



HAL
open science

Immobilisation de biomolécules pour l'analyse multiparamétrique sur biopuces : application au génotypage érythrocytaire haut-débit

Gaëlle Le Goff Le Goff

► **To cite this version:**

Gaëlle Le Goff Le Goff. Immobilisation de biomolécules pour l'analyse multiparamétrique sur biopuces : application au génotypage érythrocytaire haut-débit. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10196 . tel-00686770

HAL Id: tel-00686770

<https://theses.hal.science/tel-00686770>

Submitted on 11 Apr 2012

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.

Année 2011

THÈSE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT (arrêté du 7 août 2006)

Spécialité

CHIMIE (ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE DE L'UNIVERSITE DE LYON N°206)

Par

Gaëlle C. LE GOFF

**Immobilisation de biomolécules pour l'analyse multiparamétrique sur
biopuces. Application au génotypage érythrocytaire haut-débit.**

Soutenue publiquement le 14 octobre 2011

JURY

Dr Maryse St-Louis	<i>Rapporteur,</i>
Dr Franck Molina	<i>Rapporteur,</i>
Dr Carole Chaix-Bauvais	<i>Examineur,</i>
Dr Jean-Charles Brès	<i>Examineur,</i>
Prof. Loïc Blum	<i>Examineur,</i>
Dr Christophe Marquette	<i>Directeur de Thèse</i>

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles
Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. G. Pignault

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

L'ensemble des travaux constituant cette Thèse ont été réalisés au sein de l'équipe GEMBAS de l'ICBMS à l'Université Claude Bernard Lyon 1 sous la direction du Dr Christophe A. MARQUETTE.

Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires

(anciennement Laboratoire de Génie Enzymatique et Biomoléculaire)

Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires

UMR 5246 Université Lyon 1 / CNRS

Bât. CPE – Université Claude Bernard Lyon-1

43 Bd du 11 Novembre 1918

69622 Villeurbanne Cedex – France



Ecole Doctorale de Chimie de l'Université de Lyon n°206



Remerciements

Un grand merci ...

... à l'ensemble des membres de l'équipe GEMBAS

Tout d'abord au Pr. Loïc Blum pour avoir accueilli une chimiste dans son laboratoire,

A Christophe bien sûr pour son temps, ses conseils, et tout ce qu'il m'a apporté ces trois dernières années,

A Céline, Benjamin et Cloé avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler plus particulièrement,

Et puis à tous les autres, Gaëlle, Agnès, Bastien, Béa, Agnès... Ce fut toujours très agréable de partager avec vous un déjeuner ou un bureau.

Je souhaite beaucoup de réussite aux étudiants du laboratoire, en particulier à Cloé, Mohsine, Mourad et Sofiene pour la fin de leur thèse.

... à l'équipe de l'Etablissement Français du Sang de Rhône -Alpes

Je remercie bien sûr en premier lieu Jean-Charles pour son accueil et ses conseils, merci également à Jeanine pour le temps qu'elle m'a consacré, et surtout un grand merci à Sandra pour son aide toujours précieuse. Ce fut toujours un plaisir de venir travailler chez vous.

... à Gabriel pour les heures qu'il nous a consacrées au MEB

... à mes amis

Je remercie pour leur soutien et tous les bons moments passés ensemble mes amis d'agreg Jean-Nicolas, Clément, Mathilde et Antoine ; mes amis de l'ENS, en particulier Audrey, Amélie et Claire ; mes amis de prépa ou du lycée (que vous soyez partis en médecine, archi ou commerce, c'est agréable de savoir qu'on peut toujours se retrouver).

Toutes mes félicitations à notre promotion de nouveaux docteurs (depuis quelques semaines ou dans quelques mois), qui vont s'envoler vers d'autres horizons plus ou moins lointains.

Merci aussi à tous ces jeunes mariés qui nous ont divertis pendant la rédaction !

Enfin, une petite pensée particulière pour Claire en souvenir de nos nombreuses discussions fort enrichissantes.

... à ma famille

En particulier à mes parents, sans lesquels je ne serais pas arrivée jusqu'ici, et à ma sœur Anne, notamment pour ses relectures pleines de bon conseil (j'espère pouvoir te rendre la pareille l'an prochain).

... à Nicolas

Pour son soutien et sa patience à toute épreuve.

Abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AIBN	azobisisobutyronitrile
AP	<i>alkaline phosphatase</i> (phosphatase alcaline)
BCIP	5-bromo-4-chloroindolylphosphate
CCD	<i>charged coupled device</i>
COC	<i>cyclic olefin copolymer</i>
COP	<i>cyclic olefin polymer</i>
CRP	protéine C-réactive
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
DMF	diméthylformamide
dNTP	désoxyribonucléotide
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfert</i>
GOx	glucose oxydase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (peroxydase de raifort)
IgE	immunoglobuline de type E
IgG	immunoglobuline de type G
IR	infrarouge
ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
MABP	<i>methacryloyloxybenzophénone</i>
MPTS	mercaptopropyl-triméthoxysilane
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i>
NHS	N-hydrosuccinimide
NTA	acide nitriloacétique
PAA	<i>poly-(acrylic acid)</i>
PAAm	poly-(acrylamide)
PC	polycarbonate
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PCR MPX	<i>multiplex polymerase chain reaction</i>
PDMMA	poly-(diméthylacrylamide)
PDMS	poly-(diméthylsiloxane)
PEG	poly-(éthylèneglycol)
PHEMA	poly-(hydroxyéthylméthacrylate)
PMMA	poly-(diméthylméthacrylate)
PMT	<i>photomultiplier tube</i>
POC	<i>point of care</i>

PS	polystyrène
VPA	<i>vinyl phosphonic acid</i>
RMN	résonance magnétique nucléaire
SAV	streptavidine
SMCC	succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
SNP	<i>single nuclotide polymorphism</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
μTAS	<i>micrototal analysis system</i>
TMB	2,2',5,5'-tétraméthylbenzidine

Sommaire

Abréviations	9
Sommaire.....	11
Introduction.....	17
Chapitre 1. Biopuces à détection optique.....	19
1. Introduction.....	20
1.1. Les biopuces, des biocapteurs multiparamétriques	20
1.2. Puces à ADN et puces à oligonucléotides.....	22
1.3. Puces à protéines	22
2. Supports et activations possibles	25
2.1. Supports à deux dimensions	25
2.1.1. Supports plans classiques	25
2.1.2. Supports plans à base de polymères	26
2.2. Supports à trois dimensions	28
2.2.1. Membranes	28
2.2.2. Les hydrogels	30
3. Stratégies de fabrication.....	32
3.1. Cas des puces à oligonucléotides : synthèse <i>in situ</i> des sondes	32
3.2. Dépôt de solution	33
3.3. Techniques non conventionnelles.....	34
3.3.1. Impression microcontact	34
3.3.2. Immobilisation de billes fonctionnalisées	35
4. Immobilisation de biomolécules	36
4.1. Immobilisation par interactions faibles.....	36
4.2. Immobilisation covalente	37
4.2.1. Couplage covalent classique.....	37
4.2.2. Photochimie.....	39
4.3. Interaction par bio-affinité	40
4.3.1. Interaction biotine/streptavidine	40
4.3.2. Immobilisation par hybridation d'oligonucléotides complémentaires	41
4.3.3. Etiquettes poly-Histidine	42
5. Méthodes de détection de l'interaction biologique	43
5.1. Luminescence	43
5.1.1. Fluorescence.....	44
5.1.2. Chimiluminescence	45

5.2.	Colorimétrie	46
5.2.1.	Nanoparticules	47
5.2.2.	Méthodes enzymatiques	48
Chapitre 2.	Le génotypage érythrocytaire.....	49
1.	Le groupage sanguin : enjeux et problématique.....	50
1.1.	Compatibilité transfusionnelle.....	50
1.1.1.	Historique et exemple du système ABO.....	50
1.1.2.	Groupes sanguins mineurs et phénomène d'alloimmunisation	51
1.1.3.	Recherche d'anticorps irréguliers	52
1.2.	Caractérisation des groupes sanguins.....	53
1.2.1.	328 antigènes érythrocytaires identifiés	53
1.2.2.	Essor des connaissances moléculaires sur les systèmes sanguins	53
1.2.3.	Exemples de groupes sanguins mineurs	55
2.	Méthodes de groupage	60
2.1.	Sérologie : détermination du phénotype.....	60
2.2.	Emergence des techniques de génotypage	60
2.3.	Applications du génotypage érythrocytaire étendu	61
2.4.	Le génotypage érythrocytaire en routine : une réalité ?	63
3.	Solutions de génotypage érythrocytaire	64
3.1.	Etat de l'art.....	64
3.2.	Systèmes de type biopuce	66
3.2.1.	BLOODChip®	66
3.2.2.	HEA BeadChip™	67
3.2.3.	Genome Lab SNP Stream.....	69
3.3.	Autres techniques	70
3.3.1.	Matrices de billes en suspension (xMAP®, Luminex®)	70
3.3.2.	SNaPshot reaction	71
Chapitre 3.	Développement d'un outil d'analyse multiparamétrique haut-débit	73
1.	Présentation de l'outil d'analyse haut-débit	74
1.1.	Vue d'ensemble.....	74
1.2.	Etudes préliminaires et conception de l'outil	77
1.2.1.	Choix du support	77
1.2.2.	Détection par colorimétrie	78
2.	Preuves de concept.....	80
2.1.	Puces à oligonucléotides et protéines sur membrane de filtration.....	80

☞ Article 1.....	81
2.2. Compléments sur le génotypage érythrocytaire.....	97
2.2.1. Reproductibilité entre essais.....	97
2.2.2. Concentration de SAV-PA et dilution de l'échantillon	98
2.2.3. Influence de longueur des sondes.....	99
2.3. Perspective : Immobilisation d'anticorps pour la détection de protéines CRP par test sandwich (preuve de concept).....	100
3. Validation de l'outil : étude à moyenne échelle.....	102
3.1. Validation en aveugle de l'outil de génotypage érythrocytaire sur un panel de 293 donneurs	102
☞ Article 2.....	102
3.2. Compléments	115
3.2.1. Intégration de sondes complémentaires pour le système Duffy	115
3.2.2. Immunotest multiplexé pour la détection d'anticorps auto-immuns	116
☞ Article annexe 1	116
4. Elaboration d'une nouvelle stratégie de détection colorimétrique.....	117
☞ Article 3.....	117
Chapitre 4. Supports d'immobilisation innovants pour tests colorimétriques..	129
1. Nouveaux supports pour test colorimétrique haut-débit	130
1.1. Comparaison de différentes architectures de surface	130
☞ Article 4.....	130
1.2. Puce à oligonucléotides sur support adhésive pour la mise au point d'outils de diagnostic multiparamétriques	143
☞ Article annexe 2	143
2. Immobilisation d'oligonucléotides sur PolyShrink™	144
2.1. Travaux préliminaires.....	145
2.1.1. Première stratégie : Activation de la surface par le glutaraldéhyde.....	145
2.1.2. Seconde stratégie : activation des sondes et photogreffage	146
2.2. Immobilisation des oligonucléotides dans des plots d'hydrogel	148
☞ Article 5.....	148
Chapitre 5. Matériel et méthodes.....	159
1. Matériel.....	160
1.1. Instruments	160
1.2. Logiciels	160
1.3. Réactifs	160
1.3.1. Supports.....	160

1.3.2.	Solvants et réactifs chimiques	160
1.3.3.	Oligonucléotides, protéines et enzymes	161
1.3.4.	Tampons et solution	162
2.	Méthodes.....	163
2.1.	Dépôt liquide (faible volume) pour la fabrication de biopuces	163
2.2.	Activation de surface et greffage	165
2.2.1.	Activation de surface par le glutaraldéhyde	165
2.2.2.	Photogreffage d'oligonucléotides sur le PolyShrink™	165
2.2.3.	Matrice de plots d'hydrogel et d'oligonucléotides	166
2.3.	Caractérisation des surfaces	167
2.3.1.	Imagerie de surface.....	167
2.3.2.	Mesure d'angle de contact.....	168
2.4.	Détection de l'interaction	169
2.4.1.	Marquage et génération du signal.....	169
2.4.2.	Instrumentation.....	169
2.4.3.	Analyse d'image.....	170
2.5.	Protocole des tests sur puce	171
2.5.1.	Test sur acides nucléiques (puce à oligonucléotides)	171
2.5.2.	Immunoessais (sur membrane).....	171
2.6.	Automatisation des tests colorimétriques sur plaque de filtration (96 puits).....	173
2.6.1.	Instrumentation.....	173
2.6.2.	Protocole.....	174
2.7.	Tests de génotypage érythrocytaire	176
2.7.1.	Polymorphismes sélectionnés.....	176
2.7.2.	Préparation des échantillons	176
2.7.3.	Test d'hybridation haut-débit	179
	Conclusion et perspectives.....	181
	Liste des publications associées à ces travaux de thèse	185
	☞ Publications	185
	☞ Brevets	185
	Références	187
	Annexes	197
	☞ Article annexe 1.....	199
	☞ Article annexe 2.....	207

Introduction

Aux critères de sensibilité, de rapidité, de facilité de mise en œuvre et de coût, utilisés habituellement pour évaluer les performances d'un test de diagnostic, se rajoute aujourd'hui la capacité de réaliser une analyse multiparamétrique. On attend en effet des nouveaux outils d'analyse développés qu'ils fournissent un nombre accru d'informations en un temps réduit, aussi bien dans le domaine du criblage haut-débit que pour les tests bas-débit réalisés « au lit du patient ». Dans ces deux cas, la technologie des biopuces a permis d'accéder à un niveau d'analyse multiparamétrique.

A un extrême, avec le nombre croissant d'échantillons sujets à des tests médicaux, il s'est créé un besoin urgent de tests haut-débit multiparamétriques. Dans le domaine des tests sanguins par exemple, les banques du sang européennes concentrent à elles-seules 14 millions de nouveaux échantillons par an, sur lesquels il faut mener une recherche de virus et de microorganismes (plus de 40 pathologies infectieuses d'après l'Organisation Mondiale de la Santé). Les tests sur acides nucléiques haut-débit sur biopuce ont ainsi fait leur entrée dans les banques du sang pour la détection automatisée de pathogènes. Une autre application candidate pour l'analyse haut-débit sur biopuce est le génotypage érythrocytaire étendu. Il s'agit d'une stratégie d'identification des groupes sanguins directement au niveau de l'information contenue dans l'ADN d'un donneur. L'amélioration de la sécurité transfusionnelle passe par la mise en place d'un génotypage étendu qui consiste à rechercher plusieurs dizaines de paramètres dans l'ADN du donneur et nécessite donc une analyse multiparamétrique.

C'est dans ce contexte qu'a débuté le projet à l'origine de cette thèse, sur l'initiative de l'Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes (EFS-RA) qui souhaitait développer son propre outil de génotypage érythrocytaire étendu et a approché en 2007 le laboratoire GEMBAS pour son expertise concernant la technologie des biopuces. Cet outil étant destiné à la qualification à haut-débit des donneurs, il doit être innovant, simple à mettre en œuvre, à bas-coût et transférable vers une plateforme d'analyse haut-débit compatible avec les chaînes robotiques standard, notamment celles utilisées dans les centres de qualification biologique du don de sang.

En pratique, une préparation de l'échantillon de sang est nécessaire afin d'obtenir l'ADN sur lequel sera réalisé le test de génotypage (Figure 0) : l'ADN génomique est dans un premier temps extrait de l'échantillon de sang total, puis les cibles recherchées sont amplifiées par PCR (*polymerase chain reaction*). Les différents outils biologiques nécessaires à l'analyse (conditions de PCR, sondes pour le test d'hybridation) ont été précédemment optimisés au laboratoire de recherche de l'EFS-RA sur un premier prototype de biopuce. La technique utilisée alors nécessitait un appareillage de détection très coûteux et présentait un format difficilement automatisable, ce qui la rendait peu compatible avec une analyse haut-débit.

La première partie de la thèse a donc été consacrée à la mise au point de cet outil d'analyse haut-débit basé sur une puce à oligonucléotides. Un format original de plaque filtrante a été élaboré et une méthode colorimétrique a été utilisée pour la détection de l'hybridation. Un simple scanner de bureau suffit pour l'acquisition du signal. Cette technologie a par la suite été transférée à l'immobilisation de protéines et appliquée notamment au diagnostic allergique multiparamétrique.



Figure 0 Principe de la recherche des groupes sanguins érythrocytaires par génotypage sur biopuce à partir d'un échantillon de sang total

A l'opposé de la problématique de ces tests de masse, l'avènement des techniques de miniaturisation et de microfluidique, ainsi que du concept de « laboratoire sur puce », a ouvert un nouveau champ d'application aux biopuces. Ces approches visent une miniaturisation maximale des systèmes d'analyse dans le but principal de développer des tests portatifs et/ou réalisables « au lit du patient ». Les applications de tels outils sont très diverses et impactent aussi bien le secteur de la santé que l'environnement ou la défense. Parmi les plus connus, on peut citer les tests de grossesse sur bandelette. Une fois de plus, la combinaison de ces techniques avec la technologie des biopuces ouvre la voie au développement de tests miniaturisés multiparamétriques. Une problématique majeure est l'élaboration de nouveaux matériaux pour la mise au point de ces systèmes miniaturisés : il s'agit de mettre au point des supports permettant une immobilisation efficace des biomolécules sondes, mais aussi d'élaborer des matériaux facilement intégrables dans le système final.

Une deuxième partie de la thèse s'est ainsi intéressée au développement de nouveaux matériaux pour les tests colorimétriques développés précédemment, tout d'abord dans un format haut-débit identique au précédent, mais aussi pour un format miniaturisé, en se concentrant plus particulièrement sur un polymère aux propriétés originales : le PolyShrink™.

Les Chapitres 1 et 2 seront consacrés à une vue d'ensemble du contexte de la thèse. Le Chapitre 1 présentera les technologies existantes dans le domaine des biopuces à détection optique. Le Chapitre 2 sera dédié au génotypage érythrocytaire qui a constitué le cadre d'application principal de ce travail. Les Chapitres 3 et 4 seront ensuite consacrés à la présentation des résultats. Celle-ci s'articulera autour des différents articles publiés au cours de cette thèse ou bien de manuscrits soumis ou en préparation. Chaque article sera replacé dans le contexte global de la thèse et éventuellement complété par la présentation de travaux complémentaires. Enfin, le Chapitre 5 présentera une description de l'ensemble des méthodes et matériels utilisés.

Chapitre 1. Biopuces à détection optique

Ce premier chapitre se consacre aux aspects technologiques et à la description des biopuces dont nous décrirons tout d'abord le principe et les différentes catégories. Nous nous intéresserons ensuite aux stratégies d'élaboration d'une biopuce plus particulièrement aux points critiques du choix du support, de la chimie d'immobilisation et la technique de matricage des sondes sur la surface. Enfin, une dernière sous-partie sera consacrée aux méthodes de détection de l'interaction sur les biopuces, en se restreignant aux méthodes optiques. Le domaine des biopuces étant extrêmement vaste ce chapitre ne prétend pas dresser un état de l'art exhaustif, mais cherchera à introduire les concepts principaux et à illustrer en particulier les méthodes et matériaux utilisés dans cette thèse.

1. Introduction

1.1. Les biopuces, des biocapteurs multiparamétriques

Des biocapteurs...

Le principe de fonctionnement d'un biocapteur, illustré à la Figure 1-1, repose sur l'association d'un bio-récepteur, permettant la reconnaissance moléculaire spécifique d'un analyte, avec un transducteur, qui convertit le signal physicochimique produit lors du phénomène de reconnaissance en un signal physique interprétable et quantifiable.

Le terme de « biocapteur » est apparu dans les années 1950 avec la mise au point par Leland Clark d'un dispositif permettant de mesurer le glucose dans le sang (Clark et Lyons **1962**). Pour cela, il immobilisa la glucose oxydase sur une membrane, à proximité d'une électrode de platine, et l'utilisa comme bioélément de reconnaissance pour la détection spécifique du glucose dans un échantillon, en association avec une transduction électrochimique.

Depuis ces travaux pionniers, de nombreux biocapteurs ont été mis au point, à partir de systèmes enzyme/substrat, mais aussi basés sur d'autres interactions biologiques : entre anticorps et antigène notamment ou bien entre séquences d'acides nucléiques complémentaires. Un large panel de modes de transduction associés à des phénomènes physicochimiques variés est aujourd'hui disponible : transducteur électrochimique, optique, thermal, piézoélectrique, gravimétrique...

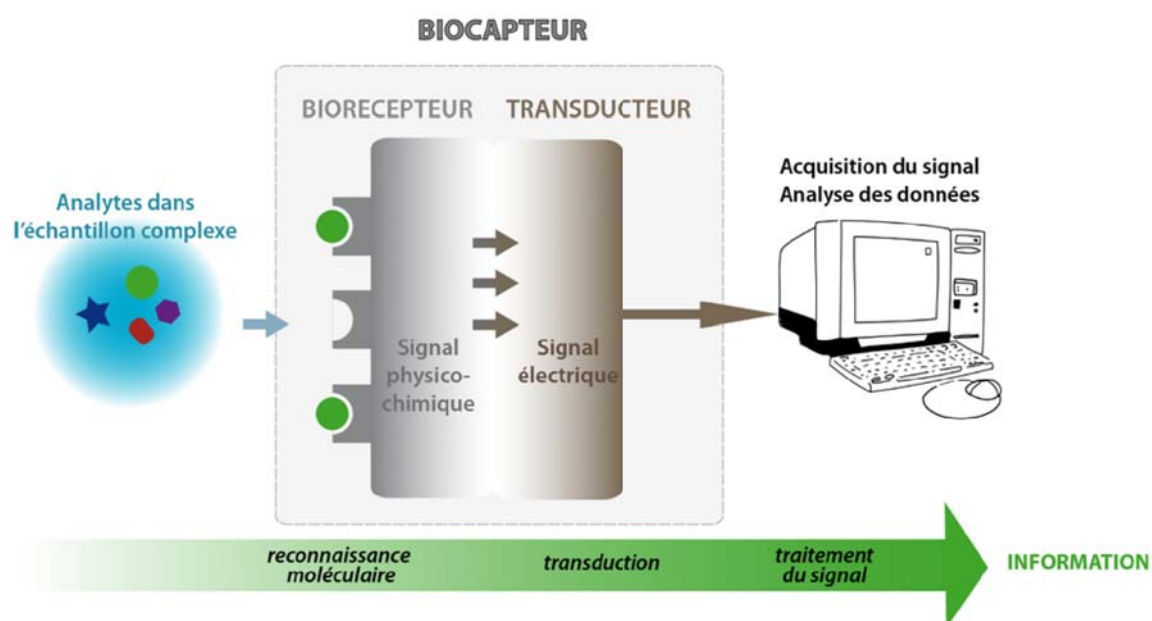


Figure 1-1 Principe de fonctionnement d'un biocapteur Un biocapteur associe un biorécepteur et un transducteur. Le biorécepteur immobilisé (enzyme, protéine, anticorps, oligonucléotide...) forme une couche sensible qui permet la reconnaissance moléculaire sélective du composé recherché (substrat, protéine, anticorps, oligonucléotide...) dans l'échantillon. Le transducteur (électrochimique, optique, thermal, piézoélectrique, gravimétrique...) convertit le signal physico-chimique obtenu en un signal électrique enregistrable.

Les performances d'un biocapteur s'évaluent principalement en termes de sélectivité (voire de spécificité) vis-à-vis du composé recherché et de rapidité de la réponse. Il est également intéressant de pouvoir utiliser le capteur en continu, ou bien le réutiliser. Le succès du fonctionnement d'un biocapteur est étroitement lié à la bonne synergie entre les différents éléments le composant : le support, la méthode d'immobilisation et le système de détection/transduction. En particulier, un contact proche entre la couche sensible et le transducteur est nécessaire. En outre, la fragilité de l'élément biologique nécessite de travailler dans des conditions douces et maîtrisées (pH, température, force ionique) afin d'obtenir une activité stable.

... aux biopuces

L'avènement de la technologie des biopuces au début des années 1990 a ouvert le champ des biocapteurs à l'analyse multiparamétrique et a permis une grande avancée dans ce domaine. Résultant de l'application aux biocapteurs des techniques de miniaturisation et de parallélisation, les biopuces se sont imposées comme un outil incontournable pour les tests miniaturisés multiparamétriques.

Une biopuce est constituée d'une surface sur laquelle ont été immobilisés de façon spatialement ordonnée un grand nombre d'éléments de reconnaissance différents, sous la forme de plots. Ceux-ci forment la couche sensible du capteur (Figure 1-2). Ces biomolécules jouent le rôle de sondes vis-à-vis de cibles multiples dans un échantillon donné, qu'elles capturent via une interaction biologique spécifique. Lors de la reconnaissance moléculaire, la présence de la molécule cible se traduit directement ou indirectement par un signal physicochimique. La transduction et l'analyse de ce signal permettent d'identifier les plots où la reconnaissance a eu lieu, et donc les cibles présentes initialement dans l'échantillon. De plus, les biopuces permettent une importante réduction des quantités d'échantillon et de réactifs mis en œuvre, la surface de la couche sensible étant en effet de taille très réduite ($\sim\text{cm}^2$). Suivant l'élément de reconnaissance impliqué, on distingue deux grandes catégories de biopuces : les puces à ADN et les puces à protéines.

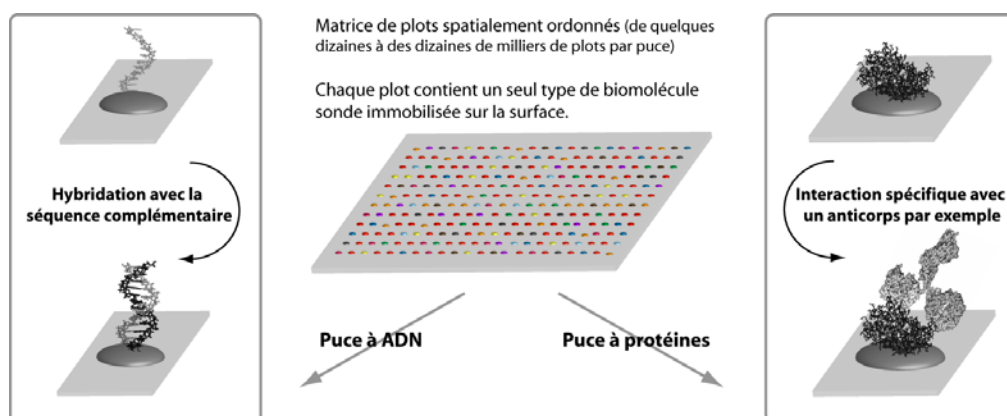


Figure 1-2 Principe de fonctionnement d'une biopuce Une biopuce se présente comme une surface fonctionnalisée par une matrice spatialement ordonnée de plots de biomolécules (un seul type de biomolécule par plot). Celles-ci agissent comme sondes pour la détection d'une cible spécifique dans un échantillon. (gauche) L'immobilisation d'oligonucléotides ou de brins d'ADN permet la détection de brins d'ADN de séquences complémentaires par hybridation. (droite) L'immobilisation de protéines permet notamment la détection d'anticorps (à l'inverse l'anticorps peut être l'élément de reconnaissance immobilisé).

1.2. Puces à ADN et puces à oligonucléotides

Les premières puces développées furent les puces dites « à ADN ». Celles-ci sont rapidement devenues un outil analytique incontournable et le marché des puces à ADN est passé de 48 millions de dollars en 1997 à 670 millions en 2008 (Biophoenix **2009**). Il est estimé à 2,25 milliards en 2014.

Les éléments de reconnaissance immobilisés sont alors des brins d'ADN ou des oligonucléotides (quelques dizaines de bases). Ceux-ci peuvent s'hybrider, par un appariement des bases très spécifique, avec les séquences cibles complémentaires en solution dans l'échantillon (Figure 1-2). La détection des doubles brins formés permet d'identifier les cibles présentes. L'étendue des densités de plots accessibles donne accès à un large champ d'applications (Tableau 1-1).

Tableau 1-1 Applications des puces à ADN suivant la densité de sondes

Degré de complexité	Nombre de plots d'hybridation	Application visée
Basse complexité	10-1000	Diagnostic
Moyenne complexité	1000 – 10 000	Etude de mutation, génotypage
Haute complexité	10 000 – 100 000	Séquençage des gènes, étude de l'expression des gènes
Très haute complexité	> 100 000	

En offrant la possibilité de réaliser des milliers d'analyses génétiques en parallèle, les puces à ADN ont ouvert de nouvelles voies dans le domaine de la découverte ou l'identification des gènes par séquençage, révolutionnant notamment le séquençage des génomes, qui semblait jusqu'alors une tâche ambitieuse et démesurée. L'une des applications majeures des puces à ADN a été l'analyse de l'expression des gènes, à savoir l'identification de l'expression différentielle des gènes mais aussi la quantification de leur expression. Schena *et al.* proposent ainsi en 1995 une puce sur lame de verre pour le suivi quantitatif de l'expression des gènes, grâce à une étape de transcription inverse suivie d'une étape d'hybridation sur une matrice d'ADN complémentaire (Schena *et al.* **1995**). Depuis, l'essor des techniques de fabrication a permis d'élaborer des puces de très haute densité extrêmement performantes pour ce type d'application. De nombreux outils ont aujourd'hui atteint le stade industriel. Les puces Affymetrix®, leader dans le domaine, sont basées sur une synthèse chimique *in situ* des fragments d'ADN permettant d'immobiliser quelques dizaines de milliers de sondes par cm². En parallèle des puces à très haute densité servant au criblage que nous venons de décrire, les puces de moyenne et basse densité ont également trouvé leurs applications. C'est notamment dans le domaine du diagnostic qu'elles contribuent à l'identification de virus et de pathogènes, de mutations ainsi que de polymorphismes (Campàs **2004**).

1.3. Puces à protéines

Le succès rencontré par la technologie des tests sur puces à acides nucléiques a suscité une volonté de transposer ces résultats au développement de tests immunologiques multiparamétriques miniaturisés, en immobilisant cette fois protéines, peptides ou anticorps (Figure 1-2). En utilisant les équipements de matriçage et les scanners de lame développés pour

les puces ADN, MacBeath et Schreiber élaborent en 2000 une puce à protéines sur lame de verre et présentent les preuves de concept de leur applicabilité pour l'étude haut-débit des interactions protéine/protéine, enzyme/substrat et protéine/petite molécule (MacBeath et Schreiber **2000**). Après avoir révolutionné la génomique, les biopuces offrent de nouvelles perspectives à la protéomique quantitative et fonctionnelle (étude ou découverte de nouvelles fonctions) (Phizicky *et al.* **2003** ; Pandey et Mann **2000**).

Cependant, l'immobilisation des protéines s'avère bien plus délicate et moins reproductible que celle des acides nucléiques, et freine le développement de ces outils. Les protéines, bien plus complexes d'un point de vue structurel et fonctionnel, sont en effet plus fragiles et risquent dénaturation, oxydation ou autre dégradation, susceptibles d'altérer leur spécificité. De plus, les interactions de reconnaissance concernées reposent sur des phénomènes d'affinités plus complexes et moins robustes que l'hybridation et imposent des contraintes notamment quant à l'orientation des protéines sur la surface et la distance entre protéine et surface.

Malgré ces obstacles, de nombreux exemples de biopuces à protéines ont été rapportés dans la littérature. En plus des puces haute densité pour les applications de criblage (biomarqueurs, médicaments) (Weinrich *et al.* **2009**), des immunotests miniaturisés ont été développés pour des applications multiparamétriques de diagnostic ou de dosage. Ces tests reposent sur l'interaction spécifique entre anticorps et antigène. Différentes architectures, adaptées des tests ELISA macroscopiques, peuvent être utilisées (MacBeath **2002**). Les plus courantes sont illustrées sur la Figure 1-3, dans le cas où la détection repose sur une méthode de marquage.

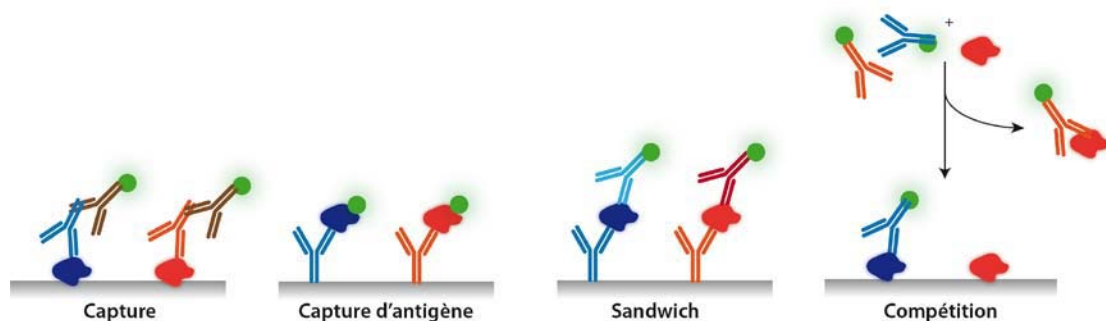


Figure 1-3 Exemples d'architectures utilisées pour les immunotests multiparamétriques

- i. Il est tout d'abord possible de marquer directement la biomolécule cible (anticorps ou protéine) avant l'interaction avec la matrice de cibles. Le succès du test dépend toutefois de l'efficacité du marquage des différentes cibles. Pour la détection d'anticorps sur une matrice de protéines, il est également possible de procéder à un test de type « capture » : les anticorps cibles interagissent avec les protéines sondes associées et sont détectés par un anticorps secondaire commun. L'intérêt de la technique est de pouvoir détecter un grand nombre d'anticorps cibles au moyen d'un unique anticorps de marquage. Elle est cependant sujette au problème de spécificité des anticorps.
- ii. Dans le cas des architectures de type sandwich, on utilise un couple d'anticorps spécifiques pour la détection de protéines cibles : le premier joue le rôle de l'élément de reconnaissance immobilisé et le second permet la détection de l'interaction. Ce système apporte une forte spécificité surtout lorsque l'on utilise un

couple d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes différents. Toutefois, quand le nombre de paramètres augmente, les problèmes d'interactions croisées et un manque de spécificité sont récurrents.

- iii. Mentionnons pour finir les stratégies de compétition qui permettent d'obtenir d'excellentes sensibilités. L'anticorps cible marqué est mis en solution avec des antigènes libres en compétition avec les antigènes sondes immobilisés.

Enfin, en parallèle de ces biopuces s'appuyant sur des biorécepteurs non-catalytiques, on distingue les biopuces enzymatiques. Le biorécepteur immobilisé est une enzyme qui catalyse une réaction clé pour la détection de l'analyte, comme dans le cas de l'électrode à glucose de Clark. Les exemples de biopuces enzymatiques pour l'analyse multiparamétrique sont cependant moins nombreux.

La performance d'une biopuce repose sur de nombreux critères qui seront discutés par la suite :

- i. le choix du support : ses propriétés chimiques et physiques de surface influent à la fois sur l'immobilisation spécifique et non spécifique des biomolécules, et sont souvent cruciales pour une détection efficace ;
- ii. la stratégie de fabrication : comment former la matrice sensible sur la surface ?
- iii. la chimie d'immobilisation et la nécessité éventuelle d'orienter les biomolécules sur la surface (en particulier pour les puces à protéines) ;
- iv. enfin, le choix de la méthode de détection.

Cette étude ne vise pas à être exhaustive mais tentera d'illustrer les techniques les plus utilisées et celles discutées dans la thèse, en se concentrant principalement sur les capteurs optiques (les techniques électrochimiques, notamment, ne seront pas discutées).

2. Supports et activations possibles

Le choix d'une surface solide comme support pour l'immobilisation d'une matrice d'oligonucléotides ou de protéines dépend en premier lieu de l'application visée. Ainsi, pour des capteurs optiques, le verre et le silicium sont des substrats de choix grâce à leurs intéressantes propriétés optiques. Dans le cas d'une détection par voie électrochimique ou bien par résonance de plasmon de surface, on préférera en revanche des surfaces d'or. D'une manière générale, les critères pris en compte seront l'homogénéité chimique et la stabilité du support, les propriétés de surfaces (polarité, mouillabilité...), mais aussi l'étendue de réactions de modification de surface connues, leur facilité de mise en œuvre et leur reproductibilité.

2.1. Supports à deux dimensions

2.1.1. Supports plans classiques

Verre

Le verre s'est rapidement imposé comme une surface de référence pour l'immobilisation de biomolécules, en particulier les séquences d'ADN. Il est en général utilisé sous le format standard d'une lame de microscope. Son attrait tient d'abord à son importante résistance physique et chimique : inerte, durable, il peut supporter de hautes températures et ses propriétés de surface restent stables en milieu aqueux (Situma *et al.* **2006**). De plus, sa transparence et sa faible fluorescence intrinsèque le rendent particulièrement intéressant pour le développement de capteurs optiques. Enfin, les stratégies de modification de surface sont bien connues et maîtrisées pour ce matériau.

La voie la plus couramment employée consiste à activer le verre dans une première étape par un traitement oxydant, tel qu'un plasma d'oxygène ou la solution « piranha » ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$), afin de générer en surface des groupements silanol réactifs (Jonkheijm *et al.* **2008**). Dans un second temps, des trialkoxysilanes ou bien trichlorosilanes fonctionnalisés permettent l'introduction d'un nouveau groupement fonctionnel en surface. Une large gamme d'organosilanes est disponible commercialement pour l'introduction de fonctions variées : amine, thiol, acide carboxylique, époxyde... La Figure 1-4 en présente quelques uns ainsi qu'un exemple de protocole pour la fonctionnalisation d'une surface de verre par des groupements thiols (Halliwell et Cass **2001**).

Quartz

Autre silicate, le quartz est également un substrat très utilisé, en particulier pour les capteurs optiques. C'est notamment le support utilisé par Affymetrix® (www.affymetrix.com), leader dans le domaine des puces à oligonucléotides haute densité à détection optique.

Silicium

Le silicium s'est distingué dans l'industrie des semi-conducteurs par ses propriétés électriques mais aussi par son excellente résistance aux solvants et sa bonne stabilité mécanique. Sa faible fluorescence intrinsèque est encore une fois un atout pour la fabrication de biopuces à détection optique. Cependant, le silicium s'oxydant spontanément à l'air, une étape d'activation de surface

est incontournable (Jonkheijm *et al.* 2008). Une première voie d'activation consiste à générer des fonctions Si-H en surface par un traitement par l'acide fluorhydrique, puis à les coupler avec des alcènes fonctionnalisés. Un plasma d'oxygène créera quant à lui des Si-OH, ouvrant la voie aux méthodes d'activation par les organosilanes décrites pour le verre.

Surfaces métalliques : l'or

Parmi les surfaces métalliques, l'or est le matériau le plus utilisé, généralement sous la forme d'une mince couche recouvrant un support en verre, principalement pour les capteurs à détection électrochimique ou par résonance de plasmon de surface. L'activation la plus courante est la formation en surface de monocouches auto-assemblées de thiols pour l'intégration de nouveaux groupes fonctionnels, la chimie or-thiol étant bien maîtrisée et facile à mettre en œuvre (Luderer et Walschus 2005).

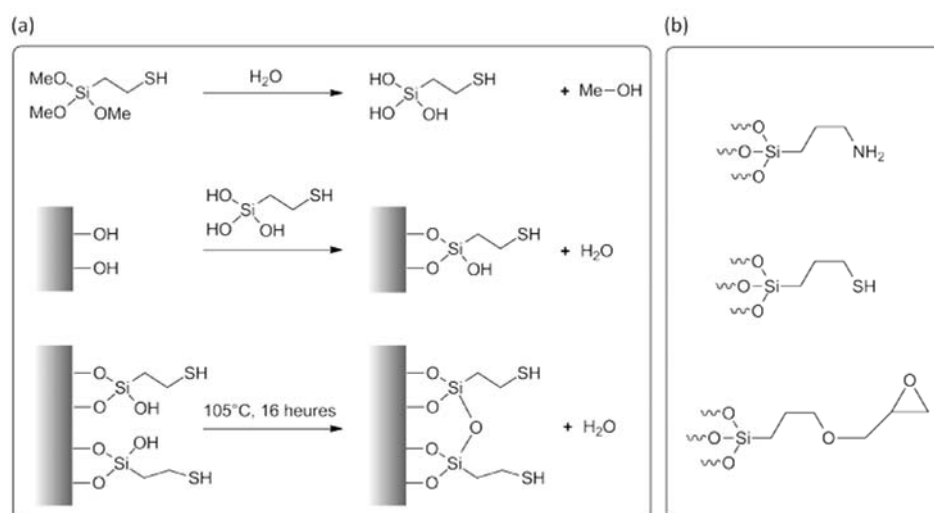


Figure 1-4 Activation du verre à partir d'organosilanes (a) Silanisation d'une surface de verre par le (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane : les organosilanes physisorbés sur la surface de verre hydratée (groupements silanols) sont hydrolysés à la surface ; ils se lient ensuite de façon covalente à la surface, puis une étape de cuisson induit le pontage entre silanols libres. (b) Exemples d'organosilanes pour la fonctionnalisation du verre.

2.1.2. Supports plans à base de polymères

Après le large développement des supports de verre et de silicium, les recherches se sont orientées vers les supports plastiques et les polymères. C'est en fait le développement de la microfluidique et des systèmes miniaturisés d'analyse totale (μ TAS) qui ont généré l'engouement pour ces nouveaux matériaux, notamment dans le domaine biomédical (Rivet *et al.* 2011). Les polymères sont en effet intéressants pour la fabrication de microsystèmes par leur coût et leur disponibilité, notamment en ce qui concerne les matériaux thermoplastiques. Mais c'est surtout le panel de techniques de fabrication déjà maîtrisées pour ces matériaux qui fait leur attrait. Les techniques d'usinage et les procédés de production de masse issus de l'industrie des polymères (moulage par injection) ou bien de l'industrie des semi-conducteurs (lithographie, *etching*) ont ainsi été adaptés aux systèmes miniaturisés (Becker et Gärtner 2007).

Parmi les polymères les plus fréquemment utilisés se trouvent en premier lieu les plastiques (polymères avec additifs) à base de poly-(méthyl méthacrylate) (PMMA) (Tsougeni *et al.* **2010**) et polycarbonate (PC) (Bañuls *et al.* **2008**). Ceux-ci ont comme principal inconvénient une mauvaise résistance aux solvants (Becker et Locascio **2002**). Les polymères et copolymères d'oléfines cycliques (COP et COC) (Pu *et al.* **2007**) présentent des propriétés optiques excellentes et une bonne résistance à l'humidité (Rivet *et al.* **2011**). Enfin, les supports de polystyrène (PS), largement employés pour l'immobilisation de biomolécules pour les tests ELISA, très résistants aux solvants, ont également été utilisés pour le matricage de protéines ou d'oligonucléotides (Nahar *et al.* **2001** ; Perrin **2003**).

Grâce à leur bas coût et leur facilité de mise en œuvre, les matériaux élastomères ont également suscité un fort intérêt. Le poly-(diméthylsiloxane) (PDMS) en particulier est devenu un standard pour la fabrication de dispositifs microfluidiques (Sia et Whitesides **2003**), et plusieurs techniques ont été développées pour le matricage de biomolécules sur ce support (Marquette et Blum **2004** ; Heyries *et al.* **2007**).

Cependant, comme la plupart de ces matériaux sont relativement inertes, une activation de surface préalable est généralement requise. Elle fait souvent appel à des techniques onéreuses comme l'utilisation d'un plasma d'oxygène (Diaz-Quijada *et al.* **2007**) ou bien à des couplages photochimiques. Comme exemple d'activation de surface par photochimie, on peut citer l'activation du polystyrène à l'aide du 1-fluoro-2-nitro-4-azidobenzène par Nahar *et al.* (Nahar *et al.* **2001**). Pu *et al.* ont quant à eux proposé l'incorporation de monomères fonctionnalisés au cours de la photopolymérisation de COC pour l'immobilisation ultérieure de biomolécules (Pu *et al.* **2007**). Enfin, le couplage photochimique peut également permettre directement le couplage entre la biomolécule et la surface, ces méthodes seront discutées ultérieurement (Cf. paragraphe 4.2.2).

Enfin, des propriétés structurelles et mécaniques originales du polymère peuvent offrir des voies de fabrication innovantes. Plusieurs groupes se sont ainsi penchés récemment sur l'étude de plastiques fabriqués sous contrainte qui se rétractent à la cuisson. De tels matériaux permettent un prototypage extrêmement rapide de systèmes miniaturisés (Focke *et al.* **2010**). Le PolyShrinkTM par exemple, matériau commercialisé à l'origine pour les loisirs créatifs, est un polymère à base de polystyrène qui se rétracte de 60% à la cuisson sans distorsion des motifs présents sur la surface. Sous l'effet de la chaleur, le relâchement du stress induit un retour de molécules pré-orientées à une position aléatoire dans le matériau. Le groupe de Michelle Khine notamment a mis au point diverses méthodes de fabrication de canaux et composants microfluidiques à base de PolyShrinkTM (Chen *et al.* **2008** ; Taylor *et al.* **2010**). Lorsque le support se contracte dans le plan, des canaux formés sur la surface par des méthodes de gravure (Chen *et al.* **2008**), d'impression laser (Grimes *et al.* **2008**) ou encore de sérigraphie (Sollier *et al.* **2009**) (technique « Print-n-Shrink ») voient leur profondeur augmenter d'un facteur 5. Par ailleurs, il a également été montré que le matricage de protéines à la surface du PolyShrinkTM suivi d'une étape de cuisson (163°C, 30 secondes) permettait la fixation des biomolécules sur le support, sans altérer leur fonctionnalité (Figure 1-5). Cette technique a été notamment mise en œuvre pour la fabrication de matrices d'anticorps et de protéines d'adhésion pour le développement d'immunotests miniaturisés et de puces à cellules (Mandon *et al.* **2010**).

Les possibilités de miniaturisation ne cessent de progresser notamment avec l'utilisation de nouveaux films de polyoléfines, à l'origine utilisés dans l'emballage dans l'industrie alimentaire, qui ont montré des propriétés de réduction accrues avec une contraction homogène de 95% (Nguyen *et al.* 2010).

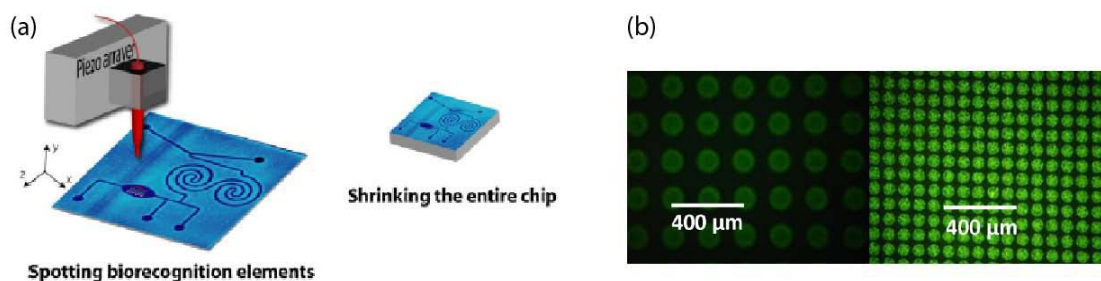


Figure 1-5 Technique "Print-n-Shrink" (extrait de Mandon *et al.* 2010) (a) Principe de fabrication de la puce à protéines : les biomolécules sont matricées sur la surface sérigraphiée, puis la cuisson du support à 163°C entraîne sa contraction. (b) Allure d'une matrice de plots de 300 pL avant (gauche) et après (droite) cuisson (microscopie à fluorescence).

2.2. Supports à trois dimensions

Les supports poreux, grâce à leur surface spécifique très élevée (plus de 200% pour les membranes à base de polymère organique et 500% pour les alumines poreuses en comparaison aux supports 2D (Campo et Bruce 2005)), permettent d'atteindre une densité d'immobilisation des sondes très importante, et donc d'améliorer la sensibilité de la détection des cibles. Celle-ci reste toutefois limitée par les contraintes de diffusion des cibles dans le support.

2.2.1. Membranes

Membranes poreuses à base de polymères organiques

Utilisées à l'origine comme support d'immobilisation de biomolécules pour le *western blot*, les membranes poreuses à base de polymères organiques, telles que la nitrocellulose, ont depuis été adaptées aux tests multiparamétriques et à l'immobilisation de matrices de biomolécules (Huang 2001). Elles sont parfois supportées sur une lame de verre, telles les lames *FAST-slides* recouvertes de nitrocellulose, ce qui permet de combiner de façon avantageuse un format standard et une très forte capacité d'immobilisation, et peut en améliorer la stabilité (Stillman et Tonkinson 2000). Si l'avantage majeur de ces supports est la forte densité d'immobilisation qu'ils procurent, celle-ci va cependant de pair avec une absorption non spécifique souvent élevée.

De très nombreuses membranes de composition et de porosité variées sont aujourd'hui disponibles commercialement (MilliporeTM (www.millipore.com), Pall Corp. (www.pall.com), Whatman® (www.whatman.com)) : membranes à base de PVDF hydrophobe, de cellulose, de polyéthersulfone, etc. Optimisées pour l'immobilisation d'acides nucléiques et de protéines, celles-ci sont parfois activées en surface afin d'en promouvoir la fixation. Les matériaux les plus couramment utilisées restent cependant les membranes de nitrocellulose et de nylon.

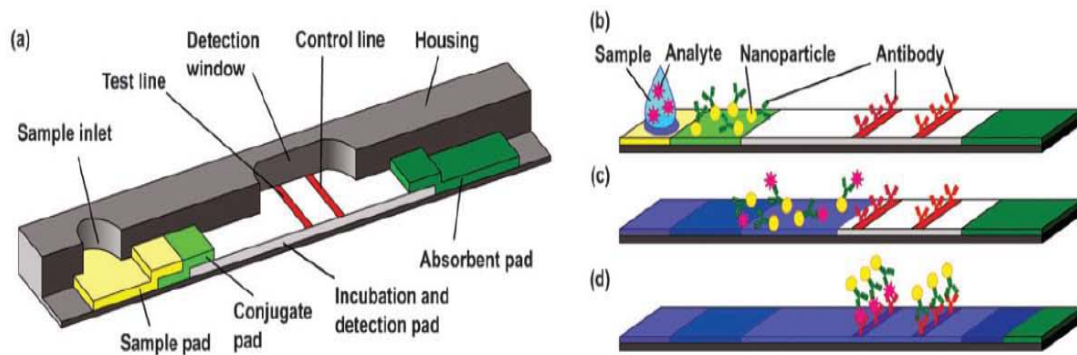


Figure 1-6 Principe d'un test par capillarité : exemple d'un immunotest sandwich (extrait de Mark *et al.* 2010)
 (a) Une succession d'éléments poreux permet de faire progresser le liquide (échantillons et/ou réactifs) par capillarité. Le test se déroule comme suit : (b) l'échantillon liquide est déposé sur le support, sur lequel il est absorbé puis migre par capillarité ; (c) l'antigène cible se lie aux anticorps de détection marqués par des nanoparticules ; (d) les particules liées aux antigènes sont immobilisées sur la ligne de test (résultat positif) et les anticorps non liés sont capturés sur la ligne de contrôle, entraînant l'apparition de deux lignes colorées dans la zone de détection.

Tirant avantage de la porosité du support, de nombreux tests par capillarité ont été développés sur membranes (Posthuma-Trumpie *et al.* 2008). Ils permettent d'élaborer des outils jetables, peu coûteux et simples d'utilisation pour des applications de diagnostic *point-of-care* (POC). C'est le principe des tests bandelette bien connus, tels que les tests de grossesse qui détectent le niveau de gonadotrophine chorionique humaine dans l'urine. Le principe de tels systèmes est exposé sur l'exemple d'un immunotest sandwich à la Figure 1-6 (Mark *et al.* 2010). Les flux d'échantillons et de réactifs migrent par capillarité sur la membrane et entrent en contact avec la zone de détection. Celle-ci peut contenir une ligne (Aveyard *et al.* 2007 ; Dineva *et al.* 2005 ; Mao, Ma, *et al.* 2009) ou bien une matrice de biomolécules sondes immobilisées sur le support (Carter et Cary 2007). Ces tests colorimétriques seront détaillés ultérieurement (Cf. 5.2).

Les systèmes de type *flow-through* ont quant à eux permis d'améliorer la sensibilité des tests sur membrane : l'échantillon est filtré à plusieurs reprises à travers la membrane, dans les deux sens, afin de s'affranchir des limites de diffusion dans les pores et d'augmenter le contact entre sonde et cible (Mocanu *et al.* 2008). Van Lieshout *et al.* ont ainsi mis un point un test sandwich en immobilisant une matrice d'anticorps sur un disque de nitrocellulose. L'assemblage *flow-through* leur permet d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 par rapport à un système sans flux (limite de détection de la protéine C-réactive : 1 pmol.l^{-1} , durée du test : 7 min, volume d'échantillon : $70 \mu\text{l}$) (van Lieshout *et al.* 2009).

Supports poreux inorganiques

Des supports poreux inorganiques ont également été utilisés pour l'immobilisation de biomolécules. L'alumine poreuse nanostructurée s'est avérée particulièrement intéressante (Campo et Bruce 2005) : sa structuration est facile à mettre en œuvre, peu coûteuse, et permet d'obtenir une surface spécifique très élevée tout en ayant une flexibilité sur la taille des pores. De plus, le traitement par oxydation anodique renforce la stabilité mécanique du matériau et surtout de nombreuses chimies d'activation de sa surface sont connues, notamment des méthodes de silanisation. Grasso *et al.* ont ainsi rapporté l'immobilisation d'ADN sur matrice d'alumine poreuse nanostructurée par une méthode photolithographique (Grasso *et al.* 2006). Kang *et al.* l'ont pour leur part utilisée pour l'immobilisation de protéines (Kang *et al.* 2005).

2.2.2. Les hydrogels

Plus récemment, une nouvelle classe de matériau à trois dimensions a fait l'objet de nombreuses études : les hydrogels. Un hydrogel est un réseau polymérique à trois dimensions ayant une forte affinité pour l'eau. La polymérisation, qui peut être photo- ou thermo- induite, entraîne la réticulation des chaînes hydrophiles et crée un réseau insoluble dans lequel l'eau peut pénétrer, provoquant le gonflement du gel. On parle d'hydrogel quand le gel est chargé d'eau et de xérogel pour la structure sèche. Hydrophiles, ils plus appropriés pour les applications biologiques que les supports poreux traditionnels, généralement hydrophobes.

Quelques exemples de polymères utilisés pour la synthèse d'hydrogels sont présentés Figure 1-7. L'étendue des compositions chimiques disponibles pour la formation d'un hydrogel et la possibilité d'inclure des copolymères permet d'adapter à façon et de contrôler leurs propriétés mécaniques, structurales mais aussi de diffusion en fonction de l'application visée. De plus, leur capacité à se charger en eau peut dépendre des facteurs physicochimiques du milieu (Langer et Peppas **2003**), par exemple du pH ou de la force ionique (gels de poly-(acide acrylique), poly-(acide méthacrylique), polyacrylamide, de la température (gels de poly-(N-isopropylacrylamide)), ou de la présence d'un composé spécifique. Ces spécificités ont donné lieu au développement de matériaux « intelligents », dont le comportement peut être contrôlé par différents stimuli (Kumar *et al.* **2007** ; Kopecek **2007**).

