

Ingénierie et électrochimie moléculaires pour la conception de puces à ADN

Gérard Bidan, Martial Billon, Thierry Livache, Pascal Mailley et André Roget

Abstract

Molecular engineering and electrochemistry for the implementation of DNA chips

The concept of DNA chips for the identification of biological sample answers the need of multiparametric analytical tools (one analyte is submitted to several characterizations simultaneously) imposed by the combinatorial chemistry of DNA. Their implementation is based on three key steps: (i) immobilization of ODN probes onto a micro-structured support; (ii) hybridization, (iii) reading. These steps involve complementary knowledges in various disciplinary fields such as surface physical chemistry, molecular electrochemistry, micro-technologies, optics, electronics and biochemistry. We present here, in a non-exhaustive way, how chemistry and particularly molecular electrochemistry play a central role in the two steps of immobilization and detection. We focus on the electro-addressed immobilization of DNA probes via the electropolymerization of DNA grafted polypyrrole and on the electrochemical detection based on redox or enzymatic labeling.

Mots-clés

Puce à ADN, polypyrrole fonctionnalisé, électropolymérisation, électrode modifiée, biocapteur, résonance plasmonique de surface, marquage enzymatique, couplage par affinité.

Key-words

DNA chips, functionalized polypyrrole, electropolymerization, modified electrode, biosensor, surface plasmon resonance, enzymatic labelling, affinity coupling.

Les puces à ADN, une révolution dans l'analyse génétique

Au cours de ces dix dernières années, les puces à ADN ont envahi le marché de la recherche, bientôt celui du diagnostic, et s'imposent comme un outil incontournable dans l'ère du « post-génome ». Elles ont changé la vision des chercheurs en leur offrant la possibilité de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, que ce soit dans le domaine du diagnostic, du génotypage, de la pharmacogénomique ou de l'analyse globale de l'expression des gènes.

Il y a seulement dix ans, le séquençage des génomes semblait une tâche ambitieuse et démesurée. Aujourd'hui, le déchiffrement de ces codes est simplement une étape préliminaire : il faut désormais identifier les gènes, leur fonction, et comprendre l'organisation spatio-temporelle de l'activité des gènes et de leurs produits au niveau cellulaire. C'est pourquoi l'accès à la technologie des puces à ADN est devenu une priorité scientifique pour les centres de recherche académiques et industriels. Il est également une priorité économique puisque le marché mondial des biopuces en 2000 était de 550 millions de dollars, et avec une croissance de 15 % par an, il devrait dépasser le milliard de dollars en 2005 [1]. Les principaux acteurs actuellement présents sur le marché sont américains (Affymetrix, Hyseq, Incyte-Synteni, Motorola-Argonne, Molecular Dynamics-Amersham...).

Les applications de tels outils sont très variées : de la recherche fondamentale jusqu'à la médecine légale (empreinte ADN) et aux applications militaires (détection de menaces bactériologiques), en passant par la découverte de nouveaux médicaments et de nouvelles cibles thérapeutiques, le diagnostic des mutations et polymorphismes de gènes

responsables d'une maladie génétique, le contrôle environnemental et agroalimentaire. Les publications les plus récentes parlent de l'identification et de la détection de mutations dans des gènes impliqués dans certains cancers et proposent que les puces à ADN puissent guider le médecin dans le choix de la thérapie la mieux adaptée à son patient. Dans

Glossaire

Complexité ou densité

Par abus de langage, on désigne souvent par « densité » le nombre de sondes de natures différentes immobilisées. Le terme « complexité » convient mieux. En effet, une biopuce de faible complexité d'une centaine de plots d'hybridation peut être de forte densité (surfactive) si ces plots sont de taille micrométrique et répartis avec des espacements micrométriques. La densité réfère aussi à la concentration surfactive en sondes à la surface d'un plot, elle varie de 10^{10} à 10^{13} molécules.cm⁻².

ODN

OligoDesoxyriboNucléotide, séquence courte (10 à 25-mères) d'un simple brin d'ADN.

PCR

« Polymerase chain reaction » : technique de laboratoire permettant d'augmenter par duplication grâce à une enzyme particulière, l'ADN polymérase, le nombre de copies d'une séquence d'ADN, et ainsi d'amplifier la sensibilité des tests ADN.

Séquence d'ADN

Sa taille (n-mères) est définie par le nombre n de nucléotides la constituant (A, T, G ou C), et sa nature est définie par la succession des nucléotides (e.g. : AATGCT est la séquence complémentaire de TTACGA).

Synthèse « on chips » ou synthèse sur puce

L'ODN qui servira de sonde est synthétisé directement sur la puce.

Synthèse « off chips »

Les sondes sont d'abord préparées (ADNc) ou synthétisées (ODN), purifiées, puis elles sont ensuite greffées sur la puce.

les applications environnementales, l'analyse par puce à ADN vise à détecter rapidement et à quantifier une grande variété de micro-organismes.

La problématique des biopuces

Les puces à ADN sont un système miniaturisé comprenant une surface structurée de plastique (polypropylène, nylon), de verre ou de silicium, sur laquelle sont greffés des milliers de brins d'ADN. Le principe repose sur la capacité d'un simple brin d'ADN à pouvoir spontanément et spécifiquement reconnaître et former un complexe (duplex ou double hélice) avec le brin contenant une séquence complémentaire. C'est ce que les biologistes appellent l'hybridation. Les milliers de simples brins d'ADN fixés sur la puce (les séquences sondes) peuvent ainsi « interroger » les séquences cibles dans l'échantillon d'analyse.

Les gains en temps et en efficacité liés à l'utilisation des biopuces reposent sur la réalisation simultanée de quelques dizaines à des centaines de milliers d'analyses. Une biopuce à ADN peut se définir comme un biocapteur multiparamétrique d'analyses en parallèle. A ce niveau de parallélisation, les systèmes de micro-plaque des biologistes ne permettent pas une miniaturisation suffisante et l'apport des microtechnologies devient fondamental. Les étapes clés de la fabrication et de l'utilisation d'une biopuce à ADN sont l'immobilisation spatialement adressée de l'ODN (séquence courte, oligomère de simple brin d'ADN) sonde sur un micro-plot, l'étape d'hybridation, puis la détection du plot où a eu lieu cette hybridation (figure 1).

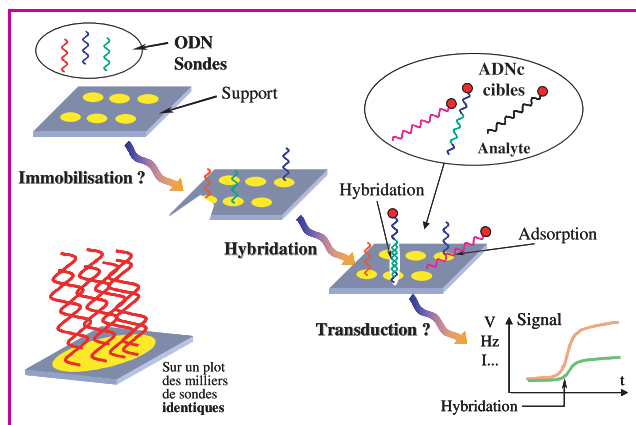


Figure 1 - La problématique des puces à ADN.

