

Figure 1

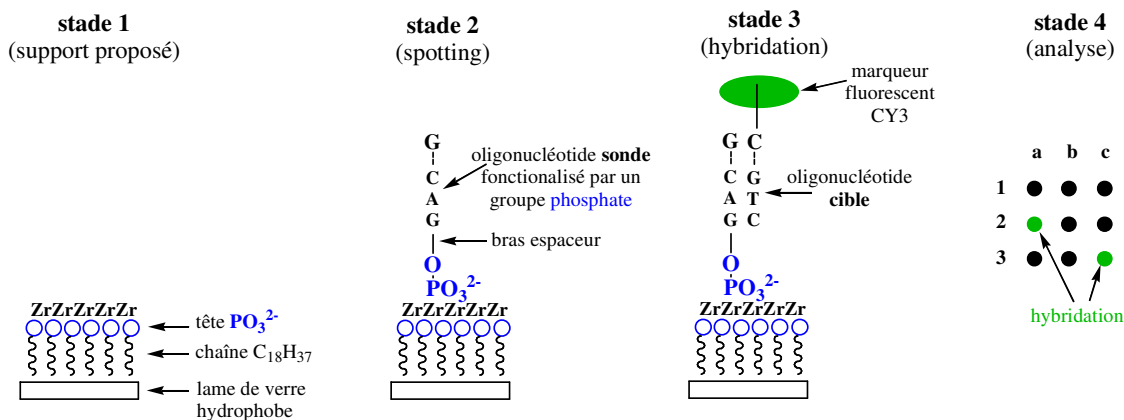
La technologie des puces à ADN connaît depuis quelques années un essor considérable, car elle permet l'analyse à haut débit de milieux biologiques, par exemple pour le séquençage de gènes ou la détection de mutations associées à certaines maladies.

Préparer une puce à ADN consiste à déposer sur un substrat plan de quelques cm² (en général du verre), plusieurs milliers d'oligonucléotides sous forme de micro-dépôts ou spots (diamètre : environ 100 μm). Les oligonucléotides sont soit synthétisés *in situ* sur le support, soit pré-synthétisés puis déposés sur le support via un robot (*Figure 1*), chaque spot correspondant à une séquence d'oligonucléotide donnée (longueur : 30 à 50 bases, le plus souvent). Dans le second cas, la tendance actuelle est d'ancrer de manière covalente les oligonucléotides sur le support. Pour cela, la surface de verre est le plus souvent fonctionnalisée via un silane fonctionnel. On obtient ainsi une surface activée (époxyde, vinylsulfone, aldéhyde, acide activé) qui va permettre la fixation d'oligonucléotides modifiés en position 5' (en général par une fonction C₆H₁₂-NH₂) par formation d'un lien organique covalent.

Notre objectif était de développer une nouvelle méthode d'ancrage à fort caractère covalent, permettant la fixation d'oligonucléotides sur un support plan à base de métallophosphonate pour la fabrication de puces à ADN. L'idée, totalement originale, était de greffer des oligonucléotides sur ces films en les fonctionnalisant par des terminaisons phosphate. En effet, le groupe phosphate est facilement incorporable sur les oligonucléotides en position 5' (par voie enzymatique ou chimique). Cette modification est peu onéreuse et permet également d'envisager l'ancrage d'ADNc.

Le support utilisé est une lame de verre sur laquelle repose un film réticulé de type Langmuir-Blodgett à base de phosphonate de zirconium (*Figure 2*, stade 1). Nous avons montré précédemment que cette surface présente une très forte affinité pour les groupes acides phosphoniques. Par analogie, il devrait en être de même avec un groupe phosphate libre (*Figure 2*, stade 2). Nous avons donc montré que les oligonucléotides ainsi modifiés peuvent être déposés sur le support par simple "spotting" grâce à un robot et que ceux-ci se fixent de manière quasi-covalente avec le zirconium à la surface du support ; les lames sont ensuite traitées par une solution de BSA (albumine de sérum bovin) pour saturer les zones non spottées.

Figure 2



Puis on effectue des tests d'hybridation avec des oligonucléotides (complémentaires et non complémentaires) marqués avec une sonde fluorescente CY3 (Figure 2, stade 3), les analyses de fluorescence étant réalisées à l'aide d'un scanner (microscope confocal) (Figure 2, stade 4).