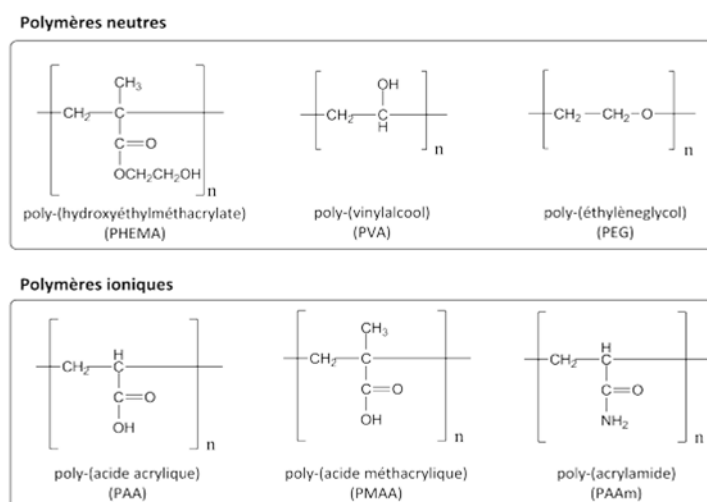


Figure 1-7 Exemples de polymères permettant la formation d'hydrogels

Du fait de leur forte biocompatibilité, les hydrogels ont tout d'abord trouvé de nombreuses applications en thérapie pour l'ingénierie des tissus, les implants biomédicaux et l'administration ciblée des médicaments (Oh *et al.* **2008**). Leur utilisation a aussi été rapportée dans le domaine des microsystèmes de diagnostic (Peppas *et al.* **2006** ; Kuckling **2009**), par exemple pour l'élaboration de valves microfluidiques contrôlées par des variations de pH (Beebe *et al.* **2000**), ou encore l'immobilisation d'ADN dans une matrice photopolymérisée à l'intérieur de canaux microfluidiques pour le développement d'un biocapteur (Olsen *et al.* **2002**).

Grâce à l'environnement hydraté très favorable qu'ils fournissent, les hydrogels apparaissent en effet comme des candidats très prometteurs pour l'immobilisation de biomolécules. Dans le domaine des biopuces, le matriçage de biomolécules sur des couches préformées d'hydrogel a

fait l'objet de nombreuses études (Kuckling et Pareek **2008**). Andersson *et al.* ont ainsi mis au point une surface d'hydrogel à base de poly-(polyéthylène glycol méthacrylate) pour l'immobilisation de protéines (Andersson *et al.* **2009**).

Une seconde approche consiste cette fois, non plus à déposer les sondes sur une couche d'hydrogel formée au préalable, mais à déposer une solution mixte contenant la biomolécule et le monomère polymérisable en solution et à polymériser les gouttes directement sur le support. Les biomolécules se greffent de façon covalente sur les chaînes du polymère lors de la réticulation du gel. Parmi les exemples de matrices de plots mixtes hydrogel-biomolécules rapportés dans les dix dernières années, la plupart concernent des gels à base de polyacrylamide déposés sur des supports en verre (Tang et Xiao **2009** ; Rubina *et al.* **2004** ; Pan *et al.* **2008**). Le groupe de Jorgen Rühle a proposé récemment une approche originale pour l'immobilisation de protéines et d'oligonucléotides dans des plots à base de poly-(diméthylacrylamide) sur support plastique (Neumann *et al.* **2010**). Ces méthodes seront détaillées au paragraphe 4.2.2.

3. Stratégies de fabrication

Le matriçage des biomolécules sur la surface consiste en général à un dépôt liquide des biomolécules en solution, mais il existe d'autres méthodes, notamment un procédé de synthèse *in situ* des sondes dans le cas particulier des puces à oligonucléotides.

3.1. Cas des puces à oligonucléotides : synthèse *in situ* des sondes

Dans le cas particulier des puces à oligonucléotides, il est possible de synthétiser les sondes directement sur le support et de façon spatialement localisée. La compagnie Affymetrix (Santa Clara, USA, www.affymetrix.com) a ainsi mis un point un procédé de synthèse utilisant un ensemble de masques photolithographiques et un jeu de groupements protecteurs photolabiles pour le contrôle de la croissance des oligomères. Le principe en est exposé Figure 1-8. La résolution du procédé photolithographique permet d'obtenir une densité de sondes très élevée : les puces produites en routine par Affymetrix présentent plusieurs millions de sondes sur 1,28 cm² correspondant à des zones d'immobilisation inférieures à 10 µm (Dufva 2005).

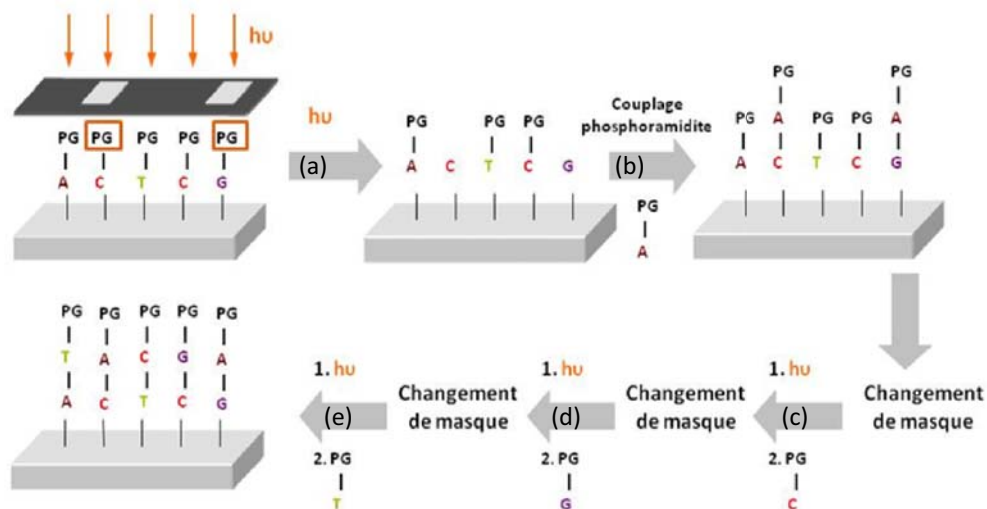


Figure 1-8 Procédé photolithographique pour la manufacture de matrices d'oligonucléotides *in situ*
 Pour allonger la chaîne en croissance d'un seul nucléotide, il faut quatre cycles réactionnels et quatre masques (correspondant aux 4 bases existantes). Le cycle est le suivant : (a) afin de déprotéger sélectivement les chaînes sur lesquels doit se greffer le premier nucléotide, la surface est irradiée de façon sélective grâce à un masque. (b) Les oligomères déprotégés sont couplés avec l'extrémité 3' de la base à ajouter (protégée en 5') par couplage phosphoramidite. (c, d, e) On répète le processus pour les trois autres types de bases.

Cependant, la longueur de la chaîne synthétisée reste limitée (environ 25 nucléotides), le rendement chutant rapidement à chaque étape de synthèse supplémentaire. De plus, la synthèse d'une chaîne de 25 nucléotides nécessite déjà la fabrication de 100 masques et un environnement de type salle blanche, ce qui entraîne des coûts de fabrication très élevés, ne pouvant être amortis que par une production de masse. Des alternatives à l'utilisation de masques ont été développées, par exemple l'utilisation de petits miroirs pour diriger spécifiquement l'irradiation (Roche NimbleGen Systems, Inc.) (Pasquarelli 2008). Enfin, l'inconvénient majeur de cette

technique est le mauvais contrôle de la sélectivité des séquences synthétisées, il est en effet impossible d'éliminer les séquences erronées, conséquence de rendements de couplage imparfaits ou d'un mauvais alignement des masques.

Pour pallier ces défauts de sélectivité et étendre cette technique à l'immobilisation de protéines, les techniques de photolithographie sont souvent mises en œuvre avec des sondes pré-synthétisées : la surface est activée de façon localisée grâce à un jeu de masques, comme décrit précédemment, ce qui permet le greffage des biomolécules sur les zones activées. Kim *et al.* ont ainsi activé un hydrogel de polyéthylène glycol par des fonctionnalités –NHS de façon localisée par photolithographie, pour l'immobilisation de protéines (Kim *et al.* 2009). Cette technique permet d'atteindre une très bonne résolution (~50 nm) mais reste une fois de plus très onéreuse (Hook *et al.* 2009).

3.2. Dépôt de solution

Parmi les techniques de matricage de biomolécules pré-synthétisées, la plus répandue reste sans conteste celle des *spotted arrays* : il s'agit de réaliser des dépôts de la solution de biomolécules (dans un tampon de dépôt) à des positions spécifiques de la surface à l'aide d'un robot à aiguilles (Figure 1-9). Deux technologies d'impression sont disponibles : contact et non-contact.

Impression contact Le dépôt se fait par contact physique direct de l'aiguille avec la surface. L'aiguille, rigide et creuse, est au préalable immergée dans la solution à déposer, de sorte qu'un petit volume entre dans l'aiguille par capillarité. Le robot amène ensuite celle-ci à la position souhaitée, puis, la goutte est transférée sur le substrat lors de la mise en contact. Le diamètre des spots obtenus dépend des propriétés physicochimiques de la surface et de la solution, mais aussi de la géométrie de l'aiguille. Cette technique a l'avantage d'être simple et robuste mais elle souffre de problèmes de reproductibilité, d'homogénéité du dépôt, de contamination, et risque d'endommager la surface.

Impression non-contact La solution est prélevée dans un réservoir puis déposée par éjection de gouttes sur la surface. L'absence de contact direct avec la surface permet de diminuer les risques de contamination. Par ailleurs, les aiguilles indépendantes permettent une plus grande flexibilité pour le matricage qu'avec un appareil d'impression contact. L'éjection de la goutte peut être contrôlée de différentes manières (Campo et Bruce 2005). Ainsi dans un système à jet d'encre, l'« encre » (la solution de biomolécules) est chauffée localement afin de former une bulle de vapeur qui grossit rapidement et provoque l'éjection d'une goutte de solution. Un autre système d'éjection utilise la déformation d'une membrane piézo-électrique pour créer une impulsion acoustique qui déclenche l'éjection de la goutte. Les propriétés de la solution à déposer sont cruciales : la tension de surface doit être assez élevée pour que l'encre ne s'écoule pas du système qui la dispense mais sa viscosité doit être assez faible pour que l'éjection soit facile. Parmi les défauts récurrents de cette technique se trouvent le dépôt de gouttes satellites lors de l'éjection, ou bien la présence de bulles d'air dans le dépôt.

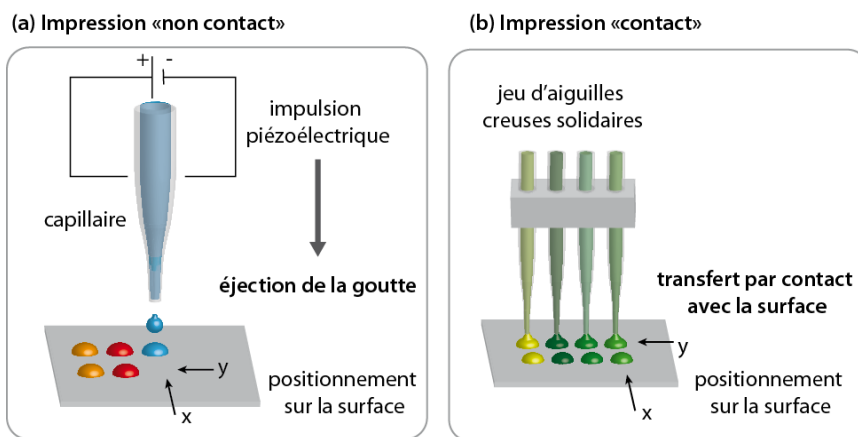


Figure 1-9 Techniques de dépôt de solution : impression (a) non-contact et (b) contact

Le volume des gouttes déposées est de l'ordre de 300 pL, ce qui correspond à des plots de 100 à 500 μm de diamètre en moyenne, avec une densité de plots de l'ordre 1000 plots. cm^2 . Ces techniques permettent un matricage simple et rapide, mais la résolution ($\sim 100 \mu\text{m}$) ainsi que la forme des plots (dépendante de celle de l'aiguille ou de la goutte) restent limitées (Hook *et al.* 2009). Enfin, un défaut majeur de cette technique est l'inhomogénéité potentielle de l'immobilisation des sondes au sein de chaque dépôt, principalement due à des phénomènes d'évaporation de solvant qui ont pour effet de concentrer les solutés sur la couronne externe du dépôt (« effet *doughnut*») (Deegan *et al.* 1997).

3.3. Techniques non conventionnelles

Nous considérerons ici brièvement deux techniques alternatives au dépôt en solution et aux procédés lithographiques évoqués précédemment : l'impression microcontact et l'utilisation de matrices de billes.

3.3.1. Impression microcontact

L'impression microcontact est une technique de lithographie douce, simple et peu coûteuse, qui offre de nombreuses possibilités de transfert de monocouches sur des surfaces (Marquette 2008). Son principe est détaillé Figure 1-10.

Cette technologie a déjà été mise en œuvre pour l'impression sur verre et sur PDMS de protéines

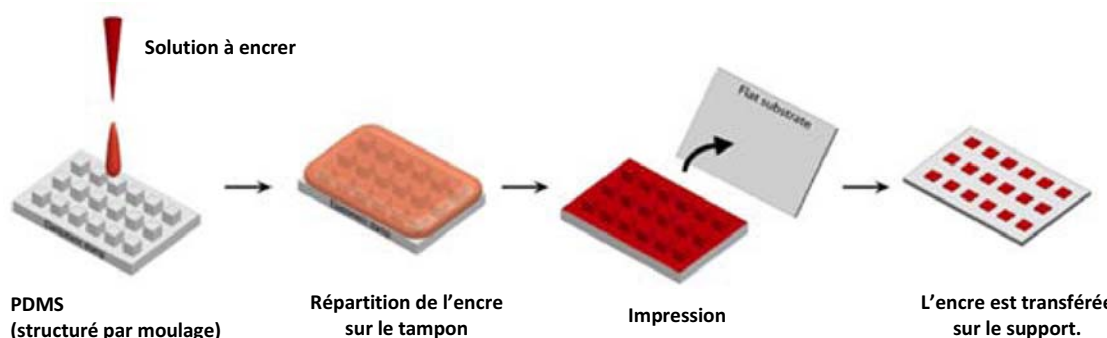


Figure 1-10 Principe de l'impression microcontact (extrait de Marquette *et al.* 2008) Un timbre élastomérique de géométrie structurée - très généralement en poly-(diméthylsiloxane) - est fabriqué grâce à un moule 3D. Le timbre est alors « encré » avec la solution de biomolécules, rincé, séché puis amené au contact de la surface pour y imprimer le matériel et former la matrice sur le substrat.

(Bernard *et al.* **2000**) et d'ADN (Lange *et al.* **2004**) par exemple. Elle permet d'obtenir des dépôts très homogènes avec une très bonne résolution spatiale (~50 nm) (Hook *et al.* **2009**). Il faut toutefois que les propriétés physicochimiques des deux surfaces permettent le transfert de l'une à l'autre.

3.3.2. Immobilisation de billes fonctionnalisées

Les microbilles ont été largement étudiées en chimie analytique, notamment pour l'immobilisation de biomolécules et on dispose aujourd'hui de matériaux aux propriétés variées (magnétisme, luminescence...) et d'un large éventail de chimies de surface et de couplage. Grâce à leur surface spécifique très élevée elles permettent d'accroître la densité de sondes et la sensibilité du test (Situma *et al.* **2006**). En immobilisant sur chacune des microbilles des biomolécules différentes (capture d'un analyte spécifique par bille), il devient possible de réaliser des tests multiparamétriques.

Les microbilles fonctionnalisées peuvent être immobilisées sur un support, soit par confinement sur une surface structurée, soit par autoassemblage aléatoire sur la surface (Marquette et Blum **2005**). La difficulté reste cependant l'identification de chaque bille afin de décoder la puce, étape qui repose souvent sur une technique d'encodage optique. Il est également possible de réaliser l'ensemble du test (capture des cibles et détection) en travaillant avec des microbilles en suspension. C'est sur cette stratégie que repose la technologie x-MAP développée par Luminex® que nous détaillerons ultérieurement (Cf. Chapitre 1, paragraphe 3.3.1).

Enfin, une dernière stratégie consiste à matricer une solution de microbilles sur la surface afin d'obtenir une biopuce de faible densité. Marquette *et al.* ont ainsi validé par chimiluminescence une approche consistant à immobiliser dans une matrice de PDMS des microbilles de sépharose ou de latex couplées à un oligonucléotide, une protéine ou différentes enzymes (Marquette et Blum **2004**).

4. Immobilisation de biomolécules

L'immobilisation des biomolécules sur la surface est une étape clé dans la fabrication d'une biopuce. En effet, la méthode d'immobilisation doit être efficace, reproductible, garantir une bonne homogénéité des plots, une densité de sondes élevée et surtout une immobilisation stable dans les conditions d'utilisation ultérieures. Selon les propriétés de la surface et des biomolécules, différents types d'interaction peuvent être mis en œuvre. Nous nous concentrerons ici sur les stratégies d'immobilisation par interactions faibles, par liaison covalente, et par bio-affinité (Figure 1-11). Les méthodes d'encapsulation et piégeage, ainsi que les méthodes électrochimiques ne seront pas détaillées.

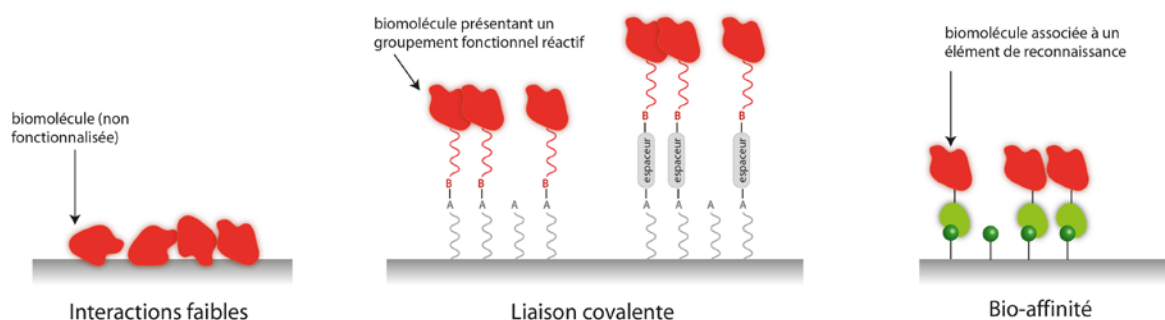


Figure 1-11 Stratégies pour l'immobilisation de biomolécules sur une surface

4.1. Immobilisation par interactions faibles

L'absorption directe de la biomolécule sur la surface est la stratégie d'immobilisation la plus simple. Elle utilise les interactions de faibles énergies entre le support solide et la biomolécule : liaisons hydrogène, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes et interactions de Van der Waals. Les oligonucléotides et brins d'ADN portent extérieurement une charge négative de par la présence des groupements phosphate, ils peuvent se lier par interaction électrostatique à une surface chargée positivement. Schena *et al.* ont ainsi immobilisé une matrice d'ADN sur une lame de verre recouverte d'une couche de polylysine chargée positivement (Schena *et al.* 1995). Dans le cas des protéines, les interactions hydrophobes sont souvent sollicitées : ce sont notamment elles qui permettent la physisorption des anticorps sur un support en polystyrène pour la réalisation de tests ELISA en microplaque.

Les interactions faibles sont également souvent à l'origine de l'immobilisation de protéines ou d'acides nucléiques sur les supports membranaires poreux, utilisés à l'origine pour le *western blot* et employés depuis comme support de test multiparamétrique sur biopuce (Huang 2001). Les membranes de nitrocellulose ont été utilisées le plus fréquemment car elles permettent une immobilisation des biomolécules particulièrement dense et stable (conservation possible pendant plusieurs mois). Si la nature de l'interaction n'est pas clairement identifiée, les interactions hydrophobes sont supposées majoritaires, même si les interactions électrostatiques sont aussi impliquées (Cretich *et al.* 2010).

Si elle est facile à mettre en œuvre, l'immobilisation par interactions faibles présente toutefois plusieurs limites qui sont principalement (Kusnezow et Hoheisel **2003**) :

- le risque de désorption des biomolécules en conditions stringentes, ou dans le cas où l'interaction est trop sensible aux variations de pH, mais aussi de par l'équilibre avec les protéines en solution ;
- la non-orientation des biomolécules sur le support, qui peut limiter l'accessibilité des sites de reconnaissance dans le cas des protéines et anticorps et défavoriser l'hybridation dans le cas de brins d'ADN ;
- un taux relativement élevé d'absorption non spécifique parasite.

4.2. Immobilisation covalente

Pour renforcer la stabilité de l'immobilisation, un couplage covalent est souvent mis en œuvre. La réaction choisie doit pouvoir se faire en conditions douces afin de protéger la biomolécule (en particulier dans le cas des protéines) et doit former une liaison stable dans les conditions du test.

4.2.1. Couplage covalent classique

Très généralement, le couplage covalent implique une activation de surface préalable. Dans le cas des oligonucleotides, les sondes sont généralement également modifiées par une fonction dite « greffable » à leur extrémité. En ce qui concerne les protéines, la liaison peut faire intervenir les groupements fonctionnels des chaînes latérales des différents acides aminés, ou bien les extrémités N- et C-terminales. L'essentiel des stratégies d'immobilisation covalente repose sur la chimie des groupements amine, acide carboxylique (plus particulièrement sous la forme d'équivalent activé), alcool et thiol. Des exemples d'immobilisation par liaison covalente sont présentés à la Figure 1-12.

Diverses activations de surfaces ont été employées pour l'immobilisation de biomolécules via un groupement amine. Il est ainsi possible de greffer une amine par attaque nucléophile sur une surface d'époxydes, comme présenté sur l'exemple (a) de la Figure 1-12. Parmi les premières puces à protéines développées, celle proposée par MacBeath *et al.* en 2000 mettait en jeu l'immobilisation des protéines par leurs groupements amines sur des lames de verre activées par des silanes portant des groupements aldéhyde (Service **2000**). Plus récemment, Fuentes *et al.* ont proposé une méthode d'immobilisation covalente d'ADN modifié par une amine primaire dans un gel de dextran, en réalisant une activation du dextran par des fonctions aldéhyde (Fuentes *et al.* **2004**).

Enfin, une autre stratégie très employée consiste à immobiliser les sondes aminées sur une surface présentant des fonctionnalités acide carboxylique activé. L'activation la plus classique, présentée dans l'exemple (b) de la Figure 1-12, utilise un carbodiimide (typiquement EDC (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide) ou DCC (dicyclohexylcarbodiimide)) conjointement avec un équivalent de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) afin de former un ester activé, stable en conditions standard (pH 7, milieu aqueux). La voie d'activation EDC/NHS fut par exemple mise en œuvre par Andersson *et al.* pour l'immobilisation de biomolécules dans une matrice d'hydrogel composée de PEG (Andersson *et al.* **2009**). Les groupements hydroxyle du

polymère sont dans un premier temps convertis en acide carboxylique par substitution nucléophile sur l'acide bromoacétique, puis l'acide est activé par un ester-NHS.

Ces stratégies de couplage peuvent évidemment être utilisées à l'inverse pour l'immobilisation de biomolécules sur des surfaces présentant des fonctionnalités amine, par exemple en utilisant des oligonucléotides activés par un ester-NHS (Zammatteo *et al.* 2000).

Il est de plus possible d'utiliser une troisième entité, un agent pontant (*cross-linker*) qui fournit des groupements fonctionnels permettant un couplage efficace entre la surface et la biomolécule et peut également jouer le rôle d'espaceur en introduisant un espace contrôlé entre les deux entités, afin d'améliorer l'accessibilité de la biomolécule envers sa cible, ou bien afin de protéger une protéine d'une surface dénaturante (Jonkheijm *et al.* 2008). Ces espaceurs peuvent être homofonctionnels, tel le glutaraldéhyde (exemple (c), Figure 1-12) ou hétérofonctionnels comme le SMCC qui contient des groupements fonctionnels ester activé-NHS et maléimide séparés par un espaceur cyclohexane (exemple (d), Figure 1-12). Les espaceurs homofonctionnels ont pour inconvénient le risque de couplage entre groupes voisins, alors que les hétérofonctionnels garantissent un couplage sélectif.

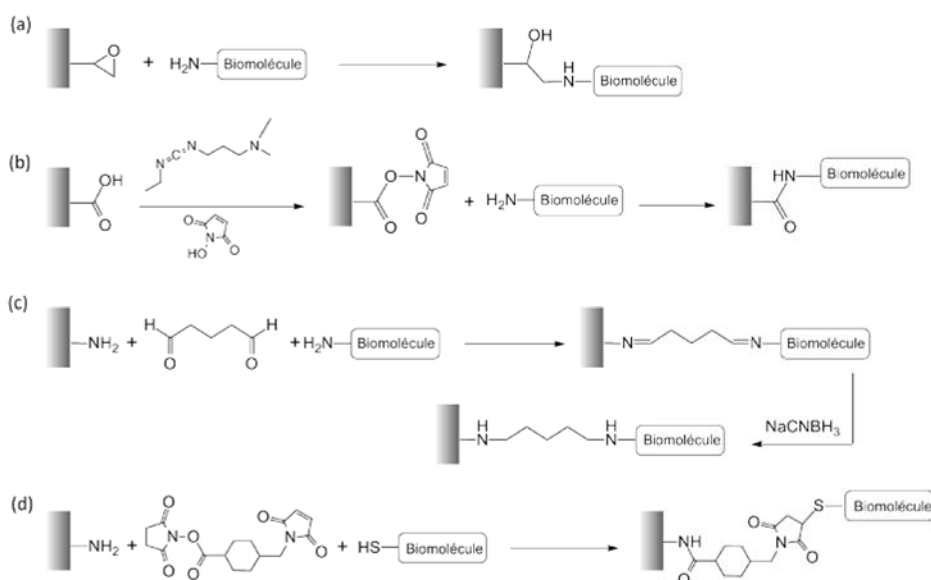


Figure 1-12 Exemples de couplages covalents (a) Immobilisation d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par des groupements époxyde par formation d'un aminoalcool. (b) Activation par la voie EDC/NHS d'une surface acide carboxylique pour l'immobilisation de biomolécules aminées. (c) Immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement amine sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur homofonctionnel, le glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial). (d) Immobilisation covalente d'une biomolécule présentant un groupement thiol sur une surface fonctionnalisée par des groupements amine grâce à un espaceur hétérofonctionnel, le SMCC (succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate).

L'étendue des fonctionnalisations de surface et des agents pontants et/ou espaceurs disponibles rend aujourd'hui possible pratiquement n'importe quel couplage. Le choix de la méthode d'immobilisation covalente et de l'activation de surface doit de plus prendre en compte les conditions du test (risque d'immobilisation non spécifique, stabilité de la liaison covalente...), mais aussi la nature de la biomolécule. En comparant différentes activations de surface pour l'immobilisation d'anticorps, Angenendt *et al.* ont en effet mis en évidence l'influence de la nature de l'anticorps immobilisé sur la qualité de l'immobilisation (Angenendt *et al.* 2002).

4.2.2. Photochimie

La photochimie offre une alternative intéressante et peu coûteuse pour l'immobilisation covalente de biomolécules sur des surfaces peu réactives ou inertes. L'application la plus célèbre de la photochimie pour la fabrication de biopuces est certainement la synthèse *in situ* d'oligonucléotides immobilisés sur une surface, développée par Fodor *et al.* (Fodor *et al.* 1991) et largement exploitée depuis par la compagnie Affymetrix, comme discuté précédemment (Cf. paragraphe 3.1). L'irradiation permet dans ce cas de déprotéger sélectivement les chaînes en croissance grâce à un système de photomasques. De la même manière, les techniques de photolithographie sont couramment employées pour déprotéger ou activer de façon localisée la surface d'immobilisation, sur laquelle une biomolécule pourra ensuite être greffée. Kim *et al.* ont ainsi réalisé l'activation d'un hydrogel à base de PEG grâce à un espaceur bifonctionnel présentant une terminaison phénylazoture pour le couplage à l'hydrogel et une terminaison NHS pour le greffage de protéines (Kim *et al.* 2009). Liu *et al.* ont quant à eux activé une surface de polystyrène en y greffant un espaceur hétérofonctionnel par voie photochimique via une terminaison benzophénone ; la seconde fonctionnalité, un groupement maléimide, permet l'immobilisation covalente d'anticorps sur la surface activée (Liu *et al.* 2000).

La réaction photochimique peut être aussi utilisée directement pour le couplage entre la biomolécule et la surface. L'activation par un groupement photoréactif peut concerner le support ou bien la biomolécule. Les groupements photoactivables présentés Figure 1-13 illustrent les grands types de réactivité impliquées : groupements cétyl (benzophénone), nitrène (p-nitrophényl azoture) et carbène (phényl-(trifluorométhyl) diazirine). Les espèces cétyl, telles que la benzophénone, ont l'intérêt de présenter une activation réversible (retour à l'état fondamental en cas de non réaction) et d'être stables en conditions aqueuses.

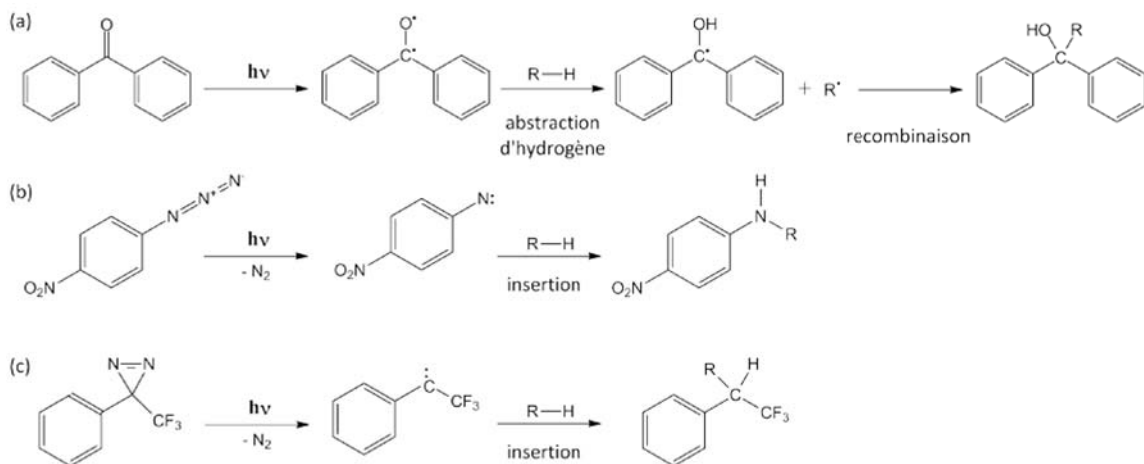


Figure 1-13 Exemples d'espèces photoactivables couramment utilisées pour l'immobilisation de biomolécules
 (a) benzophénone (cétyl), (b) nitrophényl azoture (nitrène), (c) phényl-(trifluorométhyl) diazirine.

La première stratégie possible consiste à activer le support en générant une surface photoactivable. L'activation de canaux de silice avec des groupements benzophénone portés par un espaceur de PEG a ainsi permis la photoimmobilisation d'ADN à leur surface (Renberg *et al.* 2009). De même, la fonctionnalisation de surface de diamant dopé par du bore a permis l'immobilisation de protéines, peptides et oligonucléotides sur ce support (Szunerits *et al.* 2007 ; Marcon *et al.* 2010). Le couplage covalent de protéines dans un gel de dextran a été rendu

possible par la fonctionnalisation préalable du polysaccharide par des groupements diazirine (Caelen *et al.* **2002**).

Enfin, une approche originale proposée par le groupe de J. Rùhe pour le matricage sur des surfaces plastiques consiste à immobiliser les biomolécules *in situ* dans des plots d'hydrogel à base de polydiméthylacrylamide (Neumann *et al.* **2010**). Les oligonucléotides sont mélangés avec un pré-polymère portant des groupements benzophénone. Le mélange est matricé sous formes de plots sur le support puis irradié : l'activation du groupement benzophénone induit la photopolymérisation du gel, mais aussi son ancrage dans le support plastique et surtout le greffage covalent des oligonucléotides. Des puces à oligonucléotides ont ainsi été fabriquées pour le génotypage du papillomavirus et pour l'amplification et détection d'ARN (Brandstetter *et al.* **2010** ; Mader *et al.* **2010**).

La seconde stratégie consiste à fonctionnaliser cette fois la biomolécule avec le groupement photoréactif. Elle a notamment été mise en œuvre pour l'immobilisation d'oligonucléotides sur des supports plastiques, par exemple en immobilisant des oligonucléotides-anthraquinone dans des micropuits pour la détection de produits de PCR (Koch *et al.* **2000**). Dankbar *et al.* ont comparé l'efficacité de différents groupements photoactivables (benzophénone, anthraquinone, p-nitrophényl azoture et 3-phényl-3-(trifluorométhyl)diazirine) pour l'immobilisation d'oligonucléotide sur des plastiques non activés (PMMA, PS et COC). Le p-nitrophényl azoture donna les meilleurs résultats (Dankbar **2006**).

Enfin, il est possible de coupler la biomolécule et la surface en une étape unique (sans activation préalable) par l'intermédiaire d'un agent pontant bifonctionnel photoactivable. En utilisant un agent pontant portant une benzophénone photoréactive et un groupement NHS séparé par un espaceur tétraéthylène glycol, Hypolite *et al.* ont immobilisé des gradients de protéines sur une surface de polystyrène (Hypolite *et al.* **1997**). Comme exemple de groupement homofonctionnel on peut citer l'utilisation d'un espaceur portant deux fonctions azoture pour l'immobilisation de protéines dans un gel de poly-(PEG méthacrylate) (Matsudaira *et al.* **2008**).

4.3. Interaction par bio-affinité

Une interaction moléculaire entre biomolécules peut permettre l'immobilisation de la sonde sur le support. De telles méthodes ont souvent l'avantage d'offrir une immobilisation orientée et spécifique.

4.3.1. Interaction biotine/streptavidine

L'interaction entre la molécule de biotine et la protéine streptavidine (SAV) est très souvent utilisée pour l'immobilisation de biomolécules (Figure 1-14). En effet, la très forte affinité entre ces deux partenaires ($K_D \sim 10^{-15} \text{ mol.l}^{-1}$) génère une liaison quasiment irréversible, de stabilité presque comparable à celle d'une liaison covalente, qui n'est affectée ni par les valeurs de pH et de température, ni par les solvants organiques, enzymes protéolytiques ou autres agents dénaturants (Jonkheijm *et al.* **2008**). Deux stratégies sont envisageables (Smith *et al.* **2006**) : la fonctionnalisation de biomolécules par un groupement biotine et leur immobilisation sur une surface de streptavidine ou bien l'inverse.



Figure 1-14 Structure de la streptavidine liée à quatre biotines (encart : structure de la biotine)

4.3.2. Immobilisation par hybridation d'oligonucléotides complémentaires

Une autre stratégie pour l'immobilisation orientée de protéines par bio-affinité met à profit l'appariement très sélectif et stable des séquences d'ADN. En couplage la protéine avec une séquence oligonucléotique et en immobilisant sur la surface un oligonucléotide de séquence complémentaire, il devient possible de diriger l'immobilisation de la protéine sur un plot précis puisque les deux séquences vont s'apparier, convertissant ainsi la matrice d'oligonucléotides en une matrice de protéines. Par ce biais, on se ramène aux techniques de fabrication de puces à ADN déjà bien établies.

Le couplage entre un oligonucleotide et une protéine, souvent volumineuse, représente cependant une difficulté. Wacker et al. ont contourné cette difficulté en utilisant le couple SAV/biotine pour coupler les deux entités (Wacker *et al.* 2004). Ils ont comparé cette stratégie aux méthodes conventionnelles qui consistent à matricer les anticorps directement sur la surface ou alors à déposer des anticorps biotinylés sur une surface de streptavidine, sur l'exemple d'immunotests de type sandwich sur lame de verre activée (Figure 1-15). Dans les trois cas, des limites de détection de fluorescence équivalentes ont été obtenues (150 pg.ml^{-1}). Toutefois, les techniques de dépôt direct et d'immobilisation par hybridation donnèrent les intensités de fluorescence les plus élevées, avec pour cette dernière méthode des plots plus homogènes et la meilleure reproductibilité du test. Cette technique a de plus l'avantage de minimiser les quantités d'anticorps nécessaires (100 fois moins que pour le dépôt direct).

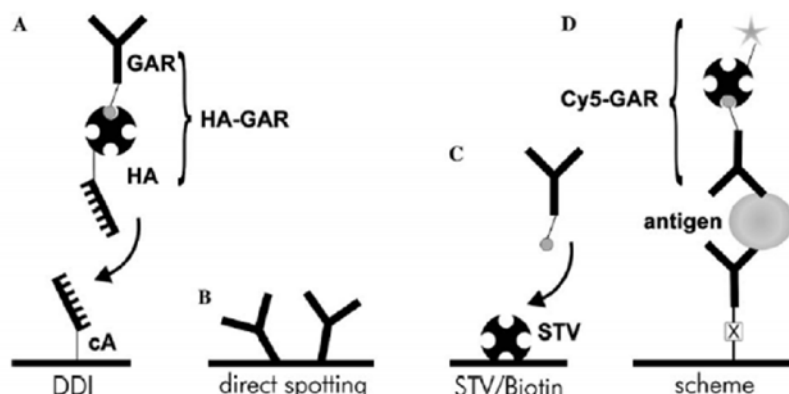


Figure 1-15 Comparaison de l'immobilisation d'anticorps par hybridation d'oligonucléotides complémentaires avec des méthodes d'immobilisation classique (extrait de Wacker et al. 2004) A, B, C Méthodes d'immobilisation utilisées (immobilisation par hybridation d'oligonucléotides complémentaires, immobilisation directe, immobilisation d'un anticorps biotinylé sur une couche de streptavidine) D. Principe de la détection par fluorescence utilisée.

4.3.3. Étiquettes poly-Histidine

La production de protéines recombinantes utilise des étiquettes d'affinité afin de faciliter la purification de ces protéines. La plus utilisée est l'étiquette poly-histidine (six acides aminés histidine successifs) qui peut être introduite par génie génétique sur la protéine recombinante. Cette étiquette interagit fortement avec certains cations métalliques divalents, notamment l'ion nickel (II). Cette propriété permet l'immobilisation orientée par complexation de protéines étiquetées sur un support présentant des cations Ni^{2+} dont la sphère de complexation est incomplète. Fréquemment, la surface est activée par l'acide nitriloacétique (NTA), un ligand tétradentate qui forme avec le cation Ni^{2+} un complexe hexagonal dont deux positions vacantes peuvent lier la poly-histidine. Des groupements NTA ont par exemple été déposés sur une surface d'or par l'intermédiaire d'une monocouche auto-assemblée de thiols (Marin *et al.* 2007), ou encore à la surface d'un PEG activé par couplage DCC/NHS (Chen *et al.* 2009) (Figure 1-16). Les deux inconvénients principaux de cette méthode sont cependant un phénomène d'adsorption non spécifique des protéines sur la surface de cations métalliques et l'affinité relativement faible entre l'étiquette poly-histidine et le complexe Ni-NTA ($K=10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$) qui se traduit par une dissociation partielle des protéines immobilisées (Jonkheijm *et al.* 2008).

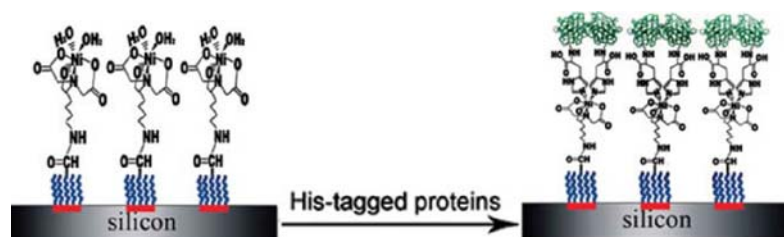


Figure 1-16 Immobilisation de protéines marquées par une étiquette poly-histidine sur une surface de NTA (extrait de Chen *et al.* 2009)

5. Méthodes de détection de l'interaction biologique

Diverses stratégies ont été développées pour la détection de l'interaction biologique sur la matrice de sondes d'une biopuce : méthodes optiques, électrochimiques... Il est possible de les classer en deux grandes catégories : les méthodes sans marqueurs (résonance de plasmon de surface, microbalance piézoélectrique, microrésonateur en anneau...) et les méthodes impliquant un marquage (principalement des méthodes optiques ou électrochimiques). Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux méthodes optiques avec marquage, puisqu'elles ont été mises en œuvre dans cette thèse. La Figure 1-17 en présente quelques exemples impliquant différents phénomènes pour la génération du signal optique. Les transducteurs utilisés sont en général soit des tubes photomultiplicateurs (PMT) couplés ou non à des fibres optiques et/ou à un système de balayage (scanner), soit des photodiodes, ou encore des capteurs CCD (*Charged Coupled Device*).

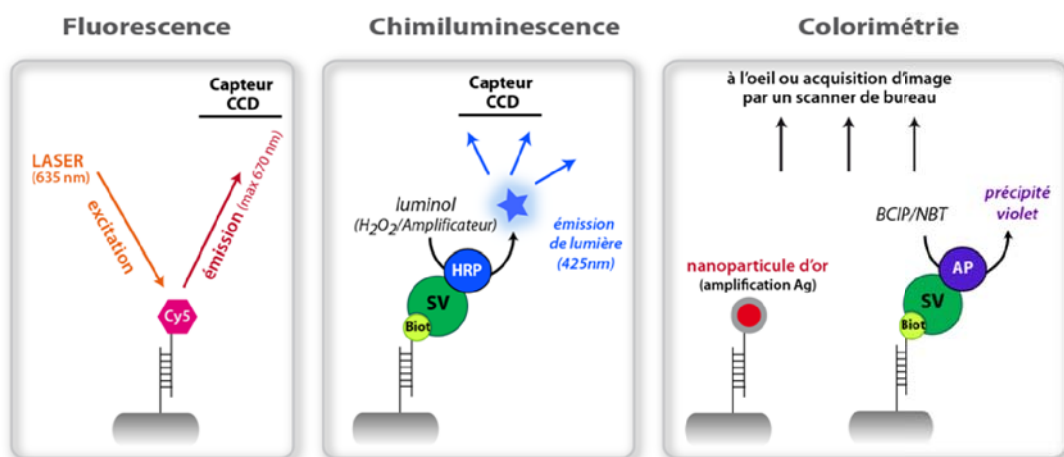


Figure 1-17 Exemples de méthodes optiques avec marquage pour la détection de l'hybridation (gauche) Détection par fluorescence, marquage direct par la cyanine 5. (centre) Détection par chimiluminescence catalysée par la peroxydase de raifort (HRP), le marquage se fait par l'intermédiaire du couple streptavidine (SAV) – biotine. (droite) Détection par colorimétrie, soit par marquage direct avec des nanoparticules d'or, soit par marquage enzymatique (phosphatase alcaline (AP)) par l'intermédiaire du couple streptavidine (SAV) – biotine.

5.1. Luminescence

La luminescence est le phénomène d'émission de lumière accompagnant le retour à l'état fondamental d'une espèce se trouvant dans un état électronique excité. Suivant la source de l'excitation, on distingue plusieurs types de luminescence, notamment :

- i. la *photoluminescence*, consécutive à une excitation lumineuse (par exemple la fluorescence),
- ii. l'*électroluminescence*, consécutive à l'application d'un champ électrique,
- iii. la *chimiluminescence*, qui résulte d'une réaction chimique au cours de laquelle l'espèce excitée est formée,
- iv. la *bioluminescence*, qui correspond à un phénomène de chimiluminescence au sein d'un organisme vivant.

Nous nous concentrerons ici sur les processus i. et iii.

5.1.1. Fluorescence

Suite à une excitation lumineuse, plusieurs processus sont envisageables pour le retour de la molécule à son état fondamental S_0 (Figure 1-18) :

- i. une désexcitation non radiative,
- ii. un retour radiatif à partir de l'état S_1 avec émission de lumière : c'est le phénomène de **fluorescence** (durée de vie de l'état excité 10^{-10} à 10^{-7} s),
- iii. un croisement intersystème vers un état triplet puis un retour radiatif de l'état T_1 vers l'état S_0 : c'est le phénomène de **phosphorescence** (durée de vie de l'état excité 10^{-6} à 1 s).

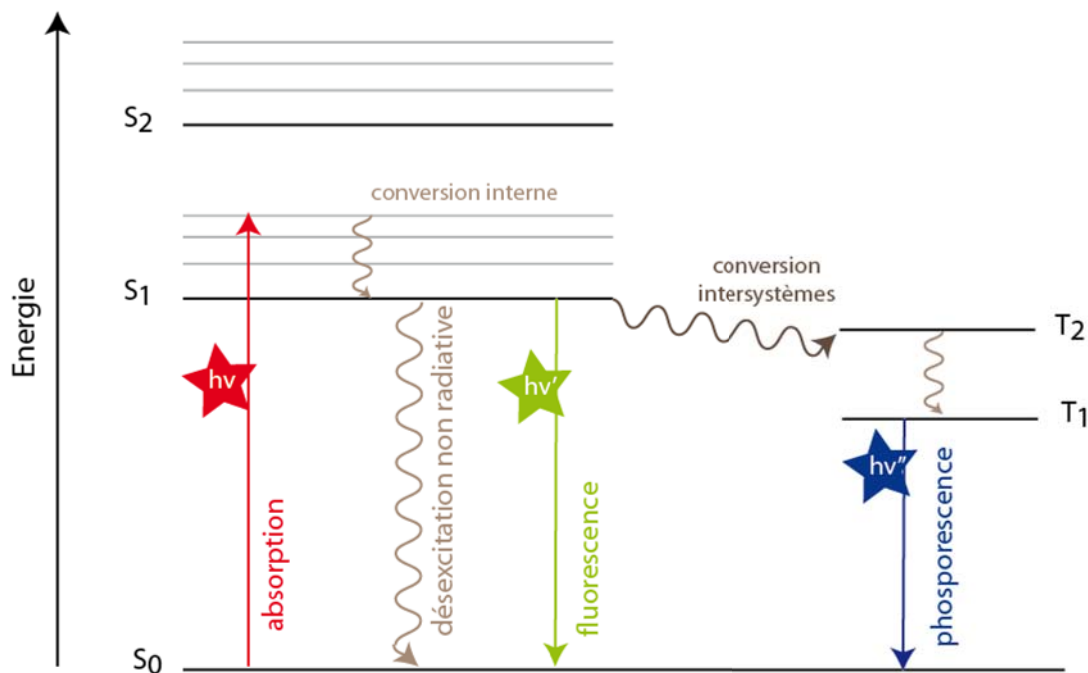


Figure 1-18 Diagramme de Jablonski simplifié Le diagramme décrit les différents processus de désexcitation possibles suite à l'excitation d'un composé par absorption d'un photon lumineux. Les processus non-radiatifs sont représentés par des flèches ondulées, les processus radiatifs par des flèches droites.

La détection par marquage fluorescent est la méthode la plus fréquemment employée pour les biopuces à détection optique. Son intérêt tient au fait qu'il s'agit d'une méthode très sensible et non destructive. Chaque fluorophore est caractérisé par ses spectres d'absorption et d'émission (la longueur d'onde du maximum d'émission étant plus élevée que celle de l'absorption, du fait du déplacement de Stokes). La Figure 1-17 présente un exemple de détection de l'hybridation sur puce par l'intermédiaire d'un marquage de la cible avec le fluorophore Cy5. Les marqueurs de la famille des cyanines, et principalement Cy3 et Cy5, sont les plus couramment utilisés. Ces deux fluorophores possèdent des rapports quantiques élevés et peuvent facilement être incorporés aux biomolécules cibles, par couplage chimique ou bien pendant une amplification par PCR en utilisant des amorces marquées (Bally *et al.* 2006). Comme ils possèdent des spectres d'absorption et d'émission distincts, Cy3 et Cy5 peuvent être utilisés simultanément pour un marquage double, particulièrement intéressant pour les tests multiparamétriques.

De nombreuses approches originales de marquage fluorescent ont vu le jour, basées notamment sur l'utilisation du phénomène de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET) et de balises moléculaires (*molecular beacons*) pour la détection de séquences d'ADN (Epstein *et al.* **2002**). La structure d'une balise moléculaire consiste en une séquence d'ADN simple brin en configuration épingle à cheveux (boucle), présentant à ses extrémités opposées un fluorophore et un atténuateur de fluorescence (*quencher*). Lorsque la balise n'est pas liée à une cible, le fluorophore et l'atténuateur sont proches l'un de l'autre et la fluorescence est supprimée (*quenching*). L'hybridation de la cible provoque l'ouverture de la bouche, ce qui active le signal fluorescent.

Toutefois, l'inconvénient majeur des techniques de détection par fluorescence est qu'elles nécessitent un appareillage complexe et coûteux pour l'excitation et la détection du signal émis. Par ailleurs, la fluorescence intrinsèque du support peut poser problème lors de l'acquisition du signal.

5.1.2. Chimiluminescence

L'oxydation du luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) en présence de peroxyde d'hydrogène aboutit à l'émission de lumière : c'est une réaction de **chimiluminescence**. Elle conduit en effet à la formation d'un ion aminophthalate à l'état excité (état triplet), dont le retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon. Les propriétés de luminescence du luminol ont été décrites pour la première fois par Albrecht en 1928 (Albrecht **1928**). La Figure 1-19 donne une vue d'ensemble du mécanisme de chimiluminescence du luminol en solution aqueuse (Blum **1997**). L'oxydation du luminol en solvant protique nécessite des conditions alcalines et l'emploi d'un catalyseur oxydant associé à un co-oxydant. Le rendement quantique est faible ($\sim 0,01$) et la longueur d'onde du maximum d'émission est 425 nm.

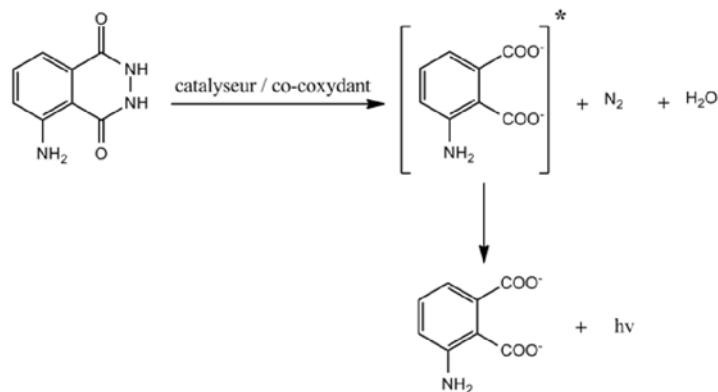


Figure 1-19 Vue d'ensemble du mécanisme d'oxydation du luminol en solution aqueuse

Les enzymes peroxydase, en particulier la peroxydase de raifort (EC 1.11.1.7), sont en général les catalyseurs les plus efficaces pour l'oxydation du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Leur capacité catalytique s'explique par leur nature hémique, les cations des métaux de transitions étant de bons catalyseurs de la réaction. La catalyse par la peroxydase de raifort présente l'avantage de se dérouler à des pH proches de la neutralité (8-9) et d'avoir une spécificité élevée pour un co-oxydant particulier, le peroxyde d'hydrogène. Le mécanisme de la réaction biocatalysée est complexe et n'est pas encore totalement élucidé. Le mécanisme supposé est présenté sur la Figure 1-20. Seule une partie de la séquence réactionnelle est

catalysée par l'enzyme, les autres étant purement chimiques. La peroxydase est convertie en un premier complexe oxydé par action du peroxyde d'hydrogène (*étape 1*), puis elle réduit deux molécules de luminol (*étapes 2 et 3*) en espèces radicalaires (L^{\cdot} LH \cdot). Dans la seconde partie du mécanisme, une oxydation chimique aboutit à la formation du luminol endoperoxyde, qui conduit enfin au 3-aminophthalate à l'état excité après élimination d'une molécule de diazote. Cette réaction de chimiluminescence a été largement mise en œuvre à des fins analytiques par exemple pour la détection de peroxyde d'hydrogène (Marquette et Blum **2006**). Elle peut aussi être utilisée afin de détecter les interactions sur une biopuce : l'émission d'un signal lumineux

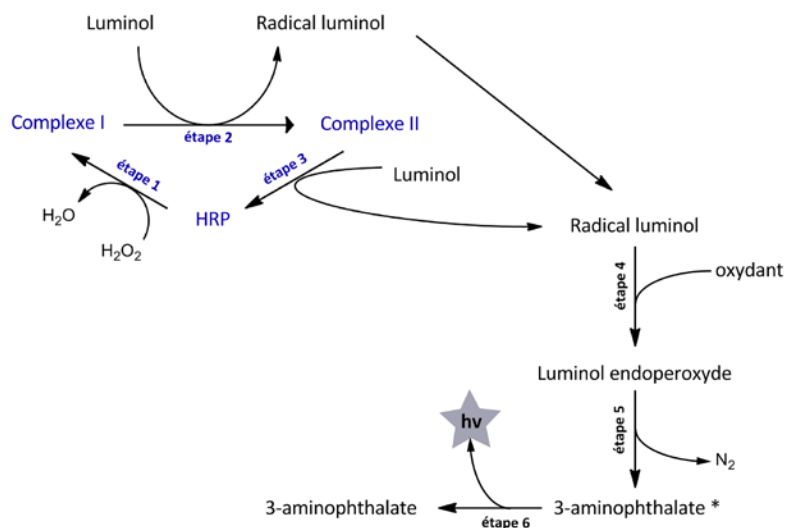


Figure 1-20 Mécanisme supposé de la réaction d'oxydation du luminol catalysée par la peroxydase de raifort (HRP) en présence de peroxyde d'hydrogène (d'après Blum 1997)

permettra de détecter les plots où la cible a été capturée, si celle-ci aura été marquée au préalable par la peroxydase de raifort. La Figure 1-17 présente une stratégie de détection de l'hybridation par chimiluminescence reposant utilisant le couple biotine-streptavidine pour le marquage.

Pour des applications analytiques, la chimiluminescence du luminol catalysée par la peroxydase de raifort est souvent réalisée en présence d'un amplificateur. Certaines molécules permettent en effet d'obtenir, pour des concentrations en luminol identiques, un signal lumineux plus intense et plus stable au cours du temps. L'amplificateur le plus couramment utilisé est le para-iodophénol, il permet d'augmenter le rapport signal/bruit par un facteur 180 lorsqu'il est présent dans le milieu réactionnel (Thorpe et Kricka **1986**).

5.2. Colorimétrie

La détection optique de l'interaction peut également se faire grâce par l'intermédiaire d'un signal colorimétrique (coloration dans le domaine du visible : 400 – 800 nm). Deux approches possibles sont illustrées sur la Figure 1-17 : marquage par une particule colorée ou bien marquage par une enzyme catalysant la production d'un produit coloré.