Le nombre de plots d'hybridation ou « complexité » (chaque plot comportant des sondes identiques mais de natures différentes d'un plot à un autre) est un critère qui détermine les applications visées (tableau I).

La complexité conditionne à son tour la technologie de fabrication. Tandis qu'il est concevable de manipuler des centaines, voire des milliers de sondes ODN présynthétisées, répertoriées et stockées, au-delà il a été imaginé un autre procédé d'élaboration avec la croissance des sondes ODN sur leur plot d'hybridation. On distingue donc la technologie « off chip » où les sondes sont présynthétisées de façon enzymatique ou chimique, contrôlées puis déposées sur le substrat par des moyens mécaniques, électrochimiques ou par jet d'encre, et la

technologie « on chip » où les sondes ODN sont synthétisées chimiquement *in situ* sur le support structuré.

Les deux étapes clés que sont l'accrochage de l'ODN sonde sur la surface et la détection de l'évènement biologique d'hybridation exploitent des méthodologies issues de disciplines très diverses. Certaines relèvent des sciences chimiques, comme la chimie et l'électrochimie des surfaces, la biochimie de synthèse des séquences d'ODN, la transduction électrochimique. Cet article est plus particulièrement consacré aux apports de l'électrochimie moléculaire dont ceux issus de nos travaux sur ces dix dernières années. Pour des revues récentes sur l'élaboration et les applications des puces à ADN, voir [2-4].

Immobilisation des ODN sondes

Cette chimie de surface est traitée en détail par M. Pirrung [2]. Le challenge est double : les différents produits (sondes présynthétisées ou bases nucléotidiques et composés de couplage) doivent être adressés précisément sur les plots de la surface tandis que les réactions de couplage ou d'accrochage doivent s'effectuer rapidement (quelques secondes à quelques minutes) avec des rendements élevés (> 98 % lors des synthèses « on chips »), compte tenu du grand nombre de réactions à réaliser afin de fabriquer la biopuce en un temps raisonnable.

La synthèse « on chip » ou *in situ*

Affymetrix, leader dans ce domaine, développe principalement des puces à haute complexité et vient d'annoncer la mise sur le marché de son produit Customseed™ capable de reséquencer rapidement les différents isolats du virus SARS qui comprend environ 30 000 paires de bases. Ce créneau du reséquençage ou du séquençage de cibles inconnues nécessite des « arrays » (matrices) de hautes complexité et densité. Affymetrix a donc opté pour la synthèse « on chip ». Les quatre bases constitutives de l'ADN sont déposées successivement dans l'ordre qui caractérise la sonde sur le support de verre. Cette opération est réalisée par un procédé de photo-déprotection localisée grâce à un jeu de masques (figure 2).

Cette étape de photo-déprotection remplace l'étape classique de détrituration en milieu acide dans le cycle conventionnel de la synthèse phosphoramidite des synthétiseurs d'ADN (schéma 1). Le rendement moyen d'un cycle de synthèse avec le premier groupe photolabile utilisé, MeNPoc, (schéma 2) était de 91-98 % ($\lambda = 365$ nm), ce qui limitait fortement la pureté des sondes et leur longueur (une vingtaine de bases). Il a été récemment montré que le groupe NPPoc permet des synthèses photochimiques sur « arrays » avec des rendements pratiquement quantitatifs [5].

Cette technique nécessite cependant une technologie coûteuse (environ 80 masques pour un 20-mère), mais le nombre de plots annoncé peut aller jusqu'à 100 000, et le nombre de solutions à manipuler est réduit aux quatre bases et aux rinçages nécessaires.

Tableau I.

Degré de complexité	Nombre de plots d'hybridation	Application visée
Basse complexité	10-1 000	diagnostic
Moyenne complexité	1 000-10 000	étude de mutation, génotypage
Haute complexité	10 000-100 000	séquençage des gènes

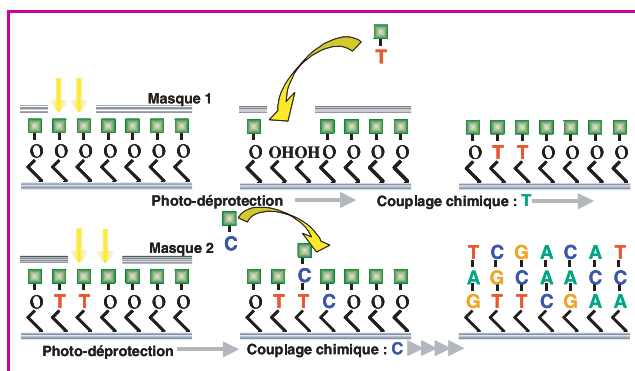


Figure 2.

Les sondes sont synthétisées *in situ* par photolithographie.

Au départ, tous les sites sont protégés par un groupement photolabile. ■

L'illumination au travers d'un masque déprotège des plots spécifiques. =||=

On peut alors procéder au greffage d'une première base protégée. ■

Le process est réitéré avec les bases ■ ■ ■ ■ jusqu'à la synthèse complète des ODN sondes.

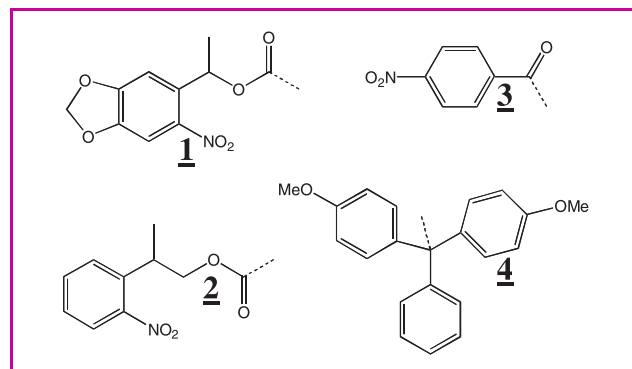


Schéma 2 - Groupements protecteurs pour la synthèse d'ADN selon le schéma 1.

1, 2: groupements photolabiles MeNPoc et NPPoc respectivement ;
3: p-nitrobenzoyle, déprotection par électroréduction à -1,4 V vs Ag/Ag⁺ ;
4: DMTr, déprotection en milieu acide trifluoroacétique.

coupeure cathodique du groupe électrolabile p-nitrobenzoyle [6] (schéma 2).

Cette électroréduction à -1,4 V vs Ag/Ag⁺ est compatible avec l'ensemble du cycle conventionnel de synthèse qui est inchangé, à part l'étape de déprotection (schéma 1). Il faut cependant souligner que le rendement de coupeure de 90 %, excellent en électrochimie, est insuffisant en synthèse oligonucléotidique et devra être optimisé afin qu'une itération sur un 20-mère donne un rendement global acceptable.

La synthèse « off chip »

Lorsque la cible ODN est connue, comme les variations génétiques de l'ADN codant les différentes mutations répertoriées d'une protéine ou les différents types génétiques d'un virus, le nombre de plots correspondant aux différentes natures des sondes à immobiliser va de quelques dizaines à quelques centaines. Il s'agit là de puces dites de faible et moyenne complexités. Il devient alors réalisable de présynthétiser des sondes purifiées, de composition parfaitement connue (jusqu'à une centaine de bases) et de stocker et manipuler les solutions correspondantes.

