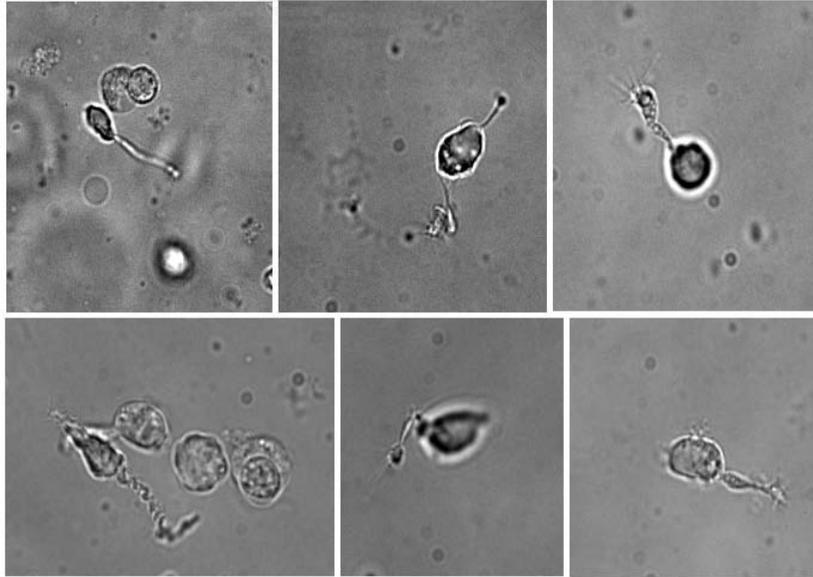


> Chaque neurone olfactif exprime seulement un seul type de RO parmi environ ≈ 1000 dans le génome du rat

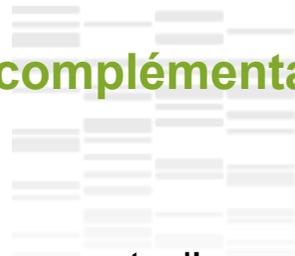
> Un odorant peut stimuler différents ROs et réciproquement un RO peut être activé par des odorants variés : code combinatoire

> Les neurones exprimant un type de RO sont dispersés dans la muqueuse olfactive

- dissociation des cellules de la muqueuse olfactive
- imagerie calcique pour identifier les neurones répondant à la stimulation par l'odorant dilué



- prélèvement individuel des cellules



Etude complémentaire *in silico* pour raffiner la sélection des ROs

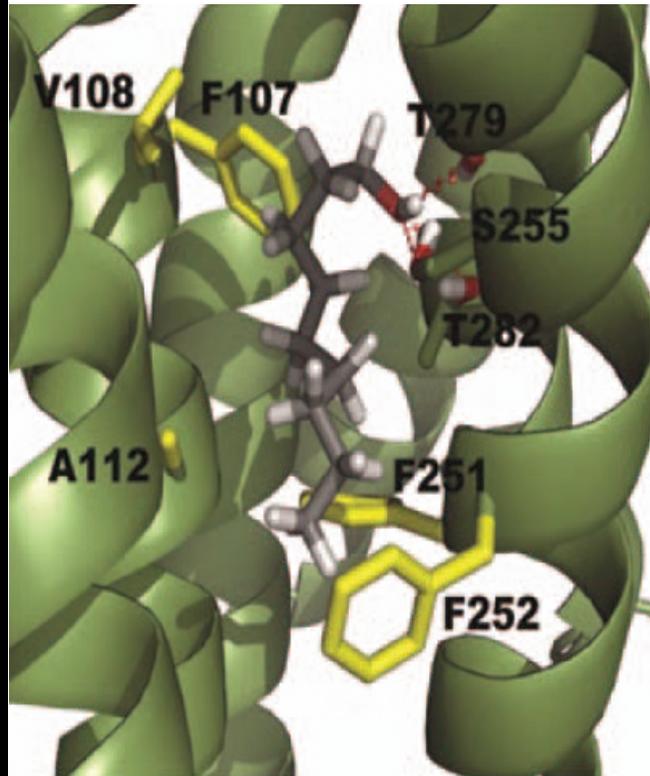
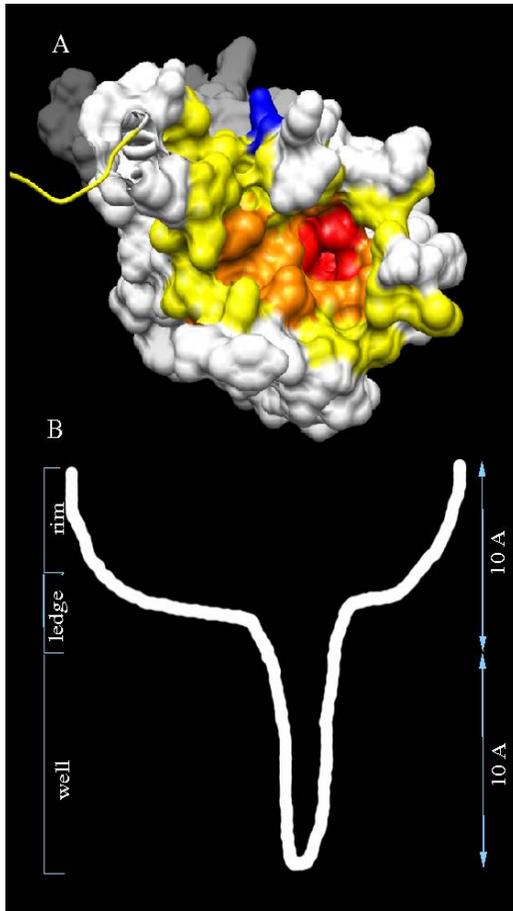
Développement d'une **procédure automatique de modélisation 3D des ROs de mammifères** "GPCR automodel" basé sur les structures 3D disponibles de RCPG