En général, un groupement espaceur (le plus souvent une chaîne *n*-hexyle) est introduit entre l'oligonucléotide et sa fonction d'ancrage pour éloigner l'oligonucléotide de la surface du support et ainsi faciliter l'hybridation. De notre côté, nous avons montré qu'un groupement espaceur de type polyguanine (longueur optimale : 7 à 9 motifs guanine) permettait une amélioration très significative des performances de nos puces à oligonucléotides, conduisant à des intensités élevées de fluorescence sur les spots où il y a eu hybridation, et de très bons rapports « signal sur bruit » (spots / zones non spottées – voir Tableau 1).

Tableau 1 : Intensité de fluorescence en fonction de la nature de l'espaceur présent sur les sondes 5'H₂O₃PO-(espaceur)-O33(X), 5'H₂O₃PO-(espaceur)-O33(Y), et 5'H₂O₃PO-(espaceur)-O33(Z), après hybridation avec les cibles complémentaires marqués avec un fluorophore de type CY3.^a

espaceur	5'H ₂ O ₃ PO-(espaceur)-O33(X) ^b	5'H ₂ O ₃ PO-(espaceur)-O33(Y) ^c	5'H ₂ O ₃ PO-(espaceur)-O33(Z) ^d
aucun	13500 ± 500	17000 ± 500	9000 ± 1500
(G) ₁₁	35000 ± 3000	40000 ± 6000	21000 ± 1500
(A) ₁₁	11000 ± 2000	16000 ± 500	10000 ± 1000
(T) ₁₁	4500 ± 500	14000 ± 1000	6500 ± 1500
(C) ₁₁	4500 ± 500	8000 ± 1000	7000 ± 1500

^a Moyenne de trois mesures. ^b concentration de spotting : 10 μM. ^c concentration de spotting : 50 μM. ^d

concentration de spotting : 5 μM. O33(X), O33(Y) et O33(Z) correspondent à des oligonucléotides de 33 bases et de séquence différentes notées X, Y et Z.

Ce projet interdisciplinaire, a été mené en partenariat avec l'UMR CNRS 6204 (Biotechnologies, Biocatalyse, Biorégulation – Professeur Charles Tellier), l'unité INSERM 533 (Équipe de Jean Léger) abritant la plate-forme technologique Ouest Génopôle, l'équipe du professeur Daniel Talham (University of Florida, Gainesville, USA) et l'équipe du professeur Didier Dubreuil du Laboratoire CEISAM de Nantes. **Ces travaux ont été brevetés¹ et ont reçu un soutien via un poste rouge CNRS d'une durée de 6 mois, un programme CNRS "Puces à ADN" (2001-2002) et une action CNRS – Etats-Unis (2005-2007 ; financement de missions d'échange).**

Pour poursuivre ces études, nous avons acquis un équipement d'imagerie Nanolane permettant de faire des mesures d'épaisseur optique à l'échelle nanométrique (technique Sarfus). Cet équipement consiste en un microscope optique modifié permettant l'observation de dépôts ou de revêtements sur des substrats (surfs) dont le traitement multicouche conduit à une amplification de contraste. Ensuite, des résultats très prometteurs ont été obtenus en immobilisant cette fois sur notre support de phosphonate de zirconium des ADN double brin (37 paires de bases comprenant une séquence de 19 paires de bases reconnue par la protéine ArgR), modifiés par des groupes phosphate, afin de préparer des puces utilisables pour l'étude d'interactions de type ADN/protéine (*Figure 3*).

