

De nouveaux capteurs sensibles et sélectifs

Discriminer des bactéries pathogènes pour **diagnostiquer des maladies de manière non invasive, étudier comment peut être réparé l'ADN, se prémunir contre le terrorisme, détecter des toxines d'agents biologiques ou évaluer la réponse immunologique de certains patients infectés par le virus de l'hépatite C...** Aussi hétéroclites soient-elles, ces recherches se retrouvent pourtant autour d'un dénominateur commun : la conception et l'utilisation de capteurs innovants.

Élaboration de capteurs chimiques à transduction optique, à base de matériaux nanoporeux dopés de molécules-sondes pour la détection de polluants gazeux.



C. Dupont/CEA

Instrument de base pour le prélèvement de données dans l'environnement, le capteur doit encore rendre exploitables les différentes grandeurs physiques en vue de leur traitement ultérieur. Aujourd'hui, une nouvelle vague de capteurs arrive dans les laboratoires, fruits d'une R&D où la chimie joue un rôle déterminant. En effet, de la recherche à l'industrie, les chimistes partagent des espaces d'investigation communs, ou proches, avec les physiciens concepteurs de procédés innovants de détection, les biologistes qui les mettent à l'épreuve, les fabricants pour les valoriser sur le marché.

Cibler les COV, même à l'état de traces

Humer des odeurs pour discriminer les bactéries pathogènes et pour diagnostiquer des maladies de manière non invasive, le concept n'est pas neuf et date déjà d'une vingtaine d'années. Les marqueurs bien établis sont, par exemple, l'ammoniac couplé au CO₂ pour les infections gastro-intestinales dues à la bactérie *Helicobacter pylori*. Dans la plupart des cas, il faut pouvoir détecter, à l'état de trace, des composés organiques volatils (COV) émis par ces micro-organismes. De nombreux laboratoires dans le monde se sont mobilisés pour identifier les COV. Cette opération a nécessité des moyens lourds de détection tels que la chromatographie en phase gazeuse (CPG), la technique de transfert de protons couplée à la spectrométrie de masse ou d'ionisation chimique également couplée à la spectrométrie de masse, pour produire une banque de données de marqueurs spécifiques. De nombreux COV pouvant être émis avec des concentrations différentes par les diverses bactéries, leur discrimination se heurte à une double difficulté : détecter certains COV à faibles teneurs (ppb) et quantifier leur vitesse de production en fonction du temps. Mais actuellement, aucun des nez électroniques ou colorimétriques disponibles sur le marché ou décrits dans la littérature ne remplissent ces deux conditions. D'où l'idée des chercheurs de concevoir des capteurs innovants capables d'allier une sensibilité et une sélectivité élevées en même temps qu'une quantification de la vitesse de production du métabolite. Leur principe repose sur des matrices nanoporeuses de polymères hybrides organiques/inorganiques, produites à partir d'alcoxydes de silicium, selon le procédé sol-gel, simple et peu coûteux. L'intérêt de ces matériaux, à forte surface spécifique d'adsorption (600 à 750 m²·g⁻¹), réside dans leur multifonctionnalité. Ils se comportent, en effet, comme de véritables éponges pouvant accumuler les COV tout en les filtrant grâce au dimensionnement des tailles de pores. De plus, une fois dopés de molécules-sondes aptes à réagir spécifiquement avec les COV-cibles, ces matériaux deviennent des nanoréacteurs qui exaltent les réactions chimiques en apportant une sélectivité accrue au capteur.

CEA

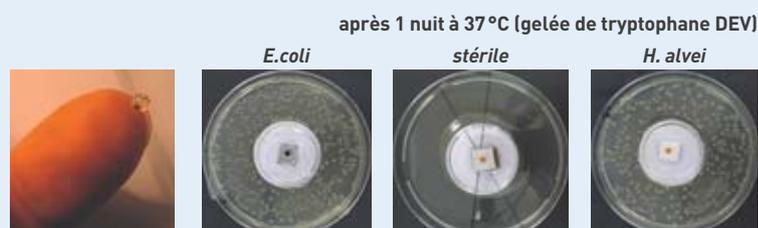


Figure 1.