Les technologies classiques de dépôts (ou « spotting ») impliquent de positionner une aiguille (ou un stylet) au contact avec une surface ou de projeter une gouttelette à partir d'une microbusse. Les volumes de liquide délivrés vont de la dizaine de pL à quelques nL. Les procédés peuvent être mécaniques (TeleChem, Genemachines, Genetic Microsystems, Genomic solutions, BioRobotics...) ou piézoélectriques (GeSiM, Packard...). De nombreux robots sont disponibles sur le marché, cependant leur fiabilité reste à améliorer. La chimie intervient à trois niveaux :

- La structuration du support : en plus d'une structuration volumique en microcuvettes, des motifs hydrophiles ou hydrophobes permettent de contenir les gouttelettes par la tension de surface afin qu'elles ne s'étendent pas.

- L'activation du support : celui-ci souvent inerte (la lame de verre étant la plus utilisée) est modifié en surface par des groupements fonctionnels capables de réagir avec les fonctions introduites à l'extrémité 5' (ou 3') de l'ODN durant la synthèse ou la PCR.

- La fonctionnalisation de l'ODN pour un greffage direct ou un couplage sur le support préfonctionné.

La littérature propose des centaines de combinaisons possibles entre les supports, leur activation et la chimie de

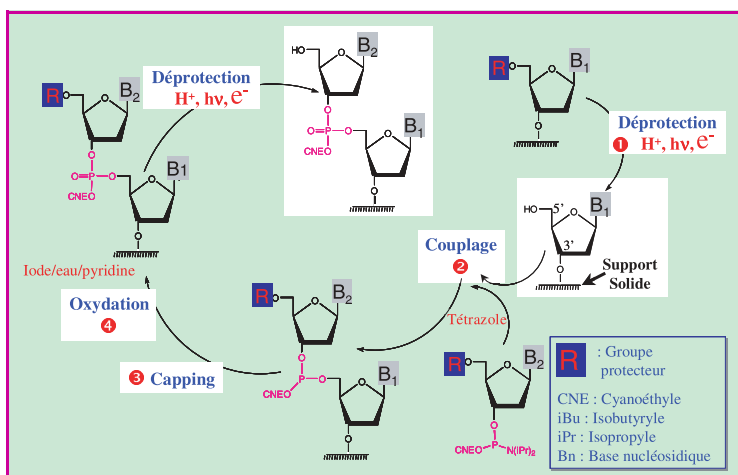


Schéma 1 - Synthèse conventionnelle phosphoramidite de l'ADN.

Les synthétiseurs automatiques de séquence d'ADN mettent en œuvre une synthèse conventionnelle dite « phosphoramidite » en 6 étapes : mis à part la fixation sur support de la première base puis après synthèse, la libération à l'ammoniaque qui fournit la séquence libre, 4 étapes sont répétitives : 1 la déprotection qui active le OH en 5' de la base n (B₁), celle-ci consiste en l'élimination acide du DMTr (R = diméthoxytrityle) ; l'approche photochimique utilise un groupe photolabile (R = MeNPoc ((α-méthyl-2-nitropipéronyl)-oxy)carbonyle), l'approche électrochimique utilise un groupe électrolabile (R = p-nitrobenzoyle) par réduction. Les étapes suivantes sont inchangées : 2 couplage par addition du phosphoramidite activé en 3' de la base n+1 (B₂) avec l'hydroxyle en 5' de la base n, 3 « capping », non détaillé ici, élimine les réactifs n'ayant pas réagi, 4 oxydation du phosphore trivalent instable en son homologue pentavalent avant d'entreprendre le cycle suivant.

Des solutions alternatives ont été proposées pour réduire les coûts et augmenter la flexibilité de production. Par exemple, Protogène utilise une technologie jet d'encre pour délivrer successivement les quatre précurseurs des bases sur une surface structurée en zones hydrophiles et hydrophobes. Nous avons validé (préparation d'un 9-mère) une approche électrochimique de la synthèse « on chip » basée sur la déprotection électrochimique de bases nucléotidiques par

Tableau II - Stratégies les plus développées pour l'immobilisation d'une sonde ADN présynthétisée sur un support.

On peut distinguer 3 étapes clés : (i) l'activation du support qui apportera en surface des groupements réactifs thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle ; (ii) la fonctionnalisation de l'ODN sonde bien souvent par ces mêmes fonctions ; (iii) le couplage des fonctions de surface avec celles portées par les ODN sondes. Ces réactions de couplage se font en conditions très douces mises au point depuis longtemps par les biochimistes pour coupler les fonctions thiol, amino, carboxyle ou hydroxyle entre elles.

Supports	Réactifs d'activation des surfaces	Agents de couplage	Fonction en 5' ou 3' de l'ODN
Lame de Verre, Silicium	<p>Silanisation</p>	<p>$\text{NH}_2 \rightleftharpoons \text{SH}$ et Inversement, ex.:</p>	<p>$\text{NH}_2-()\text{-ODN}$ $\text{HS}-()\text{-ODN}$ $\text{OH}-()\text{-ODN}$</p>
Platine	<p>Polylysine (NH₂)</p> <p>Adsorption Streptavidine</p>	<p>Affinité</p>	<p>biotine-()-ODN</p>
Or	<p>SAM (prétraitement): $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{-NH}_2$</p>	<p>Auto-assemblage</p>	<p>SAM (direct): $\text{HS}-()\text{-ODN}$</p>

couplage avec l'ODN sonde. Le *tableau II* présente les stratégies les plus communément mises en œuvre pour l'immobilisation de sondes présynthétisées.

Les groupements d'accrochage sur lame de verre ou silicium préalablement oxydé sont des trialkoxysilanes, le triéthoxysilane étant le plus utilisé. Cette silanisation modifie la surface du support et apporte les fonctions réactives amino, thiol, carboxyle ou hydroxyle. On retrouve ces mêmes fonctions greffées sur le phosphate terminal en 5' de la sonde ODN à accrocher. L'agent de couplage relie une fonction amino ou hydroxyle avec un thiol et inversement, il est constitué d'un bras portant à une extrémité une fonction réagissant avec un thiol (maléimide) et à l'autre extrémité un ester activé (succinimide) ou un époxyde réagissant avec le groupement amino. Le *tableau II* donne un exemple d'un tel agent de couplage. Le dépôt de polylysine est une méthode aisée de fonctionnalisation de lame de verre par des groupements NH_2 . La streptavidine est une protéine qui s'adsorbe spontanément sur beaucoup de surfaces (verre, métaux...). La très forte reconnaissance streptavidine/biotine ($K_a \approx 10^{15}$) permet d'accrocher une sonde ODN comportant une biotine. L'interaction or/thiol est exploitée pour faire directement l'accrochage d'un ODN-thiol. Cependant, afin de mieux contrôler l'accessibilité de la sonde pour l'hybridation, on procède souvent à l'élaboration d'une monocouche auto-assemblée (SAM) intermédiaire. Des motifs de zone active peuvent être dessinés sur cette SAM par déprotection photochimique de groupements amino protégés par des groupes photolabiles.