Les intérêts majeurs des méthodes colorimétriques sont : d'une part l'économie d'un appareillage coûteux pour la détection du signal qui permet de réduire considérablement les coûts, notamment dans le cas d'une analyse haut-débit, et d'autre part, la simplicité et la rapidité de la lecture qui en font une méthode de choix pour les tests au lit du patient (*POC diagnostics*).

En effet, pour de nombreux tests qualitatifs par capillarité, l'apparition d'une bande colorée suffit pour conclure sur le résultat du test (Cf. paragraphe 2.2.1, Figure 1-6). De nombreux immunotests colorimétriques de ce type ont été développés (Mark *et al.* 2010 ; Ngom *et al.* 2010), par exemple pour les tests de grossesse, mais aussi pour la détection de virus et bactéries (VIKIA® Rota-Adeno, HIV-1/2 (bioMérieux, www.biomerieux.fr)).

5.2.1. Nanoparticules

La plupart de ces tests POC colorimétriques reposent sur un marquage par des nanoparticules d'or (Mao, Ma, *et al.* 2009). Aveyard *et al.* ainsi que Glynou *et al.* ont rapporté l'utilisation d'un tel marquage pour la détection directe de produits de PCR par test par capillarité (Aveyard *et al.* 2007 ; Glynou *et al.* 2003). Mao *et al.* (Mao, Xu, *et al.* 2009) ont quant à eux utilisé des balises moléculaires fonctionnalisées avec des nanoparticules d'or pour la détection de polymorphismes d'un nucléotide. D'autres approches ont notamment couplé un marquage par nanoparticule d'or à une étape de transcription inverse multiplexée (pour la détection simultanée des virus HBV, HCV et HIV) (Dineva *et al.* 2005), ou bien à une étape d'élongation d'amorce oligonucléotidique (Litos *et al.* 2009).

Cette tendance va de pair avec l'intérêt croissant pour les nanoparticules en biotechnologie (Niemeyer 2001), notamment pour les méthodes de détection de biomolécules (Thaxton *et al.* 2006 ; Csaki *et al.* 2003). Les propriétés de diffusion de la lumière des nanoparticules d'or colloïdal (Figure 1-21) leur confèrent en effet une coloration physique permettant un marquage visible de l'interaction sur la puce (Storhoff *et al.* 2004). Le marquage peut se faire directement en greffant la cible sur les nanoparticules (Han *et al.* 2003) ou bien de manière indirecte en utilisant conjointement une cible biotinyllée (protéine (Liang *et al.* 2004) ou oligonucléotide (Alexandre *et al.* 2001)) et un conjugué streptavidine-nanoparticule d'or.

Une étape supplémentaire d'amplification par précipitation d'argent métallique sur la nanoparticule d'or est souvent mise en œuvre afin d'augmenter la sensibilité de la détection, et permet d'égaliser voire de dépasser la sensibilité des méthodes fluorescentes. En effet, le dépôt d'argent métallique - formé par réduction d'ions argent par l'hydroquinone - augmente considérablement le diamètre de la particule et diffuse fortement la lumière dans le visible. Alexandre *et al.* ont ainsi observé une augmentation du diamètre des nanoparticules d'un facteur 100 (de 10 à 1000 nm), ce qui a permis d'atteindre une sensibilité équivalente à celle obtenue par un marquage par Cy3 ou Cy5 pour la détection de l'hybridation sur une puce à oligonucléotides (Alexandre *et al.* 2001).

D'autres types de particule colorée ont également été utilisés pour le marquage de l'interaction sur une biopuce. Carter et Cary ont par exemple rapporté l'utilisation de microbilles de polystyrène colorées pour la détection d'anthrax sur une puce à oligonucléotides sur support poreux (Carter et Cary 2007).

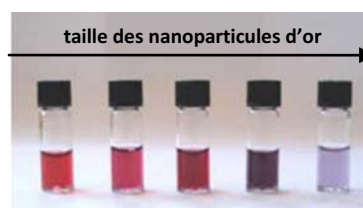


Figure 1-21 Coloration d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or de diamètre croissant

5.2.2. Méthodes enzymatiques

Une stratégie alternative à l'utilisation de particules colorées consiste à marquer les plots où l'interaction sonde/cible s'est produite par une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré. Le marquage passe souvent par l'intermédiaire du couple biotine / streptavidine (comme décrit Figure 1-17), ou par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à l'enzyme dans le cas des immunotests. Les deux enzymes les plus utilisées sont la peroxydase de raifort (HRP) et la phosphatase alcaline (AP). L'utilisation de substrats précipitant permet la fixation de la coloration sur les plots positifs. La phosphatase alcaline dégrade le BCIP en présence de NBT en formant un précipité violet foncé (Figure 1-22) et la peroxydase de raifort catalyse l'oxydation du TMB en présence de peroxyde d'hydrogène et forme un précipité bleu (Figure 1-23).

Ces marqueurs enzymatiques ont notamment permis la détection de l'hybridation sur des puces à oligonucléotides sur support de nitrocellulose (Cretich *et al.* 2010) ou agarose (Petersen *et al.* 2007). Les supports poreux sont particulièrement intéressants pour ce type de marquage enzymatique car ils permettent de retenir le précipité coloré formé sur le support. Le groupe de G. Whitesides a ainsi développé une puce à protéine sur un support de papier pour des tests ELISA colorimétriques (Cheng *et al.* 2010).

Il faut cependant noter que ces techniques de marquage sont fréquemment associées à des problèmes de bruit de fond et à un manque de sensibilité, ce qui peut s'avérer particulièrement problématique pour le développement de tests multiparamétriques.

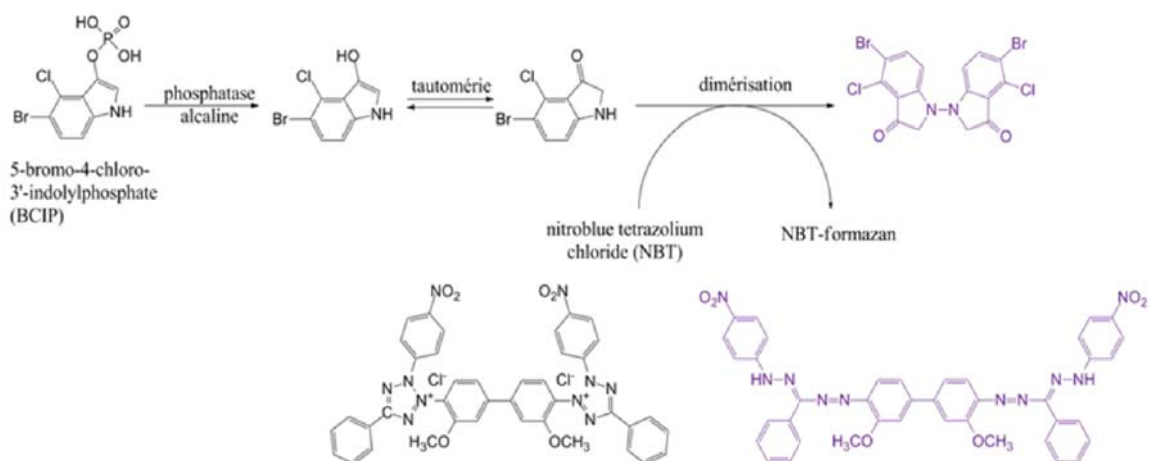


Figure 1-22 Mécanisme de la dégradation du BCIP en présence de NBT catalysée par la phosphatase alcaline

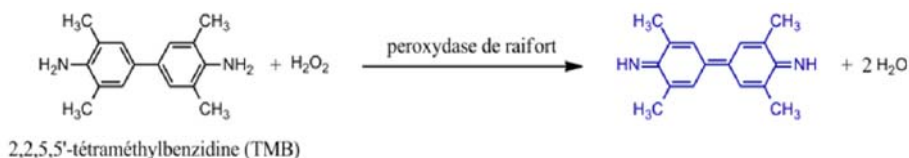


Figure 1-23 Mécanisme de dégradation du TMB en présence de peroxyde d'hydrogène, catalysée par la peroxydase de raifort

Chapitre 2. Le génotypage érythrocytaire

Ces travaux de thèse se sont principalement articulés autour du développement d'outils de tests biologiques de type biopuce pour l'analyse d'échantillons sanguins, en particulier pour l'identification des groupes sanguins. La technique de dépistage transfusionnel développée suit une stratégie de génotypage érythrocytaire et s'articule autour d'un test d'acides nucléiques. Dans ce chapitre, nous verrons plus précisément les enjeux que recouvre le groupage sanguin, les pratiques de sérologie mises en œuvre en routine dans les établissements de transfusion sanguine ainsi que les techniques de génotypage érythrocytaire qui les concurrencent aujourd'hui. La fin du chapitre sera consacrée à un état de l'art des techniques de génotypage érythrocytaire étendu haut-débit.

Nous entendrons par groupe sanguin, un groupe sanguin érythrocytaire, résultant des polymorphismes des antigènes érythrocytaires de surface et nous ne discuterons pas des antigènes plaquettaires. La dénomination de « groupe sanguin » est attribuée lorsqu'un anticorps dirigé contre un variant antigénique est connu (Daniels et Bromilow **2007**).

1. Le groupage sanguin : enjeux et problématique

1.1. Compatibilité transfusionnelle

1.1.1. Historique et exemple du système ABO

La transfusion sanguine correspond à l'injection par voie intraveineuse d'un concentré de globules rouges. Les sangs du patient et du donneur possèdent des caractères qui leur sont propres et qui sont parfois incompatibles entre eux. De ce fait, la poche à transfuser ne peut être choisie au hasard, au risque d'occasionner une incompatibilité pouvant avoir pour conséquence un accident transfusionnel immédiat ou retardé, parfois très grave, voire fatal.

L'existence de ce phénomène de compatibilité fut mise en évidence en 1901 par Landsteiner (Landsteiner **1901**) qui constata que le sang de différents individus sains présentait des caractéristiques différentes. Il observa notamment que le plasma sanguin de certains provoquait l'agglutination de globules rouges chez d'autres. Par ces tests croisés, il mettait en évidence l'existence du groupe sanguin ABO, facteur le plus important pour la sécurité transfusionnelle. Considérons l'exemple d'un receveur de groupe A : les caractéristiques spécifiques à son groupe sanguin sont la présence d'antigènes A sur la surface de ses hématies et celles d'anticorps anti-B dans son sérum (Tableau 2-1). En conséquence, si on transfuse à celui-ci du sang d'un donneur de groupe B, les anticorps anti-B présents chez le receveur vont interagir avec les antigènes spécifiques B présents à la surface des globules rouges du donneur, provoquant au final une lyse massive des globules rouges transfusés (Figure 2-1). Non seulement la transfusion est inefficace, mais les conséquences de l'hémolyse massive sont très graves voire fatales. Les anti-A ou B sont des anticorps naturels et réguliers (naturellement présents dans le sérum de tous les individus), c'est pourquoi il est impératif de respecter la compatibilité dans le système ABO lors d'une transfusion.

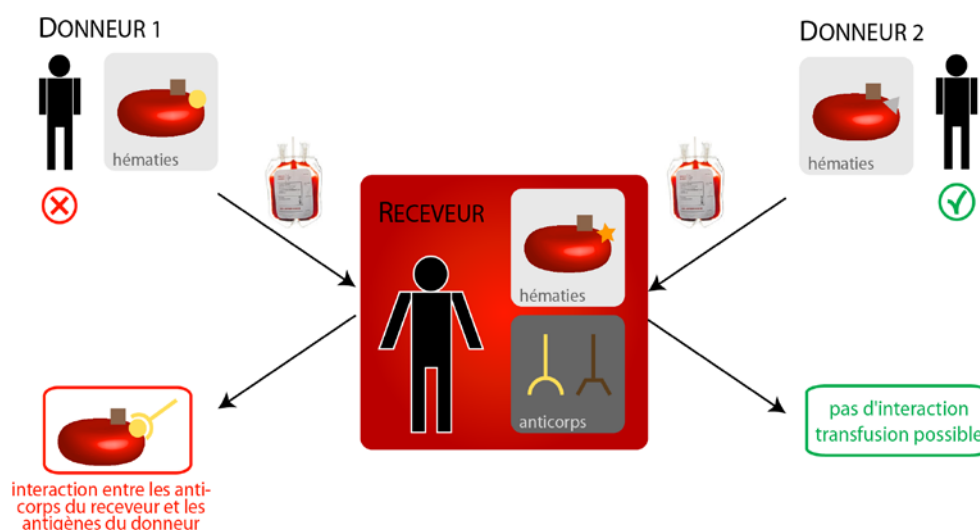


Figure 2-1 **Compatibilité transfusionnelle** Dans cet exemple, le receveur peut être transfusé avec le sang du donneur 2 seulement. En effet, la présence dans le sérum du receveur d'anticorps dirigés contre des antigènes présents à la surface des globules rouges du donneur 1 crée un risque d'accident transfusionnel.

Tableau 2-1 Caractéristiques simplifiées du système ABO

Groupe du receveur	O	A	B	AB
Antigènes érythrocytaires présents chez le receveur	aucun	A	B	A et B
Génotype du receveur	O/O	A/A ou A/O	B/B ou B/O	A/B
Anticorps dans le sérum du receveur	Anti-A,B	anti-B	Anti-A	aucun
Donneur possible	O	O, A	O, B	O, A, B, AB

1.1.2. Groupes sanguins mineurs et phénomène d'alloimmunisation

Suite à la découverte de Landsteiner, d'autres systèmes sanguins furent mis à jour, à commencer par ceux associés à des anticorps pouvant directement agglutiner les globules rouges. Mais c'est grâce à l'élaboration du test d'antiglobuline indirect - qui permet la détection des anticorps irréguliers non-agglutinants - par Coombs, Mourant et Race en 1945 (Daniels **2002**) que la sérologie des groupes sanguins a pu réellement se développer (Cf. Chapitre 2, paragraphe 2.1). Ces techniques ont permis la découverte et la caractérisation de 30 systèmes sanguins reconnus à ce jour : identification et caractérisation des molécules portant les polymorphismes, localisation et clonage des gènes responsables et classification en groupes sanguins (Figure 2-2 (Daniels et Reid **2010**)). Ceux-ci sont associés à plus de 300 antigènes qui représentent autant de risques potentiels d'incompatibilité transfusionnelle.

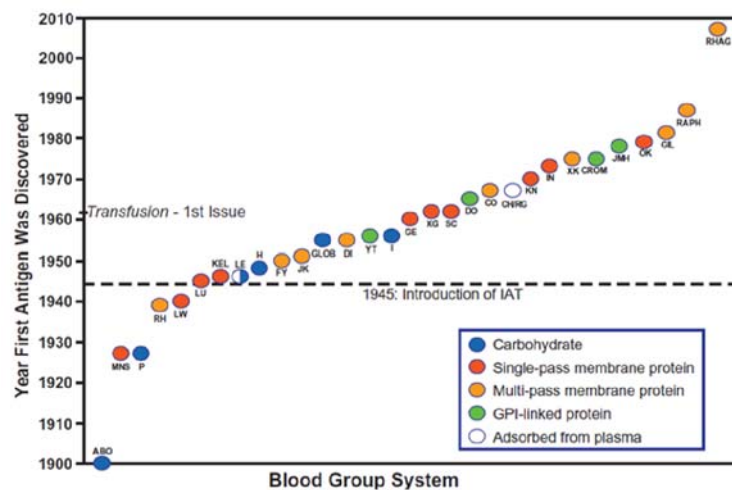


Figure 2-2 **Chronologie de la découverte ou identification des systèmes de groupes sanguins** La couleur représente le type de composant membranaire porté par les antigènes. La ligne en pointillée indique la découverte du test d'antiglobuline indirecte (IAT). Extrait de Daniels **2002**.

Dans l'extrême majorité des cas, les anticorps dirigés contre les antigènes érythrocytaires sont qualifiés d'irréguliers : contrairement au système ABO, ils ne sont pas présents de façon spontanée dans le sérum. Ils peuvent être développés à la suite d'une transfusion lorsque le sang du donneur présente des caractéristiques différentes de celui du receveur, faute d'une caractérisation suffisante de la poche, ou encore lors d'une grossesse si les groupes sanguins du

fœtus et de la mère différent. On parle alors d'alloimmunisation. Le développement d'alloanticorps concernerait environ 13% des patients (Westhoff et Sloan **2008**). Dans ce cas, le risque d'accident hémolytique pèse sur les transfusions qui suivront cette alloimmunisation. Ce phénomène est particulièrement problématique pour les patients polytransfusés, notamment les patients drépanocytaires, qui développent des alloimmunisations multiples. Il devient alors très délicat de trouver un receveur compatible et les situations d'impasse transfusionnelle se multiplient (Zimring *et al.* **2011**).

1.1.3. Recherche d'anticorps irréguliers

Afin d'éviter les accidents transfusionnels et de minimiser les cas d'alloimmunisations, une recherche d'anticorps irréguliers est pratiquée dans les cas suivants :

- avant une transfusion, pour éviter un accident hémolytique transfusionnel ;
- après une transfusion (environ six semaines après) pour déceler l'apparition d'un anticorps d'immunisation primaire, susceptible de disparaître plus tard, mais toujours dangereux du fait d'une réactivation possible (réponse secondaire) lors d'une transfusion ou grossesse ultérieure ;
- chez les femmes enceintes, pour le dépistage des incompatibilités fœto-maternelles susceptibles d'entraîner une atteinte fœtale, pour pouvoir transfuser la mère en urgence en cas d'hémorragie.

Par ailleurs, un ultime test croisé de compatibilité directe entre les globules rouges du donneur et le sang du receveur, est effectué au lit du patient avant une transfusion. Notons que les pratiques actuelles de typage des poches de sang en routine ne concernent qu'un petit nombre d'antigènes érythrocytaires (systèmes ABO, RH et Kell), malgré le fait que bien d'autres ont une importance clinique avérée (Figure 2-3).

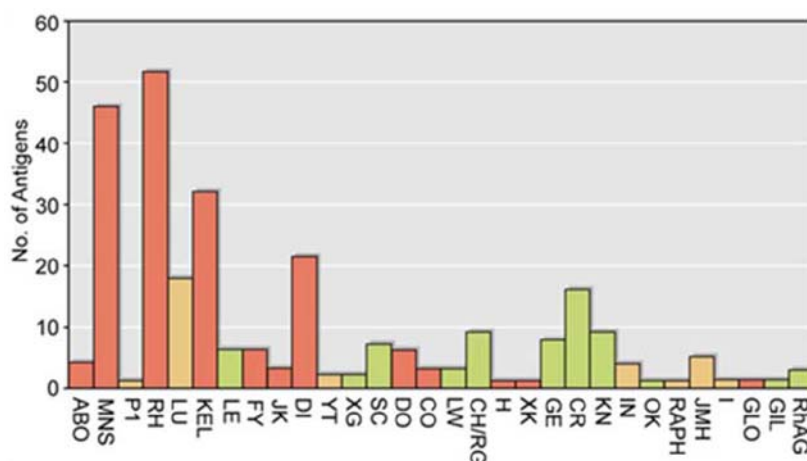


Figure 2-3 Importance clinique des antigènes érythrocytaires Les groupes sanguins sont classés en abscisse suivant leur numéro dans la classification ISBT. L'ordonnée représente le nombre d'antigènes du groupe considéré. Les couleurs correspondent à la fréquence des accidents transfusionnels dus aux anticorps correspondants : rouge = souvent ; orange = occasionnellement ; vert = rarement voire jamais. Extrait de Anstee **2009**.

1.2. Caractérisation des groupes sanguins

1.2.1. 328 antigènes érythrocytaires identifiés

En 2010, la Société Internationale de la Transfusion Sanguine (ISBT) reconnaissait 328 antigènes érythrocytaires. Parmi eux, 284 ont été attribués aux 30 systèmes des groupes sanguins identifiés (de 1 à plus de 50 antigènes par système) et 44 restent non classés (Storry *et al.* 2011). Chaque antigène est défini de manière sérologique par l'existence d'un anticorps spécifique dirigé contre lui. L'importance clinique de ces anticorps (Figure 2-3) et le risque d'accident transfusionnel est variable suivant les systèmes et les antigènes (Poole et Daniels 2007).

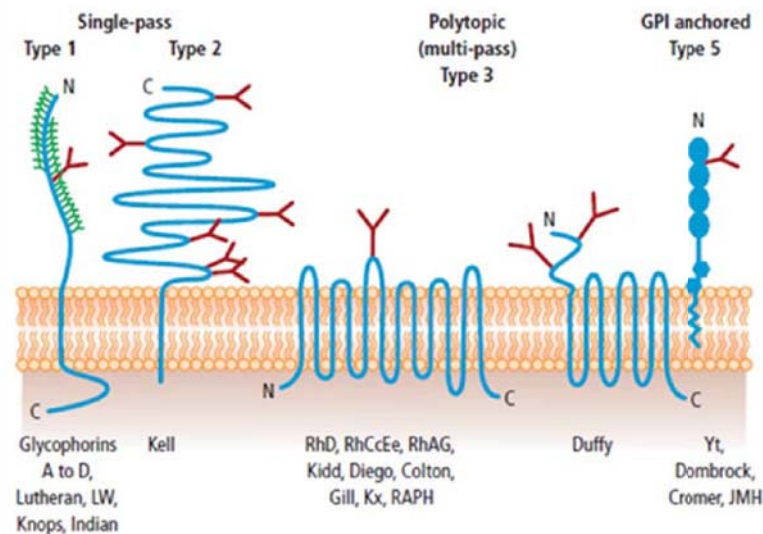


Figure 2-4 Schéma représentant les différents types de protéines et glycoprotéines associées aux groupes sanguins, selon leur intégration au sein de la membrane de l'érythrocyte (Les protéines de types 4 sont cytoplasmiques et non présentes dans les globules rouges.) Extrait de (Daniels et Bromilow 2007).

Les antigènes de groupes sanguins sont des marqueurs de surface présents sur l'extérieur de la membrane des globules rouges. Il s'agit de protéines ou d'oligosaccharides liés à un lipide ou une protéine. Les différentes structures rencontrées sont représentées Figure 2-4. La fréquence à laquelle les différents antigènes polymorphiques sont présents chez les individus est très variable. Pour certains systèmes, les variants seront présents à fréquences équivalentes ; pour d'autres certains variants sont extrêmement rares. Cette fréquence dépend aussi fortement de l'origine ethnique de l'individu, les polymorphismes cliniquement importants diffèrent donc d'une ethnie à l'autre.

1.2.2. Essor des connaissances moléculaires sur les systèmes sanguins

La caractérisation génétique des groupes sanguins a débuté en 1986 avec l'étude du système MNS (Avent *et al.* 2009) suivie en 1990 par des découvertes concernant les systèmes ABO et RH. Aujourd'hui, les gènes encodant les 30 systèmes sanguins ont pu être clonés et séquencés, et les bases moléculaires de la plupart des antigènes érythrocytaires et des polymorphismes sont connues, en tout cas pour les plus significatifs d'un point de vue clinique (Daniels 2009). Chaque

système de groupe sanguin représente un gène unique ou bien un groupe de deux ou trois avec peu ou pas de recombinaisons entre eux (Daniels et Bromilow 2007).

Le Tableau 2-2 résume les caractéristiques génétiques principales des 30 groupes sanguins avec les notations recommandées par l'ISBT. Une classification numérique des systèmes de groupes sanguins a été mise en place par l'ISBT afin d'homogénéiser la nomenclature employée : on notera ainsi KEL2 le deuxième antigène du système Kell (symbole du système et numéro de l'antigène) alors que l'allèle correspondant sera noté *KEL*2*. Par souci d'homogénéisation, cette nomenclature est employée dans ce manuscrit. Le nom courant des antigènes sera éventuellement rappelé pour plus de clarté.

Tableau 2-2 Les systèmes de groupes sanguins (reconnus par l'ISBT en 2007) Extrait de Veldhuisen 2009. Depuis 2007, un gène associé au système P (003) a été identifié. Le système a été renommé P1PK (Storry 2001).

Blood group system	ISBT symbol	ISBT number	Number of antigens	Gene name	Protein	Chromosomal localization	Molecular typing possible?
ABO	ABO	001	4	ABO	Transferase	9q34.2	Yes
MNS	MNS	002	46	GYPA GYPB	TM protein	4q31.21	Yes ^c
P	P	003	1	Unknown ^a	–	22q11.2-qter	No
Rh	RH	004	50	RHD RHCE	TM protein	1p36.11	Yes ^c
Lutheran	LU	005	19	BCAM	TM protein	19q13.32	Yes
Kell	KEL	006	31	KEL	TM protein	7q34	Yes
Lewis	LE	007	6	FUT3 FUT2	TM protein	19p13.3	Yes ^{bc}
Duffy	FY	008	6	DARC	TM protein	1q23.2	Yes
Kidd	JK	009	3	SLC14A1	TM protein	18q12.3	Yes
Diego	DI	010	21	SLC4A1	TM protein	17q21.31	Yes
Yt	YT	011	2	ACHE	GPI-linked protein	7q22.1	Yes
Xg	XG	012	2	XG	TM protein	Xp22.33	No
Scianna	SC	013	7	ERMAP	TM protein	1p34.2	Yes
Dombrock	DO	014	6	ART4	GPI-linked protein	12p12.3	Yes
Colton	CO	015	3	AQP1	TM protein	7p14.3	Yes
Landsteiner-Wiener	LW	016	3	ICAM4	TM protein	19p13.2	Yes
Chida/Rodgers	CH/RG	017	9	C4B C4A	External protein	6p21.3	Yes ^{bc}
Hh	H	018	1	FUT1	Transferase	19q13.33	Yes ^b
Kx	XK	019	1	XK	TM protein	Xp21.1	Yes ^d
Gerbich	GE	020	8	GYPC	TM protein	2q14.3	Yes
Cromer	CROM	021	15	CD55	GPI-linked protein	1q32.2	Yes
Knops	KN	022	9	CR1	TM protein	1q32.2	Yes
Indian	IN	023	4	CD44	TM protein	11p13	Yes
OK	OK	024	1	BSG	TM protein	19p13.3	Yes
RAPH	MER2	025	1	CD151	TM protein	11p15.5	Yes ^d
JMH	JMH	026	5	SEMA7A	GPI-linked protein	15q24.1	Yes ^b
I	I	027	1	GCNT2	Transferase	6p24.2	Yes ^{bd}
Globoside	GLOB	028	1	B3GALNT1	P-synthase	3q26.1	Yes ^{bc}
GIL	GIL	029	1	AQP3	TM protein	9p13.3	Yes ^d
RHAG	RHAG	030	3	RHAG	TM protein	6p21-qter	Yes ^d

^aPossibly A4GALT1; ^bdifficult; ^chomologous genes; ^donly null phenotypes.

La majorité des polymorphismes de groupes sanguins résulte d'un polymorphisme d'un seul nucléotide qui code la substitution d'un acide aminé dans la séquence de l'antigène (SNP pour *single nucleotide polymorphism*). Dans la plupart des cas, en particulier pour les systèmes bi-alléliques impliquant un unique SNP, le phénotype peut se déduire directement du génotype¹.

¹ Dans le cas d'un système bi-allélique comme *KEL*1/KEL*2*, on utilisera les notations suivantes.

- (i) Le phénotype correspondant à l'expression de l'antigène KEL1 seul sera noté KEL : 1,-2.
- (ii) De même, les génotypes des individus homozygotes seront notés *KEL*1/1* et *KEL*2/2*. Dans le cas d'un hétérozygote, le génotype sera *KEL*1/2*.

Toutefois, pour certains systèmes de groupes sanguins (notamment les plus complexes ABO et RH), ceci n'est plus le cas car il arrive que les antigènes ne soient pas les produits primaires des gènes (Veldhuisen *et al.* **2009**). Pour le système Duffy par exemple, il existe des phénotypes FY2 faible et FY2 nul associés à d'autres mutations ayant une incidence sur l'expression du gène correspondant (Castilho **2007** ; Olsson *et al.* **1998**).

1.2.3. Exemples de groupes sanguins mineurs

Les caractéristiques des groupes sanguins mineurs étudiés lors de cette thèse sont reportées ci-après. Elles proviennent principalement des ouvrages de Marion Reid et Christine Lomas-Francis (Reid et Lomas-Francis **2004**) et Geoff Daniels (Daniels **2002**).

SYSTEME KELL

Terminologie

Numéro ISBT 006, symbole KEL.

Description générale

Identifié en 1946, suite à l'implication d'anti-KEL1 dans un cas de maladie hémolytique du nouveau-né, le système Kell est composé de 24 antigènes connus, parmi lesquels se trouvent six paires et triplets d'antigènes antithétiques. Ils sont situés sur la glycoprotéine Kell, qui traverse une fois la membrane érythrocytaire et présente un large domaine extracellulaire fortement replié. Le gène *KEL* est localisé sur le chromosome 7, organisé en 19 exons. L'ensemble de ses polymorphismes résultent de SNP.

Polymorphisme KEL1/KEL2 (ou K/k)

Bases moléculaires

Les antigènes KEL1(K) et KEL2 (k) résultent d'un SNP sur l'exon 6 (698C>T) encodant une méthionine à la position 193 pour KEL1 et une thréonine pour KEL2. Ce polymorphisme résulte en une N-glycosylation sur le résidu 191 du variant KEL2 de la protéine Kell, non présente sur le variant KEL1.

Fréquence

KEL1 a une fréquence d'environ 9% dans la population caucasienne, alors que celle de KEL2 est supérieure à 99%.

Phénotypes	KEL: -1,2	KEL: 1,2	KEL: 1,-2
% occurrence dans la population caucasienne	91 %	8,8 %	0,2 %

Importance clinique

Anti-KEL1 est couramment impliqué dans des accidents transfusionnels ou des cas de maladie hémolytique du nouveau-né (MHNN).

	Accident transfusionnel	MHNN
alloanti-KEL1	Faible à sévère / retardé / hémolytique	Faible à sévère (rare)
alloanti-KEL2	Faible à modéré / retardé	Faible à sévère (rare)

Polymorphisme KEL3/KEL4 (KEL21)

Bases moléculaires

L'antigène de haute fréquence KEL4 (Kp^b) présente deux antigènes antithétiques : KEL3 (Kp^a) de fréquence faible et KEL21 (Kp^c) qui est très rare chez toutes les populations. Ils correspondent à deux SNP à des positions différentes sur le même codon (281) : KEL3 correspond au codon TGG codant pour un tryptophane, KEL4 au codon CGG codant pour une arginine et KEL21 au codon CAG pour une glutamine.

Fréquence

Phénotypes	KEL: -3,4	KEL: 3,4	KEL: 3,-4
% occurrence dans la population caucasienne	rare	2,3 %	97,7 %

Importance clinique

	Accident transfusionnel	MHNN
alloanti-KEL3	Faible à sévère / retardé	Faible à sévère
alloanti-KEL4	Aucun à modéré / retardé	Faible à modéré

SYSTEME KIDD

Terminologie	Numéro ISBT 009, symbole JK
Description générale	Identifié en 1951 (découverte d'anti-JK1), le système Kidd est composé de 3 antigènes : le couple antithétique JK1/JK2, auquel s'ajoute l'antigène JK3. La glycoprotéine Kidd est le transporteur membranaire de l'urée des érythrocytes. Elle présente dix domaines transmembranaires, ses extrémités N- et C- terminales étant cytoplasmiques. Le gène <i>JK</i> est localisé sur le chromosome 18, organisé en 11 exons.

Polymorphisme JK1/JK2 (ou Jk^a/Jk^b)	<p>Bases moléculaires</p> <p>JK1 et JK2 résultent du SNP 838G>A qui génère les allèles codominants <i>JK*1</i> et <i>JK*2</i> codant respectivement pour des résidus acide aspartique et asparagine en position 280 de la glycoprotéine Kidd.</p>
---	---

Fréquence

Les deux antigènes JK1 et JK2 sont présents avec des fréquences similaires chez toutes les populations. Notons l'existence d'un phénotype JK :-1,-2, très rare pour l'essentiel des populations.

Antigènes (% occurrence)	Européens	Africains	Asiatiques
JK1	76 %	92 %	73 %
JK2	72 %	49 %	76 %

Importance clinique

Les anticorps anti-JK1 et anti-JK2 sont importants en matière de sécurité transfusionnelle car ils ont déjà été reconnus à l'origine de réactions hémolytiques immédiates ou retardées, sévères voire fatales. Ainsi, en France, le cas tragique d'une incompatibilité immunologique JK1 fatale a été rapporté en 2009, avec une forte imputabilité à une transfusion précédente².

En revanche, peu de cas de MHNN ont été rapportés.

² « Un diagnostic "Incompatibilité immunologique" (JK1) : homme de 50 ans, hospitalisé pour prise en charge d'un choc hémorragique post-traumatique avec hématome de la cuisse gauche, ictère généralisé d'emblée. Anémie profonde et troubles de l'hémostase sur un terrain d'éthylisme chronique non sévère justifient la prescription de PSL. Devant l'inefficacité relative transfusionnelle et en l'absence d'hémorragie extériorisée, l'hypothèse d'une hémolyse aiguë est soulevée, qui sera confirmée par la mise en évidence d'un anticorps anti-JK1 la veille du décès. Malgré la poursuite secondaire de transfusions phéno-compatibles, le patient décèdera au 7ème jour d'hospitalisation. L'enquête réalisée retrouvera la notion de transfusion de CGR 8 mois avant le décès, dans un autre établissement de la région. L'imputabilité est cotée 3. » Source : AFSSAPS Rapport d'hémovigilance 2009

SYSTEME DUFFY

Terminologie Numéro ISBT 008, symbole FY

Description générale Découvert en 1950 (anti-FY1), le système Duffy est composé de 6 antigènes, parmi lesquels se trouve le couple antithétique FY1/FY2. La glycoprotéine Duffy est un récepteur de chémokines, elle possède 7 domaines transmembranaires, une extrémité N-terminale externe glycolisée et une terminaison C-terminale cytoplasmique. Le gène *DARC* (*Duffy Antigen Receptor for Chemokines*) est situé sur le chromosome 1 et organisé en deux exons.

Polymorphisme Bases moléculaires

FY1/FY2

(ou Fy^a/Fy^b)

FY1 et FY2 résultent du SNP 125G>A qui entraîne un changement Gly42Asp dans la séquence de la protéine. Notons que chez les populations africaines il existe un troisième allèle, *FY*FY*, plus commun que *FY*1* et *FY*2*. Celui-ci ne produit pas la glycoprotéine Duffy et donc aucun des antigènes du système. La région codante de l'allèle *FY*FY* est identique à celle de l'allèle *FY*2*, mais une mutation dans la région du promoteur du gène Duffy inactive l'expression du gène.

Il existe également une forme faiblement exprimée de FY2, notée FYX.

Fréquence

Phénotype	Génotype		Fréquence (%)		
	Caucasien et asiatique	Africain	Européens	Africains	Japonais
FY : 1,-2	<i>FY *1/1</i>	<i>FY *1/1</i> ou <i>FY *1/FY</i>	20	10	81
FY : 1, 2	<i>FY *1/2</i>	<i>FY *1/2</i>	48	3	15
FY : -1,2	<i>FY *2/2</i>	<i>FY *2/2</i> ou <i>FY 2/FY</i>	32	20	4
FY : -1,-2		<i>FY *FY/FY</i>	0	67	0

Importance clinique

	Accident transfusionnel	MHNN
alloanti-FY1	Faible à sévère / immédiat / retardé	Faible à sévère (rare)
alloanti-FY2	Faible à sévère / immédiat (rare)/retardé	Faible (rare)

LE SYSTEME MNS

Terminologie Numéro ISBT 003, symbole MNS

Description générale Second système de groupe sanguin découvert, en 1927 par Landsteiner et Levine, le système MNS est hautement complexe et comprend 45 antigènes identifiés aujourd'hui. Parmi eux se trouvent les couples antithétiques MNS1/MNS2 et MNS3/MNS4, étroitement associés l'un à l'autre. MNS1 et MNS2 sont portés par la glycophorine (GPA) et MNS3 et MNS4 par la glycophorine B.

Polymorphisme MNS1/MNS2 (ou M/N) **Bases moléculaires**

Le polymorphisme MNS1/MNS2 est relativement complexe au niveau génétique et entraîne plusieurs différences dans la séquence d'acides aminés des deux antigènes.

Fréquence

Phénotypes	MNS : -1,2	MNS : 1,2	MNS : 1,-2
% occurrence dans la population de race blanche	22 %	50 %	28 %

Importance clinique

Pas d'accidents reportés pour anti-MNS1 et de très rares cas pour anti-MNS2.

Polymorphisme MNS3/MNS4 (ou S/s) **Bases moléculaires**

Un polymorphisme génétique T143C induit une modification Met29Thr sur la glycophorine B, correspondant aux deux antigènes MNS3 et MNS4.

Fréquence

Phénotypes	MNS : -3,4	MNS : 3,4	MNS : 3,-4
% occurrence dans la population de race blanche	45 %	44 %	11 %

Importance clinique

Les anticorps alloanti-MNS3 et -MNS4 ont déjà été impliqués dans des accidents transfusionnels et des cas de MHNN sévère ou fatale.

2. Méthodes de groupage

2.1. Sérologie : détermination du phénotype

Les techniques de typage sanguin utilisées en routine dans les laboratoires d'hématologie sont essentiellement basées sur les réactions d'hémagglutination entre antigènes et anticorps.

Pour la caractérisation du receveur, on identifie son groupe sanguin et on recherche les anticorps irréguliers potentiellement présents dans le sérum qui pourraient réagir avec les hématies transfusées. Pour cela, on utilise un panel d'hématies de référence en tant que réactifs standardisés pour la détection des anticorps présents dans le sérum. Dans certains cas, les anticorps spécifiques seuls suffisent à provoquer l'agglutination des hématies, c'est le cas notamment pour les IgG anti-A et anti-B, on parle de « test d'agglutination directe ». Cependant, pour les recherches d'anticorps irréguliers, il arrive souvent que ceux-ci ne provoquent pas directement l'agglutination. On procède alors à un test d'antiglobuline indirect dont le principe est décrit Figure 2-5. Un second anticorps (anti-globuline humaine) est utilisé afin de promouvoir l'agglutination. Le format du test a été progressivement amélioré et a gagné en fiabilité et praticité : test en tube, sur phase solide (anti-globuline immobilisée sur une microplaque), « gel-test » (microtube contenant une phase gel, préchargée avec les antiglobulines et ne nécessitant pas de lavage) (Lapierre *et al.* 1990), etc.

A l'inverse, pour la caractérisation d'une poche de sang de donneur, ce sont cette fois les antigènes de surface que l'on cherche à identifier à l'aide d'un panel d'anticorps réactifs connus.

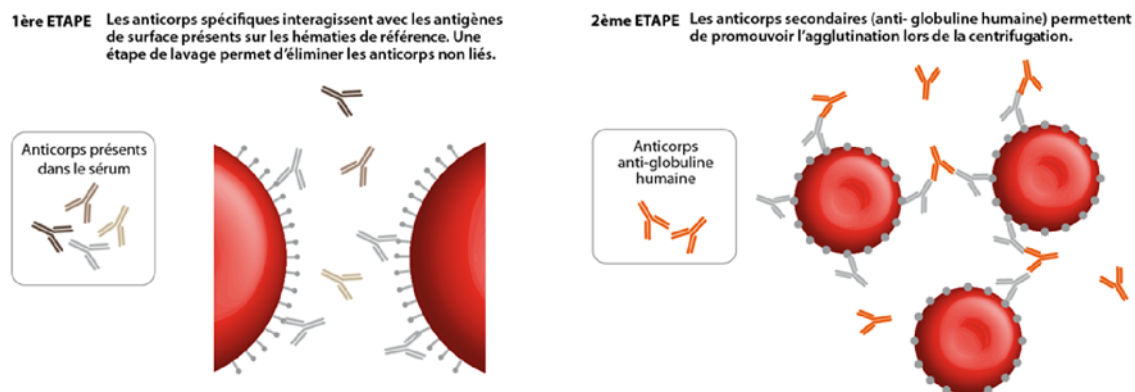


Figure 2-5 Principe du test indirect utilisant l'antiglobuline

2.2. Emergence des techniques de génotypage

L'essor des connaissances concernant les bases moléculaires des groupes ont offert la possibilité d'aller chercher l'information sur les groupes sanguins directement au niveau de l'ADN (Denomme et Flegel 2008). Il s'agit cette fois d'identifier les variants des gènes présents dans l'ADN du patient: on parle de génotypage érythrocytaire.

Dans la plupart des cas, il s'agit d'étudier des systèmes bi-alléliques simples et de déterminer si le patient est homozygote ou bien hétérozygote, comme décrit Figure 2-6.

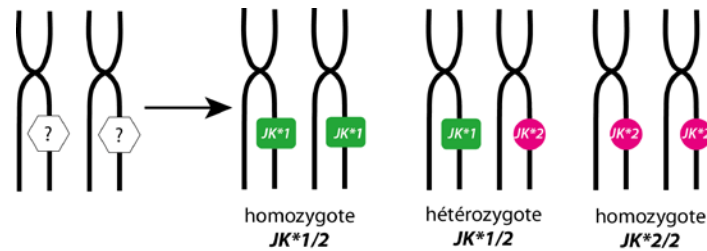


Figure 2-7 Génotypes possibles pour un système biallélique, exemple du système Kidd

Les séquences des deux allèles ne diffèrent souvent que d'un seul nucléotide (SNP) et de nombreuses techniques d'analyse de SNP sont disponibles. Elles nécessitent en général une première phase d'extraction de l'ADN génomique à partir de l'échantillon sanguin puis son amplification. Les puces à ADN en particulier sont des outils de choix pour la détection simultanée de multiples SNP dans le génome du patient par test d'hybridation. La stratégie la plus simple consiste à immobiliser des sondes spécifiques du polymorphisme d'intérêt sur le support et à hybrider directement les séquences cibles amplifiées sur la puce (Figure 2-7). Une des difficultés de ces méthodes est de promouvoir l'hybridation spécifique et diminuer le nombre de faux positifs dus à un nombre important de mésappariements, les séquences polymorphiques étant extrêmement proches.

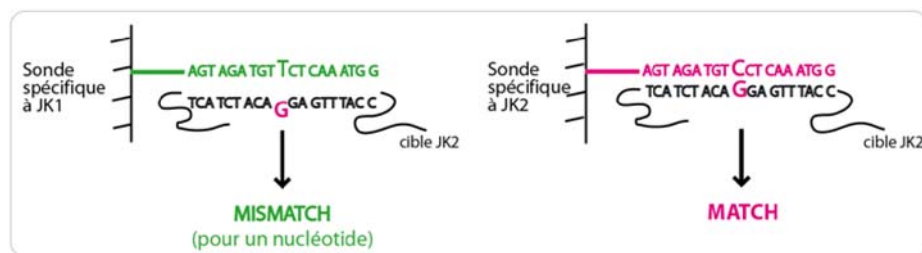


Figure 2-6 Analyse de SNP par hybridation sur puce, exemple du système Kidd

Enfin, dans les rares cas où le phénotype ne peut pas se déduire directement au génotype du fait de l'existence d'allèles nuls ou silencieux (Cf. paragraphe 1.2.2), des faux-positifs peuvent apparaître. S'ils n'ont pas d'incidence clinique pour le typage des donneurs, ils sont en revanche critiques pour le typage des receveurs, c'est pourquoi, dans la mesure où les mutations responsables sont connues, il est important de les inclure au test de génotypage (cas des allèles *FY*FY* et *FY*X* notamment).

2.3. Applications du génotypage érythrocytaire étendu

Le génotypage érythrocytaire est potentiellement supérieur au phénotypage sérologique dans un certain nombre de cas cliniques et de situations pratiques, pour l'essentiel décrites ci-dessous.

Limites sérologiques (anticorps non disponibles, peu réactifs)

Il arrive que les techniques sérologiques ne permettent pas un phénotypage fiable de l'échantillon : les anticorps réactifs sont parfois peu fiables ou peu, voire pas disponibles ; il arrive aussi que les antigènes soient trop faiblement exprimés sur les globules rouges pour être détectés par sérologie. Les méthodes de génotypage peuvent alors apporter une solution alternative. Pour le système Dombrock par exemple, les techniques de génotypage sont utilisées

pour la recherche des antigènes DO1 et DO2 afin de pallier le manque de réactifs fiables pour la sérologie (Reid **2003**).

Screening des donneurs et banque de donneurs rares

Une caractérisation étendue des poches de sang à un plus grand nombre de groupes sanguins mineurs permettrait de façon indubitable une amélioration de la sécurité transfusionnelle. En effet, les antigènes actuellement phénotypés en routine en France sont seulement ceux des groupes majeurs ABO et RH, ainsi que l'antigène KEL1. Pourtant, bien d'autres antigènes ont une importance clinique avérée, si bien que la sérologie de routine recommandée en Europe concerne au minimum ABO, RH, Kell, Duffy, Kidd et MNS. L'extension du typage à un plus grand nombre d'antigènes érythrocytaires permettrait de mieux prévenir les accidents transfusionnels immédiats ou retardés ainsi que les alloimmunisations, en optimisant la compatibilité entre donneur et receveur.

La mise en place d'un typage étendu à l'échelle des banques du sang nécessite cependant le développement de plateformes de criblage haut-débit et les tests de phénotypage sérologiques sont difficilement adaptables à grande échelle : il s'agit de tests monoparamétriques laborieux, et les coûts en anticorps réactifs s'avèreraient particulièrement élevés et rédhibitoires. Les tests basés sur les acides nucléiques apparaissent ici comme une alternative particulièrement intéressante puisque leur adaptation au haut-débit est nettement mieux maîtrisée, notamment via la technologie des puces à ADN qui donne accès aux tests multiparamétriques.

L'intégration de tests de génotypage étendu à haut-débit dans les centres de qualifications du don permettrait la mise en place d'une banque de sang mieux caractérisée, et un stockage de ces informations *in silico* augmenterait l'efficacité de la sélection des poches par la mise en place par exemple d'une recherche électronique de poche compatible (Avent **2009a**). Le bénéfice serait d'autant plus perceptible pour la recherche de phénotypes rares. En effet, dans le cas d'un receveur de phénotype rare, les procédures actuelles de recherche d'une poche compatible sont fastidieuses et coûteuses, puisqu'elles consistent à typer en aveugle différentes poches jusqu'à l'obtention d'une comptabilité. La création d'une bibliothèque de donneurs rares pré-identifiés permettrait de résoudre plus rapidement ces impasses transfusionnelles (Peyrard *et al.* **2008**).

Groupage sanguin des patients polytransfusés et/ou récemment transfusés

Le typage étendu de patients multitransfusés, tels que les patients atteints de drépanocytose (Castilho *et al.* **2002**), est souvent nécessaire autant pour identifier leurs propres anticorps que pour leur fournir un sang compatible afin d'éviter une alloimmunisation, mais il est rendu difficile par la présence d'hématies du donneur dans l'échantillon ainsi que de nombreux alloanticorps. Le même problème se présente pour les patients récemment transfusés (Reid *et al.* **2000**). Cependant, il apparaît que les tests de génotypage révèlent, pour un ADN préparé à partir du sang du patient récemment transfusé, le génotype du patient et non celui du donneur (probablement du fait du faible nombre de cellules nucléées dans le sang transfusé).

Génotypage foetal

Le génotypage est appliqué dans la prédiction du risque de maladie hémolytique du nouveau-né (cas d'une grossesse alloimmunisée). La forme la plus sévère est causée par les anticorps de la mère dirigés contre les antigènes du système RH (D, c) et contre l'antigène KEL1 présents sur les globules rouges du fœtus (Daniels et Bromilow **2007**).

Standardisation du panel d'hématies de référence

Kappler-Gratias *et al.*, du Centre national de référence sur les groupes sanguins à l'Institut national français de la transfusion sanguine, ont étudié l'impact des méthodes de génotypage pour la caractérisation du panel d'hématies de référence utilisées comme réactifs pour le criblage et l'identification des anticorps (Kappler-Gratias *et al.* 2010). Les auteurs sont arrivés à la conclusion que le génotypage étendu haut-débit permettait d'améliorer la qualité du panel d'hématies de référence et que le génotypage devrait à terme remplacer l'un des deux tests de phénotypage imposées par la loi, moyennant toutefois le développement d'une technologie à bas coût. En France, plus d'une vingtaine d'antigènes appartenant aux groupes RH, Kell, Duffy, MNS, Lewis, P et Lutheran doivent être analysés.

2.4. Le génotypage érythrocytaire en routine : une réalité ?

Il est maintenant admis au sein de la communauté de la transfusion sanguine mondiale que ces techniques d'immunohématologie moléculaire sont des outils à très fort potentiel pour la sécurité et la fiabilité du dépistage transfusionnel (van Der Schoot *et al.* 2009). Pour le moment, ces techniques sont utilisées principalement en laboratoire de recherche et occasionnellement pour la confirmation d'un phénotype. Certaines limites perdurent en ce qui concerne le typage de patients : risque de faux positifs dus à des allèles nuls, existence de variants non identifiés, etc (van Der Schoot *et al.* 2009). Par ailleurs la longueur du test (imposée en général par l'étape d'amplification d'ADN) ne permet pas la gestion des situations d'urgence.

En revanche, l'apport des méthodes de génotypage érythrocytaire pour le typage des donneurs n'est plus à démontrer et il est acquis que les techniques de génotypage seront implémentées à plus ou moins court terme dans les centres de qualification du don du sang (Avent 2009b). La question encore en suspens est de savoir dans quelles proportions le génotypage haut-débit remplacera les pratiques de sérologie actuellement en vigueur (Wagner 2009 ; Hustinx *et al.* 2009 ; Schönitzer 2009 ; Storry et Olsson 2009 ; van Der Schoot *et al.* 2009). Si certains envisagent un remplacement total de la sérologie, il est plus probable que les techniques de génotypage s'intégreront en complément des techniques sérologiques, en premier lieu pour le typage des groupes sanguins mineurs. En ce qui concerne le typage ABO, il est peu probable que les tests par génétique moléculaire soient utilisés : les tests sérologiques sont rapides et fiables alors que les bases génétiques sont complexes avec de nombreux variants (Anstee 2009). De plus, un ultime test de compatibilité direct par sérologie sera toujours maintenu au lit du patient.

Toutefois, les experts s'accordent surtout sur le fait que l'intégration du génotypage étendu haut-débit en routine ne pourra se faire que lorsque sera disponible une plateforme fiable, concurrentielle d'un point de vue économique et facile à mettre en œuvre dans les laboratoires (Veldhuisen *et al.* 2009). Le cas échéant, la plateforme technologique devra d'abord faire l'objet d'études pilote sur site et se concentrera à long terme sur le criblage des donneurs récurrents (Hillyer *et al.* 2008). L'intégration de tests basés sur les acides nucléiques à haut-débit a déjà été réalisée avec succès dans les établissements de transfusion sanguine pour le dépistage de pathogènes (Avent 2009a).

3. Solutions de génotypage érythrocytaire

3.1. Etat de l'art

Depuis une dizaine d'années, les solutions de génotypage érythrocytaire se multiplient dans la littérature, à l'échelle mondiale, reflétant l'engouement général pour le génotypage érythrocytaire comme technique de choix pour le groupage sanguin étendu.

Les polymorphismes de groupes sanguins résultent pour la plupart de polymorphismes génétiques d'un unique nucléotide (SNP). Ceux-ci peuvent être analysés grâce à différentes techniques basées sur une amplification des séquences d'ADN cibles par PCR (Denomme **2009** ; Monteiro *et al.* **2011**). Les techniques bas-débit mises en œuvre furent d'abord la RFLP-PCR et la PCR allèle-spécifique. Aujourd'hui la PCR en temps réel, qui permet de suivre quantitativement l'amplification d'ADN, est la plus couramment utilisée. Par ailleurs, les techniques de PCR multiplexée (PCR MPX) permettent d'augmenter le débit d'analyse en amplifiant de manière simultanée plusieurs séquences cibles grâce à plusieurs couples d'amorces. Elles permettent une économie de temps et de réactifs. Toutefois, les conditions d'amplification sont difficiles à mettre au point et il faut notamment optimiser les amorces afin d'obtenir des températures de fusion proches.

Plus récemment, les recherches se sont orientées vers le développement de techniques haut-débit, en réponse au besoin d'une analyse haut-débit à faible coût pour l'implantation durable du génotypage en laboratoire d'analyse, en particulier pour le criblage de donneurs. Ces techniques multiparamétriques permettent d'analyser jusqu'à plusieurs dizaines de SNP en même temps et associent en général une étape de PCR multiplexe à l'analyse des produits sur une plateforme haut-débit. Différentes situations sont rencontrées dans les laboratoires d'hématologie : utilisation de plateformes commerciales de génotypage de SNP, développement de solutions originales utilisées en interne ou destinées à la commercialisation. Le Tableau 2-3 donne une vue d'ensemble des principales technologies disponibles.

Les technologies basées sur l'utilisation de biopuces se sont vite révélées attractives en offrant la possibilité d'une analyse multiparamétrique. Deux outils de type biopuces exclusivement dédiés au génotypage érythrocytaire ont déjà fait leur apparition sur le marché : BLOODChip® et HEA BeadChip™. On reproche cependant souvent aux techniques de type biopuces un coût de revient encore trop élevé et un manque de flexibilité concernant la modification de la matrice de sondes utilisée.

Dans cette partie, nous détaillerons le principe des différentes technologies mises en œuvre pour le génotypage érythrocytaire en portant un intérêt particulier aux outils de type biopuce.