Test de détection de l'indole gazeux généré par les bactéries. La pastille transparente de capteur nanoporeux, dopé de diméthyl-aminocinnamaldéhyde (photo à gauche), est disposée sur une soucoupe contenant un desséchant et déposée au centre de la boîte de Petri. Le desséchant se justifie par le fait que les bactéries croissent dans une atmosphère tiède et humide : l'eau peut entrer dans les pores et changer l'acidité du nanoréacteur qui deviendrait alors moins efficace. La boîte de Petri contient un milieu de culture gélosé dans lequel vont croître les colonies de bactéries. Au bout de 7 heures, les colorations sont déjà visibles et s'intensifient au cours du temps. La pastille devient verte en accumulant l'indole généré par l'*Escherichia coli*. Le test est négatif pour l'*Hafnia alvei* qui n'en produit pas ainsi que pour l'échantillon stérile. La coloration est dans ce cas orange (voir figure 2).

Les chercheurs ont obtenu la preuve de l'efficacité de ce concept en cherchant à discriminer deux bactéries : l'*Escherichia coli* et l'*Hafnia alvei* – la première étant capable de générer de l'indole dans un milieu de culture contenant du tryptophane, contrairement à la seconde. D'où la mise au point d'un capteur spécifique, réalisé avec un matériau dont la taille des pores, suffisamment grande, permettait de piéger les molécules d'indole (figure 1). Ce capteur a été dopé avec une molécule-sonde,

le diméthyl-aminocinnamaldéhyde (DMACA), dont la réaction avec l'indole conduit à la formation d'un sel d'azafulvénium fortement coloré (bleu-vert), absorbant dans le rayonnement visible avec un maximum centré à 625 nm (figures 2 et 3). La vitesse de formation du chlorure d'azafulvénium est proportionnelle à la concentration d'indole dans une large gamme de concentrations ($5 \cdot 10^{-7}$ à $2 \cdot 10^{-4}$ mole·L⁻¹) et la sensibilité atteinte avec une pastille de réactif s'établit de 0,1 à 40 nanomoles d'indole avec un prélèvement de 20 µL de la solution à analyser. Ce concept pourra s'étendre à de nombreux COV-cibles, avec de nombreuses applications à la clé dans les domaines de la santé et de l'agroalimentaire. La recherche de marqueurs pour le diagnostic précoce des cancers, par exemple, se trouve en pleine expansion. De même, dans le domaine de l'agroalimentaire, le suivi de la fraîcheur des aliments ou la détection précoce de leur contamination par des bactéries pathogènes pendant leur processus de transformation revêtent une grande importance avec un fort impact économique pour les entreprises.

Quantifier la réparation de l'ADN avec des biocapteurs

L'ADN se trouve constamment soumis à des agents endogènes ou exogènes susceptibles de l'endommager, voire de générer des processus de mutagenèse ou de mort cellulaire. Heureusement, différents complexes enzymatiques de réparation peuvent prendre en charge de telles lésions, les éliminer et ainsi restaurer l'intégrité du message génétique. La moindre déficience en capacité de réparation de l'ADN peut entraîner l'apparition de cancers. Ces mécanismes de réparation agissent donc comme de véritables « gardiens du génome ». Par ailleurs, sachant que la surexpression des protéines de réparation de l'ADN se trouve liée à la résistance de certains cancers aux traitements anti-tumoraux, l'une des stratégies capables de limiter ce phénomène consiste à combiner le traitement chimio ou radiothérapeutique avec un inhibiteur de la réparation. Ainsi, au regard du rôle primordial joué par les systèmes de réparation de l'ADN, l'ambition des chercheurs vise-t-elle à mesurer, aussi précisément que possible, les activités enzymatiques de ces systèmes.