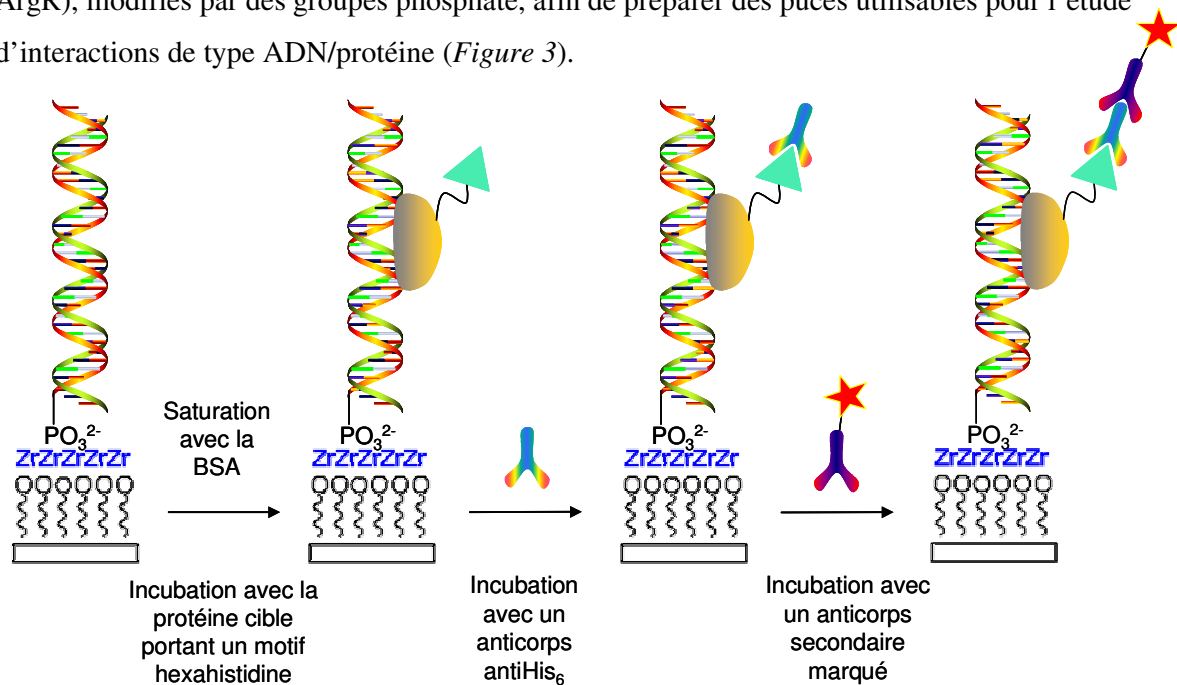


Figure 3

¹ Brevet CNRS WO 04/011401A2 du 05/02/04

Nous avons en effet montré que de très bons résultats étaient obtenus quand : (a) deux terminaisons phosphate étaient introduites sur les extrémités 3'-3' ou 5'-5' du double brin (b) un espaceur polyguanine comprenant au moins 5 motifs guanine était introduit entre le double brin et les terminaisons phosphate. Pour rationaliser ces observations, nous comparons pour chaque type de modification de la sonde, les données de fluorescence (quantifiant la qualité de la reconnaissance ADN/protéine), l'épaisseur optique des spots mesurée par Sarfus, la densité de couverture en ADN double brin mesurée par XPS via un protocole mis au point par notre partenaire américain. Nous avons ainsi montré que la qualité de la reconnaissance ADN/protéine n'est pas liée à une quantité de sonde greffée supérieure mais à une présentation des doubles brins plus favorable. Nous envisageons maintenant de déposer des produits de PCR porteurs d'une modification phosphate introduite par voie enzymatique (kinase).

Une autre extension du projet est actuellement en cours ; celle-ci consiste à étudier la possibilité d'utiliser nos films pour la préparation de puces à protéines, en mettant en œuvre un **concept d'ancrage utilisant une modification naturelle des protéines** (introduction d'une extrémité peptidique par génie génétique), avec le **développement parallèle de méthodes de détection directe des interactions sondes – cibles**. Ce travail s'appuie sur le même réseau de travail, avec comme partenaire supplémentaire le Docteur. H. Bedouelle [Institut Pasteur / CNRS], qui a développé des immunocapteurs fluorescents autonomes. Il s'agit d'anticorps qui, par couplage d'un groupement fluorescent au voisinage du site de reconnaissance, permettent la mesure de la concentration en antigène dans un mélange complexe, sans marquage des protéines à analyser, afin de s'affranchir des problèmes de perturbation biologique et également de réduire les coûts d'analyse. Cette construction, généralisable à la plupart des anticorps, permettrait de générer des puces à anticorps à usage de détection, de dosage ou de diagnostic. Nous bénéficions ou avons bénéficié pour ce projet d'un **soutien via le Programme CNRS 2003-2005 « Protéomique, Génie des protéines », de deux contrats DGA (2005-2007 et 2008-2010), et d'un financement de thèse DGA-CNRS débutée en Octobre 2006.**