L'adressage électrique de l'immobilisation est une alternative qui offre de nombreux avantages en terme de manipulation et de miniaturisation, puisque la connectique passive ou active (CMOS) peut être intégrée au support. Ainsi Nanogen utilise un concept proche de l'électrophorèse, si ce n'est que les molécules d'ODN sont libres en solution [7]. Dans ce concept, on applique un potentiel positif à une électrode pour guider la sonde à greffer et pour produire un champ électrique qui améliore la dynamique et la spécificité

de l'hybridation. Cette approche repose sur l'interaction électrostatique avec les charges négatives (phosphate) portées par l'ADN. Une matrice d'électrodes de platine (jusqu'à 10 000) recouvertes de streptavidine immobilisées des sondes 12 à 26-mère greffées par une biotine. Le dispositif implique une microfluidique importante.

Deux propriétés essentielles des polymères conducteurs électroniques, l'électropolymérisation et leur fonctionnalisation aisée, expliquent leur implication dans la conception de capteurs à ADN. Du fait de sa biocompatibilité et d'une électropolymérisation qui peut être menée en milieu aqueux et à des pH biologiques, le polypyrrole (PPy) est de loin le polymère conjugué le plus utilisé. Ainsi, l'électropolymérisation du monomère pyrrole ou de ses dérivés en solution aboutit au dépôt à la surface d'une électrode d'un film mince de PPy. Cette réaction d'électrosynthèse est stœchiométrique (*schéma 3*) ; par conséquent, l'épaisseur du film polymère est directement reliée à la quantité d'électricité utilisée. L'adressage électrique par électropolymérisation est aussi une clé de la miniaturisation car le film polymère recouvre seulement et entièrement le spot d'or adressé quelle que soit sa taille.

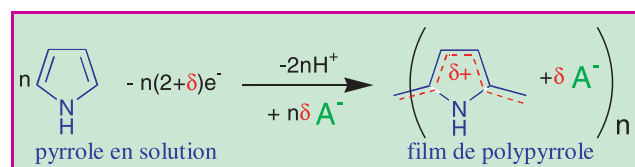


Schéma 3 - Réaction d'électropolymérisation du polypyrrole.

Cette réaction de couplage par électro-oxydation condensante associée à chaque unité monomère pyrrolique $(2 + \delta)$ électrons, δ étant le taux de dopage (classiquement $\delta = 0,2-0,3$) et A^- est l'anion dopant.

Trois approches mettent en œuvre une réaction d'électropolymérisation du PPy pour déposer un film polymère incluant en volume et/ou en surface les séquences ADN sonde :

- **Le procédé MICAMTM**, initié en 1993 par notre équipe du Département de recherche fondamentale sur la matière condensée en collaboration avec le CEA/LETI, est maintenant développé par Apibio, filiale CEA-BioMérieux. Ce procédé permet, en une étape, l'adressage et l'immobilisation simultanés des sondes ODN par copolymérisation électrochimique de sondes ODN portant un pyrrole **5** (*schéma 4*) avec du pyrrole libre [8] (*figure 3A*).

Cette simultanéité apporte un avantage considérable en gain de temps, puisque le dépôt peut être mené en 0,5 s, tandis qu'un couplage chimique nécessite au moins 30 mn. Le « design moléculaire » du pyrrole-ODN **5** intègre deux paramètres importants : respecter un espace de fonctionnalisation à l'azote devant éviter un encombrement stérique qui bloquerait le couplage électrochimique en α , et permettre une bonne accessibilité de la sonde afin d'atteindre de bon rendement d'hybridation. Ce greffage covalent assure la stabilité et l'accessibilité pour l'hybridation des sondes ADN à la surface des puces MICAMTM.

- **Le dopage électrochimique du polypyrrole** par des sondes ODN : celles-ci sont emprisonnées dans la matrice polymère durant l'électrosynthèse, elles se comportent comme un dopant anionique multichargé [9]. La perte du dopant ODN par échange avec d'autres anions de l'électrolyte contribue à la dérive du signal.

- **Un procédé en deux étapes**, introduit par F. Garnier *et al* [10] et nommé « post-fonctionnalisation », comprend une

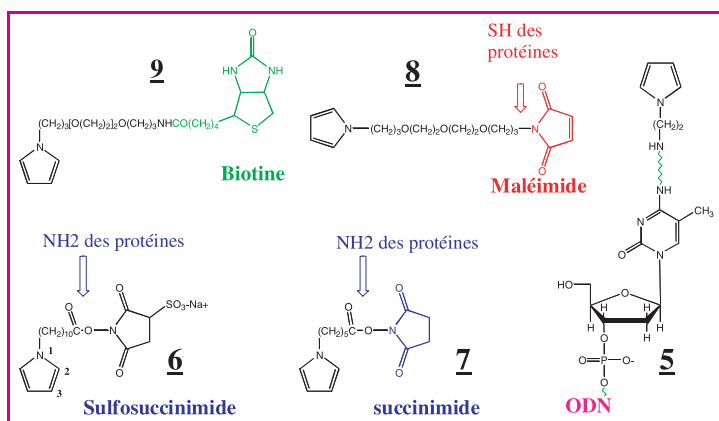


Schéma 4 - Différents réactifs pyrrole et leurs cibles réactionnelles développés par notre laboratoire.

Les synthèses de pyrrole portant différents groupes réactifs, greffés sur l'azote par l'intermédiaire de bras espaceurs, ont été réalisées à partir de diméthoxytétrahydrofurane et d' ω -aminoacides ou de diamines. Les groupements amino ou acide sont ensuite protégés, puis couplés avec une biotine ou introduit à la dernière étape d'une synthèse d'ODN. On obtient : (i) des pyrrole portant un groupe carboxyle qui est transformé en ester activé réactif sur les fonctions amines. Ces réactifs permettent d'introduire un pyrrole sur un oligonucléotide ou sur les lysines des protéines ; (ii) des pyrrole portant un groupe amine capable de réagir sur un ester activé de maléimides, ces « maléimide pyrrole » réagissent sur les fonctions SH des protéines ; (iii) des pyrrole portant une biotine capable de se coupler par affinité avec une avidine (ou streptavidine) ; (iiii) un pyrrole portant la sonde ODN.

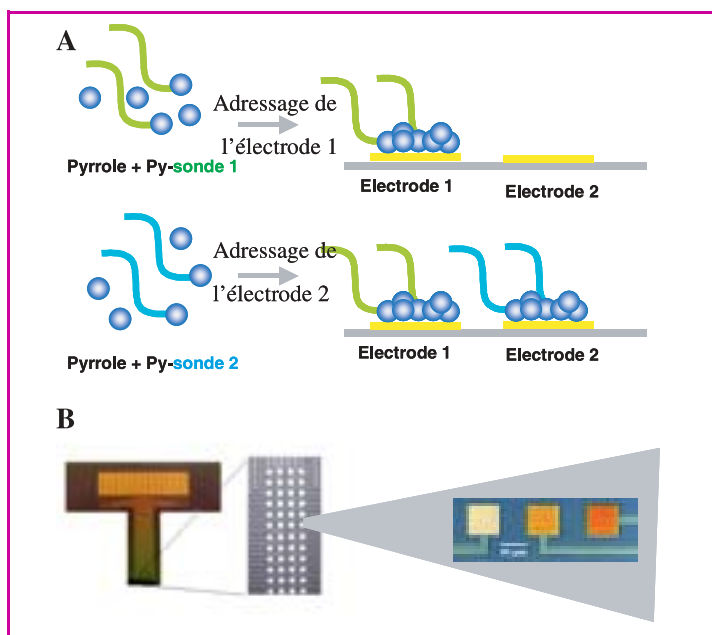


Figure 3. A : principe de la fabrication d'une puce à ADN développée par Apibio (technologie MICAM™) :

- Les sondes ODN fonctionnalisées par le pyrrole, Py-sonde, sont « greffées » sur le substrat par copolymérisation électrochimique avec le pyrrole libre, ●.