Classiquement, la réparation de l'ADN, par excision/resynthèse⁽¹⁾, est mesurée à l'aide de tests fonctionnels utilisant des sondes nucléiques radioactives couplées à une analyse par électrophorèse. Longues et fastidieuses, ces approches analytiques ne permettent pas les analyses en routine et haut débit d'échantillons biologiques nombreux. Aussi, les chercheurs du Laboratoire des lésions des acides nucléiques⁽²⁾ ont-ils mis au point de nouveaux biocapteurs à ADN utilisant une détection fluorescente, en solution ou sur un support. Ces nouveaux biocapteurs permettent désormais l'analyse fonctionnelle, facile et rapide, des enzymes de la voie dite réparation par excision de bases (REB) ou encore des complexes protéiques de la réparation par excision de nucléotides (REN), autrement dit, deux mécanismes de réparation basés sur l'excision des lésions puis la resynthèse d'ADN. Un de ces biocapteurs innovants a pour objectif de mesurer différentes activités de réparation de l'ADN. Il s'agit d'un test fonctionnel, basé sur l'utilisation de sondes oligonucléotidiques fluorescentes ou pro-fluorescentes

(1) Il s'agit d'un processus faisant intervenir une coupure, l'élimination de la lésion puis la synthèse d'ADN intègre.

(2) Laboratoire du Service de chimie inorganique et biologique (SCIB) de l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac).

	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	<i>Hafnia alvei</i> ATCC 13337	contrôle (Blanc)
tryptophane milieu agar			
LB milieu agar			

Figure 2.

Souche standard commercialisée par LGC Standards dont le département Recherche et technologie représente l'Institut national de métrologie britannique pour les analyses chimiques et biochimiques : distributeur européen exclusif de biomatériau American Type Culture Collection (ATCC) dont le numéro indique l'origine de la souche.

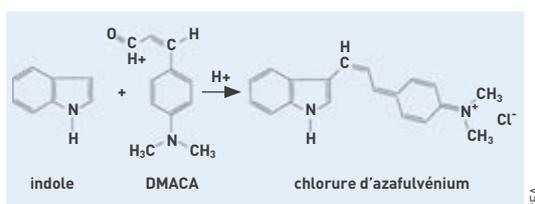


Figure 3.

DMACA : 4-(N,N-diméthylamino)cinnamaldéhyde ou 4-(N,N-diméthylaminophényl)propenal. Chlorure d'azafulvénium ou 3-[4-(N,N-diméthylaminophényl)-2'-propénylidène]indollinone hydrochloride.

(fluorescence initialement quenchée). Comme le montre la figure 4, les différents oligonucléotides contenant chacun une lésion distincte sont synthétisés, puis, utilisés soit en solution (en format micro-tube ou micro-plaque), soit fixés sur un support solide de type biopuces. Ce biocapteur, miniaturisé et multiplexé (fixation simultanée de plusieurs séquences) permet de mesurer l'activité d'enzymes purifiées mais aussi de quantifier des activités au sein d'extraits cellulaires (cellules cancéreuses ou cellules primaires de peau, du sang...). Il a conduit à la découverte et à l'étude d'inhibiteurs de la réparation.

Une approche similaire a été développée pour accéder à la réparation de l'ADN en tant que réseau protéique fonctionnel. Elle utilise l'immobilisation de plasmides circulaires portant des lésions spécifiques de l'ADN sur des biopuces recouvertes d'hydrogel (figure 5). Des activités de réparation, appartenant à des mécanismes différents, y sont quantifiées simultanément, ce qui rend possible la détermination des voies spécifiquement activées ou inhibées, co-régulées ou indépendantes, grâce à des outils bio-informatiques dédiés.

Outre le gain de temps et la convivialité des formats, ce type d'approche présente également l'avantage d'offrir une nouvelle dimension et une nouvelle impulsion aux recherches menées sur la réparation de l'ADN. Celles-ci seront possibles, notamment en travaillant sur des populations de grande taille, en faisant du criblage à haut débit pour identifier des inhibiteurs, en étudiant l'impact des drogues (toxiques ou anti-cancéreuses) sur les mécanismes de réparation – l'objectif à court terme étant alors de développer une recherche translationnelle et d'amener ces tests vers des applications cliniques et pharmaceutiques.