Tableau 2-3 : Comparatif des solutions de génotypage éthrocytaire étendu

Nom du dispositif	Caractéristiques techniques	Référence	Systèmes sanguins et antigènes recherchés	Nombre paramètres	
BLOODChip® 2.0 (Progenika)	<ul style="list-style-type: none"> Hybridation sur puce (lame de verre) Détection par fluorescence 6 à 8h de traitement 	(Avent <i>et al.</i> 2009 ; Avent <i>et al.</i> 2007) www.progenika.com	ABO (58 génotypes) MNS (1,2,3,4,5,7) RH (DCE) KEL (1,2,3,4,6,7,20,21) FY (1,2)	JK (1,2) DI (1,2) DO (1,2) CO (1,2)	128 SNP
HEA BeadChip™ (BioArray Solutions)	<ul style="list-style-type: none"> Matrice de billes Détection par fluorescence 8 à 96 échantillons par run, 192 échantillons en 8h 	(Hashmi <i>et al.</i> 2007)	MNS (1,2,3,4) LU (1,2) KEL (1,2) FY (1,2, Fy ^w , Fy ^{null}) JK (1,2)	DI (1,2) SC (1,2) DO (1,2,5) CO (1,2) LW (5,7)	18 SNP
		(Kappler-Gratias <i>et al.</i> 2011)	RH (CE) MNS (1,2,3,4) LU (1,2) KEL (1,2,3,4,6,7) FY (1,2) JK (1,2)	DI (1,2) SC (1,2) DO (1,2,4,5) CO (1,2) LW (5,7)	34 antigènes
GenomeLab SNP Stream (Beckman Coulter)	<ul style="list-style-type: none"> Marquage par élongation multiplexe d'un nucléotide Hybridation sur puce Détection par fluorescence 	(Denomme et Van Oene 2005)	RH (DCE) MNS (3,4) KEL (1,2,3,4)	FY (1,2, Fy ^{null}) JK (1,2) DI (1,2)	12 SNP
		(St-Louis <i>et al.</i> 2010)	RH (CE) MNS (1,2,3,4) KEL (1,2,3,4)	FY (1,2) JK (1,2)	16 antigènes
xMAP® (Luminex®)	<ul style="list-style-type: none"> Matrices de billes en suspension Détection par fluorescence Cycle de 5h pour 96 échantillons Estimation à 3€/ SNP 	(Karpsitou <i>et al.</i> 2008 ; Drago <i>et al.</i> 2009)	MNS (3,4) LU (1,2) KEL (1,2,3,4,6,7)	FY (1,2) JK (1,2) CO (1,2)	8 SNP 16 antigènes
SNaPshot (Applied Biosystems)	<ul style="list-style-type: none"> Marquage par élongation multiplexe d'un nucléotide Détection par fluorescence en électrophorèse capillaire Cycle de 24h pour 96 échantillons Estimation à 2\$/ SNP 	(Di Cristofaro <i>et al.</i> 2010)	MNS (3,4,5) KEL (1,2) FY (1,2, Fy ^w , Fy ^{null}) JK (1,2)	DO (1,2) YT (1,2) CO (1,2)	9 SNP

3.2. Systèmes de type biopuce

3.2.1. BLOODChip®

La puce BLOODChip® dédiée au génotypage érythrocytaire étendu et commercialisée par Progenika (www.progenika.com), a été développée dans le cadre d'un projet européen collaboratif. Intitulé BloodGen (2003-2006), il associa deux banques de sang (Barcelone, Prague) à des instituts de recherche académiques britanniques (University of the West of England, Bristol Institute for Transfusion (Royaume-Uni), néerlandais (Sanquin), allemand (Ulm) et suédois (Lund). Le consortium comprenait également deux partenaires industriels, l'espagnol Progenika Biopharma SA et l'allemand Biotest en charge de l'intégration sur une plateforme technologique d'analyse de SNP existante. Dans sa version 2.0 qui a reçu le marquage CE, BLOODChip® permet d'analyser 128 SNP associés à neuf groupes sanguins et certains antigènes plaquettaires (Tableau 2-3).

Principe

Les séquences cibles d'intérêt sont amplifiées à partir de l'ADN génomique extrait grâce à une technique de PCR multiplexe par hybridation de sondes amplifiables développée par Beiboer *et al.* (Beiboer *et al.* 2005). L'ADN extrait est mélangé à un jeu de fragments de séquences spécifiques des polymorphismes recherchés : si la séquence cible est présente dans l'échantillon, alors le fragment s'hybride sur l'ADN génomique. Une étape de lavage permet d'isoler les fragments hybridés et de les amplifier. Les produits de PCR sont ensuite marqués par deux fluorophores (Cyanine), fragmentés, et enfin hybridés sur la puce BLOODChip® en conditions stringentes. La puce est constituée d'une lame de verre sur laquelle est immobilisée une matrice de sondes spécifiques : les cibles s'hybrident avec les sondes de séquences complémentaires. La puce est imagée grâce à un scanner de fluorescence, et les signaux obtenus sont analysés grâce à un logiciel dédié afin de déterminer un score associé aux différents allèles, et remonter ainsi au génotype associé. Six à huit heures de traitement sont nécessaires pour aboutir aux résultats à partir de l'ADN extrait.

Tableau 2-4 Validation de BLOODChip® pour la certification européenne sur 3000 échantillons (40% patients transfusés, 10% patients AB, 2% nouveaux-nés et 2% variants D faible) Source : www.progenika.com

	Groupe sanguin	Echantillons	BLOODchip® v2.0	Sérologie
Liste A / Annexe II	Rh (D)	3000	2998 (99,93%)	2978 (99,2%)
	Rh (C, c)	1000	999 (99,9%)	995 (99,5%)
	Rh (E, e)	1000	1000 (100%)	997 (99,7%)
	Kell (K)	1000	1000 (100%)	1000 (100%)
Liste B / Annexe II	Kidd (JkA/B)	597	597 (100%)	596 (99,81%)
	Duffy (FyA/B)	506	506 (100%)	498 (99,4%)
Groupes sanguins autocertifiés	Kell(KpA, KpB)	358	357 (99,7%)	358 (100%)
	Kell (JsA, JsB)	123	123 (100%)	122 (99,2%)
	MN	445	445 (100%)	425 (95,5%)
	Ss	483	483 (100%)	479 (99,2%)
	Diego	120	120 (100%)	120 (100%)
	Dombrock	120	120 (100%)	120(100%)
	Colton	170	170 (100%)	169 (99,4%)

Validation

Après des essais cliniques à petite échelle sur des panels de donneurs rares en Espagne, Allemagne, République Tchèque, et Suède, une validation sur 3000 donneurs a permis l'obtention du marquage CE (Tableau 2-4). Confrontés à la sérologie et à d'autres méthodes de typage moléculaires, les résultats ont mis en évidence une excellente performance de BLOODChip® v2.0 pour la prédiction du phénotype érythrocytaire étendu.

3.2.2. HEA BeadChip™

Développé par BioArray Solutions Ltd. (détenu par Immucor Inc.), la puce HEA BeadChip™ propose une solution de génotypage étendu pour 11 groupes sanguins (Tableau 2-3) ainsi qu'un panel d'antigènes plaquettaires (<http://www.immucor.com/bioarray>). Ce produit a reçu l'aval de la *Food and Drug Agency* et a obtenu le marquage CE en juillet 2010. Il a notamment fait l'objet d'une évaluation sur quatre sites hospitaliers pour la mise en œuvre du génotypage étendu en routine (le typage était externalisé chez BioArray Solutions) (Klapper *et al.* 2010).

Principe (Hashmi *et al.* 2005)

Il s'agit d'un test d'hybridation sur une matrice de billes dont le principe est exposé Figure 2-8. La puce est fabriquée comme suit. Des microbilles (3 µm de diamètre) présentant des groupements acides carboxyliques sont fonctionnalisées avec les oligonucléotides sondes possédant un bras aminé (environ 20 bases). Chaque bille porte une cinquantaine de copies d'une unique sonde, dont l'extrémité 3' est spécifique d'un polymorphisme cible donné. Les différentes billes en suspension sont rassemblées (environ 4000 billes) puis déposées sur un support de silicium sur lequel elles s'immobilisent en formant une monocouche. Les matrices sur silicium sont individualisées puis assemblées sur lame de verre en format 8x1 ou 8x12, permettant ainsi de tester plusieurs échantillons en parallèle. Chaque bille possède un codage optique qui permet son identification par imagerie spectrale de la matrice, et donc celle de la séquence sonde présente à sa surface.

Après extraction de l'ADN génomique, les séquences comprenant les polymorphismes d'intérêt sont amplifiées par PCR multiplexe, purifiées et dénaturées. Le mélange d'amplicons est ensuite hybridé sur la matrice de billes puis on procède au marquage fluorescent des doubles brins formés par une étape d'élongation enzymatique de la sonde. L'élongation ne peut se faire qu'en cas de complémentarité parfaite entre sonde et cible : l'incorporation d'un nucléotide marqué (cystéine) marque spécifiquement les doubles brins. Les génotypes sont obtenus en comparant les intensités de fluorescence obtenus pour les deux allèles concernés à un panel de valeurs de référence (plus précisément le paramètre considéré est la différence d'intensité entre les deux allèles normalisée).

Validation et applications cliniques

Les principales études de validation de HEA BeadChip™ publiées ont été effectuées en collaboration avec l'équipe de Marion Reid du Laboratoire d'Immunohématologie du *New York Blood Center* (Hashmi *et al.* 2005 ; Hashmi *et al.* 2007). En 2007, les équipes présentent ainsi les résultats d'une étude menée sur 2355 patients appartenant à des ethnies multiples, pour l'analyse de 24 antigènes érythrocytaires (plus un panel d'antigènes plaquettaires) concordante à 99,5% avec les résultats sérologiques (Tableau 2-3).

Le test HEA BeadChip™ (version 1.2) a également été mis en œuvre par Kappler-Gratias *et al.* (Kappler-Gratias *et al.* 2010 ; Kappler-Gratias *et al.* 2011) pour l'évaluation des méthodes moléculaires dans la qualification des hématies utilisées en tant que réactif sur l'exemple du panel national de référence français. Le test de génotypage a ainsi permis d'analyser 34 antigènes de 11 systèmes sanguins différents pour un panel de 365 donneurs. La comparaison du phénotype prédit par le résultat de génotypage et du phénotype sérologique pour 25 de ces antigènes s'est avérée concordante dans 99.95% des cas (Tableau 2-3).

Des équipes brésiliennes ont également rapporté l'utilisation de HEA BeadChip™ comme technique de référence dans une étude évaluant l'impact des méthodes de génotypage étendu pour le suivi d'un panel de patients multitransfusés (Guelsin *et al.* 2010), ainsi que pour le suivi de patients atteints de déranocytose (Castilho *et al.* 2002).

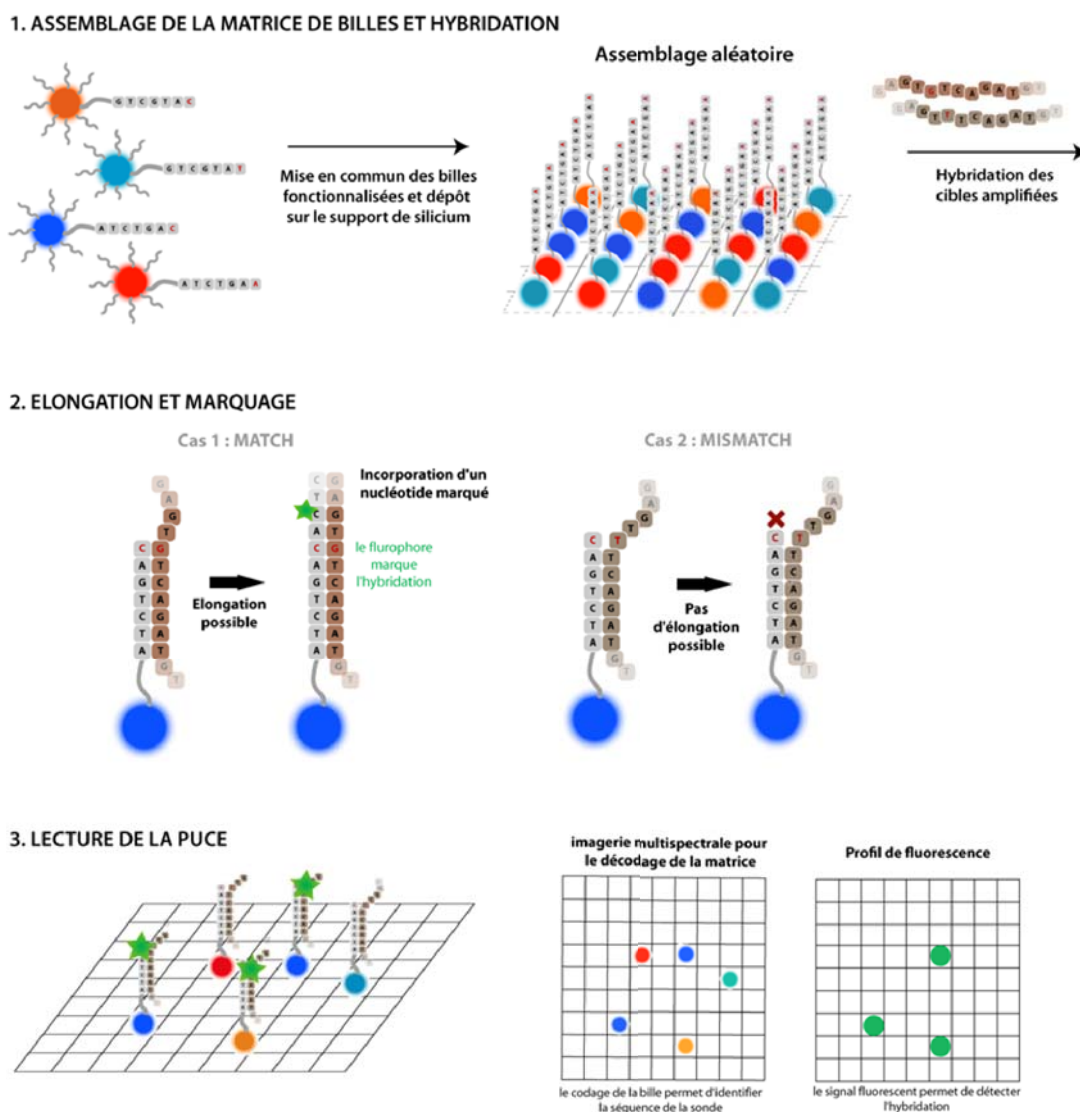


Figure 2-8 Principe des puces HEA-Bead Chip 1. Les matrices de billes fonctionnalisées avec les séquences sondes sont assemblées sur le support en silicium (1 bille = 1 codage optique = 1 séquence sonde). 2. Lorsqu'il y a hybridation sur la bille, le duplex est marqué par élongation de la sonde en présence de nucléotides fluorescents. 3. La double lecture de la puce permet de décoder les billes et de déterminer si l'hybridation a eu lieu.

3.2.3. Genome Lab SNP Stream

La plateforme GenomeLab SNP Stream, commercialisée par Beckman Coulter, utilise la technologie SNPstream[®] UHT, développée par Orchid BioScience pour des applications de génotypage ultra haut-débit en pharmacogénomique et au criblage de médicaments (Bell *et al.* 2002). Elle associe une amplification par PCR multiplexe à une étape de marquage fluorescent par élongation, suivie d'une hybridation sur puce. Les équipes canadiennes de Gregory Denomme (Toronto) et Maryse St-Louis (Québec) ont développé les outils de biologie moléculaire nécessaires au transfert de cette technologie au génotypage érythrocytaire étendu (Denomme et Van Oene 2005 ; St-Louis *et al.* 2010).

Principe

Le format de la puce est celui d'une plaque 384 puits classique, présentant sur chaque fond de puits une matrice de sondes identique, ce qui permet de tester 384 échantillons en parallèle. Les oligonucléotides sont greffés de façon covalente sur un support en verre activé par le 3-mercaptopropyl-triméthoxysilane (MPTS) puis l'application d'un masque en néoprène permet d'individualiser les 384 puits. Chaque matrice comprend 16 sondes immobilisées : quatre sont dédiées à des contrôles (positifs et négatifs) et les 12 autres correspondent à l'un des SNP étudiés.

Chaque test permet de rechercher la présence de deux nucléotides (parmi les quatre possibles) à la position du polymorphisme. Pour chaque SNP recherché, on utilise un fragment SNP-IT construit de la façon suivante : la séquence à l'extrémité 3' du fragment est complémentaire à l'une des sondes immobilisées en fond de puits ; la séquence à l'extrémité 5' du fragment est complémentaire à la cible et immédiatement adjacente au site du SNP (Figure 2-9).

La première étape du test consiste en une PCR multiplexe, afin d'amplifier les séquences spécifiques des différents polymorphismes d'intérêt à partir de l'ADN extrait. Les amplicons sont mélangés avec l'ensemble des fragments « SNP-IT » avec lesquels ils s'apparient par hybridation spécifique. On procède ensuite à élongation enzymatique multiplexe des fragments d'une seule base (au site du SNP), en présence de deux didéoxynucléotides marqués, l'un par la BODIPY-fluorescéine, l'autre par le marqueur TAMRA. Suivant la nature de la base présente sur la cible au site du SNP, l'élongation incorporera l'un ou l'autre des fluorophores. Enfin, le mélange réactionnel est incubé sur la puce et l'extrémité 5' du fragment s'hybride avec la sonde immobilisée de séquence complémentaire. Un lecteur de plaque permet de lire l'intensité de fluorescence pour chaque sonde sur chacun des spots et de remonter automatiquement au génotype.



Figure 2-9 GenomeLab SNP Stream : structure du fragment utilisé pour l'élongation d'un nucléotide en cas d'appariement (un fragment spécifique par SNP)

Validation et applications cliniques

En 2005, Denomme *et al.* (Denomme et Van Oene **2005**) rapportent l'analyse de 372 échantillons pour 12 SNP associés aux groupes sanguins érythrocytaires RH, MNS, KEL, FY, JK, DI (et un antigène plaquettaire) avec une concordance supérieure à 98% pour 11 paramètres sur 12 (Tableau 2-4).

Le groupe de Maryse St-Louis d'Héma-Québec s'est également intéressé au développement de cette technologie. En 2006, une étude de Monpetit *et al.* porte sur l'analyse de 22 antigènes érythrocytaires mineurs (RHCE, KEL, FY, JK, MNS) et trois antigènes plaquettaires (Monpetit *et al.* **2006**). Dans le cadre de cette étude, les échantillons de sang étaient recueillis par le biais de cartes papier FTA[®]. De très bons résultats (concordance > 97%) ont été obtenus malgré les quantités variables d'ADN recueillies.

S'en est suivi à Héma-Québec un projet de criblage de donneurs réguliers impliquant 21 000 donneurs en moins de deux ans (St-Louis *et al.* **2010**) (Tableau 2-3). Une concordance de 99,6% a été obtenue avec 55% des cas de discordance résolus en faveur du génotypage. Cette étude a également permis d'évaluer l'impact de l'implémentation en routine des techniques de génotypage érythrocytaire dans un laboratoire d'analyse (Perreault *et al.* **2009**).

3.3. Autres techniques

3.3.1. Matrices de billes en suspension (xMAP[®], Luminex[®])

Le groupe de F. Poli, de l'Hopital Maggiore Polyclinique à Milan, a développé une technologie de génotypage érythrocytaire (Drago *et al.* **2009** ; Karpasitou *et al.* **2008**) basée sur la plateforme d'analyse xMAP[®] de Luminex[®] Corp. (<http://www.luminexcorp.com>).

La technologie xMAP[®] repose sur l'utilisation de matrices en suspension, un ensemble de microbilles de polystyrène comme support d'immobilisation des oligonucléotides sondes. Chaque bille de 5,6 microns de diamètre possède un codage optique particulier qui permet son identification lors de l'analyse des résultats : elle incorpore un mélange de deux fluorophores (émission à 658 et 712 nm) en différentes proportions qui lui confère une signature spectrale unique (jusqu'à 500 codes différents). Des agents de capture (anticorps, oligonucleotides, peptide...) sont immobilisés par couplage covalent à leur surface, chaque bille étant porteuse d'une sonde spécifique, et permettent la détection des analytes dans l'échantillon (Figure 2-10 a).

Dans le cas présent (Drago *et al.* **2009** ; Karpasitou *et al.* **2008**), les auteurs ont greffé des oligonucléotides sondes (18-20^{mères}) fonctionnalisés par une amine en 5' sur des billes de polystyrène en activant par un carbodiimide les groupements acide carboxylique présents en surface. Les séquences cibles sont amplifiées et marquées par une biotine lors d'une étape de PCR multiplexe. Le mélange non purifié, transféré dans un plaque 96 puits, est ensuite dénaturé puis hybridé sur les billes. Après lavage, une étape d'incubation avec des molécules de streptavidine conjuguées à la R-phycoérythrine permet le marquage des cibles, et donc celui des billes où l'hybridation a eu lieu.

Le principe de l'analyse dérive de la cytométrie en flux : l'alignement des microbilles en suspension à l'entrée de la chambre de détection permet une analyse individuelle des particules. Un laser ($\lambda = 635$ nm) excite les fluorophores contenus dans la bille, permettant son décodage et donc l'identification de la séquence sonde immobilisée en surface, tandis qu'un second laser ($\lambda = 532$ nm) permet de détecter si l'hybridation a eu lieu.

Le traitement de 96 échantillons se réalise en moins de 5h (extraction non comprise), avec un coût par SNP et par échantillon inférieur à 3 €. Cette technique permet une importante standardisation des tests en comparaison d'un système de type biopuce : les différentes billes en solution sont traitées dans des conditions identiques et le signal enregistré lors de l'analyse est moyenné sur de nombreuses billes. Par ailleurs, les auteurs apprécient l'absence de purification des amplicons et la large gamme de concentration d'ADN accessible, mais déplorent cependant l'automatisation limitée du procédé, notamment pour les transferts d'échantillons et les lavages.

Dans leur étude, les auteurs s'intéressent aux groupes sanguins mineurs MNS, KEL, LU, FY et CO (Tableau 2-3). L'analyse de 232 échantillons a permis d'établir un panel de valeurs de fluorescence de référence, validé par la suite par le typage en aveugle de 92 donneurs.

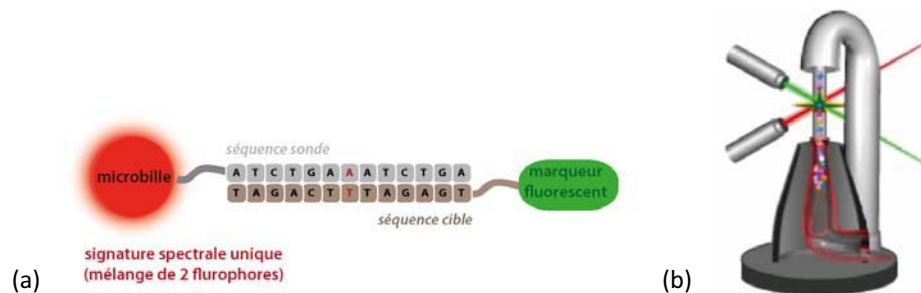


Figure 2-10 Technologie xMAP® de Luminex (a) Chaque bille, identifiable par un codage optique, porte une séquence sonde définie. (b) Deux lasers permettent de décoder la bille et de détecter l'hybridation (source : <http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/index.htm>)

3.3.2. SNaPshot reaction

Développé par Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), le procédé SNaPshot repose à nouveau sur une étape d'élongation multiplexe d'un seul nucléotide, suivant un protocole analogue à celui décrit précédemment pour GenomeLab SNP Stream (Cf. paragraphe 3.2.3). Cependant, la détection est ici réalisée par électrophorèse capillaire et non par hybridation sur une puce à oligonucléotides. Les séquences d'ADN cibles sont amplifiées par PCR multiplexe, puis mélangés à un jeu de fragments d'élongation complémentaires en 5' du polymorphisme. S'ensuit une étape d'élongation enzymatique du fragment d'un nucléotide terminal. Les quatre types de didésoxyribonucléotides marqués sont ici utilisés, avec 4 fluorophores différents suivant la nature de la base incorporée en 3'. L'électrophorèse capillaire couplée à une détection de fluorescence permet d'analyser la fluorescence ainsi que la longueur des produits, et de remonter à la nature du SNP. Le cycle complet, qui permet d'analyser jusqu'à 10 SNP en parallèle, dure 24 h pour un coût de revient estimé à 2 dollars par SNP.

Cette technique a notamment été mise en œuvre par Palacajornsuk *et al.* (Palacajornsuk *et al.* 2009) du New York Blood Center (17 SNP : MNS, LU, KEL, FY, JK, DI, DO, CO, SC, LW) et par Di Cristofaro *et al.* (Di Cristofaro *et al.* 2010) à l'Établissement Français du Sang d'Alpes-Méditerranée (9 SNP : KEL, FY, MNS, JK, DO, YT) (Cf. Tableau 2-3).

Chapitre 3. Développement d'un outil d'analyse multiparamétrique haut-débit

Les travaux se sont principalement concentrés sur le développement d'outils d'analyse multiparamétrique à haut-débit basés sur la technologie des biopuces (test d'acides nucléiques et immunologiques), pour la caractérisation d'échantillons biologiques et le diagnostic médical. Ils ont notamment débouché sur la mise au point d'un outil de dépistage transfusionnel haut-débit (génotypage érythrocytaire étendu) en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes (EFS-RA).

Après une vue d'ensemble du système et la description de sa mise au point, nous décrirons les preuves de concept effectuées concernant les puces à oligonucléotides et à protéines. Nous reviendrons plus précisément sur l'outil de génotypage érythrocytaire et sa validation sur un panel étendu. Enfin, nous présenterons une nouvelle méthode de détection colorimétrique.

1. Présentation de l'outil d'analyse haut-débit

1.1. Vue d'ensemble

L'outil de test haut-débit a été développé pour le génotypage érythrocytaire à partir du cahier des charges suivant : le support devait permettre une analyse multiparamétrique, sensible, à haut-débit et à faible coût de revient (Figure 3-1).



Figure 3-1 Stratégie de développement d'un outil de génotypage érythrocytaire à bas-coût

Analyse sur biopuce

On attend aujourd'hui des nouveaux tests d'analyse biologique qu'ils soient multiparamétriques et permettent d'obtenir un nombre d'informations supérieur en un temps réduit, aussi bien dans le domaine du diagnostic que pour des applications de criblage (génotypage, biomarqueurs, médicaments). La technologie des biopuces présente un très fort potentiel pour le développement de nouveaux outils d'analyse multiparamétrique, surtout pour les tests d'hybridation d'acides nucléiques, puisque la technologie des puces à ADN est aujourd'hui particulièrement bien maîtrisée. Une biopuce à basse densité (50 paramètres environ) a ici été utilisée.

Automatisation

Afin d'assurer un haut débit d'analyse, l'outil développé adopte un format classique de microplaque à 96 puits, pris en charge par les chaînes robotiques standard. Dans cette configuration, une matrice de sondes est immobilisée au fond de chaque puits qui devient alors un support de test multiparamétrique à part entière (Figure 3-2).

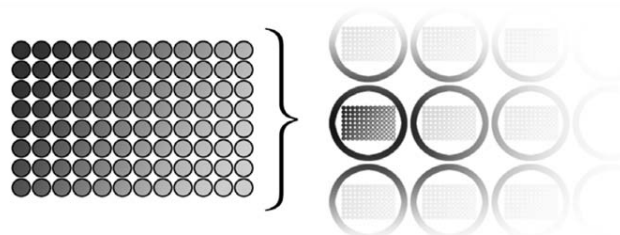


Figure 3-2 Analyse à haut-débit sur plaque 96-puits HiFi™ Le format est celui d'une microplaque 96-puits standard. Une matrice de sondes est immobilisée sur chaque fond de puits, ce qui permet l'analyse multiparamétrique d'un échantillon par puits.

Il devient possible d'analyser dans 96 échantillons simultanément sur une seule plaque, autant de paramètres que de plots présents sur la couche sensible. L'automate utilisé est un appareil EVO75 de Tecan, possédant un bras manipulateur et un bras pipetteur ; il est décrit en détails au paragraphe 2.6.1 du Chapitre 5.

Support poreux

Les microplaques utilisées sont des plaques de filtration Multiscreen HTS-HA commercialisées par Millopore™. Une membrane scellée au fond de chaque puits (puits en plastique sans fond) permet de filtrer les solutions par aspiration déposées dans le puits. Le disque de membrane organique, d'une porosité de 0,45 µm, est constitué d'un mélange de nitrocellulose et d'ester de cellulose. Ce filtre va jouer ici un double rôle (Figure 3-3). D'une part, il sert de support pour l'immobilisation des biomolécules sondes qui sont matricées sur le support poreux et absorbées dans le matériau par capillarité. L'immobilisation en 3D dans la membrane permet d'atteindre des densités de sondes élevées sur la surface. D'autre part, il permet la mise en œuvre d'un protocole de filtration : les échantillons et réactifs dans les puits sont éliminés par filtration à travers la membrane, en appliquant un vide (Cf. Chapitre 5, Figure 5-13). Cette étape de filtration permet de concentrer l'échantillon sur la membrane et le flux unidirectionnel des échantillons dans le puits permet de minimiser le risque de contamination.

Par ailleurs, la spécificité de la plaque HiFi™ est le dépôt des sondes sur la face externe du disque membranaire (Figure 3-3). Le matricage est techniquement plus facile à mettre en œuvre qu'en fond de puits, et cette configuration facilite la lecture du signal en retenant les poussières à l'intérieur du puits et en diminuant le bruit de fond sur la face de lecture, comme ce sera illustré par la suite.

Colorimétrie

La détection de l'interaction repose sur la génération d'un signal colorimétrique par voie enzymatique (phosphatase alcaline). La lecture du signal ne nécessite pas d'instrumentation complexe ce qui permet de réduire fortement le coût du test. De plus, le support s'y prête d'autant mieux que la porosité permet de retenir le précipité coloré formé dans le matériau et que la surface blanche de la membrane fournit un bon contraste pour la lecture. Une image typique du signal obtenu est présentée Figure 3-3 en couleurs réelles. La Figure 3-4 présente l'image d'une plaque entière après révélation du signal, acquise en niveaux de gris grâce à un scanner de bureau, telle qu'elle est utilisée pour l'analyse.

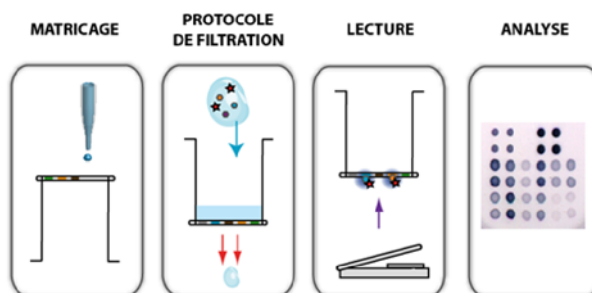


Figure 3-3 Points clés de la technique d'analyse HiFi™ : (i) les biomolécules sondes sont matricées sur la membrane à l'extérieur du puits ; (ii) le protocole d'analyse repose sur un processus de filtration ; (iii) les plots positifs sont relevés par une coloration violette (image en couleur réelles, distance entre les plots 500 µm) ; (iv) une image du fond de la plaque est acquise à l'aide d'un scanner de bureau.

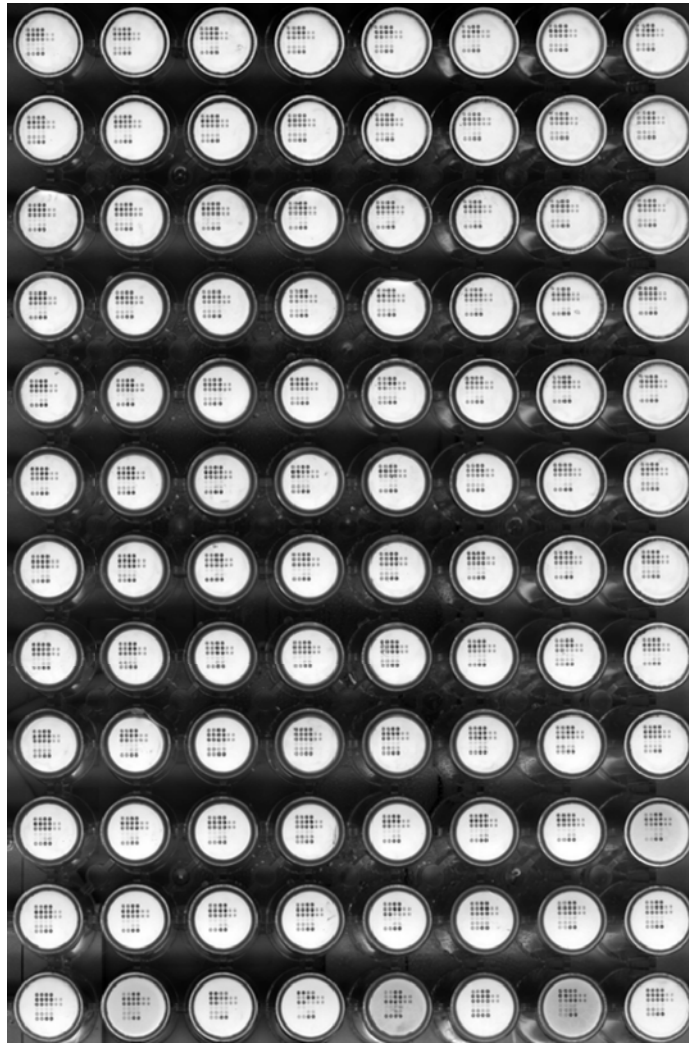


Figure 3-4 **Plaque entière après coloration des plots positifs**
La plaque représentée correspond à un test de génotypage érythrocytaire sur 96 échantillons différents. L'image a été acquise grâce à un scanner HP ScanJet 3770 (Hewlett-Packard), en niveaux de gris, avec une résolution de 2400 dpi.

1.2. Etudes préliminaires et conception de l'outil

Plusieurs séries d'études préliminaires ont abouti à la conception de l'outil définitif : elles ont porté sur le choix du support d'immobilisation, la mise au point de la détection colorimétrique et le passage à l'analyse haut-débit. Ces optimisations ont été effectuées sur des puces à oligonucléotides avec pour objectif l'application au génotypage érythrocytaire.

1.2.1. Choix du support

Les premiers essais furent réalisés en détectant l'hybridation par chimiluminescence du luminol catalysée par la peroxydase de raifort. Il s'agit en effet d'une méthode sensible et quantitative, bien maîtrisée au laboratoire. Pour ce faire, les plots positifs sont marqués par la peroxydase de raifort au moyen d'un système biotine/streptavidine (Figure 3-5) : un jeu d'amorces biotinylées permet d'obtenir des produits d'amplification par PCR présentant eux-mêmes une terminaison biotine et ces cibles sont marquées par des conjugués streptavidine - peroxydase de raifort. Le support recherché devait permettre le matriçage d'une matrice de basse densité et une immobilisation stable des oligonucléotides, qui doivent de plus rester accessibles pour l'hybridation. Deux supports ont fait l'objet d'une évaluation.

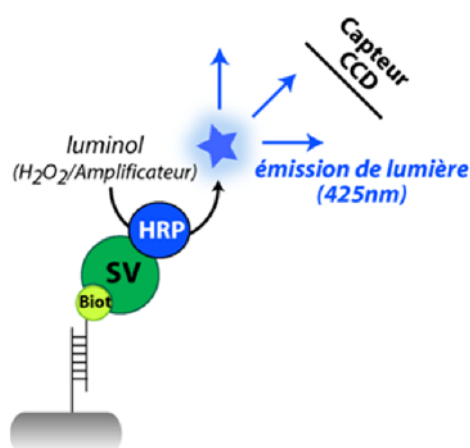


Figure 3-5 Marquage par la peroxydase de raifort et détection de l'hybridation par chimiluminescence

Lame plastique 12 puits

Le premier est un support plastique au format d'une lame de microscope structurée en 12 micropuits. La surface de la lame est activée par une solution de glutaraldéhyde (2 % dans un tampon phosphate 0,1 mol.l⁻¹ pH = 5) avant le matriçage des sondes (terminaison amine) : une matrice de sondes identique est immobilisée de manière covalente dans chaque puits. Différents traitements de la surface après matriçage ont été envisagés : lavage simple, saturation, blocage des fonctions aldéhyde par l'éthanolamine, mais l'immobilisation s'est avérée peu homogène et/ou peu reproductible à chaque fois (Figure 3-6). Seule l'utilisation de tampons commerciaux optimisés pour l'ensemble du protocole d'hybridation a permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

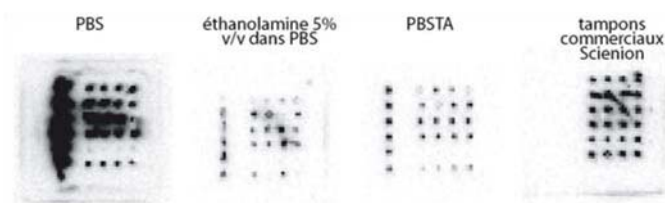


Figure 3-6 Images de chimiluminescence obtenues sur lame plastique à 12 puits activée par le glutaraldéhyde pour un test de génotypage érythrocytaire. Les quatre images correspondent à l'analyse d'un même échantillon dans quatre conditions de traitement de surface différentes. Chaque image correspond à un puits unique, les lignes de quatre plots à droite et la colonne de 6 plots à gauche correspondant à des réplicats d'une même sonde.

Membrane

Le second matériau envisagé comme support d'immobilisation des oligonucléotides fut une membrane poreuse, en l'occurrence la membrane Ultrabind® (Pall) qui possède une trame de polyéthersulfone et des fonctionnalités aldéhyde en surface. Ce support poreux a permis d'obtenir une densité de sondes élevée et une immobilisation stable et reproductible (Figure 3-7). La densité de plots sur la surface est limitée par la diffusion dans le matériau de la goutte déposée, qui impose un diamètre minimum du plot (~ 200 µm dans le cas présent). La densité de plots atteignable est cependant suffisante pour la fabrication des matrices de basse densité.

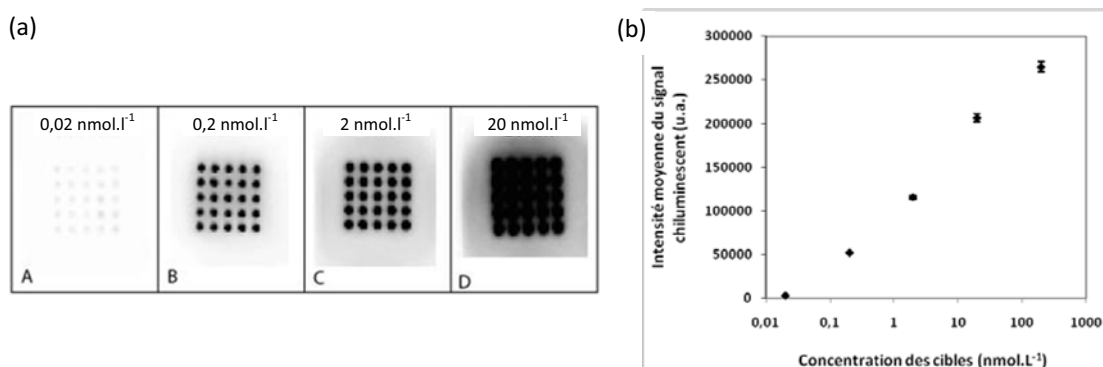


Figure 3-7 Test d'hybridation sur membrane Ultrabind® (un couple d'oligonucléotides synthétiques est utilisé comme modèle sonde/cible) (a) Allure du signal de chimiluminescence pour différentes concentrations de cibles dans l'échantillon (concentration de sondes dans la solution de dépôt : 10 µmol.l⁻¹), tous les plots étant identiques. (b) Quantification des signaux obtenus.

1.2.2. Détection par colorimétrie

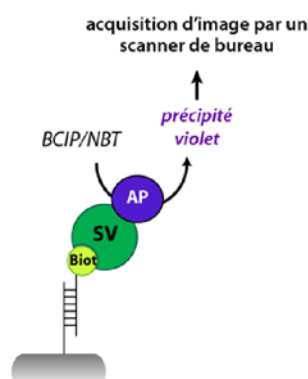


Figure 3-8 Marquage par la phosphatase alcaline et détection de l'hybridation par colorimétrie

Afin de réduire les coûts associés à l'instrumentation requise pour l'acquisition du signal, une stratégie de détection de l'hybridation par colorimétrie a été envisagée. Le marquage par l'enzyme phosphatase alcaline a donné les meilleurs résultats. En présence du substrat approprié (mélange BCIP/NBT), l'enzyme catalyse la formation d'un produit coloré qui précipite sur le plot. Comme précédemment, les plots positifs sont marqués sélectivement par l'intermédiaire du système streptavidine/biotine (Figure 3-8). Un kit prêt à l'emploi de BCIP/NBT (Sigma) permet d'obtenir une coloration violet foncé sur les plots (partant d'une solution jaune pâle).

Des tests d'hybridation sur un couple modèle sonde/cible d'oligonucléotides synthétiques ont démontré que cette méthode de détection permettait d'obtenir des signaux homogènes et reproductibles (Figure 3-9 a). Par ailleurs, le protocole a été modifié afin d'inclure un lavage de la membrane avec un tampon Véronal (et non pas phosphate) avant l'étape de révélation enzymatique du signal colorimétrique. En effet, le phosphate inhibant l'activité de l'enzyme, le tampon Véronal permet d'obtenir des signaux d'intensité plus forte (Figure 3-9 b). Enfin, des tests de génotypage érythrocytaire pour l'étude de 3 SNP ont montré qu'il était possible de différencier les génotypes par colorimétrie (Figure 3-9 c).

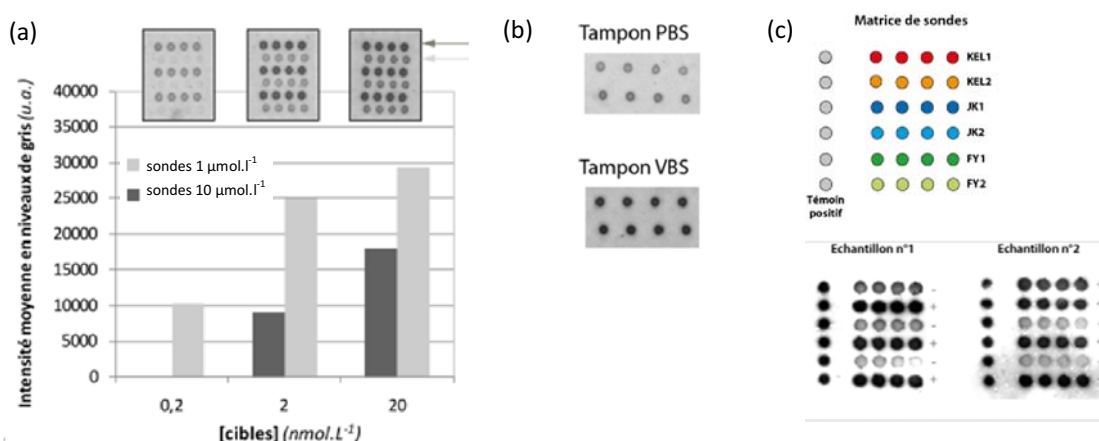


Figure 3-9 Détection de l'hybridation par colorimétrie sur membrane : allure des signaux (en niveaux de gris) (a) Test d'hybridation sur un couple modèle d'oligonucléotides synthétiques (26mères) : on constate qu'il est possible de détecter les cibles de façon quantitative dans l'échantillon (12 plots correspondent à une solution de sondes à 1 µmol.l⁻¹, les 12 autres à 10 µmol.l⁻¹). (b) Influence du tampon de lavage utilisé avant l'étape de révélation sur l'intensité du signal colorimétrique généré (temps d'incubation de la solution de BCIP/NBT équivalents). (c) Tests de génotypage érythrocytaire pour trois SNP (les réponses attendues sur les plots sont indiquées en vert) : il est possible de différencier un signal « positif » d'un signal « négatif » (faible signal dû à des mésappariements)

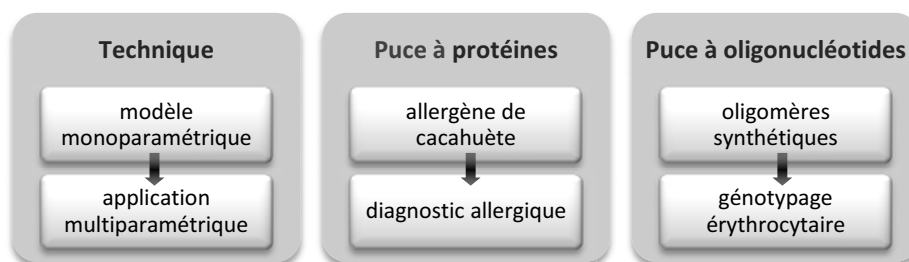
Automatisation

Pour atteindre une capacité d'analyse haut-débit, les tests sur membrane ont été adaptés à un support de type microplaque 96-puits. Dans un premier temps, les membranes Ultrabind ont été manuellement insérées en fond de puits. Nous nous sommes ensuite orientés vers l'utilisation d'une plaque de filtration préfabriquée, Multiscreen HTS-HA de MilliporeTM. Ces membranes ont elles aussi permis l'obtention d'une immobilisation stable et reproductible. La trame du filtre est composée de nitrocellulose et d'ester de cellulose, mais la chimie de surface exacte n'est en revanche pas divulguée. Il est très probable que l'immobilisation des biomolécules repose sur des interactions faibles avec le substrat.

2. Preuves de concept

2.1. Puces à oligonucléotides et protéines sur membrane de filtration

La technique développée a été mise en œuvre pour deux types de biomolécules : acides nucléiques et protéines. Pour ces deux voies complémentaires dans le domaine du diagnostic, des modèles synthétiques robustes ont permis la validation de l'immobilisation des biomolécules sur le support membranaire ainsi que la réalisation de preuves de concept pour la détection quantitative de cibles. Ces méthodes ont par la suite été éprouvées pour l'analyse d'échantillons biologiques complexes, respectivement produits de PCR et sérum de patients.



Tests d'hybridation d'acides nucléiques

L'immobilisation d'oligonucléotides, validée sur un couple d'oligonucléotides synthétiques, a permis le développement d'un test d'hybridation haut-débit à détection colorimétrique.

Cette méthode a été ensuite utilisée pour l'élaboration d'un outil de génotypage érythrocytaire à partir d'ADN extrait d'échantillon de sang total. L'étude s'est concentrée autour des six polymorphismes détaillés dans le

Tableau 3-1, en utilisant les outils de biologie moléculaire disponibles au sein du Laboratoire de Recherche de l'EFS-RA :

- i. accès à une banque d'échantillons de sang de donneurs phénotypés par sérologie ;
- ii. techniques d'extraction d'ADN génomique, d'amplification par PCR multiplexe et de contrôle sur gel d'électrophorèse ;
- iii. panel de sondes spécifiques des polymorphismes (16 à 23 bases, polymorphisme positionné au milieu de la séquence).

Tableau 3-1 Polymorphismes étudiés

Système	SNP	Antigènes	Allèles	Sondes *
KELL (006)	T698C	KEL1	<i>KEL*1</i>	KEL*1
		KEL2	<i>KEL*2</i>	KEL*2
	T961C	KEL3	<i>KEL*3</i>	KEL*3
		KEL4	<i>KEL*4</i>	KEL*4
KIDD (008)	G838A	JK1	<i>JK*1</i>	JK*1
		JK2	<i>JK*2</i>	JK*2
DUFFY (009)	G125A	FY1	<i>FY*1</i>	FY*1
		FY2	<i>FY*2</i>	FY*2
MNS (002)	C59T	MNS1	<i>MNS*1</i>	MNS*1
		MNS2	<i>MNS*2</i>	MNS*2
	T143C	MNS3	<i>MNS*3</i>	MNS*3
		MNS4	<i>MNS*4</i>	MNS*4

* Les séquences des sondes sont explicitées au paragraphe Tableau 5-3 du Chapitre 5.

Puces à protéines : détection d'anticorps

Forts du succès des tests pour acides nucléiques, une seconde approche s'est intéressée à l'immobilisation de protéines sur le support membranaire. Les puces à protéines ont été mises en œuvre pour la détection d'anticorps dans un échantillon biologique. La preuve de concept a utilisé comme sonde un allergène de cacahouète pour la détection d'un anticorps correspondant, et a permis de valider l'immobilisation ainsi que l'accessibilité des protéines sur la surface.

La méthode a été adaptée à la détection multiparamétrique dans un échantillon de sérum complexe d'immunoglobulines E spécifiques d'un panel d'allergènes déjà étudiés au laboratoire (Heyries *et al.* **2008**).

Les résultats concernant ces deux études sont présentés dans l'article suivant.



Article 1

Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays

Gaëlle C. Le Goff, Cloé Desmet, Jean-Charles Brès, Dominique Rigal,

Loïc J. Blum, Christophe A. Marquette

Biosensors and Bioelectronics, **2010**, 26, 1142–1151



Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays[☆]

Gaelle C. Le Goff^a, Cloé Desmet^a, Jean-Charles Brès^b, Dominique Rigal^b,
Loïc J. Blum^a, Christophe A. Marquette^{a,*}

^a Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE - 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France

^b Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 April 2010

Received in revised form 21 June 2010

Accepted 28 June 2010

Keywords:

Allergy
Blood genotyping
Filtration assay
High-throughput
Microarrays
Multiparametric

ABSTRACT

We are reporting here a low cost colorimetric device for high-throughput multiplexed blood group genotyping and allergy diagnosis, displayed as an automated 96-well microtiter plate format. A porous polymeric membrane sealed at the bottom of each well accounts for the sensor support. For each sensing unit, a 6 × 6 matrix of specific probes is spotted on the external surface of the membrane resulting in 5 mm² microarrays. Thanks to the membrane porosity, reagents dispensed into the well can be eliminated through vacuum soaking. This unusual design drastically reduces the assay background signal.

The system was first validated on robust models composed of either two complementary oligonucleotide sequences or one allergen/specific rabbit IgG pair. The quality of both oligonucleotide and protein immobilisation on the membrane substrate was then demonstrated together with the capacity to use the arrayed biomolecules as probes for the quantitative detection of specific targets (respectively complementary oligonucleotide and specific antibody).

On the basis of these good results, two multiplex assays were developed for crude biological samples testing, focussing on two human *in vitro* diagnosis applications: a hybridisation assay for multiplex blood group genotyping and a multiparametric immunoassay for allergy diagnosis. In both cases, the transfer to crude biological samples testing was successful i.e. high signal to noise ratio of the stained membranes, reproducibility and good correlation with results obtained using routine testing procedures.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Expectations of biological analysis have reached a new level of complexity: the diagnostic tests are now required to be multiparametric in order to produce more information within a reduced time. Moreover, the number of samples to test keeps increasing, creating a real need for new high-throughput platforms for multiplex diagnosis. In addition to these technical considerations, the economical and social context reflects a rising demand from health authorities upon cost reduction and improved security of diagnosis/prognosis making tools.

Blood donation testing is an eloquent example of that complexity. The search for blood group antigens, infectious agents, microorganisms and other various analytes requires multiple testing procedures (involving immunoassays as well as nucleic acids assays) on million samples a year (Petrik, 2010). This panel of

targets is constantly expanding with not less than 300 blood group antigens identified as for now (Daniels, 2005), and more than 40 new infectious diseases described during the past generation according to World Health Organisation (WHO Report, 2007b).

With the persistent outburst of microarrays, ideal for multiparametric assays, many diagnostic biosensors have been developed based on that parallelised technology. However, even though many of those testing procedures are scientifically mature, this type of device is still not currently available for the diagnosis laboratories. Indeed, most of existing microarray based systems have been developed in a technological driven context (adapting end-user needs to the technology), creating a gap between end-user and technology.

We have been developing a multipurpose microarray based platform for multiparametric and high-throughput filtration assays (HiFi-assays), dedicated to the characterisation of biological samples at reduced cost and time. Combining the multiparametric performances of microarray technology with a 96-well format standard for robotics, our fully automated diagnostic tool permits very high-throughput processing of both nucleic acid assays and immunoassays, in clinical laboratories conditions.

This device is based on a classical 96-well microtiter filtration plate (e.g. Multiscreen HTS-HA, Millipore). The polymeric mem-

[☆] Joint Runner up for the 2010 Biosensors and Bioelectronics Award for most original contribution to the Congress.

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 43 14 84; fax: +33 4 72 44 79 70.
E-mail addresses: christophe.marquette@univ-lyon1.fr,
christophe.marquette@axoscience.com (C.A. Marquette).

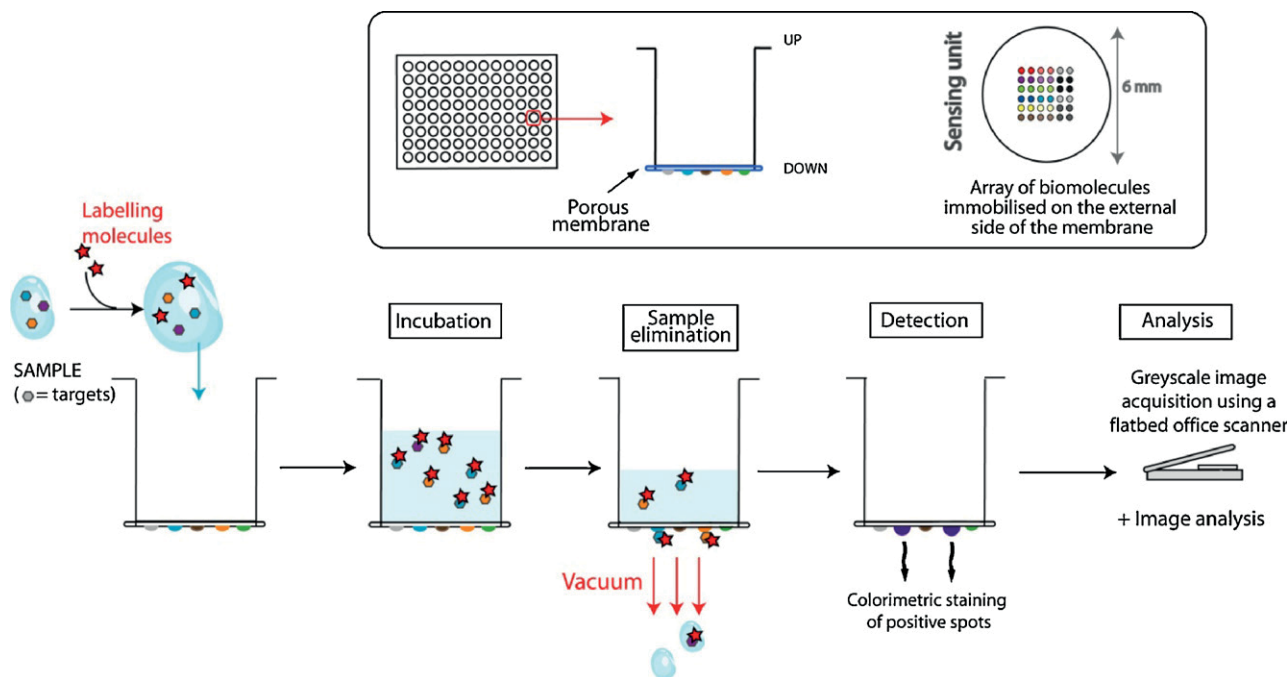


Fig. 1. HiFi-plate design and HiFi-assay filtering protocol. Probe molecules can be oligonucleotides as well as proteins or antibodies. HiFi-assays are based on a filtering protocol: thanks to vacuum soaking, reagents dispensed in wells are loaded through the membrane bottom. After staining of the positive spots, a greyscale image of the membrane bottom is acquired with a simple office scanner and analysed.

brane (mixed cellulose ester) sealed at the bottom of each well enables to eliminate reagents thanks to vacuum soaking. However, in HiFi-plates the membrane is not only used as a filter, but also as support for the immobilisation of an array of biomolecules, which constitutes the multiparametric sensing unit (Fig. 1). The distinctive feature of the plate is the immobilisation of probes on the backside of the membrane, and not inside the well as usually done (Perrin et al., 2003). To our knowledge, this non-conventional design was only mentioned once in the literature for chemiluminescent immunoassays (McBride et al., 2008).

It will be demonstrated how various biomolecules, such as oligonucleotides and proteins, can be immobilised on the substrate as medium density arrays, depending on the application and the target analyte. Our first interest was in the immobilisation of oligonucleotides on the membrane-bottomed plate in order to elaborate a multiplex blood group genotyping tool. In a second time, we successfully transferred the technology to protein immobilisation and developed a multiplex immunoassay for allergy diagnosis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Synthetic oligonucleotides (Biotin–TTTTTTTTTTTTT–C₆–NH₂, NH₂–C₆–TTGAGGTGCATGTTGTGCC, Biotin–GGCACAACATGCACCTCAA and all genotyping probes and primers) were supplied by Eurogentec (Belgium).