> structure 3D modèle du récepteur, "docking" du ligand sur le modèle, score des complexes ligand - récepteur

> **visualisation interactive 3D des modèles, localisation des résidus fonctionnels clés impliqués dans la reconnaissance du ligand**

> validation expérimentale par mutagénèse dirigée du récepteur et essais fonctionnels

Launay et al. Prot Engin, Design and Selection, 2012
Launay et al. Biophys Rev, 2012



A- Surface moléculaire de la poche de liaison du RO

B- Représentation latérale schématique de la poche

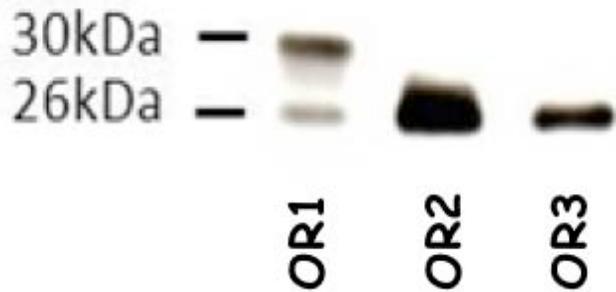
C- Mode d'accrochage (docking mode) du 1-nonanol dans OR1G1

- > sélection des ROs les plus adaptés à lier un odorant donné
- > énergie de liaison relative à l'activation du récepteur
- > position du ligand dans la poche : antagonistes > partie supérieure de la poche de liaison, agonistes > partie inférieure étroite.

Launay et al. Prot Engin, Design and Selection, 2012

Production de liposomes de taille nanométrique portant les ROs pertinents

Expression hétérologue de myc-ROs en levures *S. cerevisiae* à 15°C > repliement correct des récepteurs et adressage à la membrane



expression quantitative des myc-ROs :
immunoblot anti-myc

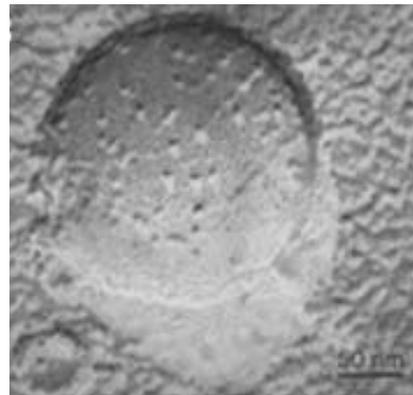
Des "nanosomes" sont préparés par sonication de la fraction membranaire des levures



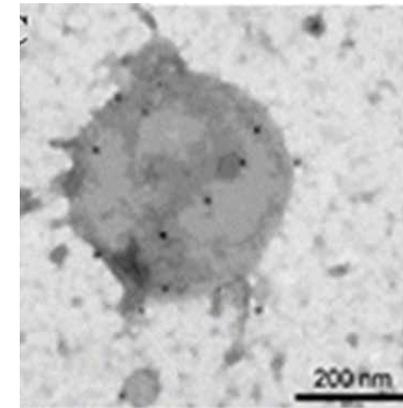
AFM : nanosome sur une surface
d'or

(Akimov et al, Analog Integr Circ Sig Process, 2008)

[Minic et al. FEBS J. 2005]