Nanotechnologies pour détecteurs de gaz neurotoxiques

Le développement du terrorisme international implique de réfléchir à la manière de se prémunir contre des agressions potentielles utilisant notamment des gaz de combat

CEA

CEA

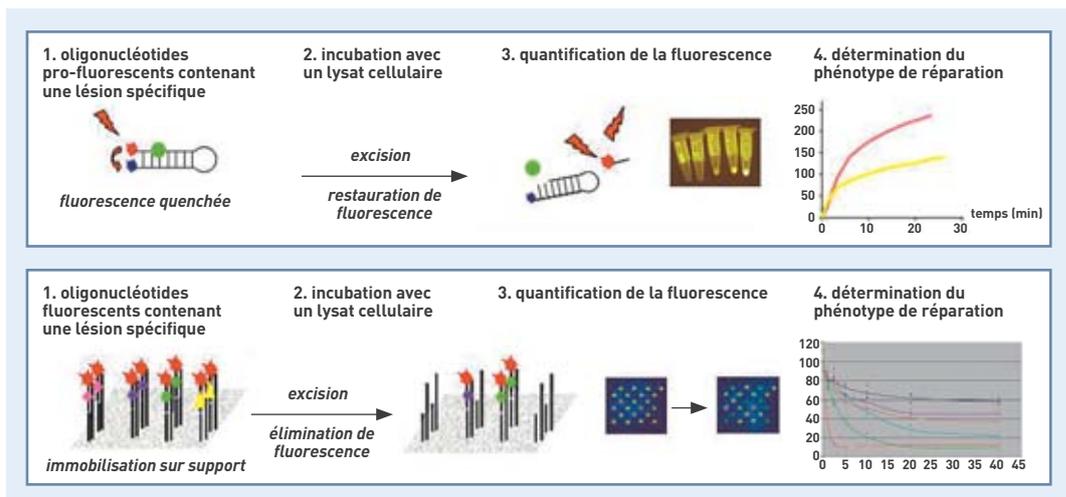


Figure 4. Représentation schématique du test de détection d'activité de réparation de l'ADN par excision par les enzymes de la REB à l'aide de sondes oligonucléotidiques pro-fluorescentes en solution (en haut) ou fluorescentes sur support (en bas). La figure du haut montre un oligonucléotide auto-complémentaire, contenant une lésion d'intérêt, qui s'organise en duplex dit en « épingle à cheveu » dans laquelle les deux molécules chromophores, situées respectivement à chaque extrémité de la structure, sont très proches. Lors de l'excitation du fluorochrome donneur, à une longueur d'onde spécifique, l'énergie émise par ce dernier est absorbée par le chromophore « quencheur ». La fluorescence est alors éteinte et aucun signal n'est mesuré (1). Lors de l'incubation en solution avec une enzyme de réparation reconnaissant la lésion, ou un extrait contenant des activités spécifiques de réparation, la lésion est coupée et le fluorochrome donneur est libéré simultanément en solution (2). Son excitation à la longueur d'onde spécifique conduit dans ces conditions à une émission de fluorescence qui est quantifiée et augmente avec le temps de digestion (3). On peut ainsi suivre, en temps réel, des cinétiques de coupure enzymatique (4); courbes rouge et jaune: quantification simultanée de deux activités de réparation caractéristiques d'un échantillon donné.