- L'adressage est réalisé en appliquant un potentiel adéquat sur l'électrode sélectionnée.

B : puce sur silicium MICAM™ de première génération élaborée par le CEA/LETI comportant 48 plots d'or de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ connectés individuellement.

première étape « d'activation de la surface » par dépôt électrochimique d'un PPy fonctionnalisé par un groupement (ester activé). Ce groupement est capable de se coupler à une séquence d'ODN. L'étape de couplage/adressage peut être effectuée par jet d'encre.

Les premiers greffages du PPy par une séquence simple brin d'ADN furent réalisés sur macro-électrode ($0,7 \text{ mm}^2$) ; puis en 1995, la miniaturisation était entreprise avec le Laboratoire de microélectronique (LETI) du CEA-Grenoble : un réseau d'oligonucléotides a été construit sur un dispositif silicium comportant une matrice de 48 plots d'or de $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ adressables électriquement (figure 3B). Cette approche a été validée par le génotypage du virus de l'hépatite C dans des échantillons de sang [11] et par la caractérisation des mutations de l'oncogène K-ras [12]. Le procédé d'électrocopolymérisation a été étendu à l'immobilisation en une étape de peptides (antigènes) pour concevoir des « immuno-chips » [13]. Une chimie de modification du monomère pyrrole compatible avec les protéines a été développée afin d'obtenir des esters activés du pyrrole (schéma 4), capables de réagir en solution aqueuse avec les groupes $-\text{NH}_2$ ou $-\text{SH}$ des protéines (6, 7 et 8 respectivement).

Afin de s'affranchir de cette chimie de modification du monomère pyrrole qui doit être adaptée à chaque nouvelle entité biologique ou d'éviter la réaction de couplage ester activé/ NH_2 qui endommage le support de PPy, nous avons développé un couplage plus doux et polyvalent reposant sur l'affinité biotine/avidine. Les études couplées d'électrochimie, de fluorescence et de microbalance à quartz, ont permis d'optimiser la nature du monomère pyrrole-biotine (longueur, hydrophobie du bras espaceur, 9, schéma 4) et les conditions d'électrosynthèse. Récemment, nous avons pu proposer un modèle de capteur à ADN régénérable [14] (schéma 5). Après une perte de 10 % au 2^e cycle d'hybridation, le système se stabilise et une dizaine de cycles de dénaturation/hybridation successifs ont pu être réalisés.

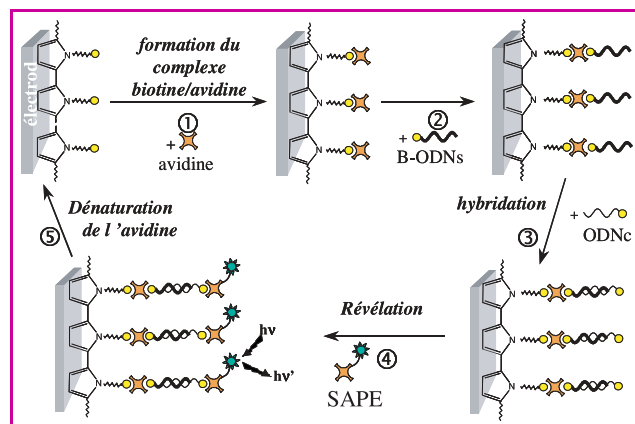


Schéma 5 - Cycle de fabrication/régénération d'un capteur à ADN.

Étapes 1-3 : construction de l'assemblage ODN sonde/ADN cible sur polypyrrole biotinylé, PPy-B. Étape 4 : révélation par addition du fluorophore streptavidine-phycoérythrine, SAPE. Étape 5 : régénération de la surface du PPy-B obtenue par dénaturation de l'avidine par une solution de SDS 0,1 M à 100°C .

« L'électrospotting » est un nouveau format d'électrocopolymérisation qui permet par des copolymérisations successives une préparation aisée de matrices d'ODN directement sur un substrat d'or non structuré, sans l'utilisation de réactifs ODN-thiols ou de synthèses multi-étapes [15] (figure 4A). Ce procédé a été appliqué à la surface uniformément métallisée du prisme d'un montage de détection par résonance plasmonique de surface (SPR) (figure 4B) et permet le suivi en temps réel de la cinétique d'hybridation de l'ADN [16].

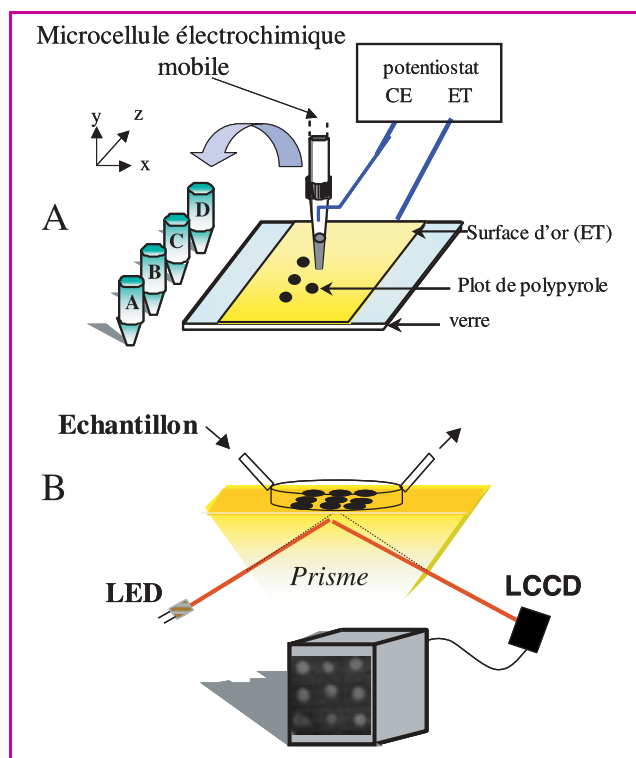


Figure 4.

A : principe de « l'électrospraying ».

La transformation d'un cône de micropipette en cellule électrochimique mobile permet d'effectuer des électrodépôts successifs sur une surface d'or utilisée comme électrode de travail. Un robot permet d'effectuer les réactions successives de rinçage et de remplissage de la pipette-cellule et d'électropolymérisation pour fabriquer la matrice d'ODN.

B : représentation schématique d'un dispositif d'imagerie SPR.

Un faisceau collimaté et p-polarisé d'une LED illumine la face interne d'une surface d'or recouverte des plots de PPy/assemblage biologique. La lumière réfléchie qui contient toute l'information SPR est collectée sur une caméra CCD.