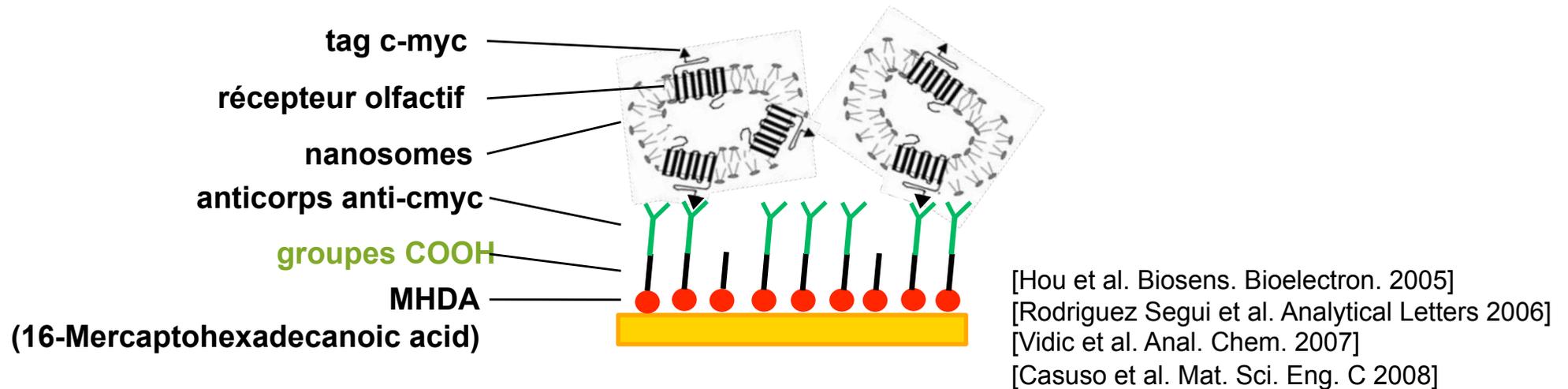


200 x 200 nm Microscopie électronique par transmission après cryo-fracture
(Casuso et al, Mat Sci and Eng C, 2008)



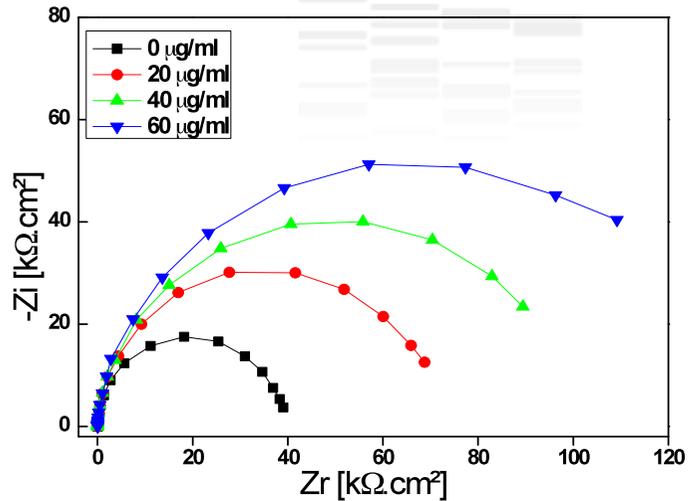
Microscopie électronique : nanosome après immunomarquage à l'or
(Vidic et al, Anal. Chem., 2007)

Adsorption des nanosomes sur des substrats d'or : chimie de surface

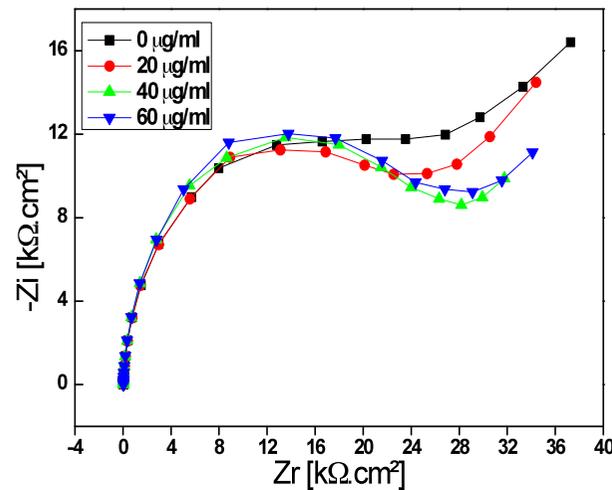


Greffage des nanosomes portant les **cmyc-ROs** en utilisant un anticorps **anti-cmyc** sur des **monocouches auto-assemblées**, permettant leur localisation, orientation, densité, et stabilisation

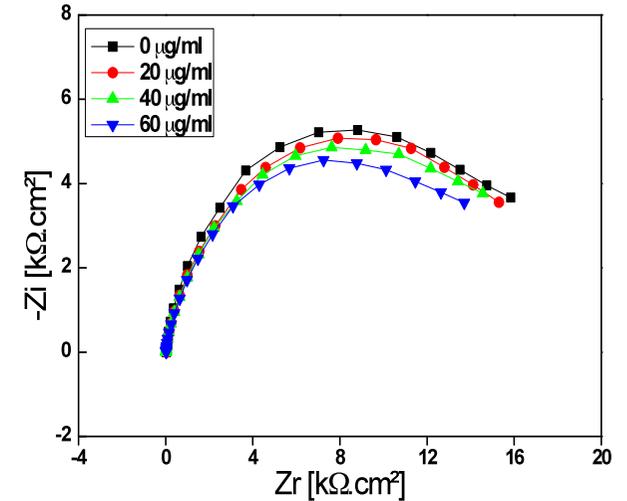
Mesures d'impédance (Spectroscopie d'Impédance Electrochimique) : diagrammes de Nyquist