La figure du bas montre des oligonucléotides contenant des lésions de bases ou de sucre de l'ADN, marqués par un fluorochrome, qui sont immobilisés par hybridation sur une lame de verre préalablement fonctionnalisée, ce qui génère des spots fluorescents (diamètre 250 µm). La fixation simultanée de lésions distinctes, à des positions prédéterminées du support, permet le multiplexage du test et donc la quantification simultanée de plusieurs activités de réparation spécifiques de chaque lésion (1). La biopuce ainsi préparée est incubée en présence d'un extrait cellulaire ou d'enzymes de réparation à caractériser (2). La réparation des lésions fixées sur le support par les enzymes contenues dans le milieu biologique est associée à la coupure des oligonucléotides reconnus et à l'élimination de la fluorescence du support. Par quantification de la fluorescence résiduelle à l'aide d'un scanner, on détermine l'efficacité de coupure des différentes lésions par les enzymes contenues dans le milieu (3); les spots rouges de la biopuce avant la réaction deviennent verts après coupure. On établit ainsi des cinétiques de coupure des lésions par les enzymes du milieu et on détermine un phénotype de réparation, caractéristique des capacités de réparation de l'échantillon biologique initial (pourcentage de coupure de chaque lésion). Chaque lame (75x25mm) comporte 24 biopuces correspondant à 24 réactions menées en parallèle.

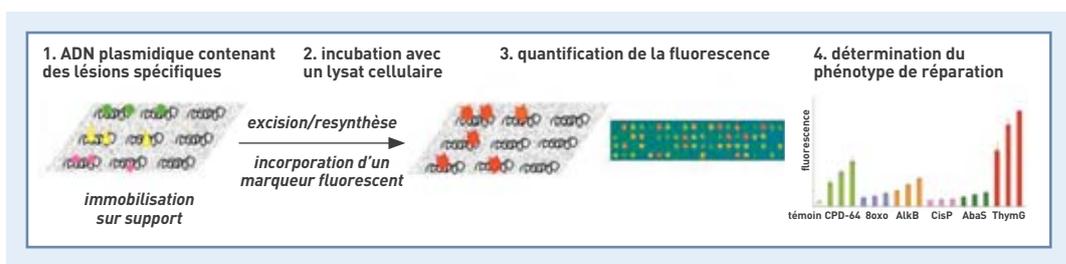


Figure 5. Représentation schématique du test de détection d'une activité de réparation de l'ADN par excision/resynthèse par les complexes protéiques de la REB ou de la REN à l'aide de sondes plasmidiques immobilisées sur support. Des plasmides contenant des lésions spécifiques en différentes quantités créées par des agents physiques ou chimiques (irradiation ultraviolette, oxydation, photosensibilisation, traitement acide...) sont immobilisés à des positions prédéterminées sur un microsupport recouvert d'un hydrogel (1). Ce dernier permet la préservation, à long terme, de l'ADN. La biopuce ainsi préparée est incubée en présence d'un extrait cellulaire à caractériser (2). La réaction d'excision des lésions et de resynthèse d'ADN intègre par les enzymes contenues dans l'extrait biologique conduit à l'incorporation de fluorescence (étoiles rouges), qui est ensuite mesurée à l'aide d'un scanner (3: image de la biopuce en fausses couleurs). L'intensité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de lésions présentes sur les plasmides (3 ratios lésion/ADN) et à l'efficacité des enzymes de réparation présentes dans le milieu biologique, et spécifiques de chaque type de lésion. L'histogramme en (4) montre le phénotype de réparation d'un échantillon avec la mesure de 6 activités de réparation différentes (une par couleur).

simples à mettre en œuvre et induisant des effets psychologiques et un impact médiatique fort. Comme l'a montré l'attaque au **sarin** dans le métro de Tokyo, en 1995, l'utilisation d'armes chimiques par des terroristes peut toucher en nombre les populations civiles. La réponse rapide à des attaques de gaz de combat nécessite la mise en place de capteurs permettant une fonction d'alerte extrêmement rapide et spécifique au type de gaz utilisé afin de procéder immédiatement aux procédures de protection, d'intervention et de prise en charge d'éventuels blessés.