Alkaline phosphatase-labelled streptavidin, alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-human IgE antibodies developed in mouse, *Arachis hypogaea* lectin (from peanut) and anti-*A. hypogaea* lectin antibodies developed in rabbit were purchased from Sigma–Aldrich (France). Alkaline phosphatase-labelled anti-rabbit IgG (H+L) antibodies developed in goat were supplied by Jackson Immuno-Research (USA).

Recombinant allergenic proteins (in PBS) from cherry (rPru a4: 0.42 mg mL⁻¹; rPru a1: 1.59 mg mL⁻¹; rPru a3: 1.86 mg mL⁻¹), apple (rMal d1: 0.11 mg mL⁻¹, rMal d3: 0.99 mg mL⁻¹, rMal d4:

1.15 mg mL⁻¹, hazelnut (rCor a1: 0.48 mg mL⁻¹) and birch tree pollen (rBet v1: 0.82 mg mL⁻¹) were kindly provided by Dr. Stephan Scheurer (Paul Ehrlich Institute, Germany) as well as apple (18 μg mL⁻¹) and cherry (419 μg mL⁻¹) extracts and reactive sera.

2.2. General protocol description

HiFi-plate preparation. Original membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen HTS-HA) were purchased from Millipore. When not mentioned, 2.4 nL drops of spotting solutions (pitch = 500 μm) were arrayed on the membrane backside using a BioChip Arrayer BCA1 (Perkin-Elmer).

Automated filtration assay and analyte detection. HiFi filtration assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a plate filtration unit and a heater. The vacuum and the soaking duration were finely controlled in order to generate the most reproducible results. The filtering protocol involved the following steps. (i) The membranes were washed with PBS (100 mmol L⁻¹, pH 7.4) and saturated with PBSTA (PBS added with Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 1% (w/v)). (ii) Meanwhile cocktail solutions of analyte and labelling molecules in PBSTA were pre-incubated on the heater unit. (iii) Samples were then transferred to HiFi-plate microwells and loaded on the membrane for interaction and labelling. (iv) The membranes were washed with veronal saline buffer (100 mmol L⁻¹, pH 8.5). (v) Finally, 200 μL of a BCIP/NBT ready-to-use solution (Sigma–Aldrich) were added per well for signal generation at room temperature (5 min to 1 h). The original colour of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the purple product of the enzymatic reaction precipitates on positive spots.

Image acquisition. The microtiter plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65,535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution.

Data analysis. Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and

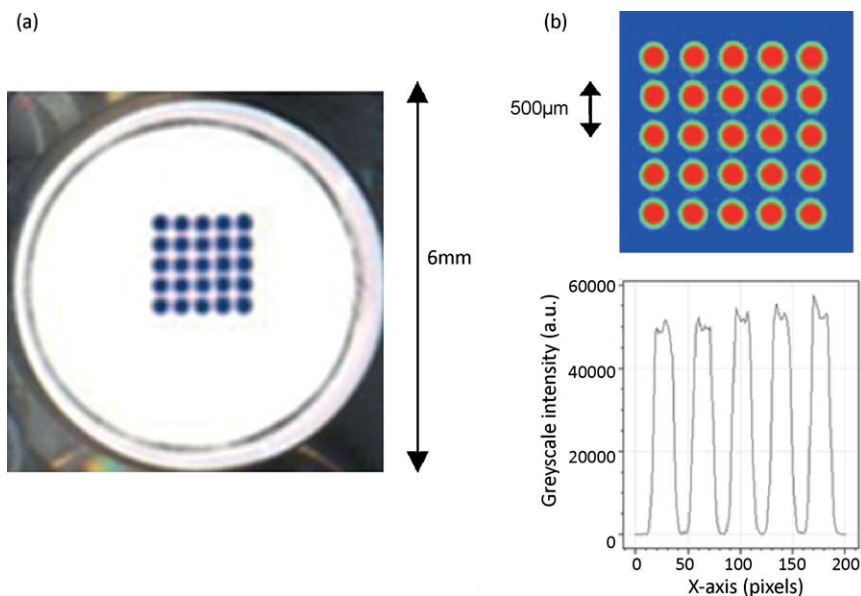


Fig. 2. Array characteristics. 5×5 microarray of replicate spots of a biotinylated 15^{mer} synthetic oligonucleotide (spotting solution: $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, 2.5 nL drops, pitch = $500 \mu\text{m}$). (a) Real colour picture. The membrane bottom was imaged using an office scanner (2400 dpi) after staining of the positive spots. (b) Greyscale intensity image of the entire array (up) and the corresponding profile for one row of spots (down).

corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity on a given probe was calculated as the mean intensity for all replicate spots.

2.3. Synthetic oligonucleotide immobilisation and detection

The synthetic oligonucleotides used as first and second model systems were Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- $\text{C}_6\text{-NH}_2$ and $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-TTGAGTGCATGTTTGCC}$ /Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA respectively.

The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 5 min at 50°C ; (iii) incubation on membrane: 10 min at 50°C . Alkaline phosphatase-labelled streptavidin was used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4. Multiplex blood group genotyping

Targeted SNPs selection. Six single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated to 4 minor blood groups (Kell, Kidd, Duffy and MNS) were selected for their clinical relevancy. Those SNPs concern the following mutations and correspond to specific red blood cell surface antigens: Kell: T698C (KEL1/KEL2), T961C (KEL3/KEL4); Kidd: G838A (JK1/JK2); Duffy: G125A (FY1/FY2); MNS: C59T (MNS1/MNS2), T143C (MNS3/MNS4) (Fig. 3).

Whole blood collection. Whole blood samples (EDTA anticoagulant) were collected (with inform consent) from the Etablissement Francais du Sang Rhone-Alpes. Samples were randomly picked among the blood bank and belonged in majority to the Caucasian ethnic group. Selected donors were phenotyped using standard serologic hemagglutination techniques at the Etablissement Francais du Sang Rhone-Alpes.

Probe patterning. Fifteen probes were arrayed on membrane backside forming a 6×6 matrix composed of 12 synthetic oligonucleotide probes (from 17^{mer} to 23^{mer}) specific of the targeted alleles (2 replicates per probe) and 3 control probes (for spotting, hybridisation and negative control; 4 replicates per probe). The spotting procedure (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany) was per-

formed using 2.5 nL drops of $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ oligonucleotide solutions in PBS.

Multiplex PCR. Genomic DNA was extracted from the blood sample using a MagNa Pure LC pure robot and the MagNa Pure LC DNA Isolation Kit 1 (Roche Diagnostics). Twelve sequences hosting the 6 target polymorphisms were amplified and labelled using a single 96-well format multiplex PCR on a TProfessional thermal cycler (Biometra, Germany). Forward primers were labelled with biotin at their 5' end. PCR product quality was controlled using electrophoresis (2% agarose gel with 190 V for 20 min)

Filtration assay. The 96-well PCR plates were directly transferred to the EVO75 robot (without further purification) and samples were tested after a 1:5 dilution. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 5 min at 50°C ; (iii) incubation on membrane: 10 min at 50°C . Alkaline phosphatase-labelled streptavidin was used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Genotype assignment. For each SNP associated to the two alleles A_1 and A_2 , the following discrimination parameter P_{score} was evaluated and compared to a set of cut-off values in order to assign genotype.

$$P_{\text{score}} = \frac{I(A_2) - I(A_1)}{I(A_2) + I(A_1)}$$

2.5. Peanut allergen/rabbit IgG monoparametric assays

The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) sample pre-incubation: 10 min at 37°C ; (iii) incubation on membrane: 60 min at 37°C . Alkaline phosphatase-labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies were used at a concentration of $0.12 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.6. Allergy diagnosis multiplex immunoassays

Probe patterning. Twelve different probes were arrayed on the membrane backside resulting in a 37-spot matrix composed of 10 recombinant allergens and extracts (2 replicates per probe) and 2 control probes (WHO reference IgE and an alkaline phosphatase-labelled antibody; 3 replicates per probe).

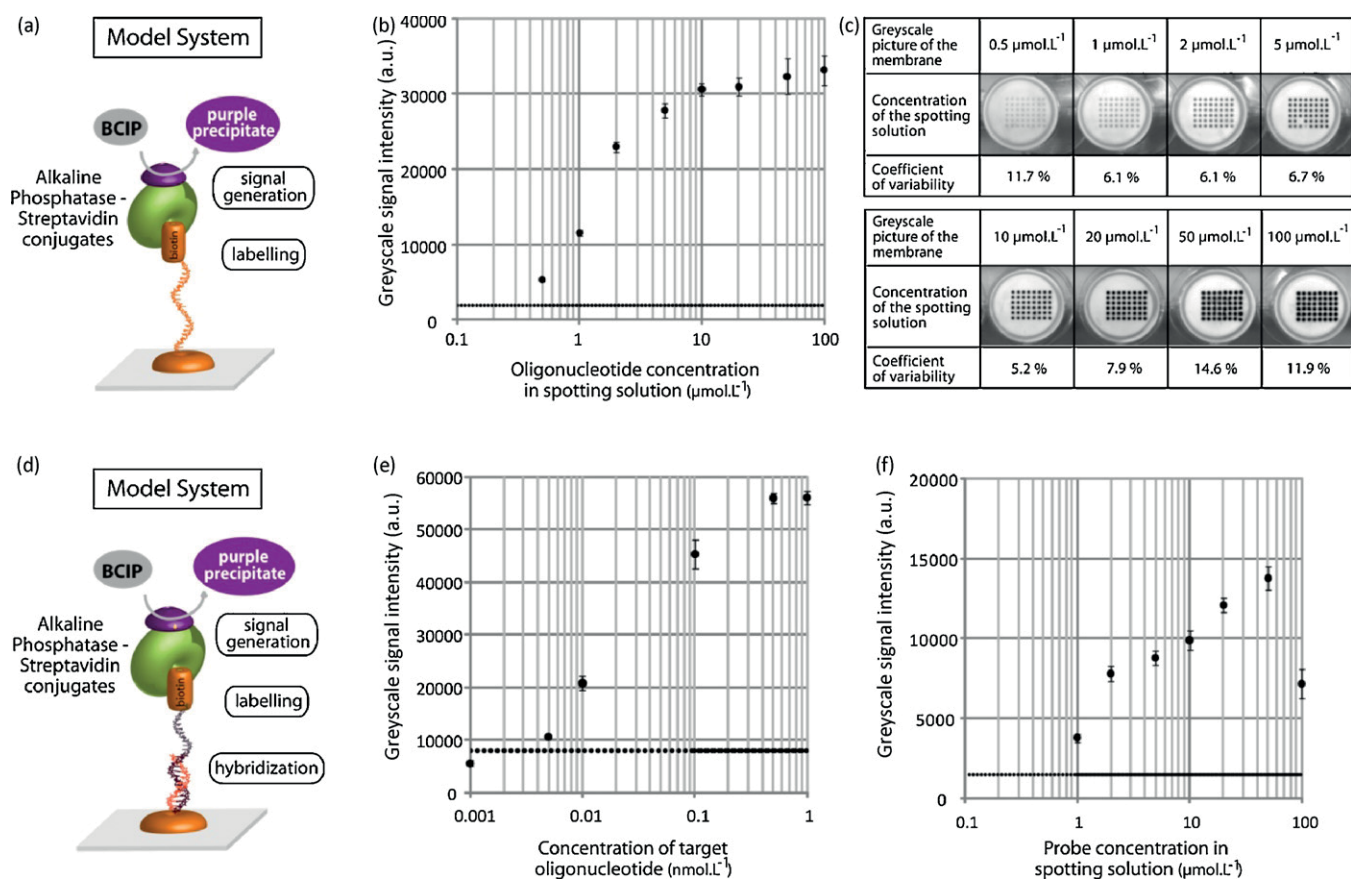


Fig. 3. Influence of probe concentration. For that whole set of experiments, alkaline phosphatase–streptavidin conjugates concentration was $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the spotting pattern was an 8×6 monoparametric matrix (2.4 nL , pitch = $500 \mu\text{m}$). The dot lines indicate limits of detection. Upper part: effect of spotting solution concentration on oligonucleotide immobilisation. (a) The model system: Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- C_6 - NH_2 . (b) Spot intensity as a function of the spotting solution concentration. (c) Images of the corresponding stained membranes (greyscale, 2400 dpi). Lower part: hybridisation assays using a couple of synthetic probes. (d) The model system: NH_2 - C_6 -TTGAGGTGCATGTTGTGCC/Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA. (e) Spot intensity as a function of the target concentration (probe concentration = $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (f) Spot intensity as a function of the probe concentration (target concentration = 2 nmol.L^{-1}).

Filtration assay. The automated protocol took place as described above. Operating temperatures and durations were the following: (i) saturation: 10 min at room temperature; (ii) 1:10 dilution sample pre-incubation: 10 min at 37°C and (iii) incubation on membrane: 60 min at 37°C . Alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-human IgE antibodies were used at a concentration of $2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3. Results and discussion

Each membrane-bottomed well of HiFi-plate represents a single multiparametric sensing unit, so that processing the whole plate enables to test 96 biological samples simultaneously for multiple parameters. The combination of HiFi-assay's automated filtering protocol and specific layout (backside spotting) is the key to the sensor's efficiency. First of all, the porous membrane (pore diameter = $0.45 \mu\text{m}$) filters dust and micrometer-sized contaminants, which get trapped on its upper surface. Since such particles tend to concentrate the coloured precipitate used for revelation, generating then strong interfering noise signals, this filtration lowers partially the background on the underside of the membrane. Moreover, the filtering protocol enables to avoid the diffusion constrain: during the loading of the sample through vacuum soaking, the analyte molecules are forced to pass through the membrane, which favours the interactions of targets with the immobilised probes and improves the sensor's sensitivity. Finally, the resulting background observed on the membrane underside is lower than the upperside

one and much more homogeneous. In the end, the overall signal appears much "cleaner" under the plate, with a strong specific signal and a homogenous background which facilitates a lot the signal analysis.

The level of interactions on each spot is quantitatively detected through a colorimetric signal generation using alkaline phosphatase labelling. The exposition of the membrane to a BCIP/NBT solution (enzyme substrate) generates a purple precipitate on positive spots (Fig. 2). After this staining step, the microtiter plate bottom can be easily imaged using low cost equipment such as a flatbed office scanner (greyscale imaging, 2400 dpi).

Before developing an assay for complex biological samples, such as blood or sera, preliminary studies were performed in order to optimise the biomolecules immobilisation on the membrane substrate and to investigate the possibility of a quantitative detection of the interaction taking place between target and probe molecules.

3.1. Oligonucleotide immobilisation and detection

In order to investigate the quality of the oligonucleotide immobilisation on the polymeric membrane substrate, synthetic biotinylated oligonucleotides (Biotin-TTTTTTTTTTTTTT- C_6 - NH_2) were arrayed using a piezoelectric spotter and labelled with streptavidin-alkaline phosphatase conjugates (Fig. 3(a)). Immobilisation did require neither surface pre-treatment nor functionalisation of biomolecules, suggesting a non-covalent interaction with

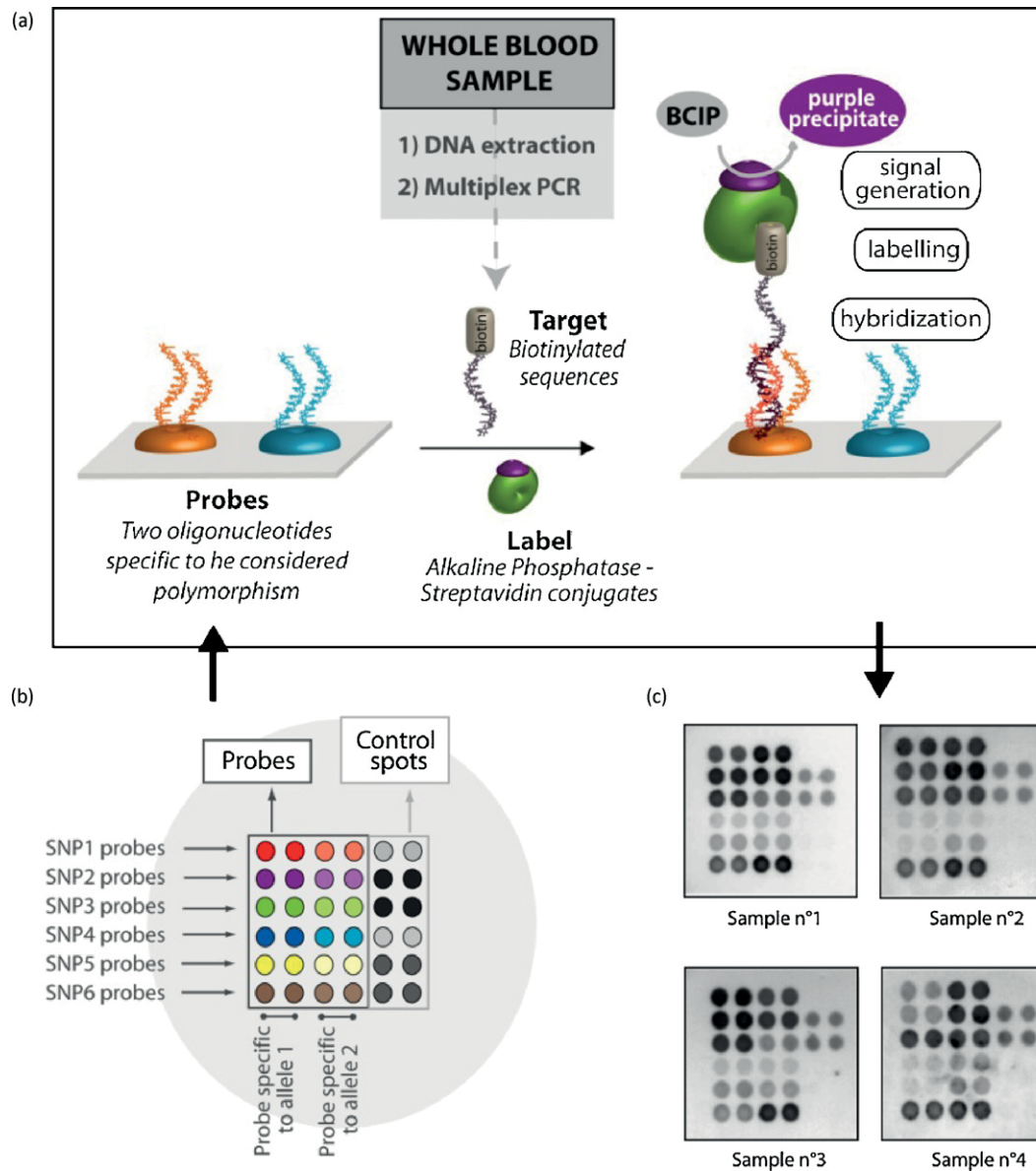


Fig. 4. HiFi-assay for multiplex blood group genotyping. (a) HiFi-assay strategy (simplified scheme: case of a single SNP). (b) Spotting pattern: $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (in PBS) solutions of the 12 specific probes and 3 controls probes were spotted on the membrane (2.4 nL, pitch = $500 \mu\text{m}$). (c) Greyscale images of 4 representative stained membranes resulting for 4 different samples testing (2400 dpi).

the substrate. Fig. 2(a) presents a real-colour picture of a stained array of 25 replicate spots.

Oligonucleotides were thus successfully immobilised as medium density microarrays (10–100 spots per well, up to $1000 \text{ spots cm}^{-2}$), with an average spot diameter of $300 \pm 50 \mu\text{m}$. Spots were homogeneous and highly reproducible (Fig. 2(b)) with coefficients of variability yielding between 5 and 10%. The membrane porosity enables a 3D immobilisation of the probes (Supplementary Fig. 1), which results in an increased amount of oligonucleotides per spot and consequently an enhanced sensor sensitivity.

The density of probes arrayed on the membrane can be finely tuned through the control of the spotting parameters. On the one hand, an increase in drop volume results in a stronger signal and a slight enlargement of spot (Supplementary Fig. 2). On the other hand, as shown in Fig. 3(b) and (c), the concentration of spotting solutions can be directly correlated to the probe density in each spot. Indeed, a direct correlation between spotting concentrations and spot signal intensities was observed. The spot signal intensities

increased linearly with the spotting concentration before reaching a plateau for concentrations higher than $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Such a plateau can be explained either by a saturation of the immobilisation sites or by a labelling limitation through steric hindrance between neighbour streptavidins.

On the basis of these good spotting results, monoparametric hybridisation assays were performed in order to evaluate the capacity of quantitatively detect the level of interactions on each spot. In that case, two complementary synthetic oligonucleotide sequences were used as a robust model of probe/target couple. The target oligonucleotide was functionalised with a biotin group acting as an anchor for streptavidin–alkaline phosphatase conjugate (Fig. 3(d)). The apparition of a blue precipitate on a spot indicates that hybridisation took place.

Furthermore, in order to evaluate the effect of probe density on the spot intensities, a constant concentration of target was hybridised on arrays prepared using increasing probe concentrations (Fig. 3(f)). At very high probe concentration in the spotting solution, a very high probe density on the surface leads to a steric

Table 1
Comparison between the HiFi-assay results and the phenotypes determined by classical serology on a set of 16 patients. For each sample, both phenotypes determined by serology (hemagglutination techniques) and deducted from HiFi-assay resulting genotype are compared. Each column corresponds to an existing phenotype. Discordances are indicated in bold.

	SNP1			SNP2			SNP3			SNP4			SNP5			SNP6		
	KEL:1,-2	KEL:1,2	KEL:-1,2	JK:1,-2	JK:1,2	JK:-1,2	FY:1,-2	FY:1,2	FY:-1,2	MNS:1,-2	MNS:1,2	MNS:-1,2	MNS:-3,-4	MNS:3,4	MNS:-3,4	KEL:3,-4	KEL:3,4	KEL:-3,4
Sample 1		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 2		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 3				X	X	X	X		X			X						
Serology				X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay				X	X	X	X		X			X						
Sample 4		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 5		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 6		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 7		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 8		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 9		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 10		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 11		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 12		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 13		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 14		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 15		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						
Sample 16		X	X	X	X	X	X		X			X						
Serology		X	X	X	X	X	X		X			X						
HiFi-assay		X	X	X	X	X	X		X			X						

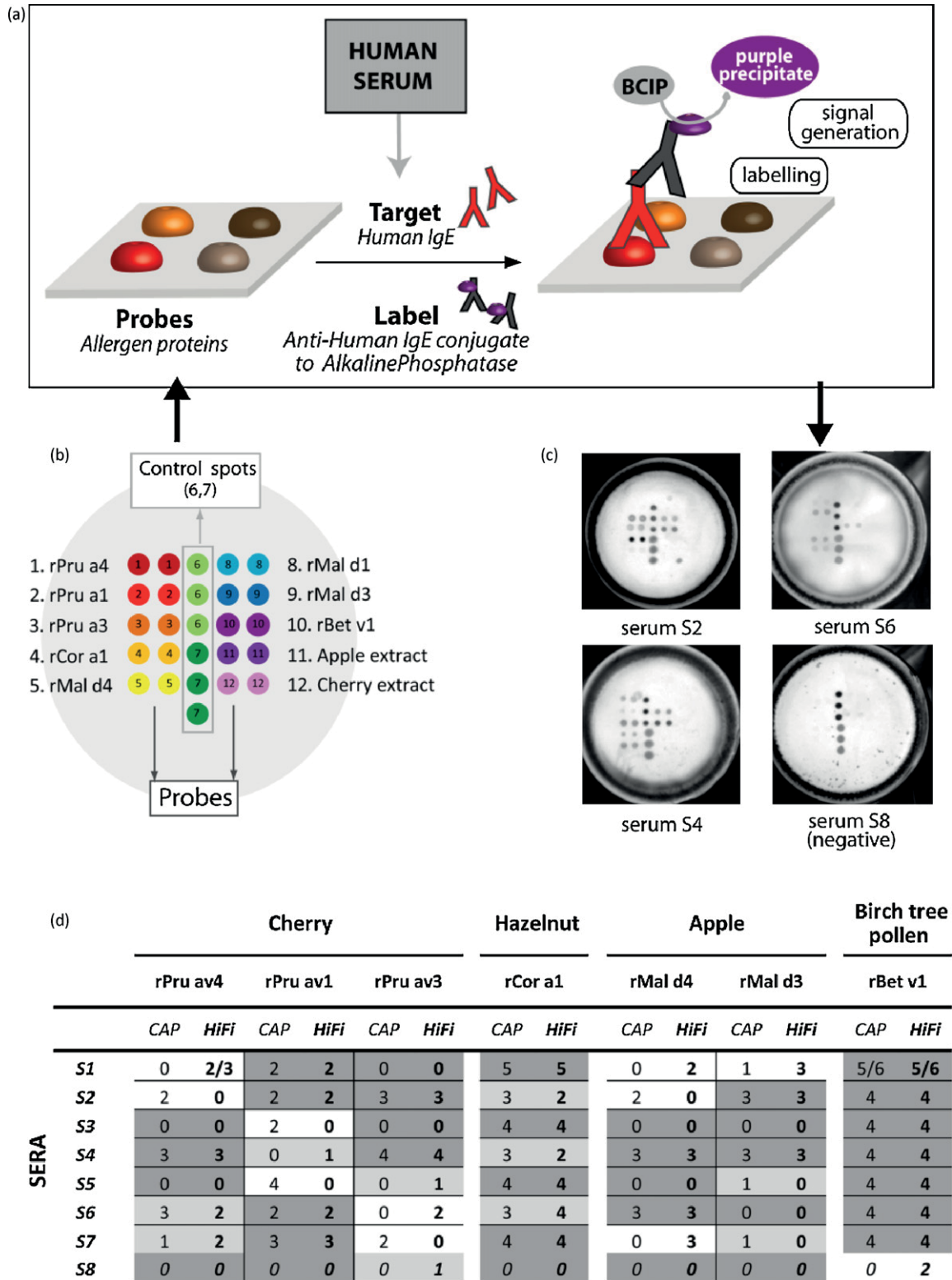


Fig. 5. HiFi-assay for multiplex allergy diagnosis. (a) HiFi-assay strategy for IgE detection in serum. (b) Spotting pattern: 10 specific probes (average concentration = 1 mg mL⁻¹ in PBS) and 2 control probes were arrayed on the membrane (2.4 nL, pitch = 500 μm). (c) Greyscale pictures (2400 dpi) of 4 representative stained membranes corresponding to 3 allergen-reactive sera (S2, S4 and S6) and a negative serum (S8). (d) Comparison of HiFi-assay results with phenotypes determined by serology on a set of 16 patients. ImmunoCAP classification was used to compare the results of the 2 methods (corresponding reactivities: class 0 absent or undetectable, class 1 low, class 2 moderate, class 3 high, classes 4–6 very high). Specific IgE levels are calculated from CAPunit results as following (Fall et al., 2003): class 0 < 0.35 kU L⁻¹; class 1 0.35–0.70 kU L⁻¹; class 2 0.70–3.5 kU L⁻¹; class 3 3.5–17.5 kU L⁻¹; class 4 17.5–50 kU L⁻¹; class 5 50–100 kU L⁻¹; class 6 > 100 kU L⁻¹.

hindrance between single strands resulting in a signal decrease (Ramsay, 1998).

This first raw of results validated both the oligonucleotide immobilisation protocol (with a probe density on the membrane easily tunable) and the quantitative detection of target oligonucleotides. The next step was to use the HiFi-nucleic acids assay for real sample characterisation in developing a reliable tool for multiplex blood group genotyping.

3.2. Application to multiplex blood group genotyping

Blood group typing of patient and donor is a critical step for the prevention of transfusion adverse reactions and blood compatibility can become very challenging in complex cases such as polytransfused patients. If the well-known ABO and Rhesus blood groups are currently typed in routine clinical laboratories, many other minor blood groups (29 blood groups identified) are also associated to clinically relevant red blood cell surface antigens (Quill, 2008). Extension of typing to other blood groups would increase transfusion safety by enabling a better characterisation of blood pouches and consequently a better matching between donor and patient. With average numbers of blood donations of 14 M a year in Europe and 20 M in the US (WHO Report, 2007a), blood qualification centres have to face a high-throughput demand. However, the serologic tests routinely performed in clinical laboratories rely on heavy monoparametric procedures, unsuitable for high-throughput and multiplexing formats (Petrik, 2010).

On the contrary, DNA microarray-based tests were identified as the alternative for bringing multiple blood group typing in blood donation qualification centres (Denomme and Flegel, 2008; Veldhuisen et al., 2009). Most of the already identified blood group antigens are associated to single nucleotide polymorphisms (SNPs) (Daniels, 2005), i.e. the variation of a unique nucleotide in the sequence of the coding gene. Those SNPs give the possibility to directly identify blood groups at the DNA level, through the determination of patient's genotype, i.e. the identification of the 2 copies of the considered gene displayed in patient's genome. Since each SNP is associated to 2 polymorphic alleles, the patient can exhibit 3 different genotypes: 2 homozygote configurations (2 copies of one allele) and one heterozygote configuration (one of each).

We have been developing a multiplex assay for the genotyping of 4 clinically relevant blood groups (Kell, Kidd, Duffy, MNS) (Poole and Daniels, 2007) associated to 6 single nucleotide polymorphisms. In order to target the sequences specific to the 12 considered alleles, 12 oligonucleotide probes were arrayed on membrane-bottomed wells (2 replicates per probe). For each array, 3 controls probes (4 replicates) completed the 6 × 6 sensor matrix (Fig. 4(b)). Since the starting material is a whole blood sample, it is necessary to extract genomic DNA and to amplify the target sequences before the hybridisation assay. The 12 target sequences were simultaneously amplified and labelled with a biotin group during a multiplex PCR step. These PCR products were directly dispensed in HiFi-plate wells without further purification. As described in the preliminary studies, streptavidin-alkaline phosphatase conjugate was used for a colorimetric signal generation on the hybridised spots (Fig. 4(a)). Using a 4-h-protocol duration, 96 whole blood samples can be fully processed on a single plate.

Fig. 4(c) presents 4 typical greyscale images of stained membranes, corresponding to 4 different blood samples. As can be seen, specific reactivity patterns were obtained for each sample. An image of the entirely stained plate is reported in Supplementary Fig. 3.

Ideally, a qualitative test might be sufficient to identify a patient's genotype, a positive coloration appearing only in the presence of the allele in the patient's genome. However, because those

blood group polymorphisms concern a single nucleotide (SNP), a non-negligible percentage of mismatch events occurs, resulting in "false positive" signals. The absence of fully negative result (white spot of probe) in Fig. 4(c) illustrates that fact. To optimise the genotyping efficiency, we investigated the effect of the hybridisation temperature on the match/mismatch signal ratio. The optimal operating temperature was 50 °C. Nevertheless, genotype assignment for each SNP still requires a semi-quantitative analysis performed through a quantitative comparison of the greyscale intensity levels of both alleles. Thus, a P_{score} parameter was calculated for each SNP of each sample (see Section 2) and compared to a set of cut-off values specific to each genotype (data not shown).

In order to evaluate the accuracy of HiFi genotyping assay, parallel serological tests were performed on every sample for phenotype determination. Table 1 compares results from HiFi-assay and serology technique for a set of 16 patients. A phenotype result was deducted from HiFi resulting genotype in order to enable a direct comparison of both techniques. Results were in excellent agreement (98% of concordance) with only 2 discordant results (for MNS blood group system) over 96 distinct parameters. It is likely that the signal weakness of MNS associated probes reduces sensitivity and implies a loss of accuracy.

Multiplex genotyping results were excellent with 100% matching with serological test results for 3 of the studied blood groups and an overall 93% matching for the 4 blood groups. Compared to other commercially available genotyping techniques, HiFi-assay is clearly fitting the blood bank requirements in terms of safety, automation and throughput. Indeed, most of the numerous microarray-based genotyping techniques developed over the past few years (Di Cristofaro et al., 2007; Hashmi et al., 2007; Hopp et al., 2010; Karpasitou et al., 2008) are based on technologies often expensive, seldom easy to handle and difficult to integrate within high-throughput industrial blood supply processes. On the contrary, HiFi-technology main added-value remains its transfer to a fully automated, well-proven and secure high-throughput protocol. This full automation (including genomic DNA extraction, multiplex PCR and filtering hybridisation assay) guarantees that HiFi-technology constitutes a secured and cost-efficient technique for blood qualification centre environment and requires a minimum technician intervention which lowers human error hazard. Besides, the convenient elimination of reagents through vacuum soaking during the filtration assays and the unidirectional fluids handling ensures reduced contamination. Last but not least, the long term stability of the colorimetric staining enables the end-user to store result plates in addition to *in silico* data storage, leading to better traceability.

3.3. Multiplex allergy diagnosis

Taking advantage of the successful development of the genotyping HiFi-assay, we transferred the technology to protein immobilisation, aiming to develop an immuno HiFi-assay for multiplex allergy diagnosis. Indeed, although classical monoparametric assays such as a classical ELISA and even more the high-capacity solid phase test ImmunoCAP (Phadia(ImmunoCAP(R) InVivoSight TM, 2007)) remain the gold standards for routine allergy diagnosis, recent literature indicates an increasing interest of the field for multiparametric assays based on microarray technologies (Cretich et al., 2009; Fall et al., 2003; Jahn-Schmid et al., 2003; Lebrun et al., 2005; Ott et al., 2008; Tai et al., 2009). Here, HiFi-assay can be a promising candidate thanks to its microarray-based multiparametric format, its high-throughput capacities and its significant background signal reduction obtained from using a filtering protocol. Undeniably, for immunoassays dedicated to the characterisation of crude serum, this last point can be really advantageous.

The immuno HiFi-assay building blocks for the development of an allergy diagnosis tool were here (i) the use of recombi-

nant proteins and crude allergen extracts as arrayed probes for the detection of (ii) allergen-specific immunoglobulins E (IgE) in crude human sera and (iii) a detection of the interaction using a secondary anti-human IgE antibody labelled with alkaline phosphatase (Fig. 5(a)).

In a preliminary study, monoparametric assays were performed on a fully-characterised peanut allergen/rabbit IgG system in order to validate the protein immobilisation protocol and to investigate the possibility of a quantitative immunoassay on the HiFi system. For that purpose, membrane bottomed wells were arrayed with *Arachis hypogaea* lectin (specific peanut allergen) spots and loaded with cocktail solutions composed of anti-*Arachis hypogaea* lectin rabbit IgG at different concentrations and alkaline phosphatase-labelled monoclonal anti-rabbit antibodies. The obtained calibration curve is presented in Supplementary Fig. 4. As observed for oligonucleotide-based assays, coefficients of variability yielded between 5 and 10% and a quantitative correlation between the resulting greyscale signal and the concentration of target molecules was demonstrated. A limit of detection of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of specific antibodies was found with a linear detection ranging over two decades at least.

Given the successful results obtained using the peanut allergen/rabbit IgG system, we proceed with the development of a multiplex array for allergy testing on crude serum samples. A set of recombinant antigens associated to different allergens (birch tree pollen, hazelnut, cherry, apple) and crude allergen extracts (apple, cherry) were arrayed on the membrane (2 replicates per probe, average antigen concentration = 1 mg mL^{-1} in PBS). The spotted matrix was completed by 2 control probes (3 replicates each): a WHO reference IgE and an alkaline phosphatase-labelled antibody as positive control (Fig. 5(b)). Seven patient sera with a positive allergic reaction history and one patient serum without any known sensitivity were loaded on the membrane and incubated at 37°C for 1 hour. The cocktail solution was here composed of 1:10 dilution of patient serum together with anti-human IgE antibodies conjugated to alkaline phosphatase ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Images of 4 representative resulting stained membranes are reported in Fig. 5(c).

As can be seen, specific reactivity patterns were obtained for each sample whereas the control spot signals remained stable. Moreover the image obtained from the control well, loaded with an allergen non-sensitive patient serum, confirms the high specificity of the system. Indeed, for this sample, only the control spots were positively stained. It is also worth noting that as expected, the filtering protocol enables a drastic reduction of the background on the external side on the membrane (see images of membrane bottom and top in Supplementary Fig. 5).

In order to validate the allergy diagnosis potentiality of the immuno HiFi-assay, the greyscale signal of every spot was quantified for each patient. The normalised signals were then converted into CAP unit and compared to the reactivity previously determined using the ImmunoCAP system. Fig. 5(d) presents a comparison of the two methods for a set of 7 allergen-sensitive sera (S1–S7) and one negative serum (S8). Because of the very low signals obtained on apple extract, cherry extract and rMal d1 protein spots, no reliable analysis was performed for those probes. For the full set of parameters, only 63% of the results were matching data from ImmunoCAP testing. However, as a matter of fact, both result sets were in very good agreement (92%) for sera characterised as highly reactive by ImmunoCAP system (classes 4–6). Indeed, within these 3 classes, 12 results over 13 were concordant. The weak correlation observed for low reactivity samples can be explained by the fact that class determination is based on an exponentially increasing CAPUnit scale. Actually, values obtained for class 1, 2 or 3-samples are extremely close in comparison with class 4, 5 and 6 data sets. The lower sensitivity of HiFi-test makes thus difficult the differentiation of class 1, 2 or 3-samples.

Nevertheless, it should be noted that only one parameter was totally misdiagnosed (very different reactivity levels): a negative response was obtained for serum S5 against rPru av 1 allergen, whereas ImmunoCAP characterised that sample as highly reactive.

For rBet v1 (birch tree pollen) and rCor a1 (hazelnut), the two allergens which yielded the highest HiFi signals, a quantitative comparison of both techniques was performed to validate the correlation between the normalised greyscale signal intensity of the spots and the ImmunoCAP system result. Supplementary Fig. 6 presents the correlation plots together with their linear regression. The correlation coefficients of the linear regressions were good, especially for rCor a1 (0.93), even if as explained above, the lower sensitivity of HiFi-assay increases the dispersion of values for weakly reactive samples.

Allergy diagnosis results were very encouraging with 63% matching the gold standard ImmunoCAP assays. Furthermore high correlation (92%) was obtained for highly reactive sera (Classes 4–6) and a quantitative correlation with ImmunoCAP results was demonstrated for two allergens. In addition to the many advantages described above for multiplex blood group genotyping, immuno HiFi-assay main added-value is the drastic reduction of background on the external side of the membrane thanks to the filtering protocol, which is an undeniable advantage for immunoassays dedicated to the characterisation of crude serum.

4. Conclusions

HiFi-technology provides a multipurpose platform for multiparametric high-throughput testing suitable for nucleic acids-based assays as well as immunoassays. Indeed, preliminary studies performed on robust model systems demonstrated (i) the quality of both oligonucleotide and protein immobilisation on the membrane substrate and (ii) the capacity to use the arrayed biomolecules as probes for the quantitative detection of specific targets (respectively complementary oligonucleotide and specific antibody).

Given the successful results obtained during these monoparametric assays, we proceeded with the development of multiplex assays for crude biological samples testing, focussing on two applications for human in vitro diagnosis: a hybridisation assay for multiplex blood group genotyping and a multiparametric immunoassay for allergy diagnosis. In both cases, the transfer to crude biological samples testing was successful i.e. high signal to noise ratio of the stained membranes, reproducibility and good agreement with results obtained using routine testing procedures.

The present report demonstrates proof of protocol for both blood group genotyping and allergy diagnosis assays. Next step will be further validation of assays reliability on a cohort of random patients. The resulting collected information will also be used as a feedback for optimisation of protocols.

Acknowledgments

The authors thank the Blood Donation Qualification Center of Metz-Tessy for whole blood samples providing and extended phenotyping characterisations. The authors thank Dr. Stephan Scheurer (Paul Ehrlich Institute, Germany) for providing of recombinant allergens and sera.

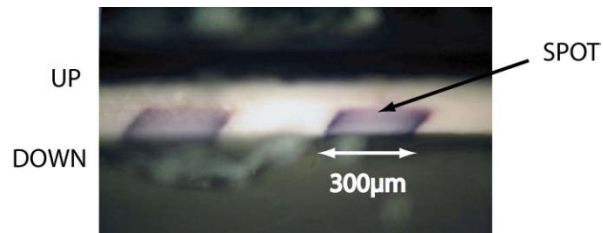
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bios.2010.06.057.

References

- Cretich, M., Di Carlo, G., Giudici, C., Pokoj, S., Lauer, I., Scheurer, S., Chiari, M., 2009. *Proteomics* 9 (8), 2098–2107.
- Daniels, G., 2005. *Transpl. Immunol.* 14, 143–153.
- Denomme, G.A., Flegel, W.A., 2008. *Transfusion* 48 (11), 2461–2475.
- Di Cristofaro, J., Silvy, M., Chiaroni, J., Bailly, P., 2007. *J. Mol. Diagn.* 12, 453–460.
- Fall, B.I., Eberlein-Konig, B., Behrendt, H., Niessner, R., Ring, J., Weller, M.G., 2003. *Anal. Chem.* 75 (3), 556–562.
- Hashmi, G., Shariff, T., Zhang, Y., Cristobal, J., Chau, C., Seul, M., Vissavajhala, P., Baldwin, C., Hue-Roye, K., Charles-Pierre, D., Lomas-Francis, C., Reid, M.E., 2007. *Transfusion* 47 (4), 736–747.
- Hopp, K., Weber, K., Bellissimo, D., Johnson, S.T., Pietz, B., 2010. *Transfusion*, 50.
- ImmunoCAP(R) InVivoSight™, 2007. <http://www.immunocapinvivosight.com/>, last accessed June 2010.
- Jahn-Schmid, B., Harwanegg, C., Hiller, R., Bohle, B., Ebner, C., Scheiner, O., Mueller, M.W., 2003. *Clin. Exp. Allergy* 33 (10), 1443–1449.
- Karpsitou, K., Drago, F., Crespiatico, L., Paccapelo, C., Truglio, F., Frison, S., Scalapogna, M., Poli, F., 2008. *Transfusion* 48 (3), 505–512.
- Lebrun, S.J., Petchpud, W.N., Hui, A., McLaughlin, C.S., 2005. *J. Immunol. Methods* 300 (1–2), 24–31.
- McBride, J.D., Francis Guy, G., John Fordham, G., Kolind, T., Barcenas-Morales, G., Isenberg, D.A., Swana, M., Delves, P.J., Lund, T., Cree, I.A., Roitt, I.M., 2008. *Clin. Chem.* 54, 883–890.
- Ott, H., Baron, J.M., Heise, R., Ocklenburg, C., Stanzel, S., Merk, H.F., Niggemann, B., Beyer, K., 2008. *Allergy* 63 (11), 1521–1528.
- Perrin, A., Duracher, D., Perret, M., Cleuziat, P., Mandrand, B., 2003. *Anal. Biochem.* 322 (2), 148–155.
- Petrik, J., 2010. *Biologicals* 38, 2–8.
- Poole, J., Daniels, G., 2007. *Transfus. Med. Rev.* 21 (1), 58–71.
- Quill, E., 2008. *Science* 319 (5869), 1478–1479.
- Ramsay, G., 1998. *Nat. Biotechnol.* 16 (1), 40–44.
- Tai, L.W., Tseng, K.Y., Wang, S.T., Chiu, C.C., Kow, C.H., Chang, P., Chen, C., Wang, J.Y., Webster, J.R., 2009. *Anal. Biochem.* 391 (2), 98–105.
- Veldhuisen, B., van der Schoot, C.E., de Haas, M., 2009. *Vox Sang* 97, 198–206.
- World Health Organisation Report, 2007a. World Health Organisation report on global blood safety and availability, 2007. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/index.html>.
- World Health Organisation Report, 2007b. A safer future: global public health security in the 21st century, 2007. www.who.int/whr/2007/en/index.html.

Supplementary information

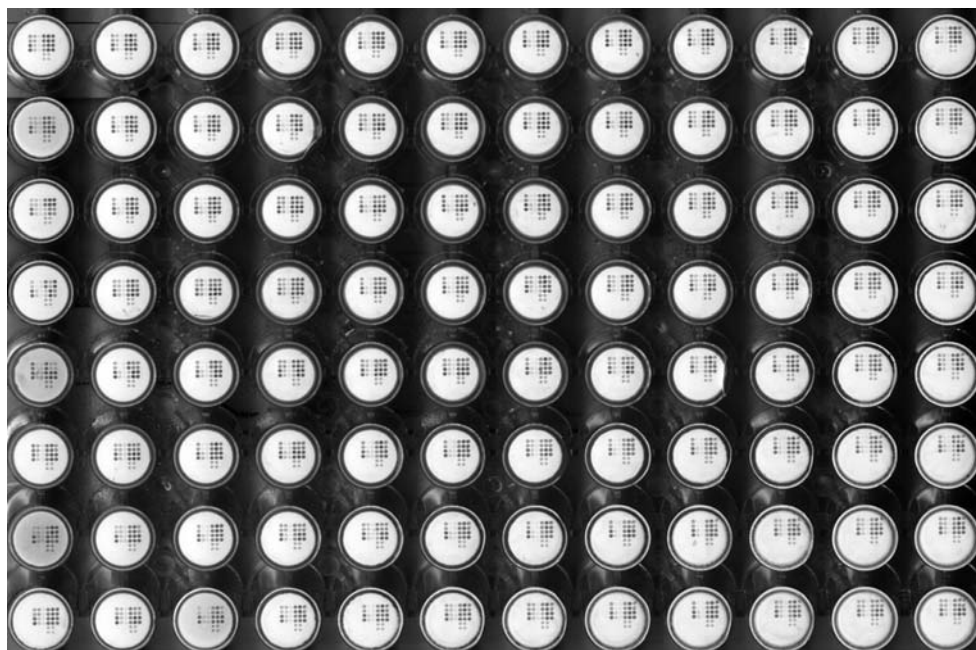


Supplementary Figure 1 | Traversal view of a stained membrane
(real colors optical microscopy picture)

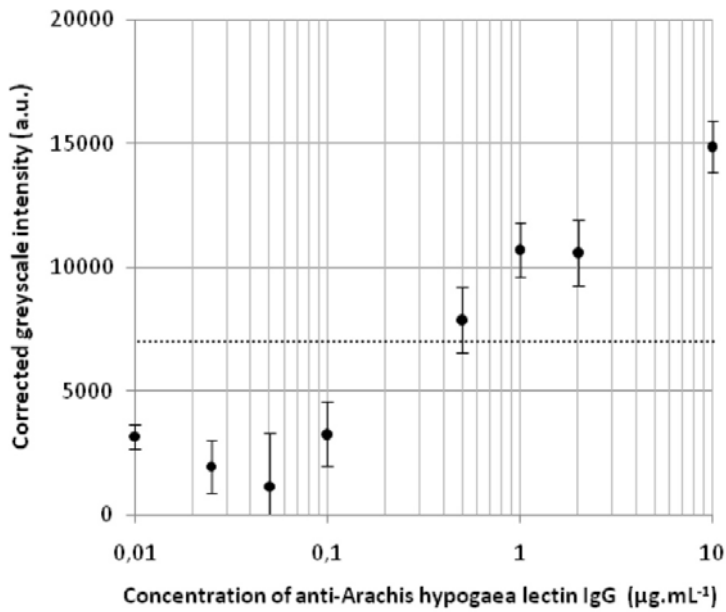


Supplementary Figure 2 | Effect of drop volume on probe density

5*5 microarrays of replicate spots of a biotinylated 15^{mer} synthetic oligonucleotide solution (10µmol.L⁻¹) were spotted with increasing drop volumes (0.7, 1.4 and 2.8nL). The membrane bottom was imaged with an office scanner (2400dpi) after staining of the positive spots (real colours).

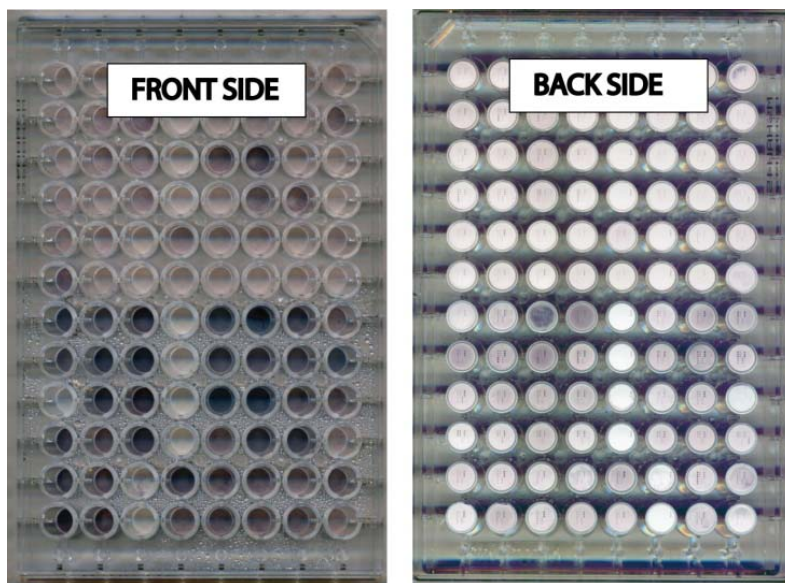


Supplementary Figure 3 | Greyscale picture of a stained HiFi-plate used for blood group genotyping of 96 different patients (2400 dpi)



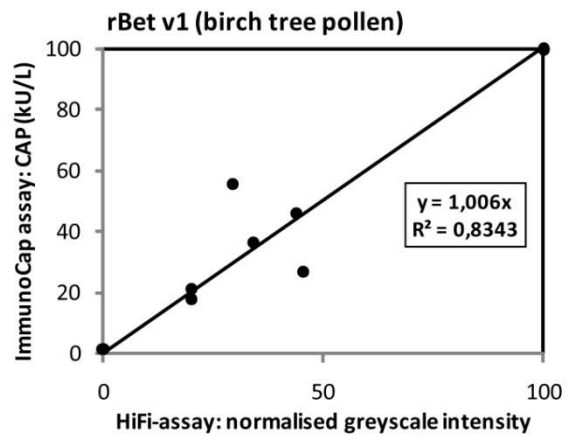
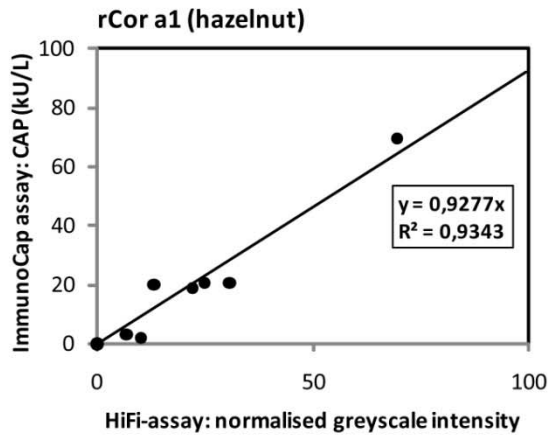
Supplementary Figure 4 | Quantitative detection of peanut allergen/rabbit IgG interaction

The immunoassay was performed using 8*6 arrays of replicates spots of 2.5 nL drops of a 1 mg.mL^{-1} solution of peanut allergen. Alkaline phosphatase-labelled polyclonal anti-rabbit IgG antibodies were used at a concentration of $0.12 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. The dot line indicates limit of detection.



Supplementary Figure 5 | Comparison of background levels on the inside and outside of wells (HiFi-allergy diagnosis assay)

HiFi filtering protocol enables a drastic reduction of background on the external side of the membrane, leading to highly improved signal to noise ratio of the stained membranes.



Supplementary Figure 6 | Correlation between immuno HiFi-assay and ImmunoCAP results for 2 allergens

2.2. Compléments sur le génotypage érythrocytaire

2.2.1. Reproductibilité entre essais

Dans l'article précédent, la reproductibilité des tests sur puce à oligonucléotides ou protéines est évaluée sur les systèmes modèles, en considérant à la fois l'homogénéité entre les réplicats et la reproductibilité entre différents essais. De la même façon, la reproductibilité des tests de génotypage érythrocytaire a fait l'objet d'une évaluation dont quelques résultats caractéristiques sont reportés ci-dessous.

Reproductibilité puits à puits

La Figure 3-10 compare les signaux obtenus dans trois puits différents pour un même produit de PCR. Ces trois puits ont été traités en une seule série d'essais sur l'automate. Les trois graphiques présentent pour chacun puits les intensités moyennes obtenues pour chacune des sondes. Les coefficients de variations correspondant sont reportés au-dessus. Pour les couples d'amorces associés aux systèmes Kell, Kidd et Duffy (sondes : KEL*1, KEL*2, KEL*3, KEL*4, JK1, JK*2, FY*1, et FY*2), les coefficients de variation obtenus sont généralement inférieurs à 10 % qui est une valeur satisfaisante. En revanche, pour les sondes associées aux deux SNP du système MNS (MNS*1, MNS*2, MNS*3 et MNS*4), la reproductibilité est dans l'ensemble plus faible. On remarque que les variations les plus importantes sont globalement associées aux signaux les plus faibles.

La comparaison des résultats obtenus pour l'analyse d'un même échantillon en différentes séries d'essais automatisés a donné des résultats analogues avec un coefficient de variation moyen de 10% pour les 13 sondes considérées, pour 12 échantillons analysés en deux ou trois séries différentes.

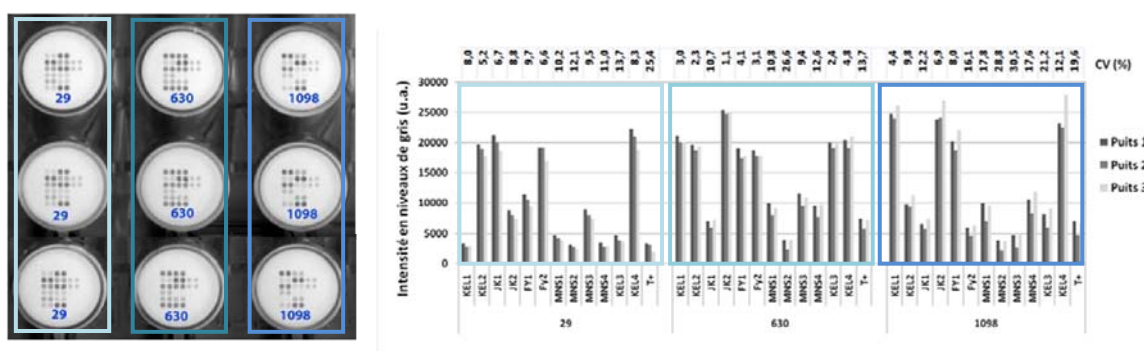


Figure 3-10 **Reproductibilité puits à puits des tests de génotypage** (gauche) Allure et (droite) quantification des signaux obtenus pour trois tests identiques sur trois échantillons de génotype différents.

Reproductibilité entre puits PCR

De la même manière, la reproductibilité de l'analyse a été évaluée en incluant prenant également en compte la reproductibilité de la PCR, en amplifiant un même échantillon dans deux puits PCR différents. Deux exemples de comparaison sont présentés Figure 3-12. Une fois de plus, on constate que les variations sur les intensités finales des signaux colorimétriques restent faibles.