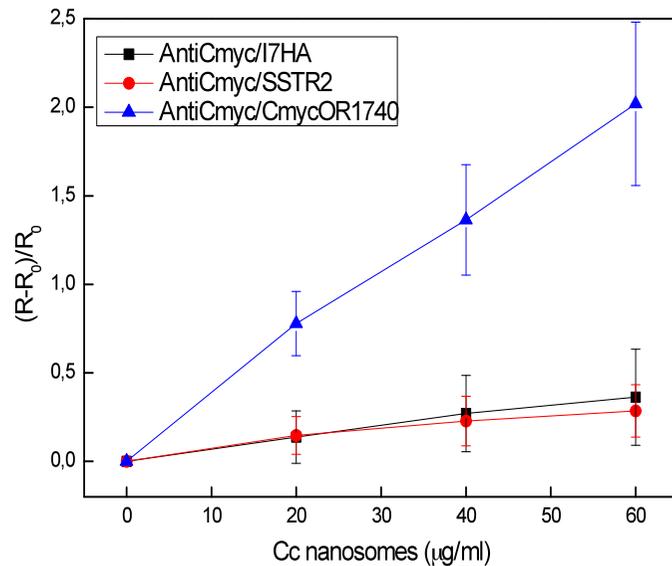
nanosomes cmyc-RO



nanosomes I7-HA



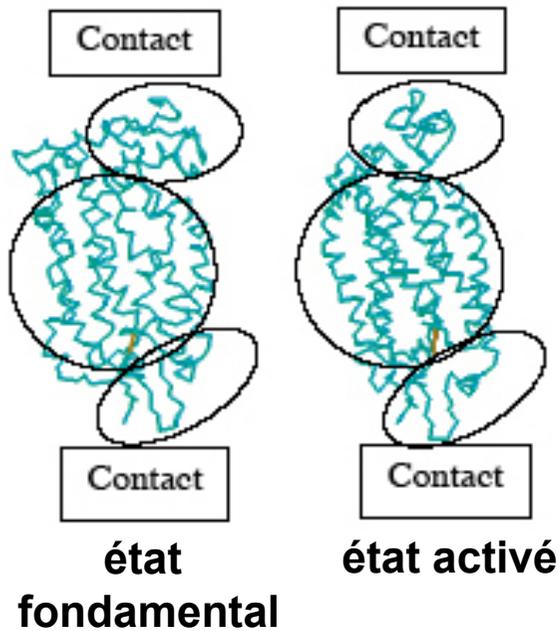
nanosomes SSTR2 non marqués



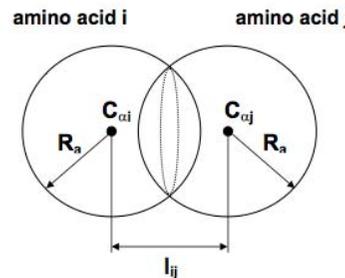
Variation relative de la résistance de transfert de charge lors du dépôt de concentrations croissantes de nanosomes cmyc-RO sur des surfaces d'or fonctionnalisées par un anticorps anti-cmyc : le dépôt est spécifique

Daligault et al, ECRO XXI, 2011

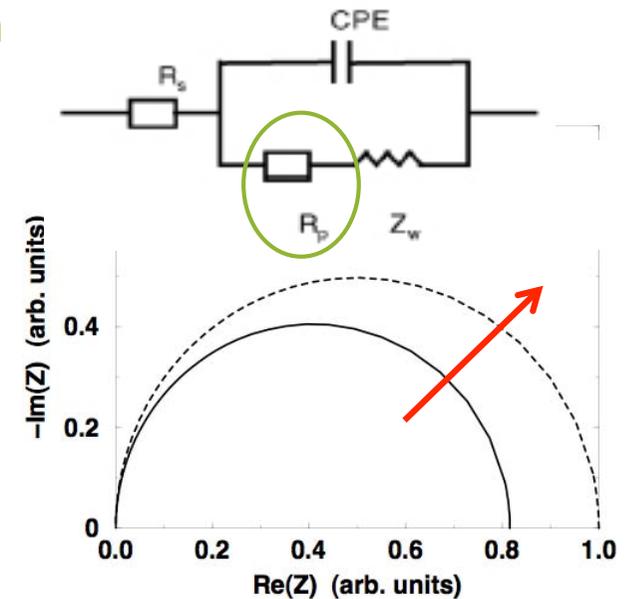
Modélisation du comportement électrique d'un récepteur unique



Association d'une **impédance élémentaire** à chaque "lien" entre 2 acides aminés distants d'un rayon d'interaction R , à partir d'un modèle de structure 3D (GPCR automodel)