Des films très fins, d'épaisseur contrôlée au nanomètre près (5 à 10 nm) ont été réalisés de façon très reproductible par des électrosynthèses « flash » afin que le film de PPy ne puisse faire écran à l'interaction entre l'assemblage biologique et les plasmons du film d'or. Un excellent taux de greffage des ODN sondes est obtenu (10-20 pmole/cm²). Les études cinétiques montrent une bonne spécificité et une bonne sensibilité ; de plus, l'utilisation d'un capteur à 9 plots permet par exemple une détection en temps réel de mutations ponctuelles de l'oncogène P53 [17]. Les études actuelles réalisées en collaboration avec la société Genoptics, qui développe l'appareillage d'imagerie SPR, ont permis de réaliser des puces comportant 50 et 100 plots.

Procédés de détection

La détection du phénomène d'hybridation d'un oligonucléotide sonde immobilisé est en règle générale effectuée par microscopie de fluorescence. Dans ce contexte, un fluorophore est greffé sur l'ADN cible durant l'étape de PCR. La fluorescence est une technique sensible et possédant une très bonne résolution spatiale. Cependant, du fait de la miniaturisation des biocapteurs et de leur intégration dans des dispositifs électroniques, d'autres voies de détection ont été développées avec un fort engouement pour les techniques électrochimiques.

La détection directe

Elle repose sur la transduction en valeurs mesurables de phénomènes physiques perturbés par l'hybridation. Nous la définissons au sens large, c'est-à-dire ne nécessitant pas le marquage chimique ou enzymatique de la cible (réalisé au cours de l'amplification de l'acide nucléique à analyser), ni celui du duplex ou du support. Les dispositifs les plus communément utilisés (électrochimiques, piézo-électriques ou à résonance plasmonique) détectent les variations de charges électriques, d'indice de réfraction et de masse résultant de la formation du duplex. En détection électrochimique directe, le signal électrique provient des perturbations engendrées par l'hybridation, soit à l'interface entre le double brin et le support (méthodes impédimétriques, ChemFET) [18], soit des propriétés électroniques du support PPy [10] (voir ci-après la détection électrochimique indirecte).

Une autre approche de la détection électrochimique sans marquage consiste à oxyder les bases guanine de l'ADN [19]. En effet, cette base nucléique présente un potentiel redox (0,81 V/ECS) permettant sa détection en milieu aqueux, ce qui n'est pas le cas de l'adénine (1,4 V/ECS). L'oxydation des guanines peut aussi être relayée par un médiateur redox en solution. Ainsi, le complexe de ruthénium, Ru(bipy)₃²⁺, a été utilisé comme relais d'électron entre l'ADN et une électrode modifiée par des sondes oligonucléotides après hybridation [20]. Ces méthodes de détection n'étant pas totalement spécifiques de la séquence analysée, de nouveaux matériaux, tels que le diamant dopé au bore qui présente une large fenêtre électrochimique sans adsorption de l'ADN [21] et permet l'oxydation des deux bases électro-oxydables, sont actuellement étudiés [22]. Toutefois, la détection électrochimique directe de l'ADN n'est pas totalement compatible avec l'immobilisation des sondes oligonucléotides qui donne aussi une réponse électrochimique sans hybridation. La société Xanthon a tenté de commercialiser une plate-forme de détection électrochimique comportant des sondes modifiées en remplaçant les guanines par la base nucléique non physiologique et électro-inactive, l'inosine [23]. Le signal résiduel de la sonde est minimisé au dépend de la qualité du phénomène de reconnaissance. Ainsi, une séquence cible 21-mère comportant 5 guanines a pu être détectée à des niveaux de 43 attomoles (amole ; 10⁻¹⁸ moles).

La détection indirecte

En détection indirecte, et selon l'objectif recherché (révélation, suivi cinétique ou quantification de l'hybridation), chaque méthode de détection (optique, électrochimique...) apporte sa spécificité et son choix dépend du type de substrat et du procédé d'immobilisation. Les différentes stratégies de détection électrochimique indirecte peuvent ainsi être répertoriées de manière générique :

- Marquage redox, soit par une sonde électro-active, soit par une oxydoréductase ;
- Utilisation de petites molécules redox interagissant spécifiquement avec le double brin ;
- Modulation de la réponse redox de la matrice d'immobilisation des sondes de capture par le phénomène d'hybridation. Comme exemple de marquage préalable de l'ADN cible par une espèce redox, on peut citer l'utilisation du ferrocène [24] qui a été mise à profit par la société Motorola pour l'élaboration de capteurs d'ADN. Très récemment, A. Hegger

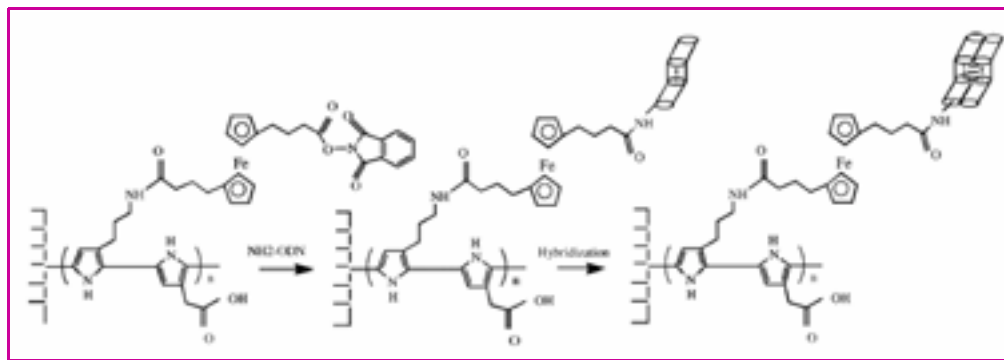


Schéma 6 - Structure des films électro-actifs destinés à la détection de l'hybridation d'ADN (d'après [27]). Le film électro-actif est synthétisé électrochimiquement, les sondes redox étant liées de manière covalente au monomère, puis est post-fonctionné par l'oligonucléotide sonde avant de procéder à l'hybridation.

et coll. ont détecté par voltampérométrie cyclique le changement de conformation après hybridation d'un ODN-boucle portant un ferrocène à l'une de ses extrémités [25]. Toutefois, le marquage unitaire de la cible ne permet pas d'obtenir un facteur d'amplification suffisant ; ainsi J. Wang et coll. ont développé le marquage des sondes par des billes polymères poreuses chargées de ferrocène et permettant un facteur d'amplification lié à la charge en molécule électro-active [26]. Garnier et coll. ont montré que la réponse électrochimique du support PPy était modifiée par l'hybridation donnant lieu à un déplacement du potentiel et à une diminution du courant mesurés lors de l'oxydation de la matrice hôte [10]. Afin d'obtenir un signal plus stable, Korri-Youssouffi et coll. ont modifié les films obtenus en intercalant un centre redox ferrocène entre l'oligonucléotide sonde et la matrice polymère (schéma 6) et ont observé le même type de phénomène électrochimique lié à la reconnaissance [27]. Par ailleurs, l'amplification redox peut être menée par l'utilisation d'enzymes redox tels que la peroxydase de Raifort ou l'alcaline phosphatase. Des mutagénèses dirigées ont permis d'accroître l'activité enzymatique de la phosphatase d'un facteur 40, tout en maintenant une haute stabilité thermique [28]. Infineon Technologie (Allemagne) [29] annonce la mise au point pour 2003 d'une biopuce (ADN, protéine) 128 plots sur CMOS. L'alcaline phosphatase est liée à la cible par une interaction biotine/extravidine et catalyse un substrat sacrificiel (p-aminophénylphosphate) en un produit (p-aminophénol) détectable par ampérométrie. La détection électrochimique totale prend moins de 3 mn. A. Heller et coll. ont développé ce principe en immobilisant les sondes dans

un polymère électro-actif médiateur de l'activité enzymatique, obtenant ainsi des seuils de détection de 3,3 amole/L sur microfibre de carbone [30].