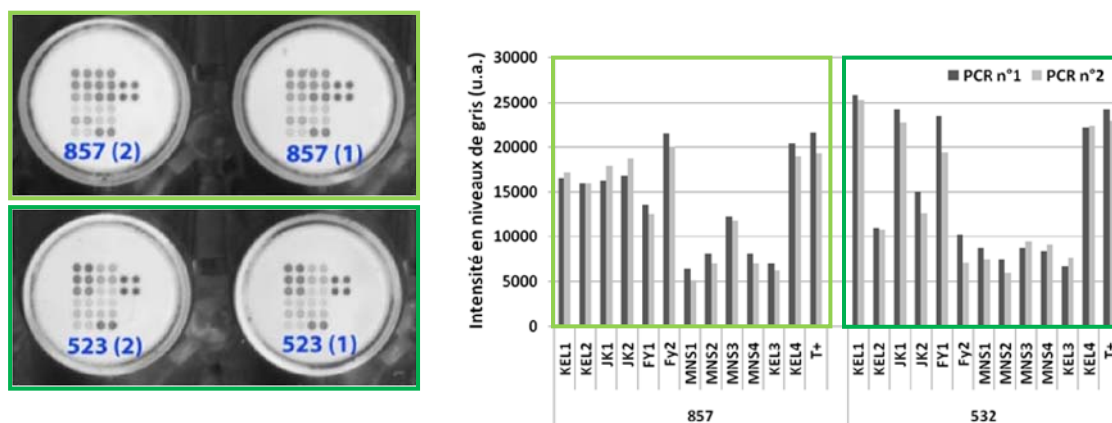


Figure 3-11 Reproductibilité des tests de génotypage (étape de PCR incluse) (gauche) Allure et (droite) quantification des signaux obtenus pour deux échantillons de génotype différents pour deux amplifications par PCR distinctes

2.2.2. Concentration de SAV-PA et dilution de l'échantillon

La Figure 3-11 compare les signaux obtenus pour un même échantillon en faisant varier la concentration des conjugués streptavidine-phosphatase alcaline (à dilution de l'échantillon constante). Comme attendu, on constate que l'intensité des signaux augmente lorsque la concentration du marqueur augmente.

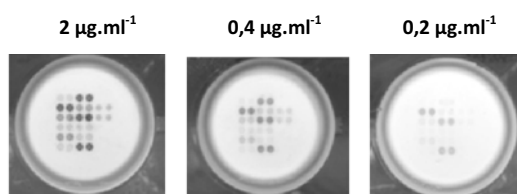


Figure 3-12 Influence de la concentration en streptavidine-phosphatase alcaline (dilution des produits de PCR = 1/5)

La Figure 3-13 compare quand à elle l'effet de la dilution des produits de PCR bruts (à concentration constante en streptavidine-phosphatase alcaline). Pour les sondes spécifiques (colonnes 1 à 4), on observe globalement une diminution en intensité des signaux lorsque la dilution augmente. A l'inverse, les signaux obtenus sur les plots correspondant au témoin positif biotinylé (colonnes 5 et 6) s'intensifient avec la dilution du sérum. En effet, lorsque la dilution de l'échantillon augmente la quantité de produits de PCR biotinylés (cibles mais aussi amorces) diminue, libérant ainsi une proportion plus importante de streptavidine disponible pour le marquage du témoin biotinylé.

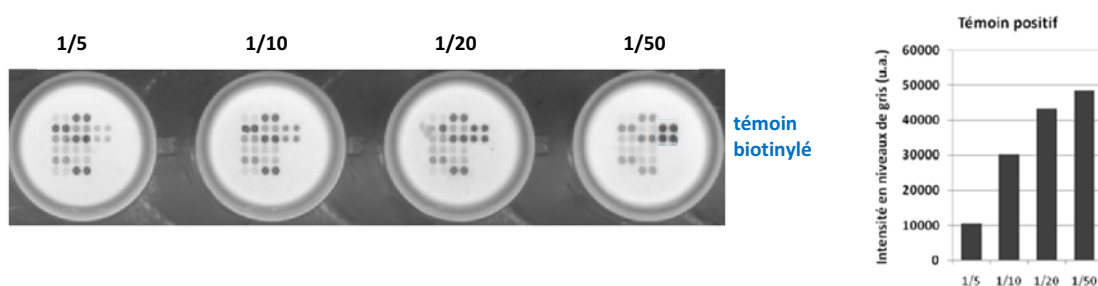


Figure 3-13 Influence de la dilution des produits de PCR sur l'intensité des signaux colorimétriques La concentration des conjugués streptavidine-phosphatase alcaline est $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour les 4 puits.

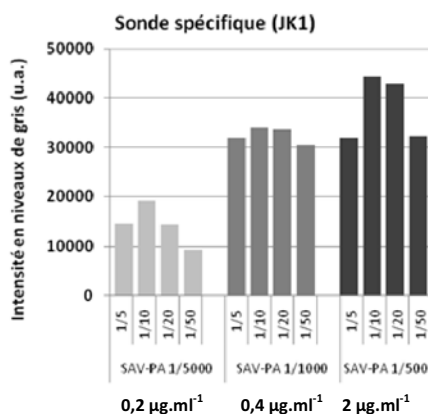


Figure 3-14 Evolution du signal mesuré pour la sonde JK*1 pour un échantillon donné à différentes dilutions de l'échantillon et différentes concentrations de marqueur.

En réalité, on peut constater que le signal des sondes évolue peu, voire décroît légèrement, pour la dilution la plus faible. Cette tendance se retrouve pour différentes concentrations de streptavidine - phosphatase alcaline et pour les différentes sondes (Figure 3-14). En effet, lorsque l'échantillon est très concentré, la concentration en marqueur ne suffit plus pour le marquage de l'ensemble de cibles et des amorces présentes dans le produit de PCR brut : le marqueur est consommé en grande partie par les amorces et la quantité de cibles marquées diminue.

Au final, les conditions retenues pour les tests de génotypage, résultant d'un compromis entre les différentes sondes, furent : une dilution au cinquième des échantillons, et une concentration du marqueur de 2 µg.ml⁻¹.

2.2.3. Influence de longueur des sondes

Enfin, une étude par chimiluminescence a permis d'étudier l'influence de la longueur des sondes utilisées sur la performance du génotypage, sur l'exemple des sondes *FY*1* et *FY*2*. La Figure 3-15 compare les signaux obtenus pour des sondes de 17, 19 ou 21 nucléotides pour l'analyse d'un même produit de PCR (les sondes *FY*1* et *FY*2* ont la même longueur, et le nucléotide concerné par le SNP reste au centre de la séquence). Le premier graphique (Figure 3-15 (a)) présente l'évolution du signal de chimiluminescence obtenu sur *FY*2* en fonction de la longueur de la sonde. On peut constater que le signal augmente lorsque la longueur de la sonde croît. En effet, l'appariement entre la sonde et la cible concerne un nombre de bases, et donc un nombre de liaisons hydrogène plus important, dans le cas de l'appariement et du mésappariement puisqu'un seul nucléotide est polymorphique.

Cependant, lorsque la longueur de la sonde augmente, l'effet déstabilisant du mismatch diminue au fur et à mesure que des bases supplémentaires s'apparient de façon spécifique : on perd donc en sélectivité. Ce phénomène est illustré le second graphique (Figure 3-15 (b)) qui compare les rapports des intensités des sondes *FY*2* et *FY*1*. On constate que l'écart entre les intensités des deux sondes diminue fortement lorsque la longueur de la sonde croît (le rapport se rapproche de la valeur 1). En conséquence, les valeurs obtenues pour les différents génotypes sont peu éloignées et le système perd en sélectivité.

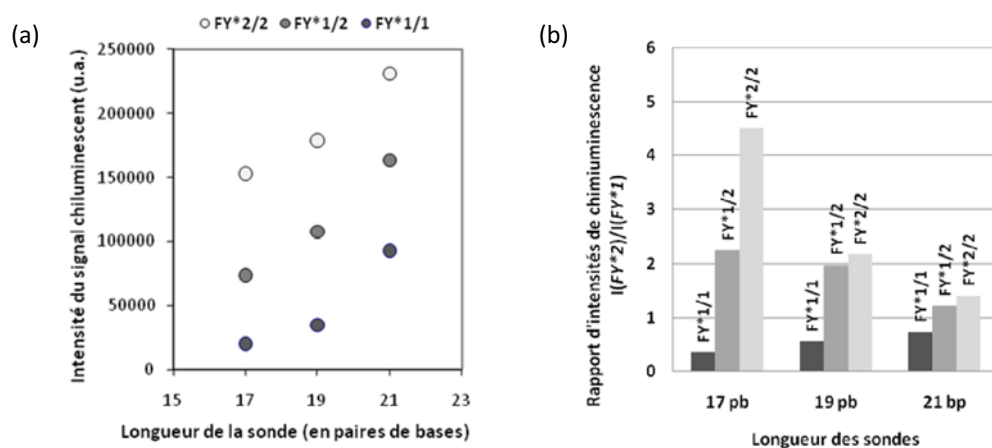


Figure 3-15 Influence de la longueur des sondes utilisées (a) sur l'intensité des signaux et sur (b) l'identification des génotypes

2.3. Perspective : Immobilisation d'anticorps pour la détection de protéines CRP par test sandwich (preuve de concept)

Enfin, afin de démontrer la flexibilité des tests colorimétriques sur plaque filtrante, une preuve de concept pour l'immobilisation d'anticorps et la détection de protéines par un test sandwich a été réalisée. L'architecture d'un tel test pour la détection multiparamétrique de protéines dans un échantillon complexe de sérum est détaillée sur la Figure 3-16 (a). Un anticorps de capture monoclonal dirigé contre la protéine cible est immobilisé sur la membrane. Une fois de plus, reconnaissance moléculaire et marquage sont effectués en une seule étape : l'échantillon est mélangé avec un second anticorps biotinylé spécifique de la protéine cible ainsi qu'un conjugué streptavidine-phosphatase alcaline. Le marquage enzymatique permet de révéler les interactions sur la puce.

La preuve de concept réalisée consiste à détecter la présence de protéine C-réactive, caractéristique des réactions inflammatoires, à différentes concentrations dans une solution tampon. La Figure 3-16 (b) présente les résultats du test immunologique réalisé de façon automatisée sur plaque filtrante *Multiscreen HTS-HA*. La CRP est capturée de manière spécifique par l'anticorps de capture anti-CRP. La limite de détection atteinte est $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ avec une gamme de détection s'étendant de 1 à $50 \mu\text{g.l}^{-1}$. La valeur clinique critique du taux de CRP étant $8,0 \mu\text{g.l}^{-1}$, ces valeurs sont pertinentes pour un test diagnostique. Par ailleurs, ces performances sont comparables à celles obtenues préalablement au laboratoire sur des électrodes sérigraphiées, couplées à une détection par chimiluminescence (limite de détection $0,5 \mu\text{g.l}^{-1}$, gamme dynamique $0,5 - 50 \mu\text{g.l}^{-1}$) (Marquette *et al.* 2008).

Il faut toutefois noter que le passage à un niveau d'analyse multiparamétrique et à l'analyse d'un échantillon complexe ne se ferait certainement pas sans difficultés au vu du nombre d'anticorps impliqués et des interactions croisées qu'ils peuvent générer. Il s'agit pour la plupart de protéines multi-épitopes, pour lesquelles les tests sandwich sont particulièrement appropriés.

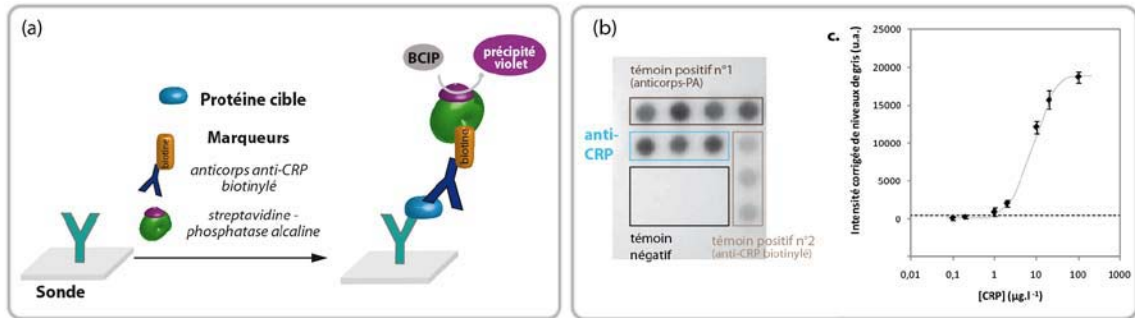


Figure 3-16 Détection de la protéine C-réactive par un immunotest de type sandwich (a) Principe du test colorimétrique (b) Signaux colorimétriques (image en fausses couleurs) obtenus pour une concentration en CRP de $100 \mu\text{g.l}^{-1}$. Le témoin négatif correspond à un anticorps de capture non spécifique de la protéine CRP, les témoins positifs sont l'anticorps secondaire marqué par la phosphatase alcaline et l'anticorps anti-CRP biotinylé. (c) Courbe de calibration obtenue dans les conditions suivantes : [streptavidine-phosphatase alcaline] = $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$; incubation 30 minutes à 37°C .

3. Validation de l'outil : étude à moyenne échelle

3.1. Validation en aveugle de l'outil de génotypage érythrocytaire sur un panel de 293 donneurs

Article 2

Robust, High-Throughput Solution for Blood Group Genotyping

Gaëlle C. Le Goff, Jean-Charles Brès, Dominique Rigal, Loïc J. Blum,
Christophe A. Marquette
Analytical Chemistry, 2010, 82 (14), 6185-6192

Après avoir réalisé la preuve de concept de l'efficacité des tests d'hybridation sur plaque filtrante pour le génotypage érythrocytaire, nous avons entrepris une validation de l'outil à plus grande échelle, en génotypant en aveugle un panel de 293 patients (par ailleurs phénotypés) pour les six SNP considérés. Les tests d'hybridation sur plaque ont été réalisés de façon automatisée, la préparation des échantillons étant quant à elle semi-automatisée (extraction automatique, PCR manuelle).

Comme expliqué précédemment (Cf. Chapitre 2, paragraphe 2.2), la lecture du test d'analyse de SNP biallélique pourrait à première vue se cantonner à une lecture qualitative : un patient homozygote ne répondrait positivement que pour une seule des sondes, alors qu'un hétérozygote répondrait positivement pour les deux (Figure 3-17). En pratique, une proportion de mésappariement est toujours présente, même si celle-ci peut être minimisée en optimisant les conditions de température et la stringence du milieu lors de l'hybridation sur la puce. Pour cette raison, il est nécessaire de procéder à une analyse semi-empirique. Elle consiste à calculer pour chaque SNP un *score* dont la valeur numérique est caractéristique d'un des génotypes. L'attribution du génotype se fait en comparant le *score* obtenu à un ensemble de valeurs de référence. L'équation de ce paramètre de *score* est rappelée sur la Figure 3-17 (la normalisation du paramètre permet la comparaison de différents essais). Dans la pratique, les valeurs de ce paramètre se classent en trois zones (autour des valeurs limites -1, 0 et 1) correspondant aux trois résultats possibles.

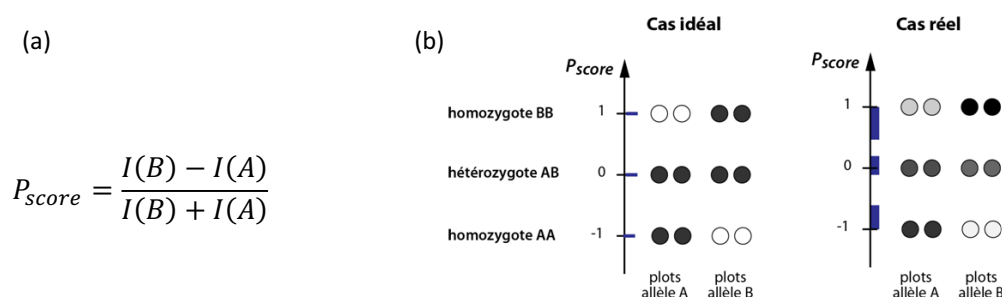
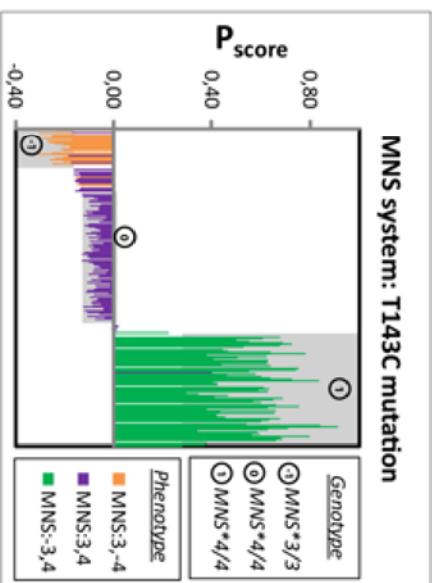
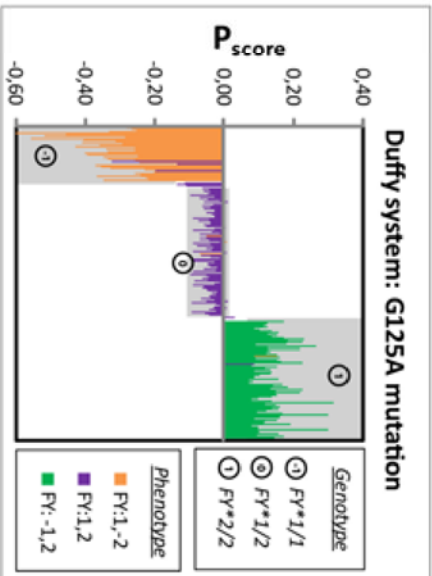
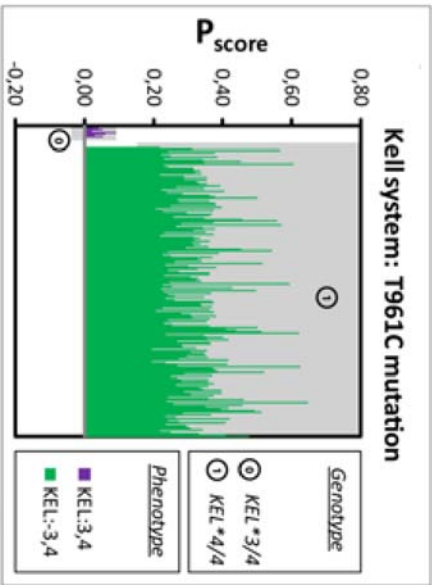
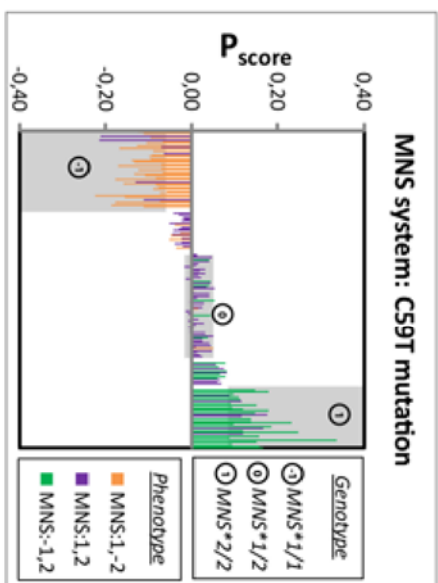
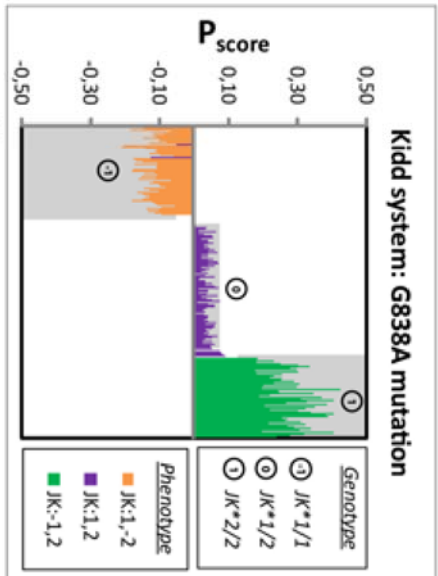
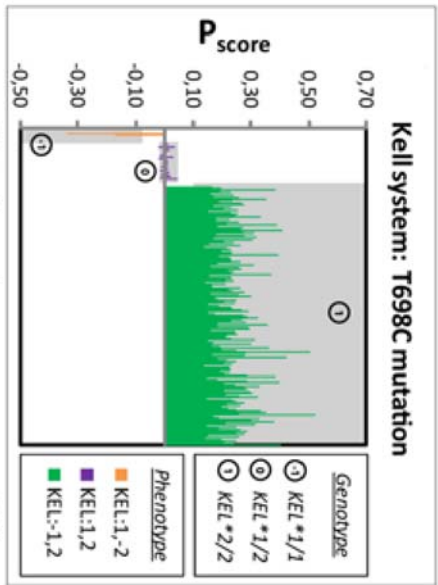


Figure 3-17 Détermination du génotype par calcul d'un paramètre de score (P_{score}) (a) Formule de calcul du score associé à deux allèles polymorphiques A et B. (b) Comparaison des résultats entre un cas d'hybridation parfaitement spécifique (trois valeurs de P_{score} sont obtenues : -1, 0, 1) et le cas réel (les valeurs de P_{score} s'étalent sur une plage spécifique à chaque génotype).

La détermination des valeurs seuils est basée sur une approche empirique : un panel de 96 échantillons référents (de phénotypes étendus déterminés par sérologie) ont été génotypés sur la plateforme, afin de déterminer les plages de valeur correspondant à chaque génotype.

Pour les études suivantes l'ensemble des résultats obtenus sur les 293 donneurs testés lors de la validation seront inclus dans ce panel de référence, afin d'affiner les valeurs seuils, d'accroître leur pertinence et leur fiabilité et à terme de les assortir d'un indice de confiance pour les études à suivre.

Pour plus de lisibilité, la Figure 4 de l'Article 2 a été reportée à plus grande échelle ci-après.



Robust, High-Throughput Solution for Blood Group Genotyping

Gaëlle C. Le Goff,[†] Jean-Charles Brès,[‡] Dominique Rigal,[‡] Loïc J. Blum,[†] and Christophe A. Marquette^{*†}

Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, CNRS 5246 ICBMS, Université Lyon 1, Bâtiment CPE, 43 bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, and Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Lyon, France

With the concomitant increase of blood transfusions and safety rules, there is a growing need to integrate high-throughput and multiparametric assays within blood qualification centers. Using a robust and automated solution, we describe a new method for extended blood group genotyping (HiFi-Blood 96) bringing together the throughput possibilities of complete automation and the microarray multiplexed analysis potential. Our approach provides a useful resource for upgrading blood qualification center facilities. A set of six single-nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with clinically important blood group antigens (Kell, Kidd, Duffy, and MNS systems) were selected and the corresponding genotyping assays developed. A panel of 293 blood samples was used to validate the approach. The resulting genotypes were compared to phenotypes previously determined by standard serologic techniques, and excellent correlations were found for five SNPs out of six. For the Kell, Kidd, Duffy, and MNS3/MNS4 systems, high matching percentages of 100%, 98.9%, 97.7%, and 97.4% were obtained, respectively, whereas a concordance percentage of 83.3% only was attained for the MNS1/MNS2 polymorphism.

Blood bank qualification's mainspring is to secure and accurately characterize donations. Therefore, the highest priorities of testing procedures are without doubt safety and reliability.¹ However, because the massive amount of incoming samples brings blood testing to an industrial scale, safety is not the only concern: cost and throughput are also major factors to take into account. The average numbers of 20 million blood donations per year in Europe and 14 million in the United States² illustrate the high-throughput demands that blood qualification centers have to face. The decision to include new testing procedures into the blood qualification chain relies then on a debate between clinical prevalence and cost–benefit analysis.³ With those expectations, any new technology candidate should not only be scientifically

mature and increase safety, but also be low-cost and perfectly compatible with existing structures and automated standards.⁴

Extended blood group typing is a serious candidate for upgrading blood testing procedures in the short term.⁵ In providing a better characterization of a blood bank, it enables a better matching between donors and patients and increases transfusion safety. However, extended typing is still an occasional testing procedure, and blood donations are currently typed for only a few (ABO, Rhesus, and Kell) of the 29 known human blood groups, although other minor groups are known to be clinically significant.^{1,6}

Routine blood typing is currently processed by blood banks using serological methods, i.e., the identification of specific surface antigens on patient's red blood cells (phenotype). Nevertheless, these standard agglutination techniques reveal certain limitations:^{3,7} cost, shortage and weak reactivity of some reagents, and labor-intensive monoparametric assays unsuitable for large-scale automated screening (Figure 1).

Here, molecular biology techniques used in conjunction with multiparametric microarray technologies were identified as the alternative to serology, which will bring high-throughput extended blood typing into blood donation testing procedures.^{8,9} Indeed, genetic-based methods for blood testing are rising¹⁰ thanks to the accumulated knowledge of the molecular basis of human blood groups.^{11,12} Most of the 300 antigens already identified⁶ result from single-nucleotide polymorphisms (SNPs),¹³ which provide an opportunity to directly identify blood group antigens at the DNA

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr, christophe.marquette@axoscience.com.

[†] Université Lyon 1.

[‡] Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes.

(1) Anstee, D. J. *Blood* 2009, 114, 248–256.

(2) WHO Report, 2007. World Health Organization Web Site. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/index.html>.

(3) Petrik, J. *Biologicals* 2010, 38, 2–8.

(4) Westhoff, C. M.; Sloan, S. R. *Clin. Chem.* 2008, 54, 1948–1950.

(5) Denomme, G. A.; Flegel, W. A. *Transfusion* 2008, 48, 2461–2475.

(6) Poole, J.; Daniels, G. *Transfus. Med. Rev.* 2007, 21, 58–71.

(7) Avent, N. D. *Br. J. Haematol.* 2009, 144, 3–13.

(8) Veldhuisen, B.; van der Schoot, C. E.; de Haas, M. *Vox Sang.* 2009, 97, 198–206.

(9) van der Schoot, C. E.; de Haas, M.; Engelfriet, C. P.; Reesink, H. W.; Panzer, S.; Jungbauer, C.; Schwartz, D. M. W.; Mayr, W. R.; Castilho, L.; St-Louis, M.; Long, A.; Denomme, G.; Semple, E.; Fernandes, B.; Flegel, W. A.; Wagner, F.; Doescher, A.; Poli, F.; Villa, M. A.; Paccapelo, C.; Karpasitou, K.; Veldhuisen, B.; Noguez, N.; Muniz-Diaz, E.; Daniels, G.; Martin, P.; Finning, K.; Reid, M. E. *Vox Sang.* 2009, 96, 167–179.

(10) Wu, Y. Y.; Csako, G. *Clin. Chim. Acta* 2006, 363, 165–176.

(11) Logdberg, L.; Reid, M. E.; Lamont, R. E.; Zelinski, T. *Transfus. Med. Rev.* 2005, 19, 45–57.

(12) Reid, M. E.; Lomas-Francis, C. *The Blood Group Antigen FactsBook*, 2nd ed.; Academic Press: New York, 2004.

(13) Daniels, G. *Transplant Immunol.* 2005, 14, 143–153.

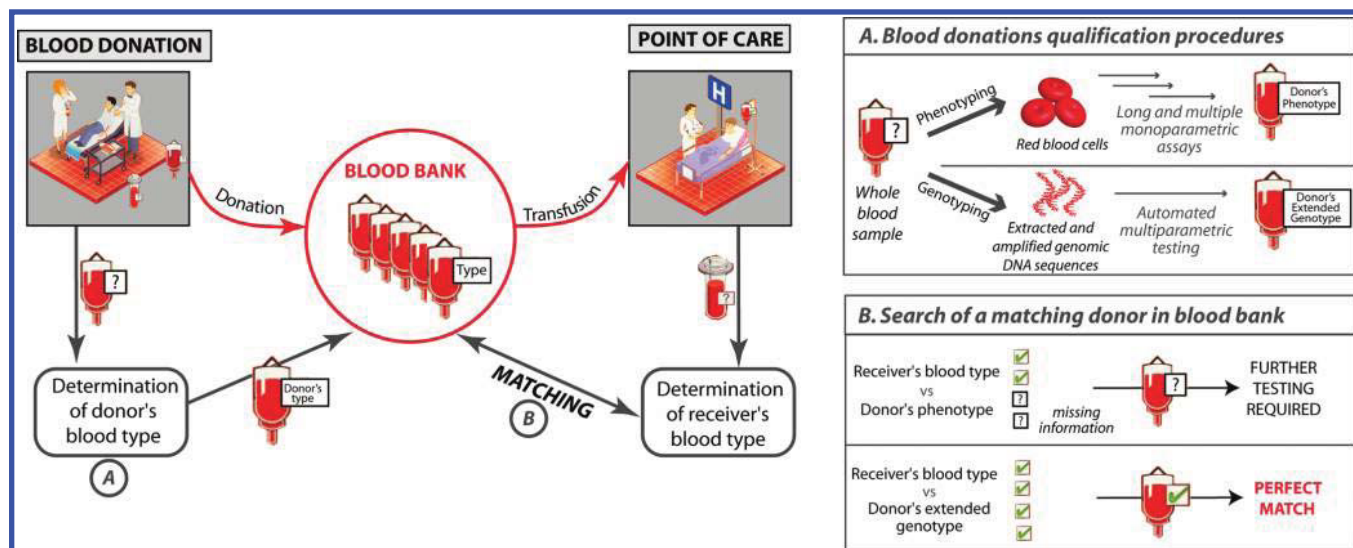


Figure 1. (Left) Blood donation qualification process. The donor's blood—stored in the blood bank—and receiver's blood are typed for a better matching to avoid transfusion adverse reactions. (Right) Comparison of blood group phenotyping and extended genotyping strategies.

level by targeting the two specific allele sequences associated with each SNP.¹⁴

The emergence of blood group genotyping technologies^{15–22} confirms the belief of technologists and clinicians that blood group genotyping assays shall in the future improve transfusion safety, providing a multiplexed solution compatible with a high-throughput format.^{7,23} Most reported techniques work on a combination of a multiplex PCR amplification step of target sequences with a dedicated hybridization support to detect specific antigen sequences and have returned very encouraging results when applied to mass-scale studies. Several blood group genotyping products are already commercialized, with two major platforms available: the BLOODChip (Progenika, Spain),²⁴ developed by the European BLOODGen Consortium, which enables testing of 128 SNPs (including additional human platelet antigens) on a glass slide array support, and the HEA BeadChip (BioArray Solutions),^{18,19} developed by the CBGG consortium coordinated by the New York Blood Center, targeting 18 SNPs using bead array technology. However, the downside of most of the already developed methods is a technology often expensive and seldom easy to handle. These

techniques remain then more suitable for research purposes than for high-throughput industrial use and integration within blood supply processes.

We are proposing here an affordable technological solution for multiplexed blood group genotyping, answering the blood bank requirements in terms of safety, automation, and throughput. This analytical tool displays a nonconventional design combining the format of a membrane-bottomed 96-well plate with the multiparametric performance of microarrays (Figure 2a). The system validation conducted on a medium-scale cohort of 293 blood donation samples for a set of 6 target single-nucleotide polymorphisms will be presented.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Synthetic oligonucleotide probes and primers were supplied by Eurogentec (Belgium). The sequence and length of the six couples of probes and primers (two per SNP) were previously optimized by the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes (the six associated SNPs are described in Table 1). For intellectual property reasons, probe and primer sequences will not be described here. Alkaline phosphatase-labeled streptavidin and BCIP/NBT ready-to-use solution were purchased from Sigma-Aldrich (France).

HiFi-Blood 96 Plate Preparation. For HiFi-Blood 96 (AXO-Science, France, <http://www.axoscience.com>) plate preparation, original membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen HTS-HA) were purchased from Millipore. Twelve oligonucleotide probes (17-mer to 23-mer) specific for the targeted alleles (two probes per SNP, two replicates per probe) and three control probes (for spotting, hybridization, and negative control; four replicates per probe) were arrayed on the membrane backside surface in a 6 × 6 matrix format with a spot-to-spot pitch of 500 μm (one matrix per well). The spotting (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany) procedure was performed using 2.5 nL drops of 50 μmol·L⁻¹ probe solutions in PBS (100 mmol·L⁻¹, pH 7.4). Arrayed plates were stored at room temperature and used up to 6 months after spotting.

- (14) Quill, E. *Science* **2008**, *319*, 1478–1479.
 (15) Daniels, G.; van der Schoot, C. E.; Gassner, C.; Olsson, M. L. *Vox Sang.* **2009**, *96*, 337–343.
 (16) Denomme, G. A.; Van Oene, M. *Transfusion* **2005**, *45*, 660–666.
 (17) Drago, F.; Karpasitou, K.; Poli, F. *Transfus. Med. Hemother.* **2009**, *36*, 157–160.
 (18) Hashmi, G.; Shariff, T.; Seul, M.; Vissavajhala, P.; Hue-Roye, K.; Charles-Pierre, D.; Lomas-Francis, C.; Chaudhuri, A.; Reid, M. E. *Transfusion* **2005**, *45*, 680–688.
 (19) Hashmi, G.; Shariff, T.; Zhang, Y.; Cristobal, J.; Chau, C.; Seul, M.; Vissavajhala, P.; Baldwin, C.; Hue-Roye, K.; Charles-Pierre, D.; Lomas-Francis, C.; Reid, M. E. *Transfusion* **2007**, *47*, 736–747.
 (20) Hopp, K.; Weber, K.; Bellissimo, D.; Johnson, S. T.; Pietz, B. *Transfusion* **2010**, *50*.
 (21) Karpasitou, K.; Drago, F.; Crespiatico, L.; Paccapelo, C.; Truglio, F.; Frison, S.; Scalomagna, M.; Poli, F. *Transfusion* **2008**, *48*, 505–512.
 (22) Montpetit, A.; Phillips, M. S.; Mongrain, I.; Lemieux, R.; St-Louis, M. *Transfusion* **2006**, *46*, 841–848.
 (23) Avent, N. D. *Transfus. Clin. Biol.* **2007**, *14*, 10–15.
 (24) Avent, N. D.; Martinez, A.; Flegel, W. A.; Olsson, M. L.; Scott, M. L.; Nogues, N.; Pisacka, M.; Daniels, G.; van der Schoot, E.; Muniz-Diaz, E.; Madgett, T. E.; Storry, J. R.; Beiboer, S. H.; Maaskant-van Wijk, P. A.; von Zabern, I.; Jimenez, E.; Tejedor, D.; Lopez, M.; Camacho, E.; Cheroutre, G.; Hacker, A.; Jinoch, P.; Svobodova, I.; de Haas, M. *Transfusion* **2007**, *47*, 40S–46S.

- (25) Daniels, G. L.; Fletcher, A.; Garratty, G.; Henry, s.; Jorgensen, J.; Judd, W. J. *Vox Sang.* **2004**, *87*, 304–316.

Sample Selection. Whole blood samples (EDTA anticoagulant) were collected (with informed consent) from the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes. Samples were randomly picked among the blood bank and belonged in majority to the Caucasian ethnic group.

Selected donors were phenotyped using standard serologic hemagglutination techniques at the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes. Complementary extended genotyping for the Duffy system was performed on four samples using a multiplex PCR SNPshot genotyping method at the Laboratoire d'Hématologie Moléculaire of the Etablissement Français du Sang Alpes-Méditerranée.

HiFi-Blood 96 Assay. Genomic DNA was extracted from the blood sample using a MagNa Pure LC pure robot and MagNa Pure LC DNA Isolation Kit 1 (Roche Diagnostics). Twelve sequences hosting the six target polymorphisms were amplified and labeled using a single 96-well format multiplex PCR on a TProfessional thermal cycler (Biometra, Germany). Forward primers were labeled with biotin at their 5' end. PCR products were controlled using electrophoresis (2% agarose gel with 190 V for 20 min).

HiFi-Blood 96 filtration assay was carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a plate filtration unit and a heater. The 96-well PCR plates were directly transferred to the robot (without further purification).

The automated protocol took place as follows (60 min per plate): The membranes were washed with 400 μL of PBS (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.4) and saturated for 10 min at room temperature with 200 μL of PBSTA (PBS, Tween 20 0.1% (v/v), BSA 1% (w/v)). Meanwhile, the samples were diluted (1:5) in a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ solution of streptavidin–alkaline phosphatase conjugates in PBSTA and preincubated for 10 min at 50 °C. The samples were then transferred to the HiFi-Blood 96 plate microwells and incubated for 10 min at 50 °C on the membrane for hybridization and labeling. The membranes were washed with 400 μL of veronal saline buffer (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.5), and 200 μL of a BCIP/NBT ready-to-use solution was added per well followed by incubation for 15 min at room temperature. The original color of the BCIP/NBT solution was yellow. The purple product of the enzymatic reaction precipitates on positive spots. The test result has to be read under the plate: the microtiter plate bottom was then imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in grayscale (from 0 to 65535 arbitrary units (AU)), and the image was analyzed for genotype determination using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in the circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation (first figure in the Supporting Information). The resulting net specific intensity $I(A_i)$ of a given allele A_i was calculated as the mean intensity for all spot replicates of that allele.

Result Quality Control Points. For the quality control issue, samples were processed twice when one of the following observations occurred: (i) wrong or insufficient response of control spots; (ii) wrong or insufficient response in the PCR control well; (iii) insufficient signal-to-noise ratio (for the SNP associated with MNS1/MNS2 antigens, positive feature signal <1000 AU; for other

SNPs, positive feature signal <5000 AU); (iv) spot homogeneity of less than 80%; (v) replicate spot coefficient of variability exceeding 20%.

RESULTS AND DISCUSSION

In the analytical system proposed here, the membrane bottom of the 96-well microtiter plate plays a double role: on one hand, it enables a filtering protocol for processing samples and reagents, and on the other hand, it is the immobilization support for oligonucleotide probe arrays (one 5 mm^2 array per well, 6 \times 6 spots, twelve specific probes, and three controls). Thanks to this layout, 96 parallel multiparametric high-throughput filtering assays (HiFi assays) can be performed on 96 different pre-treated blood samples (one sample per well), providing information on six different parameters (six genotypes) in a single run (Figure 2a).

The pros of the technology are (i) a multiplex PCR sample preparation, (ii) an automated and generic platform for multiparametric high-throughput assays, (iii) a spotting procedure on the backside of the microtiter plate membrane bottom useful for easy imaging of the arrays, (iv) a cost-efficient colorimetric staining/quantitative detection of the positive results on each spot, and (v) a filtering protocol increasing the interactions between targets and immobilized probes and lowering the assay background (Figure 2b). The stained result plate is imaged using a simple flatbed scanner that reduces drastically the detection costs when compared with the expensive instrumentation required for luminescent techniques (second figure in the Supporting Information). The whole protocol (sample preparation and filtering assay) is fully automated, and 4 h is sufficient to test 96 whole blood samples for a set of 6 SNPs.

The probe set was here limited to a medium-size selection of six SNPs, to focus on the development and optimization of the support and the automated protocol. Those six polymorphisms were selected for their clinical relevancy^{1,6} toward the Caucasian ethnic group—which is by far the most represented in Europe—and are associated with the four minor blood group systems Kell, Kidd, Duffy, and MNS. The polymorphisms and the notations for the corresponding antigens and alleles are detailed in Table 1. Twelve oligonucleotide sequences (17-mer to 23-mer) were designed as specific probes for those polymorphisms (two probes per SNP, one per allele) and included in the sensing array (Figure 2b).

Determination of Cutoff Values for HiFi Genotyping Assay. Ideally, a qualitative test would be sufficient to identify a patient's genotype, a positive coloration appearing only in the presence of the allele in the patient's genome. However, because those blood group polymorphisms concern a single nucleotide (SNP), a non-negligible percentage of mismatch occurs, resulting in “false positive” signals. The absence of fully negative results (white spot of the probe) in Figure 2b and the second figure in the Supporting Information illustrates that fact. To optimize the match/mismatch signal ratio, the operating temperature was brought to 50 °C to favor matching pairs (third figure in the Supporting Information). Nevertheless, since mismatches cannot be totally avoided, a semiquantitative analysis was still required and performed through a quantitative comparison of the grayscale intensity levels of both alleles for a given SNP.

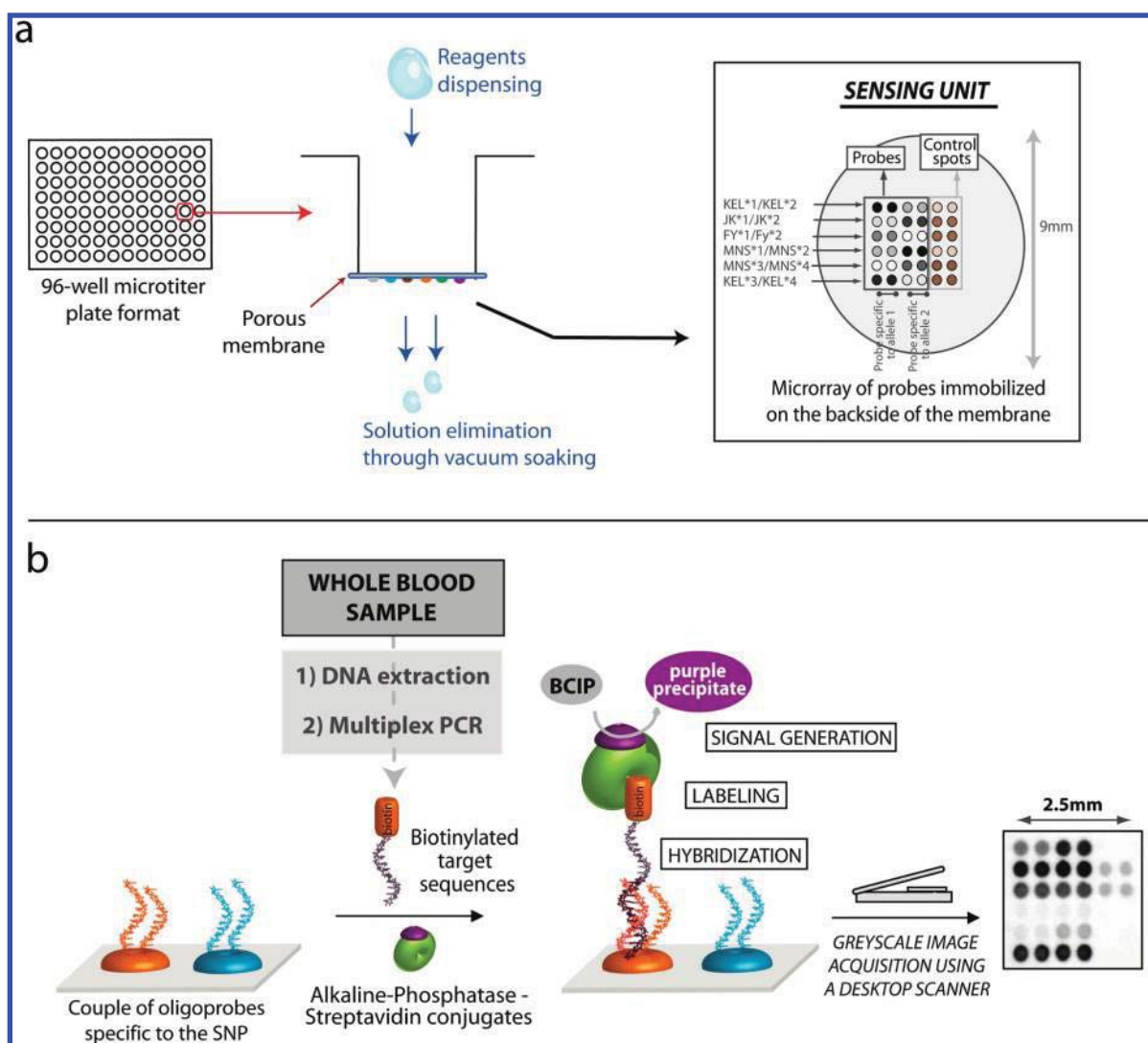


Figure 2. (a) HiFi-Blood 96 plate design for filtration protocols. (b) Principle of HiFi colorimetric assay. Whole blood samples undergo genomic DNA extraction, followed by amplification of target sequences using multiplex PCR and biotinylated primers. The resulting amplicons are mixed with streptavidin–alkaline phosphatase conjugates and directly dispensed into the wells for hybridization with the immobilized probes. The alkaline phosphatase–streptavidin system enables a colorimetric detection of hybridization: the immobilized enzyme’s reaction with its substrate (BCIP/NBT) generates a purple precipitate on the spot. The result has to be read under the plate: the microtiter plate bottom is imaged using an ordinary flatbed scanner, and the grayscale image is analyzed for genotype determination. Here the picture corresponds to a single microwell; for a picture of the entire plate, see the second figure in the Supporting Information.

Indeed, genotype assignment for each SNP (associated with the two alleles A_1 and A_2) was evaluated from the calculation of a P_{score} discrimination parameter as explained in the following equation, where $I(A_1)$ and $I(A_2)$ refer to the median spot intensity for a given allele corrected with local background subtraction (see the Experimental Section):

$$P_{\text{score}} = \frac{I(A_2) - I(A_1)}{I(A_2) + I(A_1)} \quad (1)$$

Depending on the patient’s genotype, P_{score} values range in three different clusters (ideally around -1 , 0 and $+1$). Our strategy was to analyze a first batch of samples of known phenotypes and to use the resulting empiric data set for the determination of cutoff limit values used in the final analysis device.

A preliminary study on a panel of 96 blood samples was then conducted to evaluate the microarray reproducibility, the absence of well to well cross-contamination, the quality control manage-

Table 1. Target SNPs, Antigens, and Alleles for Each Blood Group System

system	SNP	antigen ^a	allele ^a
Kell	T698C	KEL1	<i>KEL*1</i>
		KEL2	<i>KEL*2</i>
		KEL3	<i>KEL*3</i>
		KEL4	<i>KEL*4</i>
Kidd	G838A	JK1	<i>JK*1</i>
		JK2	<i>JK*2</i>
Duffy	G125A	FY1	<i>FY*1</i>
		FY2	<i>FY*2</i>
MNS	C59T	MNS1	<i>MNS*1</i>
		MNS2	<i>MNS*2</i>
		MNS3	<i>MNS*3</i>
		MNS4	<i>MNS*4</i>
	T143C		

^a Notations for phenotypes and genotypes follow ISBT’s recommendations.²⁹ For example, for a sample expressing only JK1 antigen and a homozygote for allele JK*1, the phenotype will be written as JK:1,-2 and the genotype as *JK*1/1*.

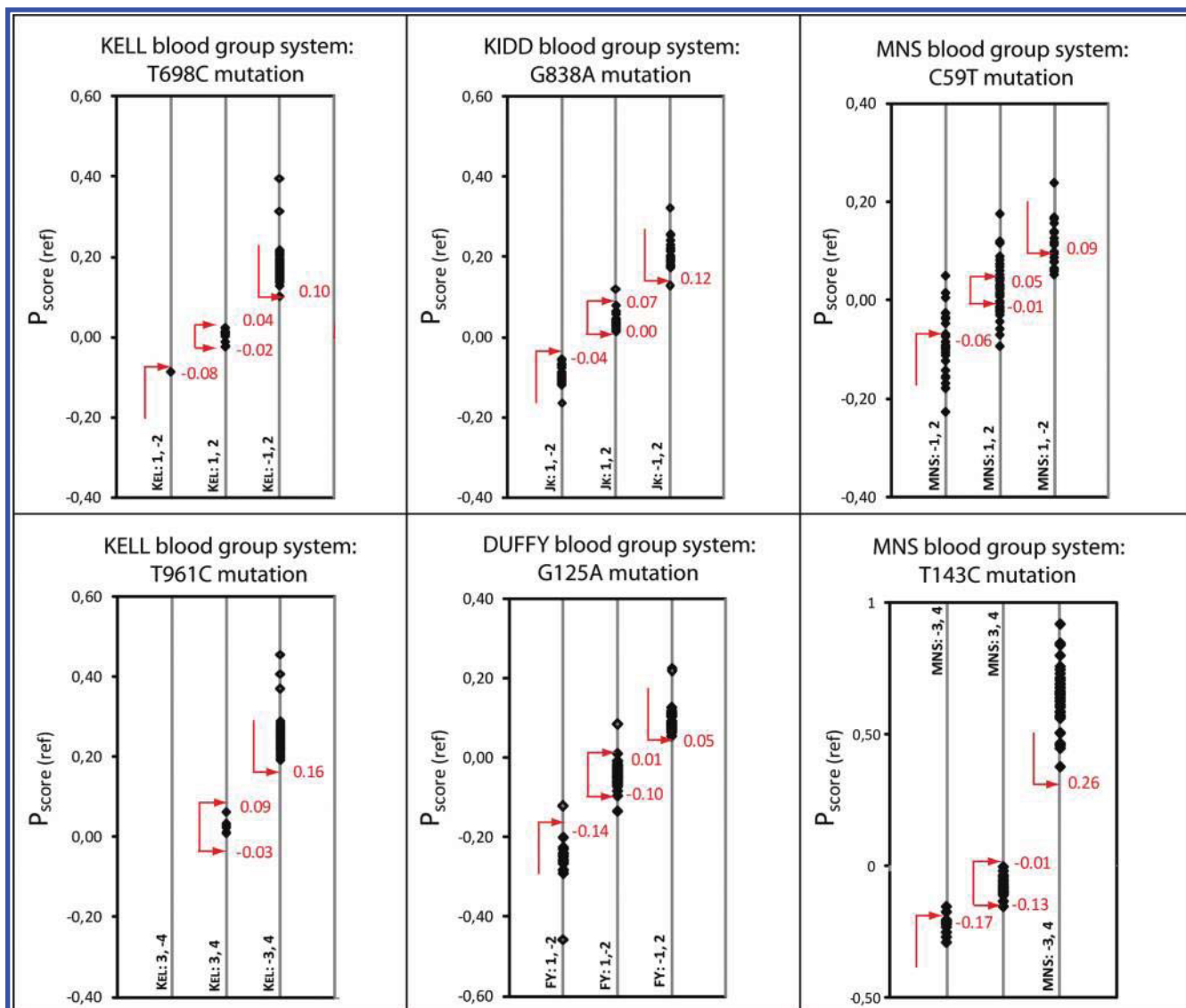


Figure 3. $P_{\text{score(ref)}}$ values of 96 reference samples sorted by phenotype. All dots on a vertical line correspond to samples of the same phenotype. The red arrows represent the cutoff values selected for HiFi assay genotyping, which are reported in Table 2.

Table 2. Selected P_{score} Cutoff Values Used for Subsequent HiFi Genotype Assignment

system	P_{score} value	genotype	cutoff value calculation ^a
Kell	$P_{\text{score}} \leq 0.08$	<i>KEL</i> *1/1	$P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 3SD_{\text{ref}}$
	$-0.02 \leq P_{\text{score}} \leq 0.04$	<i>KEL</i> *1/2	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 3SD_{\text{ref}}$
	$0.10 \leq P_{\text{score}}$	<i>KEL</i> *2/2	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$
	$-0.03 \leq P_{\text{score}} \leq 0.09$	<i>KEL</i> *3/4	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 3SD_{\text{ref}}$
Kidd	$0.16 \leq P_{\text{score}}$	<i>KEL</i> *4/4	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$
	$P_{\text{score}} \leq -0.04$	<i>JK</i> *1/1	$P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 3SD_{\text{ref}}$
	$0.00 \leq P_{\text{score}} \leq 0.07$	<i>JK</i> *1/2	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 3SD_{\text{ref}}$
	$0.12 \leq P_{\text{score}}$	<i>JK</i> *2/2	$P_{\text{score(ref)}} - 3SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$
Duffy	$P_{\text{score}} \leq -0.14$	<i>FY</i> *1/1	$P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 2SD_{\text{ref}}$
	$-0.10 \leq P_{\text{score}} \leq 0.01$	<i>FY</i> *1/2	$P_{\text{score(ref)}} - 2SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 2SD_{\text{ref}}$
	$0.05 \leq P_{\text{score}}$	<i>FY</i> *2/2	$P_{\text{score(ref)}} - 2SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$
MNS	$P_{\text{score}} \leq -0.06$	<i>MNS</i> *1/1	$P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 1SD_{\text{ref}}$
	$-0.01 \leq P_{\text{score}} \leq 0.05$	<i>MNS</i> *1/2	$P_{\text{score(ref)}} - 1SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 1SD_{\text{ref}}$
	$0.09 \leq P_{\text{score}}$	<i>MNS</i> *2/2	$P_{\text{score(ref)}} - 1SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$
	$P_{\text{score}} \leq -0.17$	<i>MNS</i> *3/3	$P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 1SD_{\text{ref}}$
	$-0.13 \leq P_{\text{score}} \leq -0.01$	<i>MNS</i> *3/4	$P_{\text{score(ref)}} - 1SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}} \leq P_{\text{score(ref)}} + 4SD_{\text{ref}}$
	$0.26 \leq P_{\text{score}}$	<i>MNS</i> *4/4	$P_{\text{score(ref)}} - 4SD_{\text{ref}} \leq P_{\text{score}}$

^a $P_{\text{score(ref)}}$ and SD_{ref} refer respectively to the mean value and standard deviation for each phenotype for reference samples.

ment, and the P_{score} cutoff values useful for a reliable genotype determination.

The 96 blood samples of known phenotype were randomly picked in French Blood Center Rhône-Alpes's blood bank and

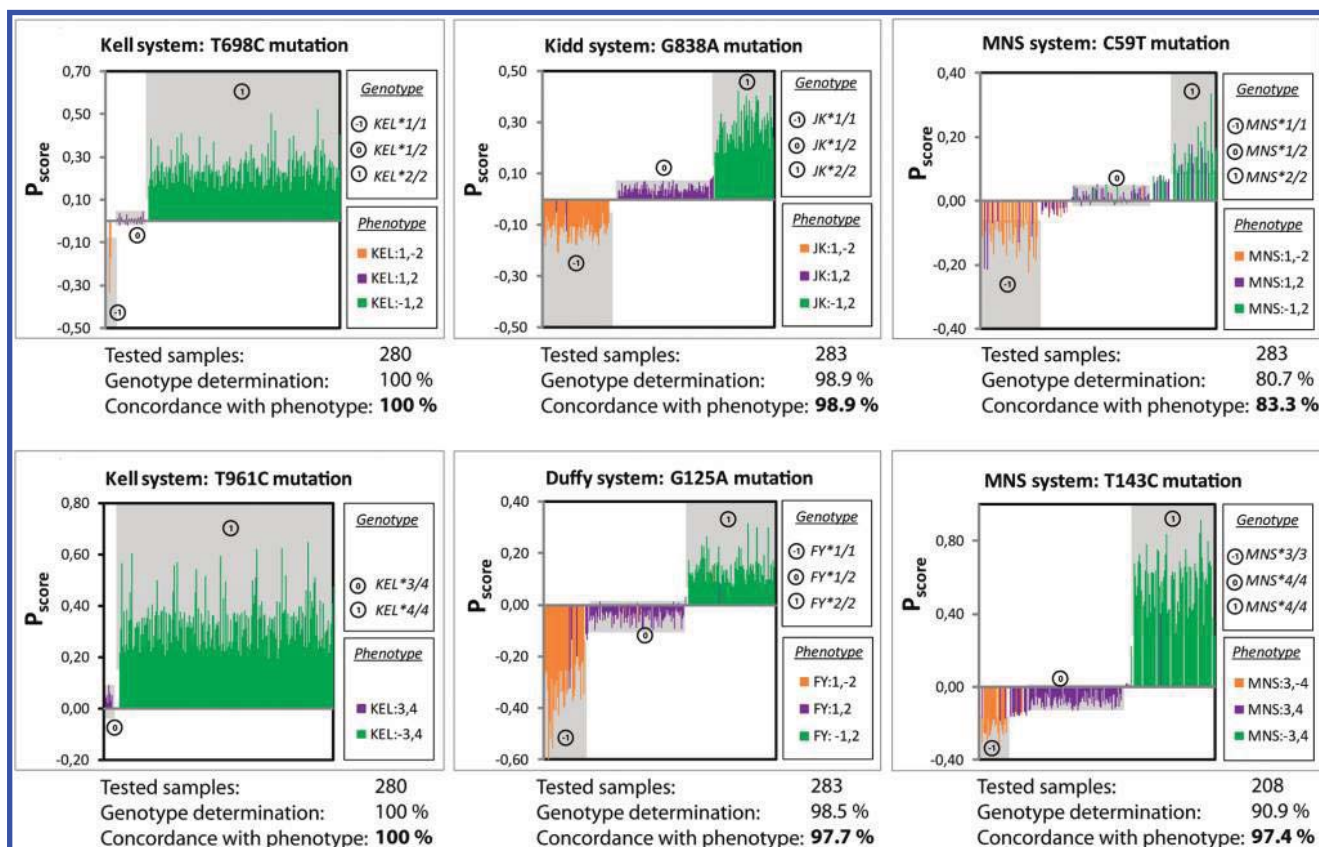


Figure 4. P_{score} values per SNP of the sample used for validation ($n = 293$). The colors indicate phenotyping results, whereas the gray zones represent the confidence area for genotype determination.

processed on a HiFi assay platform (extraction, PCR, and hybridization). The resulting P_{score} values are displayed in Figure 3.