> circuit électrique équivalent, et **modèle de résistance de polarisation**



prototype = rhodopsine ou autre
modèle structural 3D de RO

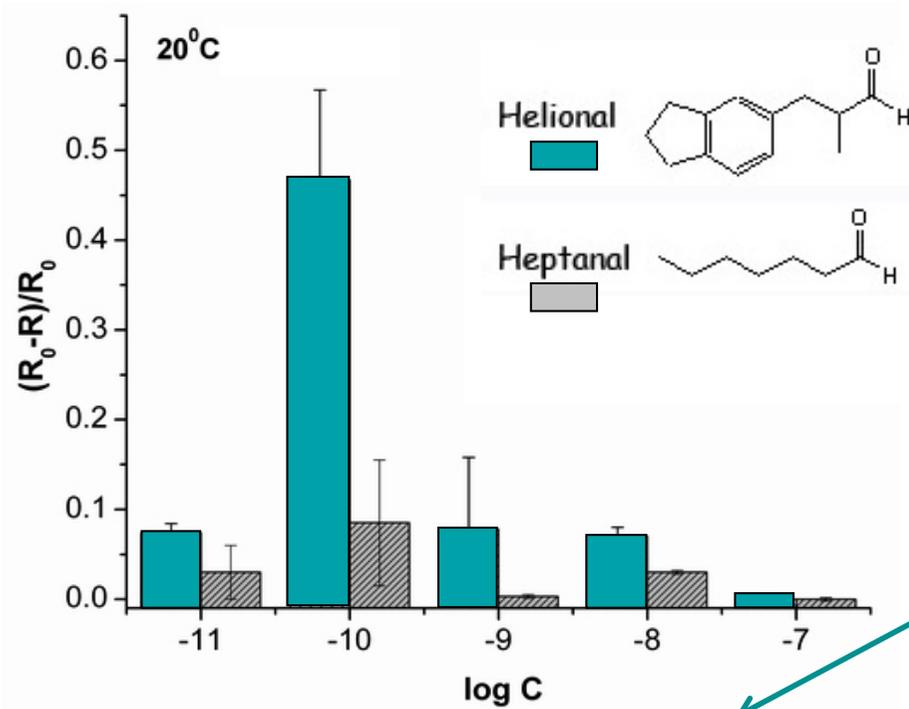
activation du récepteur par liaison du ligand

> prédiction d'un changement **conformationnel** du récepteur et d'une **modification de l'impédance de 60%**

[Pennetta et al., in "Nanodevices for the Life Sciences" 2006]
[Pennetta et al. Noise and Information in Nanoelectronics 2004]

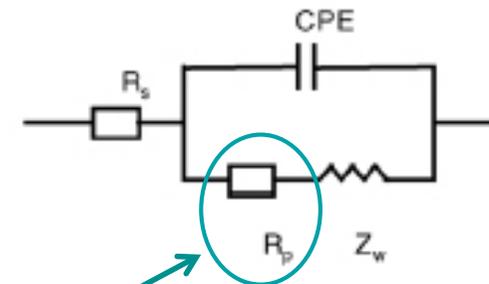
Détection électrochimique (EIS) de la réponse fonctionnelle des ROs par des nanosomes immobilisés

OR1740 : ligand spécifique = **Hélional**, odorant sans rapport = Heptanal



Variation relative de la résistance de polarisation

Traitement des données en utilisant le modèle de circuit électrique équivalent



Les ROs immobilisés (OR1740)
 --> discriminent entre odorants
 --> ont une réponse dose-dépendante

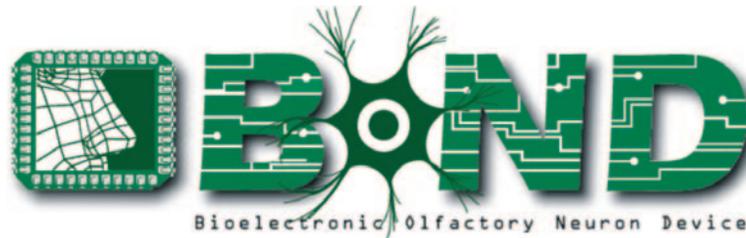
[Hou et al. Biosens. Bioelectron. 2006]

[Benilova et al. Mat. Sci. Eng. C 2008]

[Pennetta et al., in "Nanodevices for the Life Sciences" 2006]



European Consortium BOND (<http://bondproject.org/>)



Consortium



Universitat de Barcelona (UB), E



Institut National de la Recherche
Agronomique (INRA), Jouy-en-Josas, F



Université Claude Bernard Lyon 1

Université Claude Bernard
Lyon 1 (UCBL), F



Politecnico di
Milano (POLIMI), I



Centro Nacional de
Microelectrónica – CSIC
(CNM-CSIC), Barcelona, E



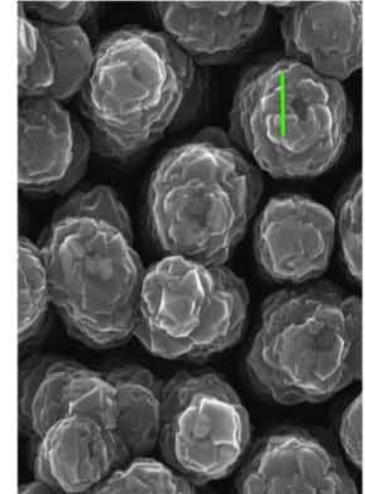
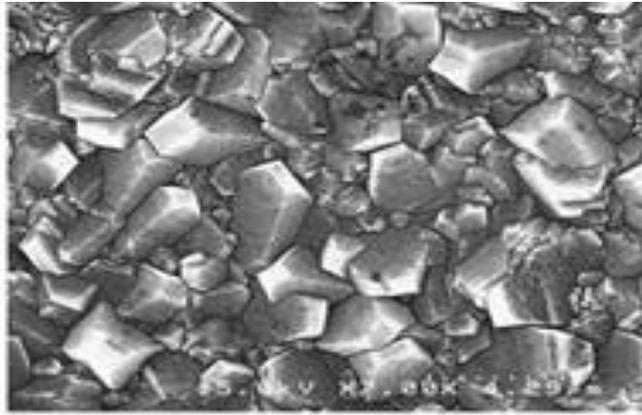
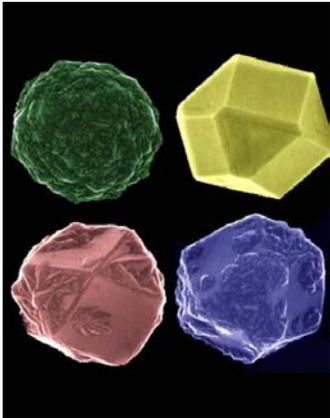
Università de Salento
(UNILE), I