B. Limoges *et al* ont mis en œuvre des conjugués acides nucléiques-enzymes comme :

- la phosphatase greffée sur l'ADN du cytomégalovirus humain (hCMV, virus de la famille des herpès), quantifiée par la détection électrochimique d'un dérivé du cobaltocénium qu'elle relargue *via* l'hydrolyse d'un sel de phosphate monoester-cobaltocénium (des limites

de détection de 10 amole/mL sont rapportées [31] ;

- la peroxydase de raifort (HRP), greffée sur l'hCMV et quantifiée par la détection du chromophore généré à partir du substrat *o*-phénylène diamine (schéma 7). Les limites de détection sont de 0,6 amole/mL [32].

Willner *et al.* ont récemment développé un nouveau concept qui implique la formation d'une réplique redox active et son utilisation comme relais d'électron dans une transformation bioélectrocatalytique [33]. La glucose oxydase est en solution, tandis que le cofacteur de l'enzyme, dérivé du ferrocène, est inclus par PCR dans la réplique de l'ADN viral cyclique M13 ϕ qui comprend 7 229 bases.

Le marquage de l'ADN cible par des nanoparticules d'or a été exploité dans diverses voies de détection comme l'amplification du signal SPR ou de microgravimétrie [34], la dissolution par oxydation des nanoparticules d'or qui génère les ions Au^{III} détectés électrochimiquement [35] ou la variation de conductivité engendrée par la connexion de deux électrodes au travers d'un réseau plan de nanoparticules d'or [36].

Les techniques de détection par marquage redox précédemment citées nécessitent la modification chimique des sondes ADN. Afin d'éviter cette étape, certains chercheurs se sont penchés sur l'utilisation de molécules électro-actives possédant une spécificité importante pour le duplex. On peut citer plusieurs familles de ces petites molécules incluant les intercalants (daunomycine [37], bleu de méthylène), les « threading agents » (SND-1) et enfin les molécules de reconnaissance du petit (Hoechst 33258) ou du grand sillon. Récemment, Takenaka a présenté une revue des différentes molécules utilisées [38]. L'amplification résulte de la multiplicité de l'intercalation le long du duplex. Wang *et al* rapporte des niveaux de détection de 4×10^{-9} M pour une séquence d'HIV-1 intercalée par Co(phen)₃³⁺ [39]. En règle générale, les intercalants sont des molécules planes polyaromatiques venant interagir avec le duplex en s'insérant dans l'empilement des bases nucléiques. Ces molécules sont rarement spécifiques de la séquence détectée, contrairement aux molécules interagissant avec le petit sillon qui doivent présenter une courbure et une densité électronique en rapport avec la taille du duplex et la nature des bases nucléiques impliquées. Excepté quelques molécules, telles que le SND-1 synthétisé par Takenaka, le bleu de méthylène ou les complexes de cobalt (Co(phen)₃³⁺ par exemple), la plupart des systèmes d'interaction avec le duplex sont des molécules pharmaceutiques développées pour leurs propriétés thérapeutiques et présentant une activité redox difficilement exploitable (réversibilité,

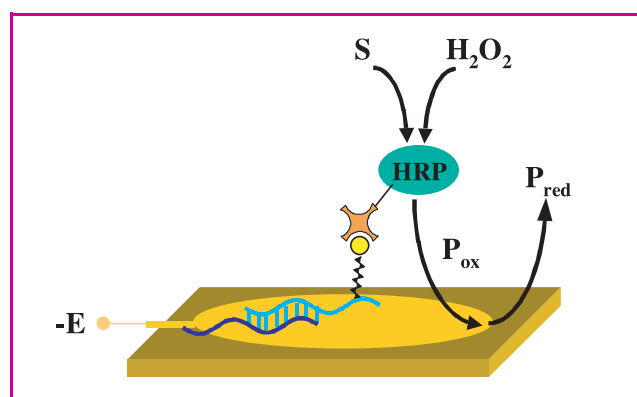


Schéma 7 - Principe de la détection amplifiée de l'hCMV. P_{ox} est détecté par DPV. HRP = peroxydase de raifort, S = *o*-phénylènediamine, P = 2,2'-diaminoazobenzène.

potentiel). Dans ce contexte, les recherches s'orientent vers le design moléculaire de nouveaux intercalants redox tels que ceux développés par M. Demeunynck (LEDSS, Univ. J. Fourier, Grenoble I) et caractérisés au laboratoire. La figure 5 présente la structure de l'une de ces molécules dérivées des pyridoacridones et son mode d'interaction avec le duplex, ainsi que la réponse électrochimique par voltamétrie pulsée différentielle (DPV) après interaction avec un simple brin ou un double brin d'ADN immobilisé sur électrode.

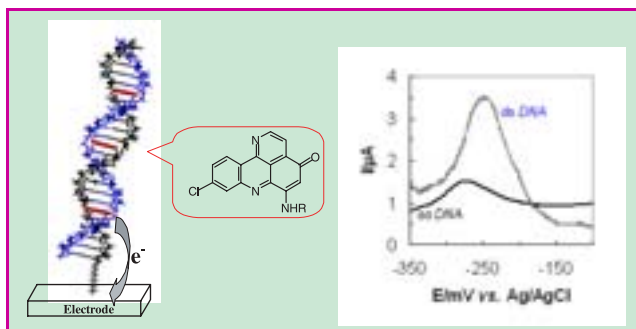


Figure 5 - Intercalant dérivé de la pyridoacridone et réponse électrochimique enregistrée par DPV sur électrode de platine modifiée par un film de polypyrrole après interaction avec un ADN simple ou double brin adsorbé.

Conclusion

Si le concept est simple, la technologie des puces à ADN est complexe car elle recouvre des compétences complémentaires dans des disciplines très diverses comme la chimie des surfaces, l'électrochimie moléculaire, les microtechnologies, l'électronique et la biologie moléculaire. Parmi les méthodes classiques d'adressage et d'immobilisation comme le « spotting » sur verre, l'adressage électrochimique de l'immobilisation de biomolécules (dont l'ADN) sur des électrodes est désormais un domaine mature qui devrait aboutir à des produits commercialisables (APIBIO, Genopics...) dans les deux ans à venir.

La détection électrochimique est attractive par sa souplesse d'utilisation (on évite un matériel lourd en remplaçant l'excitation laser par un signal électrique), et offre une palette de possibilités, que ce soit par amplification électrocatalytique à l'aide d'un marqueur redox (greffé ou intercalé) ou par transduction électrochimique en utilisant un support polymère conducteur. Pour l'avenir, l'intégration de la partie puce à ADN dans un système « lab-on-chip » ayant pour fonction d'intégrer différentes opérations dont l'immobilisation des sondes, l'électrophorèse et PCR intégrées de l'échantillon biologique, l'hybridation et la détection, sera bien plus compatible avec une interrogation/détection électrique qu'avec un guidage optique dont le tracé ne doit pas interférer avec le réseau de la microfluidique.