Aujourd'hui, il existe divers dispositifs sensibles aux gaz toxiques parfois insuffisants dans certains types de surveillance ou d'intervention. Dans l'avenir, l'essor des **nanotechnologies**, notamment le couplage de la **fonctionnalisation chimique** et des **nanomatériaux**, devrait ouvrir de nouvelles perspectives pour la réalisation de capteurs miniatures, très sensibles et sélectifs pour la détection de composés toxiques. C'est ainsi que des études récentes, menées sur l'utilisation de **nanofils** de silicium fonctionnalisés par des récepteurs chimiques

moléculaires, ont permis de mettre en évidence une excellente capacité à détecter immédiatement, et de façon très sélective, des composés toxiques **organophosphorés** (OP) – famille de molécules **neurotoxiques** à laquelle appartient le sarin. Le principe de ces nouveaux capteurs repose sur des molécules réceptrices spécifiques à ce type de composés toxiques, préparées en plusieurs étapes de synthèse organique, puis greffées à de très petits fils de silicium d'environ 100 nm de diamètre. En présence du toxique ciblé, les molécules greffées réagissent avec le gaz et créent des charges électriques. Situées à proximité immédiate du nanofil de silicium, celles-ci modifient sensiblement le passage du courant électrique dans le silicium. Par une simple mesure d'intensité électrique du dispositif, au cours du temps, il est alors possible de savoir si les molécules ont réagi, et donc, si la présence de gaz toxique a été détectée (figure 6).

Chimie flexible et polyvalente pour les biopuces

Aujourd'hui, grâce à des systèmes miniaturisés comme les biopuces, les chercheurs peuvent détecter des molécules-cibles présentes dans un échantillon biologique (marqueurs biologiques). Dans ce cas, les molécules-sondes reconnaissant les cibles présentes en solution doivent être fixées sur la surface de la biopuce. Dans les années 2000, l'ADN restait la cible de prédilection et les chercheurs optimisaient leur chimie de manière à pouvoir fixer ce type de molécules. Depuis, le spectre d'utilisation de ces objets a connu une large ouverture allant bien au-delà de l'interaction ADN/ADN. Ainsi peut-on désormais détecter des assemblages moléculaires **anticorps/ligands** (toxines, allergènes...), voire plus complexes comme des anticorps avec des cellules ou des bactéries. La chimie utilisée pour la fixation de ces différentes classes de molécules doit donc répondre à une série de critères :

- être polyvalente;
- s'adapter au mode de détection de l'interaction utilisé : fluorescence, **résonance plasmonique**, mécano-capteur...
- s'adapter aux procédés de **micro**, voire de nanostructuration, nécessaires à la construction de la biopuce.

Ainsi, le groupe Chimie pour la reconnaissance et l'étude d'assemblages biologiques (Creab)⁽³⁾ a décidé de travailler sur la fonctionnalisation de couches fines d'or (quelques dizaines de nm) en raison de leurs propriétés optiques particulières, notamment mises en jeu lors de mesures plasmoniques, mais aussi de la facilité de mise en œuvre dans les procédés de microélectronique. Le groupe a donc développé des procédés de dépôts **électrochimiques** permettant d'immobiliser des molécules sur un grand nombre de supports conducteurs dont l'or. Le principe consiste à fonctionnaliser les molécules-sondes en utilisant un **pyrrole** puis à les **copolymériser** avec du pyrrole libre sur une surface conductrice. Cette réaction se déroulant en milieu aqueux salin et à **pH** neutre, c'est-à-dire en condition physiologique, celle-ci reste compatible avec de nombreuses molécules d'intérêt biologique, et les interactions mesurées aujourd'hui peuvent s'avérer très diverses. Cela ouvre donc des domaines d'application très peu explorés actuellement. De plus, les procédés de dépôts développés permettent de fonctionnaliser des surfaces, non seulement par des spots de **polymère**