Uniscan Instruments Ltd
(UNISCAN), Manchester, UK

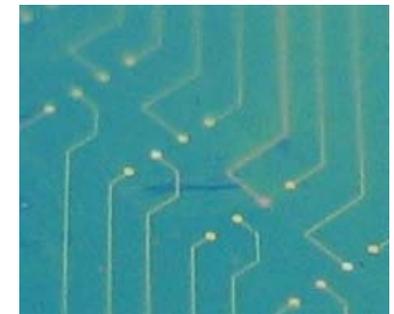
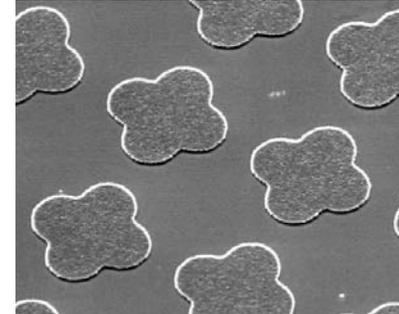
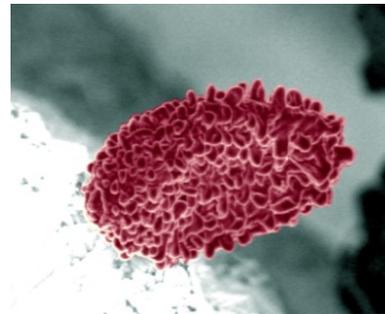
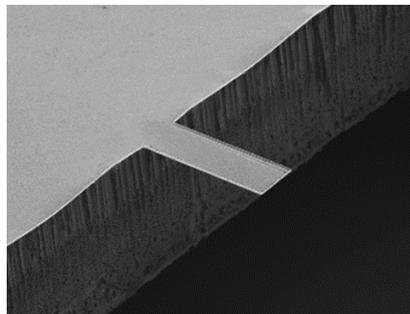
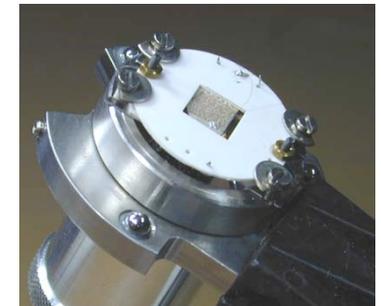


Tyndall National Institute
(TYNDALL), Cork, IRL



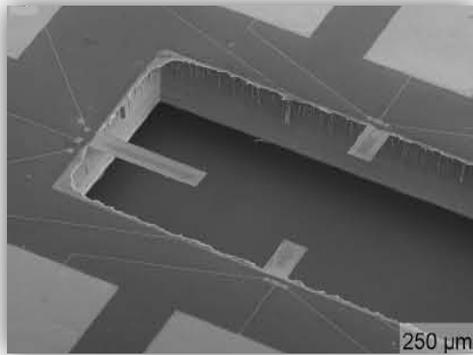
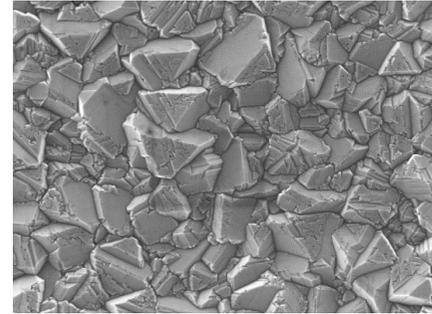
Autre système : **micro-leviers en diamant**

- semiconducteur
- biocompatible
- greffable
- fort module d'Young (> 1 TPa)
- chimiquement inerte