Samples fulfilling the two following criteria were included in the reference panel used for the calculation of cutoff values. First, quality control criteria defined in the Experimental Section had to be fulfilled. Second, the P_{score} value had to be (i) more than 1 standard deviation (1SD) for MNS1/MNS2 antigens or (ii) more than 2SD for all the other phenotypes away from that given phenotype mean P_{score} value. These selection rules were applied to avoid the inclusion of a discordant sample in the reference panel. Restrictions were stronger for MNS1/MNS2 antigens due to the overlap of the clusters corresponding to the three possible phenotypes (Figure 3).

Cluster limits for each subgroup of a given genotype were calculated using $P_{\text{score(ref)}}$ mean values and standard deviations (SD_{ref}). Final cutoff values are displayed in Table 2. For the Kell and Kidd blood group systems, the clusters corresponding to the three possible genotypes were far enough from each other to set cutoff values at the $P_{\text{score(ref)}}$ mean value $\pm 3SD_{\text{ref}}$ without overlap. No cluster could be defined for the $KEL^*3/3$ genotype as none of the references displayed a $KEL:3,-4$ phenotype. For the Duffy blood group system, the clusters' width had to be shrunk to the $P_{\text{score(ref)}}$ mean value $\pm 2SD_{\text{ref}}$. For the polymorphism associated with MNS1/MNS2 antigens, the overlap observed for the reference values forced the limits to be set at the $P_{\text{score(ref)}}$ mean value $\pm 1SD_{\text{ref}}$.

In the case of the polymorphism associated with MNS3/MNS4 antigens, MNS:3,-4 and MNS:3,4 reference subgroups were almost overlapping whereas MNS:3,4 and MNS:-3,4 reference

subgroups were far from each other. Therefore, cutoff values differentiating the $MNS^*3/3$ genotype from the $MNS^*3/4$ genotype were set at the $P_{\text{score(ref)}}$ mean value $\pm 1SD_{\text{ref}}$, whereas cutoff values differentiating the $MNS^*3/3$ genotype from the $MNS^*3/4$ genotype could be set at the $P_{\text{score(ref)}}$ mean value $\pm 4SD_{\text{ref}}$.

Medium-Scale Validation of the Genotyping Assay. As a first step in the integration of the HiFi technology within the blood donation qualification process, a medium-scale validation was used to demonstrate the HiFi assay's reliability and efficiency as a routine technique for automated blood typing. A total of 293 French donors were randomly picked in the blood bank and genotyped on HiFi-Blood 96 plates. For each sample, the genotypes were assigned by comparing the calculated P_{score} for each SNP to the set of reference cutoff values. Results of the P_{score} parameter calculation are presented in Figure 4 and the genotype assignments detailed in Table 3.

The resulting genotypes were compared to phenotypes previously determined by standard serologic techniques, and excellent correlations were found for five SNPs out of six.

For the Kell, Kidd, and Duffy blood group systems, high matching percentages of 100%, 98.9%, and 97.7%, respectively, were obtained with a high quality control level of confidence (see the Experimental Section).

More precisely, concerning the evaluation of the two SNPs associated with $KEL1/KEL2$ and $KEL3/KEL4$ antigens, all 280 samples were genotyped with full concordance with the phenotype (100%). Because samples were randomly picked among blood donors, the genotypes' frequency reflects the major ethnic group

Table 3. Detailed Results of the Validation Study on 293 Blood Samples

system	global results				detail per genotype							
	number of tested samples	number of quality samples ^b	genotyped population	concordance (%)	genotype	genotyped population	number that were discordant	concordance (%)				
Kell	289	280	280 (100%)	100	<i>KEL</i> *1/1	2	0	100				
					<i>KEL</i> *1/2	33	0	100				
	281	280	280 (100%)	100	<i>KEL</i> *2/2	245	0	100				
					<i>KEL</i> *3/3	0	0	100				
					<i>KEL</i> *3/4	10	0	100				
Kidd	284	283	279 (98.9%)	98.9	<i>KEL</i> *4/4	270	0	100				
					<i>JK</i> *1/1	85	2	97.6				
					<i>JK</i> *1/2	118	0	100				
					<i>JK</i> *2/2	76	1	98.7				
					<i>FY</i> *1/1	48	4	91.7				
Duffy	268	268	264 (98.5%)	97.7	<i>FY</i> *1/2	112	0 (4 ^a)	100				
					<i>FY</i> *2/2	104	2	98.0				
					<i>MNS</i> *1/1	40	6	85.0				
					<i>MNS</i> *1/2	55	9	83.6				
					<i>MNS</i> *2/2	31	6	80.6				
MNS	268	157	126 (80.3%)	83.3	<i>MNS</i> *3/3	27	3	88.9				
					<i>MNS</i> *3/4	87	1	98.9				
					<i>MNS</i> *4/4	75	1	98.7				
					264	208	189 (90.9%)	97.4	<i>MNS</i> *3/3	27	3	88.9
									<i>MNS</i> *3/4	87	1	98.9

^a Discordances coming from rare Duffy alleles. ^b Number of samples fulfilling the quality control described in the Experimental Section.

involved (Caucasian). This point explains the low occurrence of some genotypes: *KEL**1/1, *KEL**1/2, and *KEL**3/3 (Table 3).

Kidd SNP determination (JK1/JK2 antigens) also exhibited very good results with only 3 discordant samples out of 283 (98.9% concordance) and 1.1% undetermined samples.

Duffy blood group system (FY1/FY2 antigens) genotyping appeared at first less efficient with only 94.7% concordance with the phenotype. However, four discordances were coming from rare Duffy alleles, namely, *FY**X and *FY**Fy, consistent with a weak FY2 expression and a silent FY2 expression, respectively.^{26,27} In that case, FY2 surface antigens were not detected with the serological method whereas the *FY**2 allele was genotyped. Since the specific probes for Duffy rare alleles were not included in the probe set, we were not able to detect directly *FY**X and *FY**Fy. However, *FY**X and *FY**Fy alleles were confirmed with a different genotyping technique (multiplex PCR SNaPshot²⁸). Correcting the data using this complementary information led us to re-evaluate the Duffy system concordance to 97.7%.

The MNS blood group was the most challenging system for typing. For MNS3/MNS4 polymorphism, the concordance percentage is 97.4% with 9.1% of the samples not able to be assigned with a genotype, most of them displaying P_{score} values ranking between those of *MNS**3/3 and *MNS**3/4 clusters. Indeed, as P_{score} clusters for *MNS**3/3 and *MNS**3/4 genotypes appeared almost overlapping during reference sample testing (Figure 3), cluster limits were set to avoid overlap and provide a reliable genotyping result, reducing in the mean time the number of genotyped samples (Table 3).

Concerning MNS1/MNS2 polymorphism, the low percentage of concordance (83.3%) and the great amount of samples of undetermined genotypes (19.3%) or discarded for insufficient quality results are correlated to the weakness of the signals observed (from 50% to 70% less intense than for other SNPs). We

suspect this weak response originates from a lower PCR multiplex efficiency for that SNP.

CONCLUSION

The HiFi plate's unusual design, combining the use of a flow-through porous membrane and a spotting procedure on the membrane backside, is a key to the sensor efficiency. Indeed, the filtration protocol increases the interactions between targets and immobilized probes, while it drastically decreases the background signal: contaminants get trapped on the frontside surface of the membrane. To our knowledge, that spotting approach has been mentioned only once in the literature for chemiluminescent immunoassays.²⁹ The association of HiFi plate innovative technological developments with the sample preparation multiplexing leads to a performing platform for high-throughput genotyping.

In this format, the PCR amplification step has with no doubt the heaviest impact on the genotyping test cost, even if multiplexing both PCR and hybridization steps reduces the required number of PCRs to one amplification step per sample. Due to sensitivity issues, this amplification step, also performed in every competing technique²³ (Table 4), is almost impossible to bypass, and our strategy for cost reduction was rather focused on the hybridization platform cost optimization with the choice of a colorimetric detection mode, the parallelization of sample hybridization, and the protocol automation.

Compared to other commercially available genotyping techniques (Table 4), HiFi technology is very competitive in terms of time and cost, but its main added value remains its transfer to a fully automated, well-proven, and secure high-throughput protocol. Indeed, coupling a standard robotic 96-well format with multiparametric capacities of microarray and multiplex PCR technologies leads to an automated and generic platform for multiplex assays capable of achieving ultrahigh throughput.

(26) Olsson, M. L.; Smythe, J. S.; Hansson, C.; Poole, J.; Mallinson, G.; Jones, J.; Avent, N. D.; Daniels, G. *Br. J. Haematol.* **1998**, *103*, 1184–1191.

(27) Tournamille, C. *Transfus. Clin. Biol.* **2000**, *7*, 497–509.

(28) Di Cristofaro, J.; Silvy, M.; Chiaroni, J.; Bailly, P. *J. Mol. Diagn.*, in press.

(29) McBride, J. D.; Francis Guy Gabriel, J. F.; Guy, Kolind, T.; Barcenas-Morales, G.; Isenberg, D. A.; Swana, M.; Delves, P. J.; Lund, T.; Cree, I. A.; Roitt, I. M. *Clin. Chem.* **2008**, *54*, 883–890.

Table 4. Comparison of HiFi-Blood 96 Assay with Commercially Available Genotyping Techniques^{8,23}

genotyping technique	HEA BeadChip, ^{18,19} BioArray Solutions, Immucor	BLOODChip, ²⁴ Progenika Pharma SA, Spain	Genome Lab SNPstream, ^{16,22} Beckmann Coulter	HiFi-Blood 96, ICBMS-EFS RA, France
blood groups	MNS, KEL, JK, FY, LU, DI, DO, CO, SC, LW	ABO, RHD, RHCE, MNS, KEL, JK, FY, DI, DO, CO	MNS, RHCE, KEL, JK, FY	MNS, KEL, JK, FY
number of antigens (red blood cell antigens)	24	47	19–22	12 (soon 20)
number of target SNPs	18	128 (including platelet antigens)	12	6 (soon 11)
support detection mode and apparatus	glass slide fluorescence microscopy	glass slide fluorescence microscopy	384-well plate fluorescence microscopy	96-well plate colorimetry flatbed scanner
number of samples per run	8–96	1	384	1–96
run time/duration	24 h (without extraction)	5 h (without extraction)	36 h (without extraction)	4 h
automated high-throughput procedure	no	no	no	yes
automated secured protocol	no	no	no	yes

This full automation guarantees that the HiFi platform is secured for the blood qualification center environment. The handling of the two robotic units dedicated to sample preparation (extraction and pre-PCR) and filtration assay (PCR and HiFi) only requires minimum technician intervention, lowering human error hazard. Besides, the convenient elimination of reagents through vacuum soaking during the filtration assays and the unidirectional fluid handling ensure reduced contamination. Last but not least, the long-term stability of the colorimetric staining enables the end-user to store result plates in addition to in silico data storage, leading to better traceability.

Still, HiFi assay remains currently behind commercially available genotyping techniques regarding the amount of information provided per test (Table 4). Indeed, for that first medium-scale validation study, only 6 SNPs associated with 12 red blood cell surface antigens of 4 blood group systems were detected. However, further improvements are already in progress, with the development of additional probes specific to the Duffy system concordant with the silent and weak Fy2 phenotype and new probes associated with the major blood group system Rhesus. Our final objective is to scale up to the analysis of 28 SNPs per well, targeting mutations associated with a selection of nine systems of great interest for transfusion safety in Europe (major, RHCE; minor, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Cartwright, Colton, Dumbrock, and Lutheran). Our strategy is indeed to use a probe set which will be admittedly limited in size (maximum 70 spots per well), but specifically chosen for the ethnic groups concerned.

In conclusion, the present study demonstrates the performances and the reliability of the HiFi-Blood 96 tests, which constitutes a secured and cost-efficient automated method for

blood group genotyping. The next version of this blood group genotyping tool will incorporate (i) advanced probe design and spotting conditions to increase MNS genotyping quality, (ii) new specific probes for the Duffy system concordant with the silent and weak Fy2 phenotype, (iii) new probes associated with the Rhesus system,^{1,7,30} and (iv) an increased panel of reference samples for a more accurate determination of cutoff values (large-scale study). The next validation step will be the integration of the HiFi-Blood 96 complete platform in the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes blood qualification process to monitor its impact on the blood qualification center environment and transfusion safety.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Blood Donation Qualification Center of Metz-Tessy for the extended phenotyping of blood samples and the Laboratoire d'Hématologie Moléculaire of Etablissement Français du Sang Alpes-Méditerranée for complementary characterization of discordant samples.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

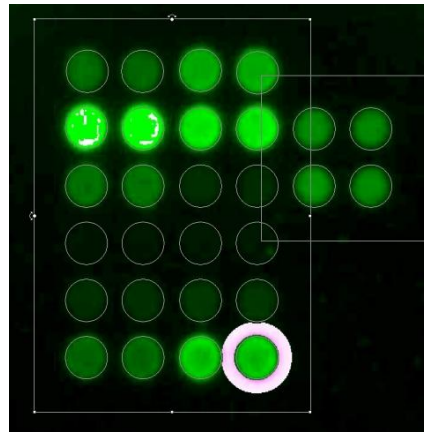
Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review April 16, 2010. Accepted June 7, 2010.

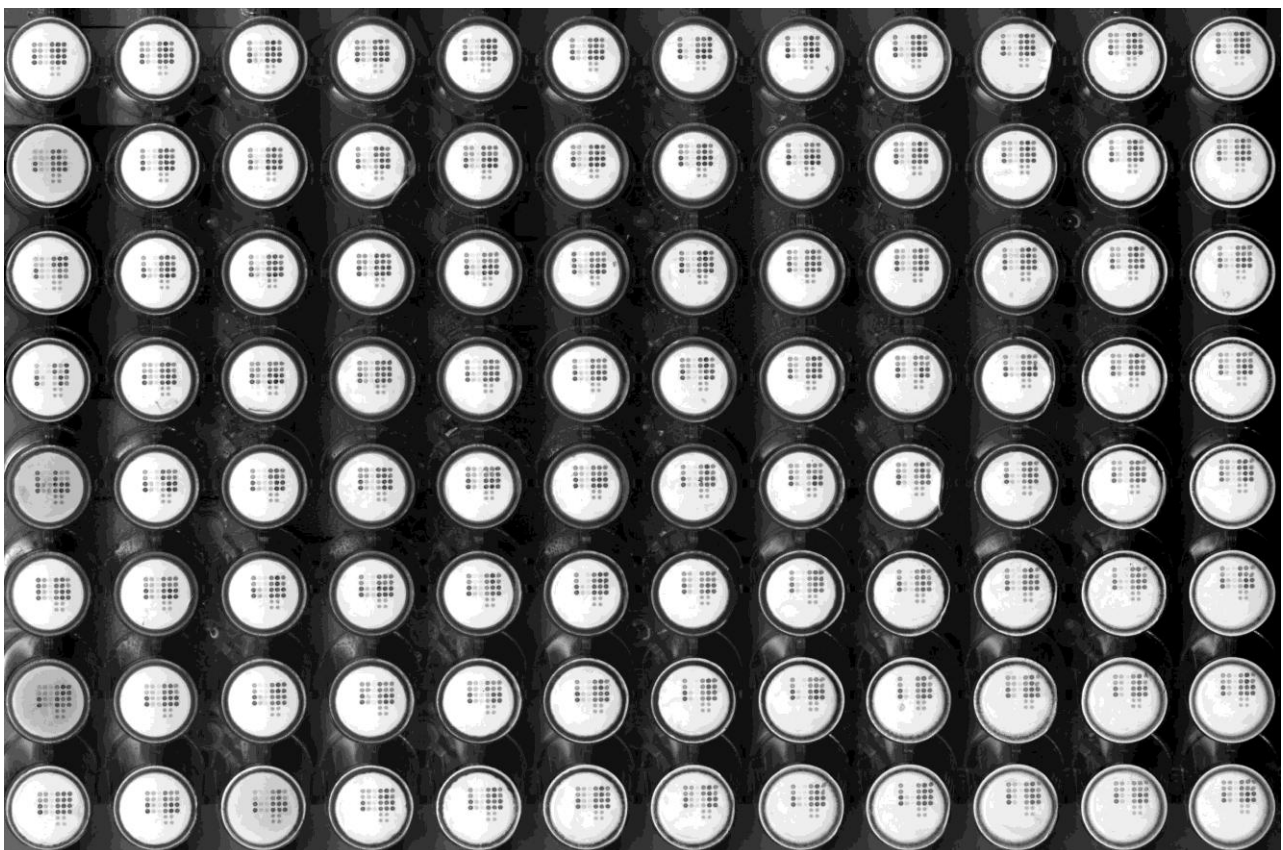
AC101008D

(30) Flegel, W. A. *Transfus. Clin. Biol.* **2006**, *13*, 4–12.

Supporting Information 1 | Example of a HiFi-array colorimetric image (false colour) analysis using GenePix Pro 6.0. The white circle corresponds to the local background of the spot.



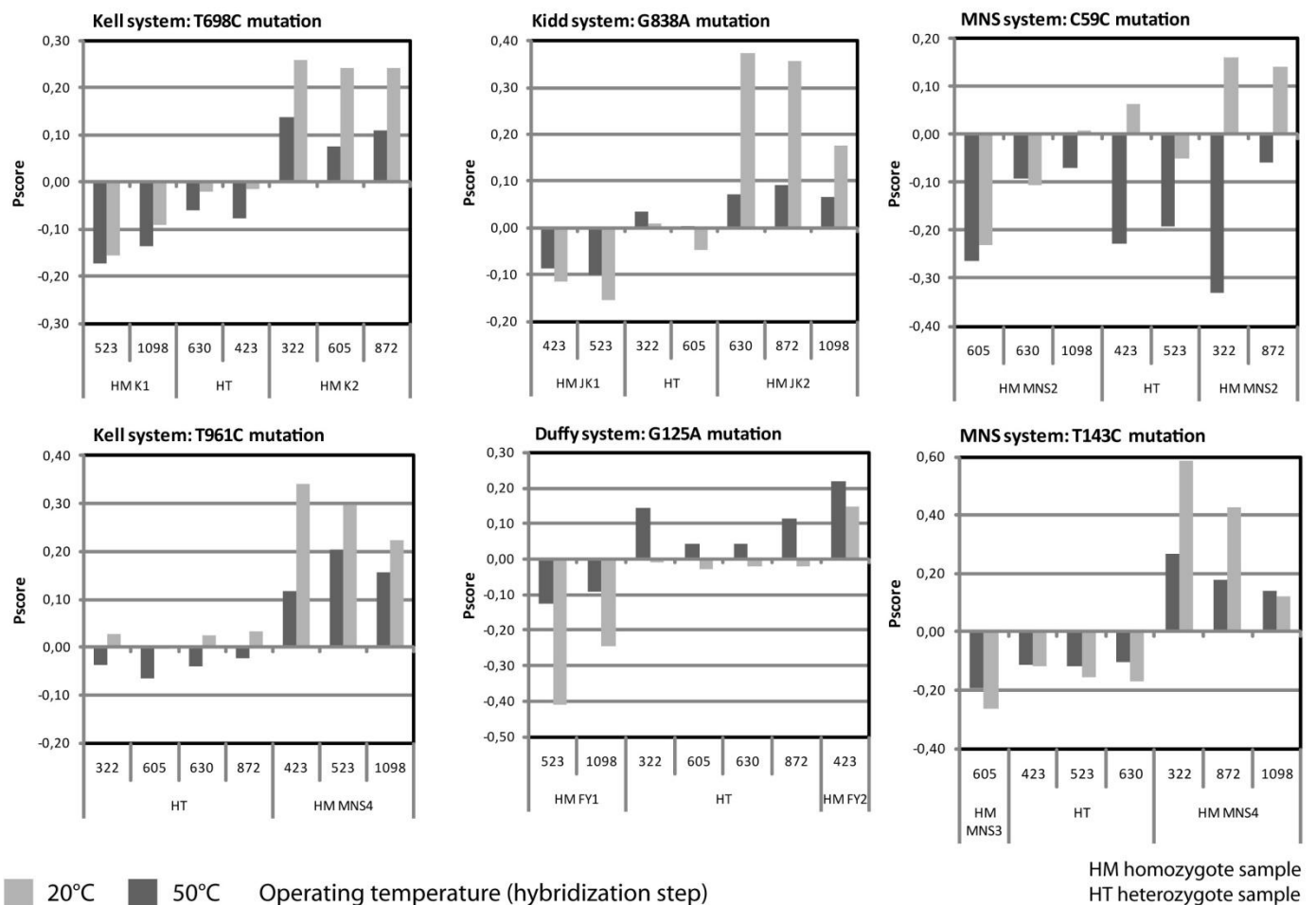
Supporting Information 2 | Grayscale image of the bottom of a stained HiFi-Blood 96TM plate used for validation. Each well corresponds to a different sample and each microarray enables to genotype 6 SNPs. This image was acquired in grayscale, using a simple office scanner with a resolution of 2400 dpi.



Supplementary Information 3 | Effect on hybridization temperature on genotyping efficiency

Seven reference samples were hybridized on HiFi plates using an automated protocol at two different temperatures: 20 and 50 °C. The highest temperature gave the larger separation between the clusters corresponding to the different genotypes, leading to a better discrimination.

(Higher temperatures would exceed melting temperatures of probes sequences.)



*** Erratum**

Light bars correspond to 50°C and dark bars to 20°C.

3.2. Compléments

3.2.1. Intégration de sondes complémentaires pour le système Duffy

Un nombre non négligeable de discordances concernant le système Duffy sont apparues lors de l'étude de validation de l'outil de génotypage érythrocytaire. Pour quatre individus de phénotype sérologique FY :1,-2 (seul l'antigène FY1 est détecté) notamment, le phénotype déduit du résultat de génotypage obtenu fut Fy :1,2 (hétérozygote). Ces incohérences ont pu être expliquées par la présence d'allèles rares du système Duffy, nommément *FY*X* et *FY*Fy*, mis en évidence par une technique de génotypage complémentaire (SNaPshot, Cf. Chapitre 2, paragraphe 3.3.2).

A la position du SNP associé aux antigènes FY1/FY2 (G125A), on trouve une guanine dans la séquence de deux allèles *FY*X* et *FY*Fy*, comme pour l'allèle *FY*2*. Cependant dans le cas de l'allèle *FY*Fy*, une autre mutation dans la région du promoteur du gène DARC inactive l'expression de l'antigène Fy2. De même, les séquences des allèles *FY*X* et *FY*2* ne diffèrent que d'une base, mais le SNP concerné entraîne une substitution Arg89Cys ayant pour conséquence une expression faible de l'antigène FY2. Ces mécanismes expliquent le fait que l'antigène FY2 n'ait pas été détecté par sérologie dans les cas précédents.

Afin de résoudre ce problème, la PCR multiplexe a été modifiée par l'équipe de l'EFS-RA afin d'amplifier les deux séquences cibles concernées et deux nouveaux couples de sondes ont été élaborés pour étendre l'analyse aux allèles *FY*X* et *FY*Fy* :

- sondes *FY*X* (mutation induisant un phénotype FY2^{faible})
et *FY*noX* (expression normale de FY2) ;
- sondes *FY*Fy* (mutation induisant un phénotype FY2^{null})
et *FY*noFy* (expression normale de FY2).

La Figure 3-18 présente quelques exemples représentatifs des résultats obtenus lors d'une évaluation préliminaire de ces deux couples de sondes. Les images présentées correspondent aux signaux colorimétriques obtenus par test d'hybridation sur plaque filtrante sur les sondes *FY*noX*, *FY*X*, *FY*noFy* et *FY*Fy* pour quatre échantillons porteurs de ces allèles rares. Pour chaque échantillon sont précisés : le génotype exact, le phénotype détecté par sérologie ainsi le génotype erroné déduit à partir des seules sondes *FY*1* et *FY*2*. Les signes + et - à droite de chaque ligne de plots indiquent la réponse attendue. Pour chaque couple de sondes, on constate que l'on obtient bien des profils spécifiques qui diffèrent suivant le génotype du patient et en accord avec le résultat attendu.

Génotype complet	<i>FY*1/X</i>	<i>FY*1/FY</i>	<i>FY*Fy/Fy</i>	<i>FY*2/Fy</i>
Phénotype observé	FY: 1,2 ou FY:1,-2 (FY2 faible)	FY: 1,-2 (FY2 nul)	FY: -1,-2 (FY2 nul)	FY: -1,2
Génotype observé (sondes FY1 et FY2)	<i>FY*1/2</i>	<i>FY*1/2</i>	<i>FY*2/2</i>	<i>FY*2/2</i>
<i>FY*noX</i> ●●●				
<i>FY*X</i> ●●●				
<i>FY*noFy</i> ●●●				
<i>FY*Fy</i> ●●●				

Figure 3-18 Résultats de génotypage des allèles *FY*X* et *FY*Fy*

3.2.2. Immunotest multiplexé pour la détection d'anticorps auto-immuns

Une autre application de criblage haut-débit sur plaque filtrante a été mise en œuvre au laboratoire. Il s'agit cette fois d'immunotests colorimétriques permettant de détecter des anticorps auto-immuns développés chez un patient en cas de pathologie cancéreuse. La méthode d'analyse repose également sur la comparaison des résultats obtenus pour un ensemble d'antigènes sondes à un panel de références empiriques.

Les résultats correspondant sont présentés dans le premier article en annexe.

Article annexe 1

Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies

Cloé Desmet, Gaëlle C. Le Goff, Jean-Charles Brès, Dominique Rigal, Loïc J. Blum,
Christophe A. Marquette
Analyst, **2011**, *136*, 2918-2924

4. Elaboration d'une nouvelle stratégie de détection colorimétrique

Enfin, parallèlement au développement de nouvelles applications, un projet annexe s'est consacré à la mise au point d'une nouvelle stratégie de détection colorimétrique sur membrane, notamment afin de résoudre les problèmes de bruit de fond rencontrés de façon récurrente lors de l'utilisation de la phosphatase alcaline, causés par l'hydrolyse spontanée du substrat.

Cette approche alternative, mise au point sur une puce à oligonucléotides, repose sur le marquage des plots positifs par la peroxydase de raifort, celle-ci catalysant la dégradation du TMB (3,3',5,5'-trétraméthylbenzidine) en présence de peroxyde d'hydrogène pour former un précipité bleu (Cf. Chapitre 1, paragraphe 5.2.2). L'originalité de la méthode consiste à produire *in situ* le peroxyde d'hydrogène nécessaire à la formation du produit coloré, à savoir directement sur la membrane, plutôt que de l'ajouter à la solution de TMB. Pour ce faire, la glucose oxydase a été immobilisée dans la membrane, et l'ajout de glucose à la solution du substrat TMB permet la production locale de peroxyde d'hydrogène, à proximité des plots (Figure 3-19).

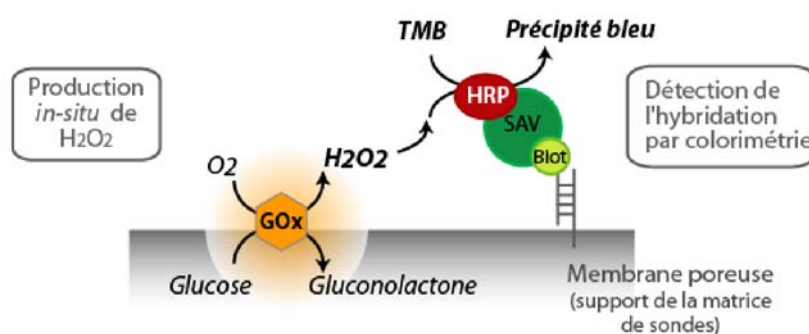


Figure 3-19 Principe de la production locale de peroxyde d'hydrogène nécessaire à la dégradation du TMB par la peroxydase de raifort pour la détection colorimétrique de l'hybridation

Ce système a permis d'obtenir une limite de détection 50 fois plus faible et une gamme dynamique plus large d'une décade, que lors de l'utilisation du kit TMB / H₂O₂ commercial. Par ailleurs, ses performances sont comparables à celle du système phosphatase alcaline - BCIP/NBT, tout en minimisant le bruit de fond.

Les résultats concernant cette étude sont présentés dans l'article suivant.

Article 3

Enhanced colorimetric detection on porous microarrays using in situ substrate production

Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum, Christophe A. Marquette

Analytical Chemistry **2011**, 83 (9), 3610–3615

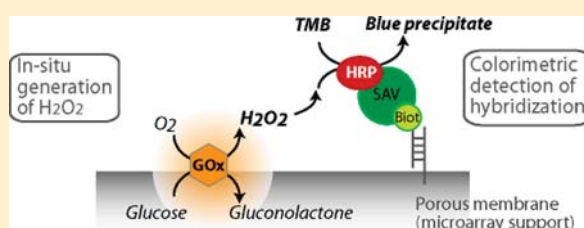
Enhanced Colorimetric Detection on Porous Microarrays Using In Situ Substrate Production

Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum, and Christophe A. Marquette*

Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1, CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE-43, bd du 11 novembre 1918-69622 Villeurbanne, Cedex, France

S Supporting Information

ABSTRACT: A new technique is reported for the enhanced colorimetric detection of multiplexed hybridization onto porous membrane-based microarrays. This approach combines the use of horseradish peroxidase (HRP) as a label together with a chromogen substrate and a local production of the hydrogen peroxide required for substrate oxidation. This in situ production of coreagent is obtained using glucose oxidase (GOx) directly immobilized within the microarray porous membrane mesh. The oxidation of glucose by the immobilized GOx produces hydrogen peroxide which itself enables the oxidation of TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) by HRP and yields a blue precipitate on positive spots. Thanks to a coreagent overconcentration within the membrane, this design drastically surpasses the performances of the standard TMB/H₂O₂ kit used for peroxidase label detection. The obtained target limit of detection is then 50 times lower (20 pM) than the one obtained with the standard kit approach, and the dynamic range expands at least one decade. Furthermore, the developed method was shown to compete well with the widely used alkaline phosphatase-BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium chloride) readout while minimizing background signal. The method was finally successfully applied to the multiplex detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in complex PCR samples. The background lowering was impacted here positively on the SNPs' detection by increasing the complementary/noncomplementary signal ratio.



There are many examples of widely used routine point-of-care diagnostic tools designed as monoparametric lateral flow test immunoassays which are coupled with a colorimetric signal detection: pregnancy tests (monitoring human chorionic gonadotropin level in urine), semen tests (monitoring prostate-specific antigen level), and virus and bacteria presence tests (VIKIA Rota-Adeno, HIV-1/2 (bioMérieux); Determine HIV-1/2, HBsAg, Syphilis TP (Inverness Medical)). This choice of a colorimetric detection for mass-scale point-of-care (POC) diagnostic tests originates from an obvious need for easy-to-handle devices but is also driven by a strong constrain upon cost reduction. Indeed, health insurance budget deficits have imposed on researchers to focus their developments onto more and more cost-efficient diagnostic tests in general and low-cost strategies. It is also worth mentioning that this major impact of the detection strategy cost of a bioassay applies not only to POC tests but also to high-throughput assays carried on in clinical laboratories.

In the field of nucleic acid assays, the number of colorimetric tests on porous material keeps increasing as well. Most of these are POC devices developed as lateral flow assays on a nitrocellulose substrate, so-called dipstick assays,^{1,2} using colloidal gold nanoparticles for DNA labeling.³ For example, Aveyard⁴ and Glynou⁵ groups reported lateral flow assays for the direct detection of PCR products, while Mao et al.^{6,7} used molecular beacon-functionalized gold nanoparticles (AuNPs) to detect single

nucleotide polymorphisms (SNPs). Other interesting approaches were described for the combination of a dipstick assay with multiplex reverse transcription⁸ (simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV) or the coupling of a polyethersulfone membrane with single primer extension.^{9,10} Finally, instead of gold colloids, colored particles such as dyed polystyrene microspheres can also be used for the generation of the colorimetric signal. A nice example is the system developed by Carter et al. for anthrax detection¹¹ on lateral flow microarrays.

Complementary approaches to these particle-based systems are methods involving enzyme labels (mainly horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (AP)) which can be of great interest when signal amplification is required. These labels are routinely used by biologists for the specific staining of Western blots, via substrates producing insoluble products (TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)/H₂O₂ and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium chloride), for HRP and AP, respectively). Applications of these labels on microarrays were also reported, for example, for PCR products detection on nitrocellulose¹² or agarose films¹³ or in combination with multiplex asymmetrical PCR.^{14,15} In these

Received: February 4, 2011

Accepted: March 21, 2011

Published: March 21, 2011

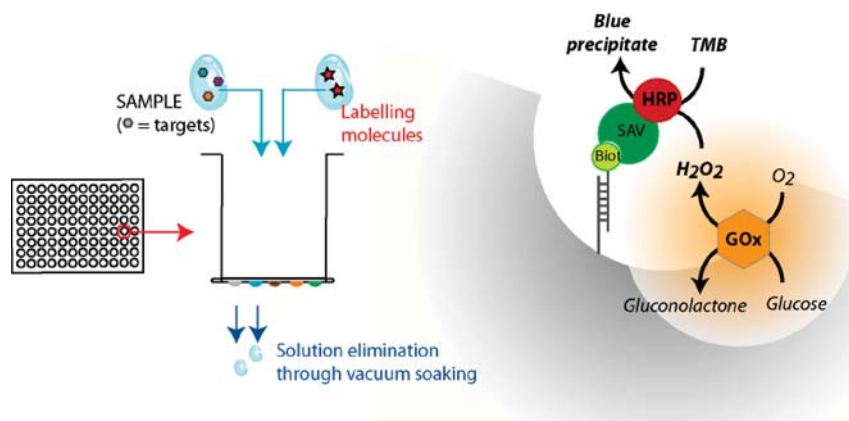


Figure 1. Principle of enhanced colorimetric HiFi-assays. The colorimetric hybridization detection on porous microarrays, based on HRP-TMB/H₂O₂, is enhanced through in situ coreagent production.

different studies, colorimetric strategies were shown to drastically lower high-throughput and mass-scale testing costs. However, lack of sensitivity and background issues were identified as recurrent drawbacks of colorimetric detection methods, which are particularly annoying when it comes to multiparametric testing and leave the assay developers no other choice than expensive sensitive techniques such as fluorescence.

Our group previously reported a cost-efficient high-throughput analysis platform (HiFi-assay) for multiparametric nucleic acids assays, on the basis of a colorimetric detection of hybridization.^{16,17} This tool, initially developed for high-throughput blood group genotyping assays, was designed in order to fulfill end-user needs (i.e., blood qualification centers): (i) the device is fully compatible with robotic platforms and thus answers throughput constrains (thousands of samples tested per day), and (ii) it is based on an enzymatic colorimetric detection process using alkaline phosphatase as label which reduces the cost per test. Although we obtained very satisfying results, detection can still be further improved. Indeed, the spontaneous degradation of AP's substrate can lead to a high background level and then lack of sensitivity.^{18–21} In order to cope with these issues, we developed a new strategy for colorimetric detection of hybridization on membrane-supported oligonucleotide microarrays based on the simultaneous use of horseradish peroxidase label and glucose oxidase (GOx; Figure 1). Our protocol involves the use of the TMB/H₂O₂ standard chromogen system for HRP label, with a local production, by the glucose oxidase, of the necessary hydrogen peroxide. This design not only drastically surpasses the performances of TMB/H₂O₂ standard kit for peroxidase but also generates signals as high as the ones obtained using the AP-BCIP/NBT system while minimizing background signal. The method was successfully applied to both synthetic oligonucleotide quantification and SNPs' detection in complex PCR samples.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. Original membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen HTS-HA nonsterile plates) were purchased from Millipore (USA). Alkaline phosphatase-labeled streptavidin, horseradish peroxidase-labeled streptavidin, glucose oxidase from *Aspergillus niger* (GOx type X-S), and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate)/NBT (nitro blue tetrazolium chloride) ready-to-use solution was purchased from Sigma-Aldrich (France). TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) Membrane Peroxidase Substrate

System (3-Component) was purchased from KPL (USA). Synthetic oligonucleotide probes and PCR primers were supplied by Eurogentec (Belgium). The synthetic oligonucleotides used as model systems were the following: biotin-(dT)₁₆-C₆-NH₂ and the pair NH₂-C₆-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC/biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA.

HiFi-Assay. Hi-Fi plate spotting and hybridization procedures were described elsewhere.¹⁷ Here, a two-step protocol (detailed in Supporting Information) was used for hybridization and labeling. In order to perform glucose oxidase coating, membranes were saturated with a 1 mg·mL⁻¹ solution of glucose oxidase in veronal saline buffer (VBS) instead of VBSTA (VBS mixed with Tween 20, 0.1% (v/v), and BSA, 1% (w/v)).

Colorimetric Detection. Three different readout systems were used in association with a simple office scanner reading procedure. In each case, the substrate solution was originally light yellow or transparent and the enzymatic reaction produced a dark blue (TMB/H₂O₂) or dark purple (BCIP/NBT) precipitate on positive spots. (i) HRP label was used in conjunction with the TMB/H₂O₂ ready-to-use kit on BSA-saturated membranes. (ii) HRP label was used in conjunction with a TMB/glucose mix on glucose oxidase-coated membranes. (iii) AP label was used in conjunction with BCIP/NBT ready-to-use solution on BSA-saturated membranes.

Multiplex Blood Group Genotyping. A set of four SNPs associated with three clinically relevant minor blood groups (Kell, Kidd, Duffy) were selected for these studies. Those SNPs concern the following mutations: Kell, T698C (SNP1) and T961C (SNP2); Kidd, G838A (SNP3); Duffy, G125A (SNP4). Eight synthetic oligonucleotide probes (from 16 mer to 19 mer) specific for the targeted alleles (three replicates per probe) and one control probe (four replicates) were arrayed on membrane backside forming a 6 × 6 matrix (50 μmol·L⁻¹ oligonucleotide solutions in PBS).

Whole blood samples (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, anticoagulant) were collected (with informed consent) from the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes. Sample selection, phenotyping, preparation (DNA extraction, multiplex PCR), and hybridization on Hi-Fi plates proceeded as previously described.¹⁶ Images of the stained membranes were quantified, and the resulting net specific intensity of a given allele A, I(A), was calculated as the mean intensity for all spot replicates of that allele probe. For each SNP (associated to two alleles A and B), a discrimination score parameter, P_{score} , was evaluated and three

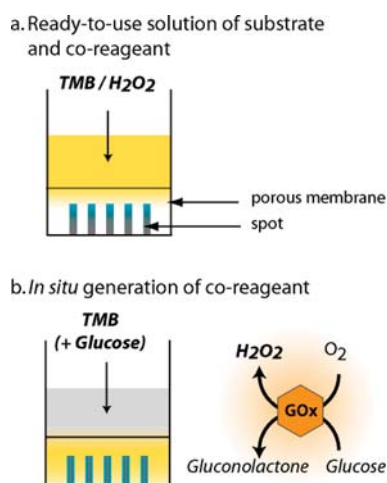


Figure 2. In situ hydrogen peroxide production. (a) Use of a standard TMB/H₂O₂ mix for peroxidase. (b) The immobilization of GOx on the membrane enables in situ hydrogen production on the membrane, which results in local coreagent overconcentration and limits the effect of diffusion by bringing the source of coreagent directly in the spots vicinity.

clusters specific to each genotype (AA, AB, or BB) were identified (see Tables S-1 and S-2, Supporting Information). The calculation of these P_{score} cluster cutoff values, used for genotype assignment, is described in the Experimental Section.

RESULTS AND DISCUSSION

HiFi-assays are multiplexed high-throughput assays supported on 96-well filtration plates (Figure 1). Each well accounts for a single multiparametric sensing unit: when vacuum is applied, the sample is loaded through the filter bottom and the biotinylated targets are forced to interact with a microarray of specific probes immobilized within the membrane (previously spotted from the backside of the plate). Initially,¹⁷ the detection of hybridization was achieved through an enzymatic staining of positive spots using alkaline phosphatase-streptavidin conjugates together with BCIP/NBT and a simple office scanner for the plate backside imaging. Such a colorimetric detection enabled a detection ranging over two decades and a 20 pmol · L⁻¹ limit of detection.

To further improve the detection efficiency, we pursued the development of a new colorimetric detection strategy based on the standard horseradish peroxidase-TMB indicator system, coupled with an innovative in situ production of the hydrogen peroxide necessary for the chromogen oxidation. We managed to form this coreagent directly on the spots thanks to a second enzyme, glucose oxidase (GOx), immobilized in the membrane mesh, notably in the spots vicinity. Instead of the standard TMB/H₂O₂ mix, a solution of TMB mixed with glucose (0.1 M) is loaded through the membrane for the colorimetric signal generation. The oxidation of glucose by the immobilized GOx produces hydrogen peroxide which itself enables the oxidation of TMB by HRP and yields a blue precipitate on positive spots. This local generation enables one to notably overcome diffusion limitation of hydrogen peroxide by bringing the source of coreagent directly on the spots (Figure 2).

Local Production of Hydrogen Peroxide. The first step of the present study was to validate the feasibility of a local H₂O₂ production at a high enough rate to raise a significant colorimetric

signal on positive spots. Indeed, the coreagent production rate should overpass its consumption rate by HRP to avoid any local lack of substrate around the spots. The immobilization of glucose oxidase within the substrate material was achieved by loading the membrane with a GOx solution (1 mg · mL⁻¹) and incubating at room temperature for 10 min. As the enzyme is here successfully immobilized through physical adsorption, we can reasonably assume that this approach would be suitable for other common membranes designed for protein immobilization (nitrocellulose or polyvinylidene difluoride (PVDF)). This loading step was also used as a saturation step (usually performed with BSA), preventing nonspecific binding.

As a first set of experiments, we confronted our in situ H₂O₂ production approach to the use of a commercial kit for HRP-TMB/H₂O₂ detection using robust synthetic model systems. The kit included a TMB solution, an oxidant solution (hydrogen peroxide, 3 mM), and an enhancer solution necessary for the precipitation of the blue oxidation product. We detected, using either the whole TMB kit on a BSA-saturated membrane or a TMB/glucose mix on a GOx-coated membrane, different amounts of biotinylated oligonucleotide targets hybridized on immobilized probes spots. A blue staining of the positive spots was obtained on the GOx-coated membrane, validating (i) the physical adsorption of glucose oxidase on the substrate, (ii) the functionality of the immobilized enzyme, and (iii) the viability of the local production of hydrogen peroxide for the colorimetric detection of hybridization. Moreover, it appeared that the local production of hydrogen peroxide shifts the calibration curve (Figure 3a) to lower target concentrations (for hybridization assays, the limit of detection (LOD) decreases from 1 nM to 20 pM) and expands the dynamic range of one decade at least.

All these observations can be correlated with the local overconcentration of the hydrogen acceptor appearing in the vicinity of the HRP, when producing the hydrogen peroxide in situ. Indeed, since the substrate saturation cannot be reached for peroxidase,²² the enzyme activity is highly dependent on the substrate concentration. In the TMB kit, the hydrogen donor (TMB) and acceptor (H₂O₂) concentrations, which are optimized according to background lowering and substrate stability, do not correspond to saturating conditions. Moreover, it is reasonable to assume that, when the in situ production of hydrogen peroxide is used, the local concentration of hydrogen acceptor might reach higher values than the 3 mM of the optimized kit.

This overconcentration leads to higher HRP activity, resulting then in higher staining intensity. Besides, when the hydrogen peroxide is produced locally, the effects of enzyme activity (substrate consumption) and substrate diffusion are put in competition, creating new equilibria highly dependent on the amount of HRP on each spot. Indeed, below a target concentration of 1 nM (low enzyme activity), the enhancement effect of the local production on HRP activity is clearly larger than the newly generated diffusion limitation and leads up to a 350% amplification of the signal. Inversely, for high enzyme activity on the spots (high target concentration), a strong substrate diffusion gradient within the membrane counterbalances the benefit coming from hydrogen peroxide local production and amplification decreases.

In order to completely validate the analytical potentiality of the technique, a complementary study was conducted in the same conditions to compare the classical alkaline phosphatase-BCIP/NBT staining method with our newly developed HRP-TMB/GOx

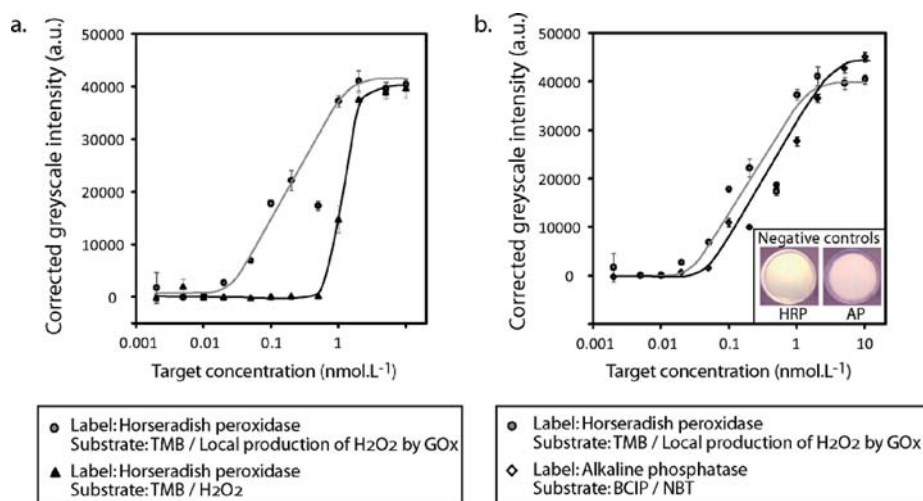


Figure 3. Hybridization assays on synthetic oligonucleotides ($50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ probe solution). (a) Comparison with horseradish peroxidase labeling used in conjunction with TMB Peroxidase Membrane System kit. (b) Comparison with alkaline phosphatase-BCIP/NBT readout (inset: pictures of stained negative control (no target) membranes).

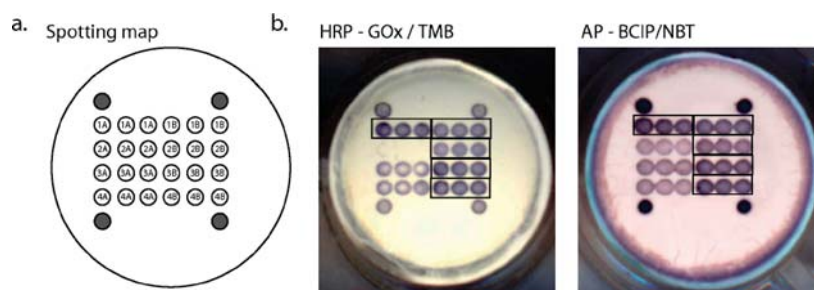


Figure 4. Typical genotyping results. (a) Spotting map. Each line corresponds to a given SNP analysis with three replicates of the two probes (A and B). The four dark spots are positive controls. Three configurations can appear: A positive/B negative (homozygote AA), A and B positive (heterozygote AB), or A negative/B positive (homozygote BB). (b) Pictures of stained membranes obtained by testing the same sample (line 1: AB; line 2: BB; line 3: BB; line 4: BB) using both HRP-GOx/TMB (left) and AP-BCIP/NBT (right) readout strategies. Positive spots are framed.

system. The target calibration curves obtained are presented in Figure 3b. As can be seen, the performances of both staining methods are similar, with a limit of detection of 20 pM and a detection ranging over two decades at least. Nevertheless, when the alkaline phosphatase system is used, the background staining of the membrane was, as expected, significantly higher (see Figure 3 inset) than with the new method. This background difference (5–10 times higher for BCIP/NBT than for TMB/GOx) is related to the usual lack of stability of alkaline phosphatase substrates, leading to their spontaneous hydrolysis.

Application to Multiplex Blood Group Genotyping. In order to fully demonstrate its benefit, our new staining system was applied to a practical application: the multiplexed detection, in real blood samples, of single nucleotide polymorphisms (SNPs) carrying information on blood groups (multiplex blood group genotyping). Before the hybridization assay, the genomic DNA is extracted from the whole blood sample, and then, the target sequences are amplified and labeled through multiplex PCR. A set of 12 specific probes, enabling the simultaneous analysis of six SNPs relevant for transfusion safety, was previously developed and validated using alkaline phosphatase labeling.¹⁶ In order to validate the reliability of our HRP-GOx/TMB detection strategy on crude samples, genotyping assays were conducted on a reduced set of four SNPs (eight specific probes; see Figure 4a).

Details on these SNPs and the probes set are reported in the Experimental Section.

Sixteen samples of known phenotypes were submitted to HiFi-assay genotyping assays, and results were compared to alkaline phosphatase readout performances. Typical images of stained membranes are presented in Figure 4b. Once again, it appeared that the background was significantly lower on HRP-GOx/TMB stained membranes than on the AP-BCIP/NBT stained ones. Moreover, the discrimination between genotypes seems to be more accurate, i.e., the signal ratio between positive and negative spots is higher. These genotyping results were analyzed using a semiquantitative method,¹⁶ on the basis of the calculation of a score parameter for each SNP, called P_{score} (the algorithm for P_{score} calculation is detailed in the Experimental Section). Three P_{score} clusters per SNP, each one proper to a unique genotype, were defined empirically. The resulting clusters, obtained using both staining methods, are reported Figure 5. The samples were alongside phenotyped by serologic methods, and both sets of genotyping results were compared with phenotypes. The detailed results are reported in Tables S-1 and S-2, Supporting Information.

For both staining methods, a genotype could be assigned to 88% of the 60 evaluated parameters. For the AP-BCIP/NBT system, 96% were in good agreement with phenotypes (4% discordant),

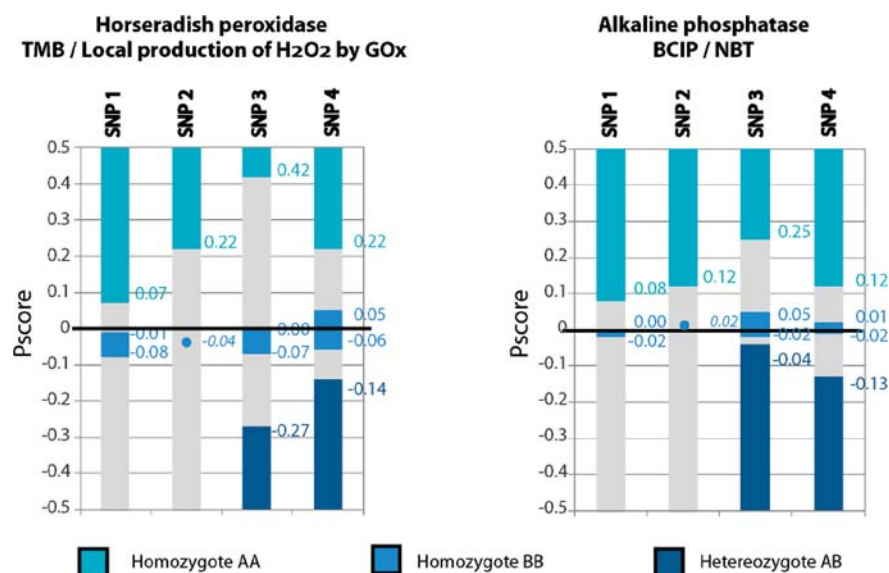


Figure 5. Genotyping results: P_{score} clusters obtained on a panel of 16 patients with either HRP-GOx/TMB readout (left) or AP-BCIP/NBT readout (right). The indicated values correspond to the calculated cutoff values (see Experimental Section). A dot is used instead of a bar when a single sample was tested for the given subgroup.

whereas the concordant percentage reached 98% with HRP-GOx/TMB readout. This difference in discrimination accuracy is related to differences between the P_{score} values' sets obtained with both techniques. Indeed, in the case of the HRP-GOx/TMB method, the P_{score} relevant clusters for each genotype are better separated, leading to a more accurate genotype determination. This is where our newly developed technique impacts the most assay performances.

CONCLUSION

Although colorimetric methods, enzymatic labeling, for instance, are frequently employed for monoparametric tests on porous substrates, their application to multiparametric analysis and microarrays remains limited because of sensitivity and background common issues. However, such methods could offer massive cost reduction in comparison with current sensitive routine techniques such as fluorescence, when mass-scale medical testing is performed for POC devices as well as for high-throughput platforms.

In this report, we have presented a new colorimetric hybridization detection strategy, based on horseradish peroxidase labeling used in conjunction with TMB chromogen and an innovative local production of hydrogen peroxide. This technique was applied to filtration microarrays (HiFi-assay 96-well plates), that we previously developed as a platform for automated high-throughput genotyping. In this new approach, glucose oxidase is immobilized on the porous membrane and is used for the local production of the hydrogen peroxide necessary for TMB oxidation (glucose consumption). This strategy enabled us to overcome sensitivity issues encountered with a classic HRP colorimetric detection using a TMB/H₂O₂ mix. Indeed, the in situ production of H₂O₂ generates a local overconcentration around the labeled spots which leads to an increase in HRP activity, resulting in an important signal amplification, especially for low target concentrations (at high concentrations the opposite effect of substrate diffusion becomes important).

Moreover, this new readout appeared as an interesting alternative to the alkaline phosphatase labeling (used in conjunction with BCIP/NBT) for colorimetric hybridization detection applied to our genotyping tool. Indeed, the in situ hydrogen peroxide production enabled us to reach equal sensitivities, while decreasing background signal, which is a recurrent problem of alkaline phosphatase label (spontaneous substrate hydrolysis). Finally, this newly developed technique was successfully applied to crude PCR products hybridization using an automated protocol, enabling then a high-throughput cost-efficient, sensitive, and reliable multiparametric analysis of real samples.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr or christophe.marquette@axoscience.com.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Blood Donation Qualification Center of Metz-Tessy for providing whole blood samples and extended phenotyping characterizations and the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes, especially Dr. Jean-Charles Brès and Dr. Dominique Rigal, for providing multiplex PCR products.