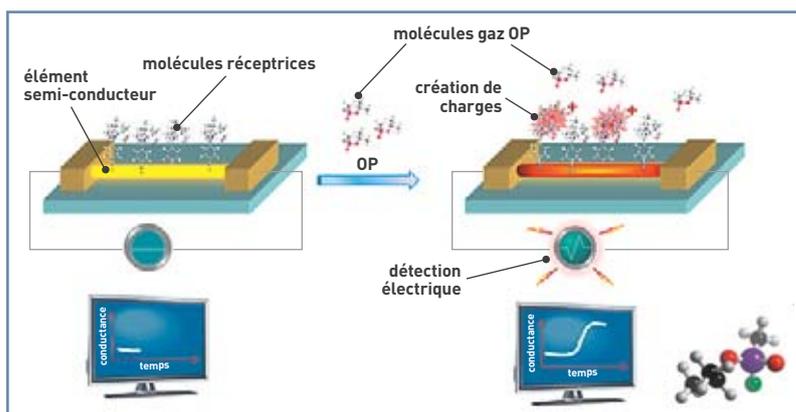


Figure 6. Représentation schématique du système de détection à base de nanofils de silicium comportant des molécules sensibles greffées en surface. La mesure du courant est stable avant la présence de composés toxiques et une augmentation de la conductance électrique s'observe après la réaction des molécules gazeuses sur le nanofil de silicium fonctionnalisé. Sur les écrans est affichée l'évolution, au cours du temps, de la conductance du nanofil fonctionnalisé. À droite, représentation de la molécule de sarin.

fonctionnalisé de quelques nanomètres d'épaisseur dont le diamètre peut être ajusté sur une gamme couvrant la centaine de nanomètres jusqu'au millimètre, mais également des surfaces de pores micro ou nanométriques. Cette grande flexibilité d'utilisation permet de s'adapter facilement à des besoins biologiques aussi variés que la détection de toxines rares dans un échantillon d'eau, l'analyse de cellules sanguines, voire au nanopositionnement d'objets...

Cette grande souplesse d'utilisation présente un double avantage : celui de s'adapter à un nombre important de procédés de détection d'interactions, optiques ou électrochimiques, avec ou sans **traceurs**, et celui de couvrir une large gamme d'applications biologiques. Par exemple, en matière de protection de l'environnement, les chercheurs peuvent désormais détecter de façon très sensible des toxines d'agents biologiques ; dans le domaine de la recherche médicale, ces procédés s'utilisent également pour l'évaluation de la réponse **immunologique** de patients infectés par le virus de l'hépatite C, la recherche d'**oligosaccharides** actifs biologiquement, l'organisation et la caractérisation de cellules humaines sur des surfaces microstructurées, etc.

Il reste donc primordial que la chimie soit développée en étroite collaboration avec les physiciens impliqués dans les procédés de détection, avec les biologistes responsables des applications, mais également, le cas échéant, avec les industriels concernés par la valorisation des résultats.

> Thu-Hoa Tran-Thi

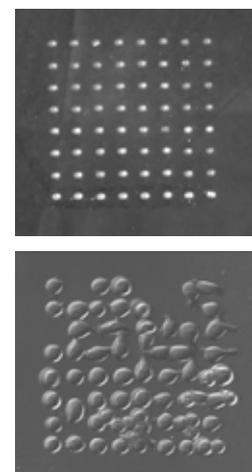
Institut rayonnement matière de Saclay (Iramis)
Direction des sciences de la matière
CEA Centre de Saclay

> Sylvie Sauvaigo, Didier Gasparutto, Thierry Livache et André Roget

Institut nanosciences et cryogénie (Inac)
Direction des sciences de la matière
CEA Centre de Grenoble

> Jean-Pierre Simonato

Institut Liten (Laboratoire d'innovation pour les technologies des énergies nouvelles et les nanomatériaux)
Direction de la recherche technologique
CEA Centre de Grenoble



Matrice au pas de 20 µm de micro-dépôts d'anticorps (haut) spécifique de certaines cellules sanguines (lymphocytes T). Étant donné la taille des spots (5 µm) et la taille des cellules (10 µm), seule une cellule peut s'installer sur le spot. La matrice d'anticorps est incubée avec l'échantillon biologique et les cellules reconnues s'auto-organisent donc suivant le motif dessiné. Les cellules sont ainsi plus facilement étudiables et des études sur les sécrétions de molécules médiant l'activité immunitaire peuvent être réalisées (bas/Roupioz et coll.).

(3) Il s'agit d'un groupe appartenant au Service structure et propriétés d'architectures moléculaires (SPRAM/UMR 5819) fonctionnant au sein de l'Institut nanosciences et cryogénie (Inac).