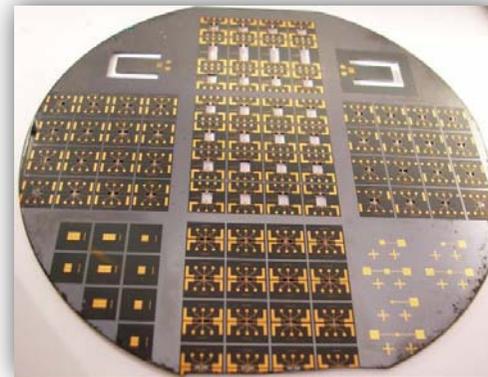
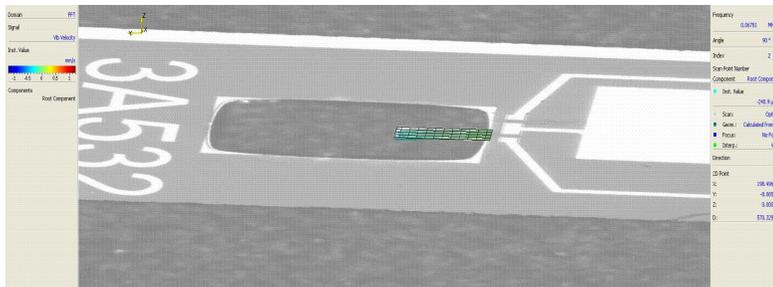
Synthèse par dépôt en phase vapeur

Microleviers en diamant



- > Hautes fréquences
- > Meilleure sensibilité
- > Chimie du carbone

J. Micromech. Microeng. **19** (2009) 074015
Langmuir Volume: 27 Issue: 19 Pages: 12226-12234 (2011)



Sensors and Actuators B Chemical, 154 (2011) 142–149

Production de ROs



Production en cellules de levure de ROs recombinants



récepteurs cmyc-OR solubilisés et purifiés

Production acellulaire

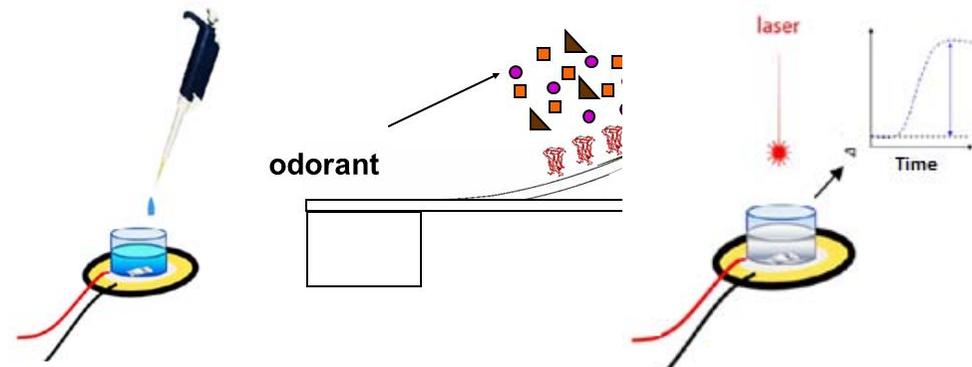
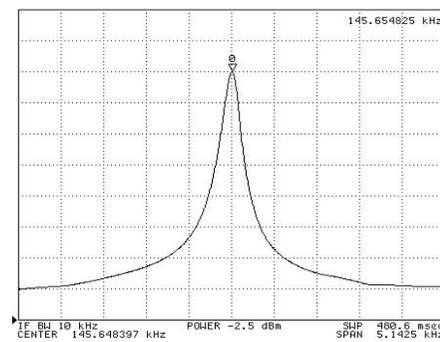
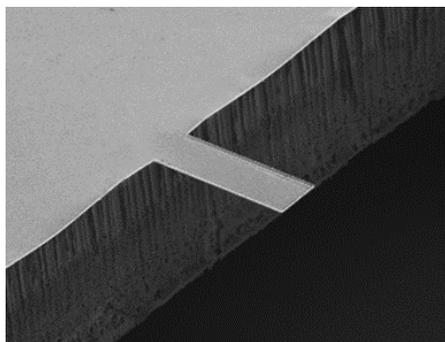


purification de cmyc-OR-6HIS

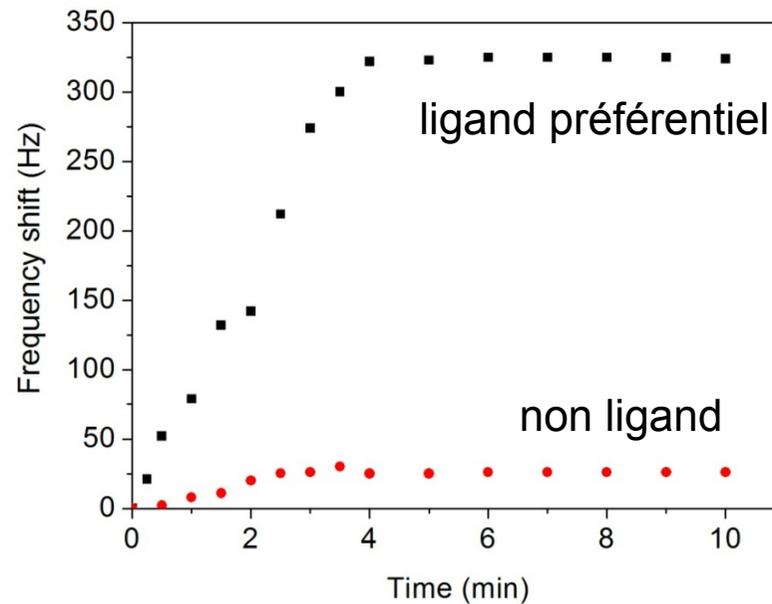
Immobilisation des ROs sur électrodes de diamant