Références

- [1] Yole Micronews, avril 2002, 2, p. 4 (www.yole.fr).
- [2] Pirrung M., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, p. 1276.
- [3] Delpech M., *Ann. Bio. Clin.*, **2000**, 58, p. 28.
- [4] Souteyrand E., *Analysis*, **1999**, 27, p. 639.
- [5] Beir M., Hoheisel I.D., *Nucleic Acids Res.*, **2000**, 28, p. 11.
- [6] Roget A., Livache T., *Mikrochim. Acta*, **1999**, 131, p. 3.
- [7] Heller M.J., Forster A.H., Tu E., *Electrophoresis*, **2000**, 21, p. 157.
- [8] Bidan G., Billon M., Galasso K., Livache T., Mathis G., Roget A., Torres-Rodriguez L.M., Vieil E., *Appl. Biochem. & Biotech.*, **2000**, 89, p. 183.

- [9] Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraiishi H., Farias P., Dontha N., *Anal. Chem.*, **1996**, 68, p. 2629.
- [10] Korri-Youssoufi H., Garnier F., Srivastava P., Godillot P., Yassar A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, p. 7388.
- [11] Livache T., Fouqué B., Roget A., Marchand J., Bidan G., Téoule R., Mathis G., *Anal. Biochem.*, **1998**, 255, p. 188.
- [12] Lopez-Crapez E., Livache T., Marchand J., Grenier J., *Clinical Chem.*, **2001**, 47, p. 186.
- [13] Livache T., Bazin H., Caillat P., Roget A., *Biosensors and Bioelectronics*, **1998**, 13, p. 629.
- [14] Dupont-Filliard A., Roget A., Livache T., Billon M., *Anal. Chem. Acta*, **2001**, 449, p. 45.
- [15] Livache T., Guédon P., Brakha C., Roget A., Levy Y., Bidan G., *Synth. Met.*, **2001**, 121, p. 1443.
- [16] Guédon P., Livache T., Martin F., Lesbre F., Bidan G., Levy Y., *Anal. Chem.*, **2000**, 72, p. 6003.
- [17] Livache T., Maillart E., Lassalle N., Mailley P., Corso B., Guédon P., Roget A., Levy Y., *J. Pharm. & Biomed. Anal.* (accepté).
- [18] Souteyrand E., Cloarec J.P., Martin J.R., Wilson C., Laurence I., Mikkelsen S., Lawrence M.F., *J. Phys. Chem.*, **1997**, 101, p. 2980.
- [19] Jelen F., Tomschik M., Palecek E., *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 423, p. 141.
- [20] Popovich N.D., Eckardt A.E., Mikulecky J.C., Napier M.E., Thomas R.S., *Talanta*, **2002**, 56, p. 821.
- [21] Prado C., Flechsig G.U., Gründler P., Foord J., Marken F., Compton R., *Analyst*, **2002**, 127, p. 329.
- [22] Fortin E., Chane-Tune J., Mailley P., Szunerits S., Marcus B., Petit J.-P., Mermoux M., Vieil E., *Bioelectrochemistry* (accepté).
- [23] Xanthopoulos H., Thorp H., *Trends in Biotech.*, **1998**, 16, p. 117.
- [24] Ihara T., Nakayama M., Murata M., Nakano K., Maeda M., *Chem. Commun.*, **1997**, 17, p. 1609.
- [25] Fan C., Plaxco K., Heeger A., *Proc. Nat. Amer. Soc.*, **2003**, 100, p. 9134.
- [26] Wang J., Polsky R., Merkoci A., Turner K.L., *Langmuir*, **2003**, 19, p. 989.
- [27] Korri-Youssoufi H., Makrouf B., *Anal. Chim. Acta*, **2002**, 469, p. 85.
- [28] Boulain J.-C., Muller B., Ducancel F., *L'Act. Chim.*, **2002**, 8-9, p. 18.
- [29] <http://www.infineon.com/news/press/archive.htm>
- [30] Dequaire M., Heller A., *Anal. Chem.*, **2002**, 74, p. 4370.
- [31] Bagel O., Degrand C., Limoges B., Joannes M., Azek F., Brossier P., *Electroanalysis*, **2000**, 12, p. 1447.
- [32] Azek F., Grossiord C., Joannes C., Limoges B., Brossier P., *Anal. Biochem.*, **2000**, 284, p. 107.
- [33] Patolsky F., Weismann Y., Willner I., *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, p. 770.
- [34] Patolsky F., Ranjit K., Lichtenstein A., Willner I., *Chem. Commun*, **2000**, p. 1025.
- [35] Autier L., Grossiord C., Brossier P., Limoges B., *Anal. Chem.*, **2001**, 73, p. 4450.
- [36] Park S.J., Andrew T., Mirkin C., *Science*, **2002**, 295, p. 1503.
- [37] Mascini M., Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **2001**, 4414, p. 8.
- [38] Takenaka S., *Electrochemical detection of DNA with small molecules, DNA and RNA Binders, vol. 1*, M. Demeunynck, C. Bailly, W.D. Wilson (eds), Wiley VCH, **2002**, p. 224.
- [39] Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraiishi H., Dontha N., *Biosens. & Bioelectr.*, **1997**, 12, p. 587.



De gauche à droite : **Martial Billon**¹, maître de conférences à l'université Joseph Fourier (Grenoble I), électrochimiste, développe l'immobilisation électrochimique et par affinité de biomolécules, et la biodétection par électrochimiluminescence ; **Gérard Bidan**², expert senior CEA, directeur adjoint de l'UMR SprAM*, a introduit dès 1981 la fonctionnalisation du polypyrrole ; **André Roget**, chercheur CEA, biochimiste, spécialiste de la bioconjugaison de monomères du pyrrole et de quantum dots et **Thierry Livache**³, chercheur CEA, responsable du groupe CREAB, biochimiste, développe l'imagerie de résonance plasmonique de surface pour le suivi en temps réel d'interactions biologiques. Ces trois dernières personnes ont initié avec **Robert Teoule** (CEA, retraité) le procédé MICAMTM d'immobilisation électro-adressée d'ODN. En encart : **Pascal Mailley**⁴, maître de conférences à l'université Joseph Fourier (Grenoble I), bio-électrochimiste, développe l'utilisation des intercalants redox comme marqueurs de capteurs à ADN et l'utilisation des électrodes de diamant pour la bio-électroanalyse.

* UMR 5819, CEA/CNRS/UJF, Structures et propriétés des architectures moléculaires, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 09.

¹ Tél. : 04 38 78 48 33. Courriel : billon@drfmc.ceng.cea.fr

² Tél. : 04 38 78 48 41 - Fax : 04 38 78 51 45. Courriel : gidan@cea.fr, **auteur correspondant**

³ Courriel : thierry.livache@cea.fr

⁴ Tél. : 04 38 78 32 19. Courriel : mailley@drfmc.ceng.cea.fr