Optimisation de stratégies de greffage, par mesure d'impédance électrique

Détection de la réponse fonctionnelle à un odorant par mesure de la fréquence de résonance d'un microlevier



Microlevier activé par un piezotransducteur - Mesure de la fréquence par vibromètre laser



> obtention d'une bonne sélectivité du ligand vs contrôle

Conclusions

- ✓ greffage réussi de récepteurs olfactifs sur des surfaces de diamant
- ✓ détection de ligands spécifiques de récepteurs olfactifs au μM par des microleviers en diamant
- ✓ la sélectivité de la détection est vérifiée pour des couples récepteurs-ligand odorant

Perspectives

- > les ROs peuvent être combinés sur des **réseaux de senseurs** et leurs réponses aux odorants analysées pour identifier, quantifier, qualifier l'odorant
- > **criblage sensible** ($< \mu\text{M}$) de la réponse de récepteurs olfactifs (recherche des ligands : "dé-orphanisation" des récepteurs)

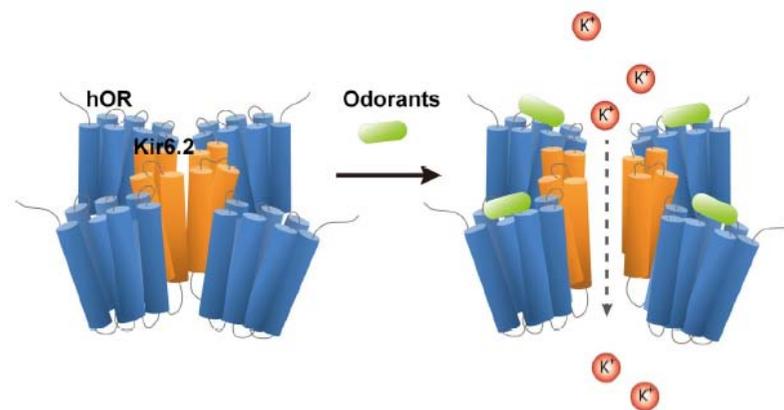
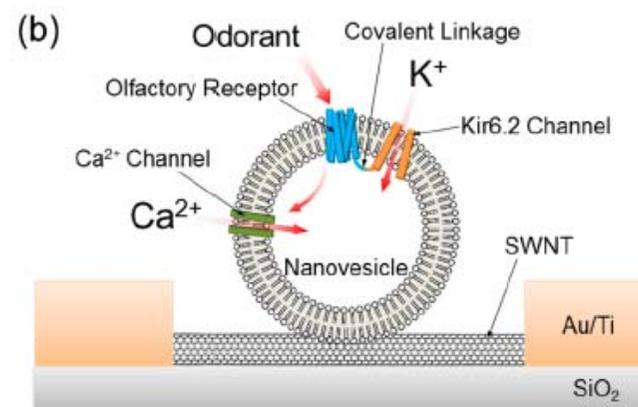
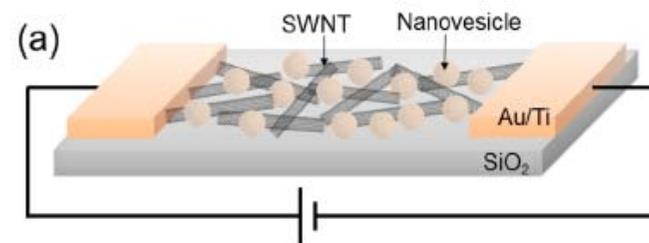




Autre méthode (groupe Coréen Tai Hyun Park)

Plate-forme basée sur des ROs couplés à des canaux Kir6.2, portés par cellules HEK (Oh Acta Biomaterialia 2015) ou par des nanovésicules issues de HEK (Lim ACS Nano 2015)

- > ouverture des canaux et changements du potentiel électrique de membrane sans passer par les processus de signalisation
- > mesure par imagerie de fluorescence (cellules), ou combinaison des nanovésicules avec des transistors à effet de champ (FETs) à nanotubes de carbone pour une mesure sensible et stable en temps réel
- > sensibilité 1fM (nanovésicules), 2μM (cellules)
- > spécificité parmi odorants de structure chimique proche, mais d'autres odorants induisent aussi des réponses fortes



L'étude des réponses d'un réseau de ROs à toute une base d'odorants serait nécessaire



NeuroBiologie de l'Olfaction

Karine Badonnel

Christine Baly

Patrice Congar

Julien Daligault (BOND)

Aurélie Dewaële

Nicolas Meunier

Régine Monnerie

Marie-Annick Persuy

Guenhaël Sanz

Edith Pajot-Augy

Roland Salesse

doctorant Fallou Wade



Jean-François Gibrat

Guillaume Launay (BOND)

Stéphane Téletchéa



Christine Mer

Raafa Manai

Massiel Habchi

Dounia Kamouni

Emmanuel Scorsone



Gaëlle Lissorgues

Lionel Rousseau

Farbod Ghassemi

Maira Possas-Abreu

Merci de votre attention !