REFERENCES

- (1) Ngom, B.; Guo, Y. C.; Wang, X. L.; Bi, D. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1113–1135.
- (2) Mark, D.; Haerberle, S.; Roth, G.; von Stetten, F.; Zengerle, R. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1153–1182.

- (3) Mao, X.; Ma, Y.; Zhang, A.; Zhang, L.; Zeng, L.; Liu, G. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 1660–1668.
- (4) Aveyard, J.; Mehrabi, M.; Cossins, A.; Braven, H.; Wilson, R. *Chem. Commun.* **2007**, 4251–4253.
- (5) Glynou, K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; Syriopoulou, V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4155–4160.
- (6) Mao, X.; Xu, H.; Zeng, Q. X.; Zeng, L. W.; Liu, G. D. *Chem. Commun.* **2009**, 3065–3067.
- (7) He, Y. Q.; Zeng, K.; Gurung, A. S.; Baloda, M.; Xu, H.; Zhang, X. B.; Liu, G. D. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7169–7177.
- (8) Dineva, M. A.; Candotti, D.; Fletcher-Brown, F.; Allain, J. P.; Lee, H. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 4015–4021.
- (9) Litos, I. K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; Traeger-Synodinos, J.; Kanavakis, E. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 395–402.
- (10) Litos, I. K.; Ioannou, P. C.; Christopoulos, T. K.; Traeger-Synodinos, J.; Kanavakis, E. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3135–3139.
- (11) Carter, D. J.; Cary, R. B. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e74.
- (12) Cretich, M.; Di Carlo, G.; Giudici, C.; Pokoj, S.; Lauer, I.; Scheurer, S.; Chiari, M. *Proteomics* **2009**, *9*, 2098–2107.
- (13) Petersen, J.; Stangegaard, M.; Birgens, H.; Dufva, M. *Anal. Biochem.* **2007**, *360*, 169–171.
- (14) Chen, J. J. W.; Wu, R.; Yang, P. C.; Huang, J. Y.; Sher, Y. P.; Han, M. H.; Kao, W. C.; Lee, P. J.; Chiu, T. F.; Chang, F.; Chu, Y. W.; Wu, C. W.; Peck, K. *Genomics* **1998**, *51*, 313–324.
- (15) Mao, H. L.; Wang, H. M.; Zhang, D. L.; Mao, H. J.; Zhao, J. L.; Shi, J.; Cui, Z. C. *Clin. Biochem.* **2006**, *39*, 67–73.
- (16) Le Goff, G. C.; Bres, J. C.; Rigal, D.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6185–6192.
- (17) Le Goff, G. C.; Desmet, C.; Bres, J.-C.; Rigal, D.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *26*, 1142–1151.
- (18) Bauer, C. G.; Eremenko, A. V.; EhrentreichForster, E.; Bier, F. F.; Makower, A.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R.; Scheller, F. W. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2453–2458.
- (19) Stinson, R. A. *Clin. Chem.* **1993**, *39*, 2293–2297.
- (20) Smejkal, G. B.; Kaul, C. A. *J. Histochem. Cytochem.* **2001**, *49*, 1189–1190.
- (21) Serra, B.; Morales, M. D.; Reviejo, A. J.; Hall, E. H.; Pingarron, J. M. *Anal. Biochem.* **2005**, *336*, 289–294.
- (22) Puetter, J.; Becker, R. In *Methods of Enzymatic Analysis*, 3 ed.; Bergmeyer, H. U., Ed.; VCH: Weinheim, 1995; Vol. 3, pp 286–293.

Supporting Information

Enhanced colorimetric detection on porous microarrays using *in-situ* substrate production

Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette*

Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
Université Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS
Bâtiment CPE - 43, bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne, Cedex, France.

E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; christophe.marquette@axoscience.com

Further details about the automated filtration protocol and the genotyping results analysis are reported in this section. Tables S-1 and S-2 describe the complete results of genotyping studies for both horseradish peroxidase – TMB/GOx read-out and alkaline phosphatase – BCIP/NBT read-out.

Detailed protocol for HiFi automated filtration assay

HiFi-plates were prepared by arraying 2.4 nL drops of spotting solutions (spot to spot distance = 500 μm) on the membrane backside using a BioChip Arrayer BCA1 (Perkin-Elmer).

HiFi filtration assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a plate filtration unit and a heater. For all detection strategies, the filtering protocol involved the following steps. i) Membranes were washed with veronal buffer saline (VBS, 0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) and saturated with either VBSTA (VBS added of Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 1% (w/v)) or a 1 mg.mL⁻¹ solution of glucose oxidase in VBS. ii) Samples (synthetic target solutions or crude PCR products) were transferred to HiFi-plate microwells and loaded on the membrane for hybridization (30 min incubation, 37°C). iii) The membranes were then loaded with the enzyme-labeled streptavidin solution (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 30 min incubation, 37°C). v) Finally, 200 μL of the proper substrate solution were added per well for signal generation at room temperature (from 5 min to 1 hour, depending on the test condition). Membranes were washed with VBS after hybridization, labeling and signal generation steps. The microtiter plate bottom was imaged using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution.

Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity on a given probe was calculated as the mean intensity for all replicate spots.

Genotyping results analysis

For each SNP associated to two alleles A and B, the following discrimination score parameter (P_{score}) was evaluated ($I(A)$ corresponds to the resulting net specific intensity of a given allele A).

$$P_{score} = \frac{I(B) - I(A)}{I(B) + I(A)}$$

For each SNP, 3 clusters specific to each genotype (AA, AB or BB) were identified. Within each subgroup of a given genotype (based on serologic results), a median P_{score} value and the corresponding standard deviation (SD) were calculated. The cut-off limits of the clusters specific to each genotype were set as following i) AA homozygotes cluster: $median(AA) - 1SD < P_{score}$; ii) AB heterozygotes cluster: $median(AB) - 1SD < P_{score} < median(AB) + 1SD$; iii) BB homozygotes cluster: $median(BB) + 1SD < P_{score}$. The empiric set of P_{score} raw data was compared once again to these cut-off values: when P_{score} values ranged in the wrong cluster, samples were withdrawn from the references set used for cut-off values calculation. A second set of corrected cut-off values was then calculated using this reliable restricted references set (see Tables S-1 and S-2).

Table S- 1

Genotyping results for horseradish peroxidase – TMB/GOx read-out

	Genotype	Cluster cut-off values	Number of samples	Comparison with phenotype	
				concordant	discordant
SNP1	KEL*1/2	$-0,02 < P_{score} < 0,00$	2	2	0
	KEL*2/2	$0,08 < P_{score}$	13 (12)*	12	0
SNP2	KEL*3/4	$P_{score} = 0,02$ **	1	1	0
	KEL*4/4	$0,12 < P_{score}$	14 (12)*	12	0
SNP2	JK*1/1	$P_{score} < -0,04$	6	6	0
	JK*1/2	$-0,02 < P_{score} < 0,05$	4 (3)*	3	0
	JK*2/2	$0,25 < P_{score}$	5	5	0
SNP4	FY*1/1	$P_{score} < -0,14$	2	2	0
	FY*1/2	$-0,06 < P_{score} < 0,05$	4(1)*	3	0
	FY*2/2	$0,22 < P_{score}$	9 (6)*	5	1
				51/60 (85%)	1/60 (2%)

* The second number doesn't take in account samples which P_{score} value ranged outside of clusters). If nothing is indicated, all samples were successfully genotyped.

** A single sample of this genotype was tested.

Table S- 2

Genotyping results for alkaline phosphatase – BCIP/NBT read-out

	Genotype	Cluster cut-off values	Number of samples	Comparison with phenotype	
				concordant	discordant
SNP1	KEL*1/2	$-0,02 < P_{score} < 0,00$	2	2	0
	KEL*2/2	$0,08 < P_{score}$	13	13	0
SNP2	KEL*3/4	$P = 0,02^{**}$	1	1	0
	KEL*4/4	$0,12 < P_{score}$	14 (12)*	12	0
SNP2	JK*1/1	$P_{score} < -0,04$	6	5	1
	JK*1/2	$-0,02 < P_{score} < 0,05$	4	3	1
	JK*2/2	$0,25 < P_{score}$	5 (4)*	4	0
SNP4	FY*1/1	$P_{score} < -0,13$	2	2	0
	FY*1/2	$-0,01 < P_{score} < 0,02$	4 (3)*	3	0
	FY*2/2	$0,12 < P_{score}$	9 (8)*	8	0
				52/60 (88%)	2/60 (3%)

* The second number doesn't take in account samples which P_{score} value ranged outside of clusters). If nothing is indicated, all samples were successfully genotyped.

** A single sample of this genotype was tested.

Chapitre 4. Supports d'immobilisation innovants pour tests colorimétriques

Un deuxième axe de recherche de cette thèse s'est intéressé à l'élaboration de supports d'immobilisation innovants pour les tests colorimétriques développés. Différents matériaux (polystyrène, adhésif) ont ainsi été comparés au support membranaire pour la mise en œuvre de tests d'hybridation haut-débit. Cette comparaison est présentée dans l'article 4. Par ailleurs, une partie des travaux a porté sur la mise au point d'une stratégie d'immobilisation d'oligonucléotides sur un support innovant utilisé au laboratoire pour la fabrication de systèmes miniaturisés, le PolyShrink™.

1. Nouveaux supports pour test colorimétrique haut-débit

1.1. Comparaison de différentes architectures de surface

Dans le but d'optimiser l'efficacité des tests d'hybridation colorimétriques, quatre matériaux ont été comparés pour l'immobilisation des oligonucléotides: (i) la membrane Multiscreen HTS-HA présentée précédemment, (ii) une surface de polystyrène brute classiquement utilisée pour les tests ELISA, (iii) une surface de polystyrène activée et (iv) un support adhésif double-face.

Ces différents matériaux ont été assemblés en fond de puits d'une microplaque 96-puits afin de procéder à un test d'hybridation automatisé comme présenté au chapitre précédent. Dans chaque puits, une matrice de sondes spécifiques de trois polymorphismes a été immobilisée. Il s'agit des SNP associés aux antigènes érythrocytaires KEL1/KEL2, JK1/JK2 et FY1/FY2. La détection du signal a reposé une fois de plus sur un marquage des plots positifs par la phosphatase alcaline et l'utilisation d'une solution de substrat BCIP/NBT.

L'ensemble des résultats fournis par les tests colorimétriques, une étude des surfaces par microscopie électronique à balayage et une série d'expériences complémentaires de chimiluminescence, ont mis en évidence le fait que l'efficacité du test ne dépendait pas seulement de la densité de sondes sur la surface mais aussi de la capacité du matériau à retenir le précipité coloré.

L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'article 4 ci-après.

Article 4

Surface architectures for colorimetric microarrays

Gaëlle C. Le Goff, Benjamin P. Corgier, Céline A. Mandon, Gabriel De Crozals, Carole Chaix, Loïc J. Blum et Christophe A. Marquette

Manuscrit soumis.

Surface architectures for colorimetric microarrays

*Le Goff G.C.^a, Corgier B.P.^a, Mandon C.A.^a, De Crozals G.^b, Chaix C.^b, Blum L.J.^a
and Marquette C.A.^{a*}*

^a Laboratoire de Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire, Université Lyon1 – CNRS 5246 ICBMS, Bât. CPE – 43 Bd du 11 Nov., 69622 Villeurbanne, France.

^b UMR CNRS 5280, Université Claude Bernard Lyon 1, Bâtiment CPE
43, bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne, Cedex, France.

E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; Fax: +334 72 44 79 70; Tel: +334 72 43 13 69

ABSTRACT

We report here an extensive comparison of support materials for colorimetric hybridization assays on microarrays. Four surfaces with various chemistries and architectures (from flat to porous) were evaluated: i) bare and ii) activated polystyrene surfaces classically used for ELISA; iii) a double-sided adhesive support; and iv) a porous nitrocellulose/cellulose acetate membrane. Each substrate was functionalized with a microarray of probes and subjected to an enzymatic colorimetric DNA hybridization test for 3 SNPs genotyping. Tests were carried out in a 96-well assembly suitable for automated high-throughput analysis. Colorimetry results, microscopy observations and a complementary chemiluminescence study showed that the test efficiency not only depended on the surface probe density but that the capacity of the material to retain the colored enzymatic product was also a critical parameter. All parameters being considered, the adhesive coated surface appeared in the end to display the best surface architecture for efficient colorimetric microarrays.

KEYWORDS: adhesive surface; colorimetry; high-throughput; microarray; polystyrene; porous surface

1- INTRODUCTION

Colorimetric solid phase tests shall be the cost-efficient approach for the democratization of multiparametric diagnosis and prognosis testing. This fact is clearly evidenced by the many examples of widely used routine point-of-care diagnostic tools (pregnancy tests, semen tests, virus and bacterium presence tests: VIKIA® Rota-Adeno, HIV-1/2 (bioMérieux); Determine® HIV-1/2, HBsAg, Syphilis TP (Inverness Medical)), designed as monoparametric lateral flow test immunoassays coupled with colorimetric signal detection.

In the particular field of microarrays, the necessity to image the chip surface to distinguish the specific response of each one of the different spots has led to an intensive utilization of fluorescence imagers. Despite the fact that this approach was giving very good results when sensitivity was required, the technology restrictions impacted negatively on the democratization of the tool. Indeed, none of the health insurance authorities, even in developed countries, have budget to reimburse expensive tests, even real breakthrough technologies in pathology early diagnosis. The unique economically viable solution seems then to be the adaptation of the pre-existing colorimetric single parameter assays to automated high-throughput multiparameter tools. So far, such approaches have been based either on colloidal gold nanoparticles for DNA labeling [1-3], on molecular beacon-functionalized gold nanoparticles [4, 5] or on colored particles such as dyed polystyrene microspheres used for the generation of the colorimetric signal [6]. Enzyme labels were also used (mainly horseradish peroxidase (HRP) and alkaline phosphatase (AP)) and appeared of great interest when signal amplification was required. Practical applications using these labels on microarrays were reported, for instance for the detection of PCR products on nitrocellulose [7] or agarose films [8], or used in combination with multiplex asymmetrical PCR [9, 10]. In those different studies, colorimetric strategies were shown to drastically lower the costs of the high-throughput and mass-scale testing tools.

Our group worked for the last three years on the development of a cost-efficient high-throughput analysis platform (HiFi-assay) for multiparametric nucleic acid assays based on such an enzyme catalyzed colorimetric detection of hybridization [11, 12]. The positive spots were stained, following hybridization

of the labeled target with the immobilized probe through the production of a precipitating product (from the alkaline phosphatase substrate BCIP/NBT). Interestingly the architecture of the immobilization support was shown to critically impact the final test quality.

We are reporting here a comparison study between the different surface architectures which were foreseen for this system. Indeed, different surface materials and coating strategies were tested and appeared to have different levels of impact on both the immobilization of the probe microarray and the quality of the colorimetric staining of positive spots. Flat polystyrene surface, polymeric adhesive coated surface (polyacrylic based) and porous nitrocellulose based membranes were thus tested and characterized.

2- MATERIALS AND METHODS

2.1- Materials

Synthetic oligonucleotide probes and primers were supplied by Eurogentec (Belgium). The sequence and length of the six couples of probes and primers (2 per SNP) were previously optimized [11] (the 3 associated SNPs are described in *Electronic Supplementary Material Table 1*). For intellectual property reasons, probes and primers sequences will not be described here. Alkaline phosphatase-labeled streptavidin and BCIP/NBT ready-to-use solution were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

The bottomless 96-well plates were purchased from Greiner bio-one SAS (Courtaboeuf, France). The porous surface was an original membrane-bottomed 96-well plates (Multiscreen HTS-HA) purchased from Millipore (France). The white polystyrene surface was PolyShrinkTM purchased from Luckysquirrel (Belen, US). The white double sided adhesive 7966WDL, medical grade, was obtained from 3M (France).

2.2- Spotting procedure

For oligonucleotide microarrays preparation, the 5'-amino modified probe sequences were prepared in acetate buffer 0.1 mol.L⁻¹, KCl 0.1 mol.L⁻¹, bromophenol blue 0.25 mg.mL⁻¹, pH 5.5 to reach a final

concentration of $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. These solutions were spotted as 3.2 nL drops (pitch = 600 μm) on the different surfaces using a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany). The substrate was air-dried at room temperature and was then ready to be used.

The polystyrene surface and the double sided adhesive were, when mentioned, activated for one hour with 1% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 mol.L^{-1} acetate buffer, pH 5.5.

A double sided tape bearing 6 mm diameter holes was used to assemble the polystyrene support with a bottomless 96-well plate whereas the spotted adhesive support was directly assembled with the bottomless plate thanks to its adhesive property.

2.3- Oligonucleotide assay procedure

Blood samples were prepared according to reference [11]. Oligonucleotide assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a heater. For all experiments, the protocol involved the following steps. i) Wells were washed with phosphate buffer saline (PBS, 0.1 mol.L^{-1} , pH 7.4) and saturated with PBS mixed with LowCross Buffer 1:5 (v/v) (Candor Bioscience, Wangen, Germany). ii) Samples were diluted 2.5 times in the saturation buffer and transferred to the wells and incubated for 30 min at 55°C . iii) The wells were then loaded with the alkaline phosphatase-labeled streptavidin solution ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) and incubated for 30 min at 55°C . iv) Finally, 200 μL of BCIP/NBT substrate solution were added in each well for signal generation. The microtiter plate bottom was imaged using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution. Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation.

Wells were washed with PBS after hybridization, labeling and signal generation steps. For the porous surface, washing steps were performed through filtration under vacuum condition. For all other surfaces, washings were performed using a dispense/aspiration procedure.

For the chemiluminescent labeling experiment, alkaline phosphatase-labeled streptavidin solution was replaced by horseradish peroxidase-labeled streptavidin solution ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). The chemiluminescent measurements were realized using SuperSignalTM solution (Pierce, France) as horseradish peroxidase substrate in order to achieve bright chemiluminescent signals. The emitted light was collected and integrated for 180 seconds using a charged coupled device (CCD) cooled camera light measurement system (EM-CCD, Hamamatsu).

3- RESULTS

The present study aims to demonstrate the impact of the surface architecture of a high-throughput colorimetric assay on the test results. For that purpose we chose to compare the hybridization efficiency of real sample targets in a multiplexed assay useful for blood group genotyping [11]. Here, target molecules were 100-250 bp long PCR products obtained through multiplex PCR of whole blood extracted DNA. The target sequences were specific to 3 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with clinically important blood group antigens (Kell, Kidd and Duffy systems) and the selectivity toward detection of SNPs in the target sequences was achieved by carrying out all hybridization at 55°C. The principle of the assay is presented in figure 1-a. Whole blood samples undergo genomic DNA extraction, followed by amplification of target sequences using multiplex PCR and biotinylated primers. The resulting amplicons are mixed with streptavidin-phosphatase alkaline conjugates and contacted with the immobilized probes for hybridization. Finally, the alkaline phosphatase – streptavidin system enables a colorimetric detection of hybridization: the immobilized enzyme's reaction with its substrate (BCIP/NBT) generates a purple precipitate on hybridized spots. The stained microarrays were finally imaged using an ordinary flatbed scanner and the grayscale image analyzed for genotype determination.

A schematic view of the different surface architectures tested within this study is presented in figure 1-b. From left to right the surface complexity increases from a flat classical polystyrene substrate (bare or glutaraldehyde activated), to a pressure sensitive adhesive (PSA) acrylic based coated 2D polymer and finally a 3D porous material composed of a nitrocellulose/cellulose acetate membrane (450 nm pore

diameter). Each surface was used to immobilize multiple microarrays in a 96-well format compatible with a complete automation of the assay. The three different architectures were then tested using identical conditions of incubation and pipetting.

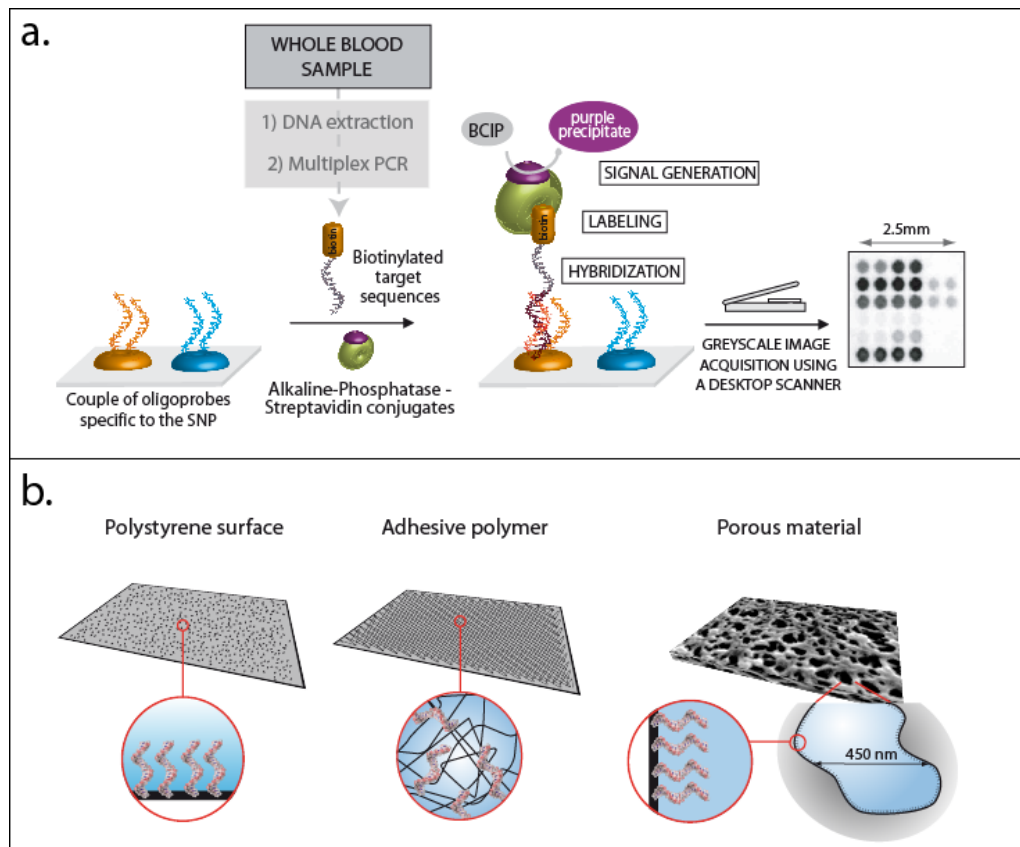


Figure 1 (a): Principle of the blood group genotyping colorimetric assay, from [11]. (b): Schematic view of the three different surface architectures tested within the study for oligonucleotide probe immobilization.

Figure 2 draws a global comparison between the different assay efficiencies: the blood group genotyping results of two patients are presented together with the microarray composition. The first remarkable observation is the signal weakness onto bare polystyrene compared to other surfaces. In particular, SNP specific probes immobilized onto bare polystyrene did not even generate measurable signal from their interaction with PCR products. Moreover, neither bare polystyrene nor glutaraldehyde activated polystyrene surfaces generated signals contrasted enough to permit the distinction between

positive (SNP perfect match) and negative (SNP mismatch) spots, while the adhesive and porous surfaces clearly enabled the discrimination between genotypes.

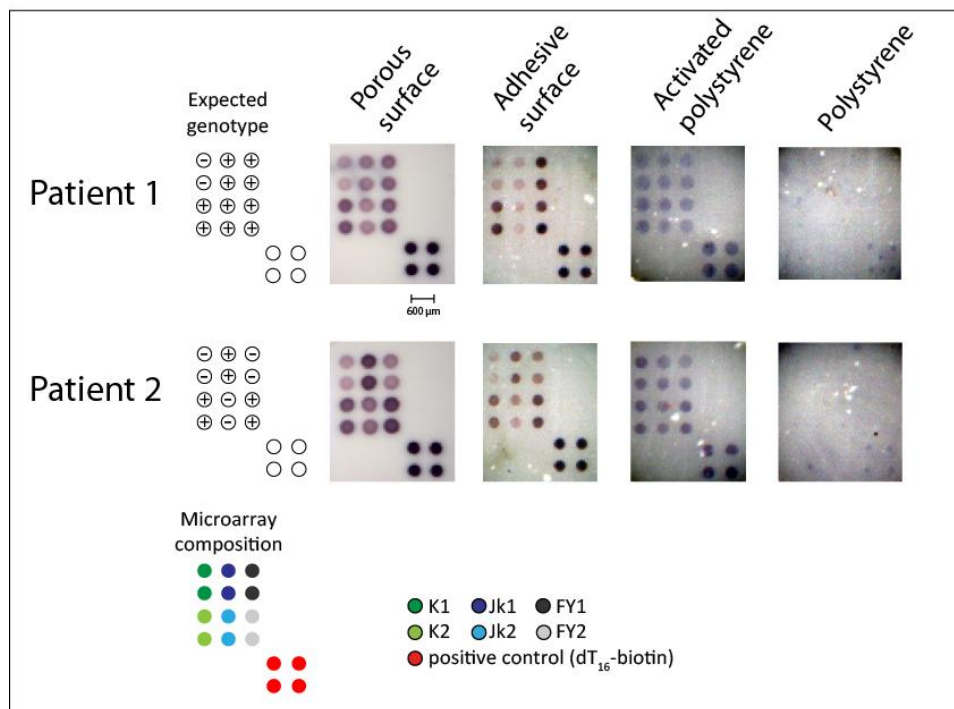


Figure 2 Blood group genotyping results for two patients using the four different tested surfaces.

In order to quantitatively compare the four architectures, the colorimetric signals of the dT₁₆ positive control spots were quantified (figure 3-a). A clear hierarchy of the different surfaces was obtained: from bare polystyrene (giving the smallest signals and the largest errors) to the porous membrane surface (giving the highest intensities and the smallest errors). A first interpretation of this trend could rely on the difference in the immobilization efficiency of the probes onto the different surfaces. Indeed, as can be seen on SEM images in figure 4, the hierarchy of the surface complexity follows the hierarchy observed in figure 3-a. This might suggest that the surface density of the immobilized probes, which increases with the specific surface of the support, is causing the signal difference between the different architectures.

However, it is worth of note that spot intensities depend also on the colorimetric staining efficiency, which could be itself conditioned by the surface structure. Indeed, different surface architectures are not expected to retain the precipitating colored product with equal efficiency.

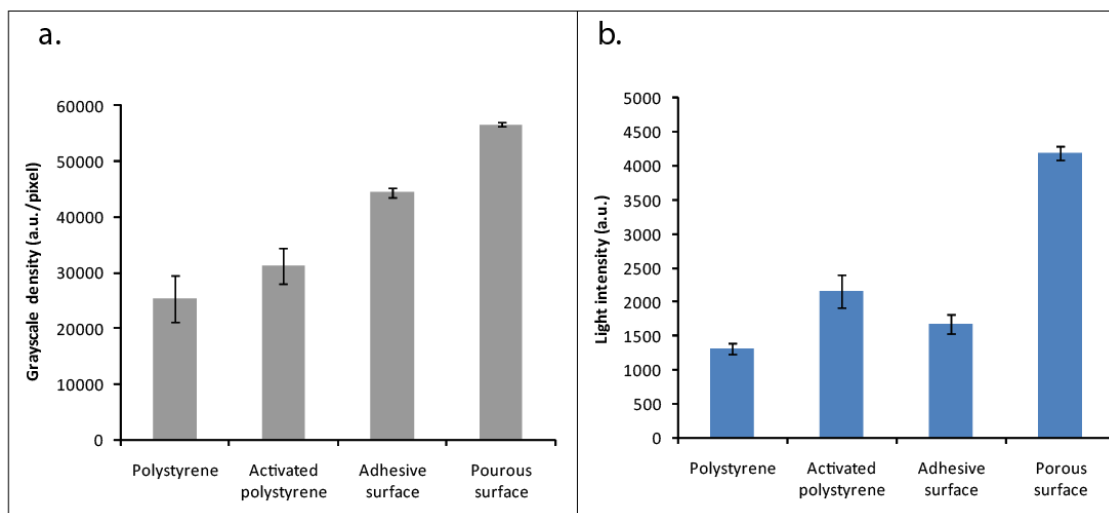


Figure 3 (a): quantification of the positive control spots using colorimetric signals, (b): quantification of the positive control spots using chemiluminescent signals. Error bars are standard deviations, n=4.

To clarify the situation, a chemiluminescent detection (based on horseradish peroxidase label) of the positive control spots was also performed. This light emitting system is solely dependent upon the amount of label enzyme present at spot location and then upon the surface density of probes, avoiding thus product accumulation effect encountered for the colorimetric assay. The quantified results are presented in figure 3-b (all the different surfaces being white and imaged the same way). As expected, the porous surface generated once again the highest signal and even if glutaraldehyde activation of polystyrene increases the surface density of the immobilized probes (higher chemiluminescent signal), it remains far lower than on the porous mesh. The major difference with the colorimetric profile was the low signal obtained on the adhesive surface: the spot intensities, almost identical to those obtained onto polystyrene surfaces, are the proof of low probe density.

Chemiluminescence results confirm that the hierarchy obtained using the colorimetric detection (figure 3-a) was then not only related to different surface densities of probes but also to the capacity of the surface to efficiently retained the precipitating enzyme colored product. Here, adhesive surface was the most efficient, directly followed by the porous coated surface since for a lower density of probe a higher

colorimetric signal was generated. Finally, the two flat polystyrene surfaces were able to immobilize probes with enough efficiency to generate chemiluminescent signals but were too flat to promote retention adhesion of the colorimetric staining.

To complete the comparison of the different surface architectures, the size of the stained spots was also compared using figure 2 images. Spots diameters of SNPs specific spots were found to be 350 μm , 200 μm and 300 μm for porous surface, adhesive coated surface and activated polystyrene, respectively (because of signal weakness and low reproducibility no reliable measure can be reported for bare polystyrene). These spot size differences are due to the surface hydrophobicity of the different substrate which impact on the spreading of the drops just after spotting. In the case of the porous surface, the spotted volume is completely absorbed within the material thanks to capillary forces, leading to a larger spot size. For the three other surfaces, the hierarchy of the spot size can be related to the measured contact angles: 88° and 73° for adhesive coated surface and activated polystyrene, respectively.

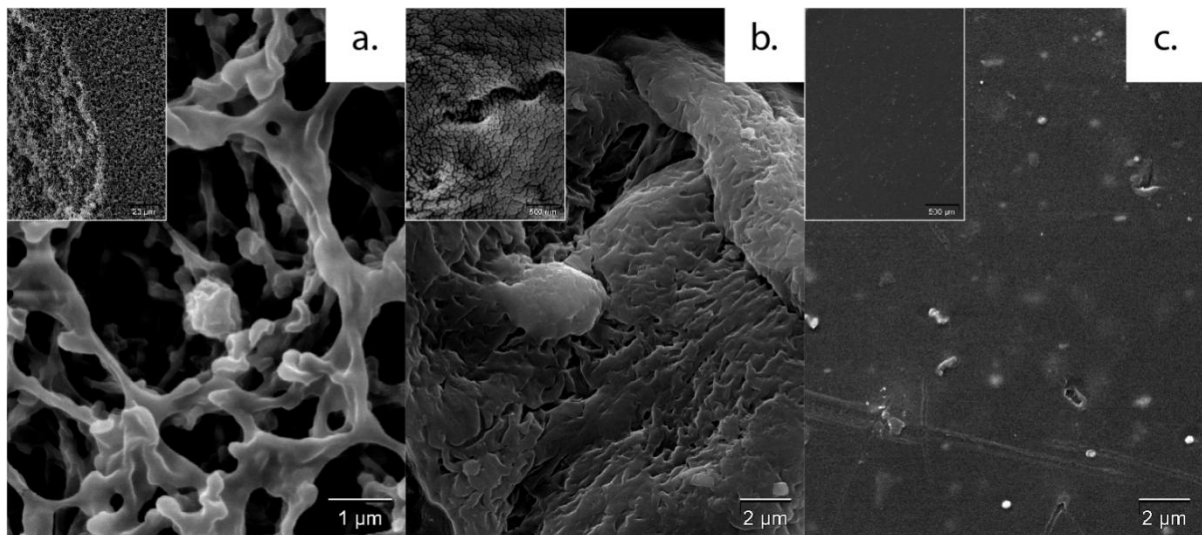


Figure 4 Scanning electron microscopy images of the different surfaces tested. (a): porous surface, (b): adhesive coated surface and (c): activated polystyrene.

4 CONCLUSION

Having all these results in hand, the choice for the most appropriate surface to produce colorimetric microarray appeared easier. Indeed, the classical ELISA testing surface (polystyrene or activated polystyrene), even if capable of immobilizing sufficient amounts of probes are not optimum for colorimetric signal generation, because of their flatness and their low capacity to retain precipitating product. On the other side, porous surfaces such as nitrocellulose/cellulose acetate membrane are able to immobilize large amounts of accessible probes and also to generate intense colorimetric signal. The only drawback of these porous surfaces is the large size of the obtained spots which reduces the spot density capability of the system. Finally, adhesive coated surface appeared to be the best compromise between immobilized probe density, spot density and colorimetric signal intensity. Moreover, an additional interesting feature of this adhesive material for probe immobilization is its possible integration in complex system thanks to fast and easy assembly through its adhesive property.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the *Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes*, especially Jean-Charles Brès and Dominique Rigal, for providing genotyped multiplex PCR products and the set of probe sequences used for SNP genotyping.

REFERENCES

- [1] X. Mao, Y. Ma, A. Zhang, L. Zhang, L. Zeng, G. Liu, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 1660.
- [2] J. Aveyard, M. Mehrabi, A. Cossins, H. Braven, R. Wilson, *Chem. Commun.* (2007) 4251.
- [3] K. Glynou, P.C. Ioannou, T.K. Christopoulos, V. Syriopoulou, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 4155.
- [4] X. Mao, H. Xu, Q.X. Zeng, L.W. Zeng, G.D. Liu, *Chem. Commun.* (2009) 3065.
- [5] Y.Q. He, K. Zeng, A.S. Gurung, M. Baloda, H. Xu, X.B. Zhang, G.D. Liu, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 7169.
- [6] D.J. Carter, R.B. Cary, *Nucleic Acids Res.*, 35 (2007).
- [7] M. Cretich, G. Di Carlo, C. Giudici, S. Pokoj, I. Lauer, S. Scheurer, M. Chiari, *Proteomics*, 9 (2009) 2098.
- [8] J. Petersen, M. Stangegaard, H. Birgens, M. Dufva, *Anal. Biochem.*, 360 (2007) 169.
- [9] J.J.W. Chen, R. Wu, P.C. Yang, J.Y. Huang, Y.P. Sher, M.H. Han, W.C. Kao, P.J. Lee, T.F. Chiu, F. Chang, Y.W. Chu, C.W. Wu, K. Peck, *Genomics*, 51 (1998) 313.
- [10] H.L. Mao, H.M. Wang, D.L. Zhang, H.J. Mao, J.L. Zhao, J. Shi, Z.C. Cui, *Clin. Biochem.*, 39 (2006) 67.
- [11] G.C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L.J. Blum, C.A. Marquette, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 6185.
- [12] G.C. Le Goff, C. Desmet, J.-C. Bres, D. Rigal, L.J. Blum, C.A. Marquette, *Biosens. Bioelectron.*, 26 (2010) 1142.

1.2. Puce à oligonucléotides sur support adhésive pour la mise au point d'outils de diagnostic multiparamétriques

Fort des bons résultats obtenus sur le support adhésif et présentés dans l'article 4, d'autres travaux au sein de l'équipe se sont intéressés à l'intégration de ce support pour la mise au point d'outils de diagnostic haut-débit et bas-débit. Les preuves de concept ont été apportées pour des tests d'hybridation sur puce à oligonucléotides mais aussi pour la détection de protéines par test sandwich sur une matrice d'anticorps. Une fois de plus, la détection de l'interaction repose sur un marquage par la phosphatase alcaline des plots positifs et la génération d'un signal colorimétrique.

Ces résultats sont présentés en annexe.

Article annexe 2

Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools

Benjamin P. Corgier, Céline A. Mandon, Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum
et Christophe A. Marquette

Lab on a Chip **2011**, in press (DOI: 10.1039/C1LC20246D)

2. Immobilisation d'oligonucléotides sur PolyShrink™

Une des thématiques du laboratoire est le développement de tests de diagnostic miniaturisés sur support microfluidique. Dans cette optique, des travaux récents se sont intéressés à l'utilisation d'un plastique à base de polystyrène aux propriétés remarquables, le PolyShrink™ (Figure 4-1). En effet, sous l'effet de la chaleur, cette feuille de polystyrène fabriquée sous contrainte réduit en taille de manière isotropique d'environ 60% dans le plan, sans déformation des motifs présents sur sa surface (canaux et éléments microfluidiques par exemple). Dans le même temps, la hauteur (ou profondeur) des motifs est multipliée d'un facteur cinq.

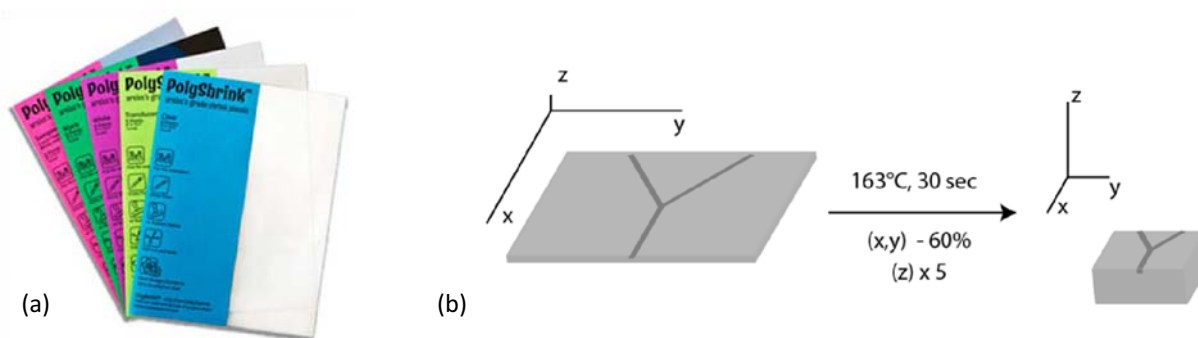


Figure 4-1 Polyshrink™ (a) Le matériau est commercialisé sous forme de feuilles pour les loisirs créatifs : il existe sous plusieurs formes (transparent, opaque, blanc, noir) ; source : www.luckysquirrel.com. (b) Par chauffage, le matériau réduit dans le plan de manière isotropique.

Le PolyShrink™ a été utilisé avec succès comme support pour l'immobilisation de matrices de protéines et d'anticorps : une étape de cuisson à 163°C piège les protéines sur le support, celles-ci conservant toutefois leur fonctionnalité (au moins partielle). Les matrices ainsi formées ont ensuite été intégrées dans des systèmes microfluidiques pour la mise au point d'immunotests miniaturisés et de puces à cellules (Sollier *et al.* 2009 ; Mandon *et al.* 2010).

Au vu du succès obtenu pour la fabrication de puces à protéines, nous nous sommes intéressés au transfert de cette technique à l'immobilisation d'oligonucléotides, notamment afin d'adapter les tests colorimétriques développés précédemment sur le PolyShrink™ blanc qui fournirait un bon contraste pour la lecture du signal.

Comme illustré dans l'article précédent, la qualité de l'immobilisation sur polystyrène non activé est médiocre. Si la cuisson et la réduction du matériau permettent de piéger plus efficacement les oligonucléotides, l'immobilisation reste limitée et peu reproductible. Pour cette raison, différentes stratégies d'activation de la surface et/ou de greffage ont été étudiées : (i) l'activation du support par le glutaraldéhyde, (ii) l'activation des oligonucléotides par un groupement benzophénone et leur photogreffage sur le support et enfin (iii) l'utilisation de plots d'hydrogel pour l'immobilisation en 3D des oligonucléotides.

2.1. Travaux préliminaires

2.1.1. Première stratégie : Activation de la surface par le glutaraldéhyde

La première stratégie considérée consiste à activer le polystyrène à l'aide d'une solution de glutaraldéhyde (2 % dans un tampon phosphate $0,1\text{ mol.l}^{-1}$ pH = 5), afin de générer des fonctions aldéhyde en surface. Des oligonucléotides présentant une terminaison amine sont ensuite déposés sous forme de gouttes et incubés sur la surface en atmosphère humide à 37°C . On procède éventuellement à une étape de réduction par le borohydrure de sodium afin de réduire la liaison imine résultant du couplage en une fonction amine plus stable (Figure 4-2).

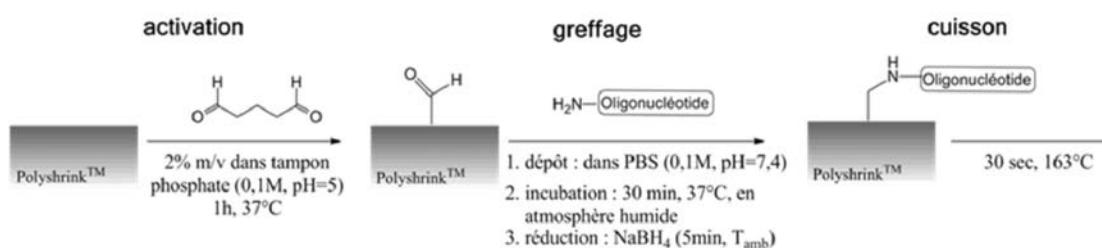


Figure 4-2 Immobilisation des oligonucléotides sur une surface de PolyShrink™ activée par le glutaraldéhyde

Une diminution de l'angle de contact de 15 à 20° est observée suite à l'activation de la surface (Tableau 4-1). Ce résultat est en accord avec la présence de fonctions aldéhydes en surface, puisque celles-ci entraînent une augmentation de l'hydrophilicité de la surface.

Tableau 4-1 Influence de l'activation sur la mouillabilité des surfaces De l'eau distillée a été utilisée pour la mesure des angles de contact.

	Non activé	Activation glutaradéhyde
Polyshrink™ blanc	$89,6^\circ$	$70,4^\circ$
Polyshrink™ transparent	$84,3^\circ$	$70,5^\circ$

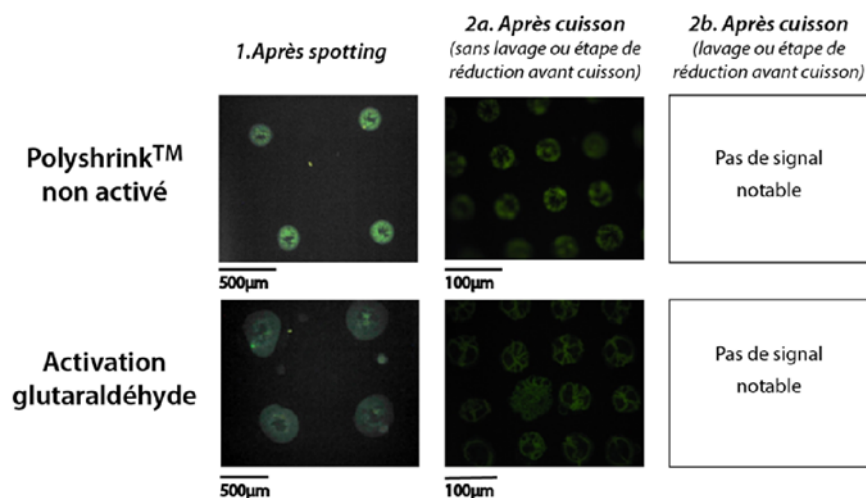


Figure 4-3 Comparaison des plots formés sur PolyShrink™ activé ou non activé
Tous les plots correspondent à des gouttes déposées identiques : solution d'oligonucléotides-FITC ($40\ \mu\text{mol.l}^{-1}$ dans PBS), $\sim 10\text{ nl}$ par goutte déposée. Le signal fluorescent a été observé au microscope optique de fluorescence avant et après cuisson des échantillons.

Un oligonucléotide marqué par la FITC a été matricé sur la surface afin de comparer l'allure des plots avant et après cuisson du support et d'évaluer l'effet de l'activation et la réduction. Tout d'abord, on observe que le diamètre des plots formés est supérieur sur la surface activée. Ce résultat est cohérent avec l'augmentation de l'hydrophilicité de la surface. Par ailleurs, on constate que lorsqu'on réalise une étape de réduction ou bien un lavage du support après incubation des oligonucléotides sur le support, aucun signal n'est détectable après cuisson du PolyShrink™. Cette observation laisse à penser que les oligonucléotides ne sont pas immobilisés de façon covalente sur la surface et sont rapidement éliminés par les solutions utilisées pour le lavage ou la réduction. Le signal observé après cuisson sans lavage préalable de la surface indique donc que les oligonucléotides sont piégés dans le matériau lors de la cuisson.

Enfin, la faisabilité des tests colorimétriques sur le PolyShrink™ blanc activé a été étudiée en réalisant des tests d'hybridation sur ce support. Une première série de tests monoparamétriques sur un couple sonde/cible synthétique (Figure 4-4 (a)) a permis de démontrer que des oligonucléotides étaient disponibles sur la surface pour l'hybridation, mais seulement dans le cas où le support est cuit sans lavage préalable des sondes déposées. Dans un second temps, une matrice multiparamétrique a été piégée sur le support et utilisée pour la détection de produits de PCR dans un échantillon réel. Dans ce cas, aucun signal n'est observé sans activation de surface. L'activation ne permet cependant d'obtenir qu'un signal très faible et peu reproductible (Figure 4-4 (b)).

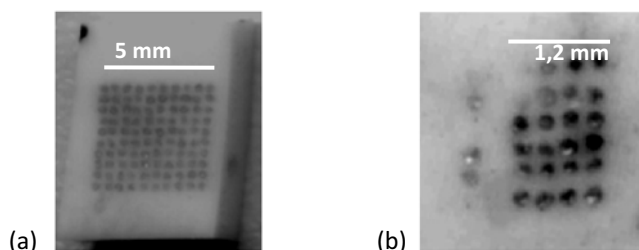


Figure 4-4 Tests d'hybridation colorimétriques sur PolyShrink™ activé par le glutaraldéhyde sans lavage du support avant cuisson (marquage enzymatique par la phosphatase alcaline ; révélation BCIP/NBT) (a) Preuve de concept : Utilisation d'un couple sonde/cible synthétique (les plots sont tous identiques). (b) Echantillon complexe : Détection de produits de PCR (7 µl par goutte, espacement entre les gouttes 800 µm)

2.1.2. Seconde stratégie : activation des sondes et photogreffage

La deuxième stratégie considérée consiste à fonctionnaliser l'oligonucléotide à immobiliser avec un groupement photoréactif, en l'occurrence la benzophénone, et à photogreffer celui-ci de manière covalente sur la surface (Figure 4-5).

Le mode opératoire pour l'activation des oligonucléotides par couplage carbodiimide, adapté de Dankbar et Gauglitz. (Dankbar et Gauglitz **2006**), est présenté Figure 4-6. Après le matricage de plots, le support est irradié 30 minutes à 250 nm, puis soumis aux ultrasons dans de l'eau distillée (5 minutes) afin d'éliminer les molécules non immobilisées.

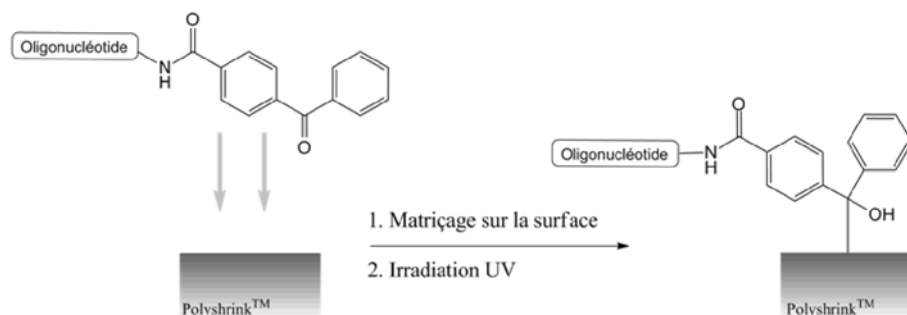


Figure 4-6 Photoaffinage d'oligonucléotides activés sur la surface de Polyshrink™

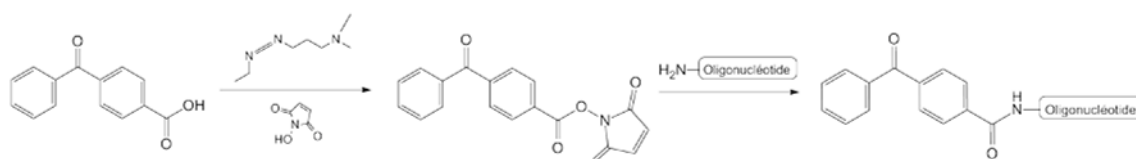


Figure 4-5 Voie de synthèse pour l'activation d'oligonucléotides présentant une terminaison amine par un groupement benzophénone

Lors de la mise en œuvre des tests colorimétriques d'hybridation, l'utilisation d'oligonucléotides-benzophénone n'a pas permis d'obtenir de meilleurs résultats en terme de reproductibilité et de sensibilité qu'avec une matrice d'oligonucléotides-amine (ayant également subi l'irradiation). Pour confirmer ce résultat, les mêmes expériences ont été réalisées en utilisant un oligonucleotide-benzophénone commercial (Eurogentec). Une fois de plus les deux approches ont donné des signaux équivalents. Il semble donc que le simple piégeage des sondes à la surface du Polyshrink™ réduit permette d'immobiliser autant de molécules accessibles que le photogreffage.

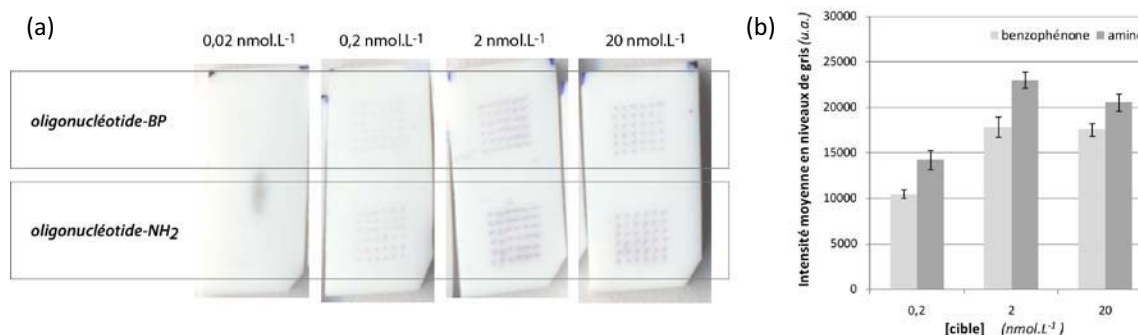


Figure 4-7 Comparaison des signaux colorimétriques obtenus pour la détection d'une cible synthétique (26^{mère}) par hybridation sur une matrice d'oligonucléotides activés soit par un groupement amine soit par un groupement benzophénone. (a) Allure des signaux obtenus (les concentrations indiquées correspondent à la concentration en cible). (b) Comparaison quantitative des signaux.

2.2. Immobilisation des oligonucléotides dans des plots d'hydrogel

Afin de promouvoir l'immobilisation des oligonucléotides sur la surface et d'en améliorer la reproductibilité, une troisième approche a consisté à immobiliser *in situ* les oligonucléotides au sein d'un plot d'hydrogel.

Le protocole utilisé pour la fabrication des plots d'hydrogels est adapté de celui rapporté dans la littérature par le groupe de J. Rùhe (Brandstetter *et al.* 2010). Il repose sur l'utilisation d'un copolymère à base de N,N-diméthylacrylamide, contenant un faible pourcentage d'un monomère acide vinylphosphonique (qui permet de réduire l'adsorption non-spécifique des oligonucléotides dans le plot) et d'un monomère contenant un groupement photoactivable (benzophénone) nécessaire à la polymérisation de l'hydrogel, mais aussi à l'immobilisation de la sonde dans le plot. L'immobilisation des oligonucléotides dans les plots d'hydrogel et les capacités analytiques du système ont été étudiées par détection colorimétrique et par chimiluminescence.

L'ensemble des résultats correspondants sont résumés dans l'article 5 (manuscrit en préparation).

Article 5

Shrinking hydrogel-DNA spots generates 3D microdots arrays

Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum et Christophe A. Marquette

Manuscrit en préparation.

Shrinking hydrogel-DNA spots generates 3D microdots arrays

G. C. Le Goff, L. J. Blum and C. A. Marquette

*Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon1 – CNRS 5246,
Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Villeurbanne, France*

Since the emergence of the miniaturization concept, the search for innovative materials and new fabrication processes for improved biomedical microdevices and microarrays, especially point of care diagnostic tools, keeps going on ^{1,2}. After glass and silicon, researches focused on polymers as innovative supports for biological microfluidic systems ³⁻⁵. Efforts were also put into the development of materials of high specific surface area for enhancing the density of biomolecule immobilization, and led to the immobilization of probes in 3D hydrogel dots. Hydrogels are hydrophilic crosslinked polymers with a high affinity for water, forming an insoluble 3D network in which water can penetrate, causing swelling of the structure. Their highly tunable chemistry enables to tailor their physical structure, mechanical and diffusion properties, and even to generate stimuli-responsive materials ^{6, 7} which swelling behavior depends on the external environment ⁸ (pH, temperature, ionic strength...). Thanks to their high water content and biocompatibility, hydrogels appear advantageous over usual porous media, generally hydrophobic, and are appealing for biological applications (tissue engineering, biomedical implants, drug delivery ⁹). Examples can also be found in diagnostic devices¹⁰, for instance for the development of microfluidic valves ¹¹ and the immobilization of DNA probes in a sensor microfluidic channels through a photo-polymerized matrix ¹². More particularly, the wet environment they provide makes hydrogels very promising candidates for biomolecules microarray fabrication.

A straightforward strategy for DNA-hydrogel microarray fabrication is to mix a polymerizable monomer together with the biological probe, to spot directly that solution on the support and to immobilize the DNA *in situ* during hydrogel polymerization. A few examples of such hydrogel-DNA droplet microarrays have been reported in the last decade. Polyacrylamide networks were thus used to immobilize aminated-DNA probes on silane-activated glass (photopolymerization) ¹³ and raw polymerase chain reaction products on acryl-activated glass (heat-directed polymerization) ¹⁴. Rühle's group also reported an efficient strategy for the fabrication of hydrogel-DNA drop microarray on plastic surfaces ¹⁵. Their approach involves a polydimethylacrylamide network copolymerized with photo-crosslinkable units enabling the *in situ* covalent immobilization of DNA during the

photoinduced polymerization. This method was applied to single nucleotide polymorphism detection for papilloma virus genotyping (coupled with total internal reflection fluorescence)¹⁶ and for a microarray-based amplification and analysis of RNA¹⁷.

However, once the density of probes optimized, further miniaturization of arrays remains limited by the spotting apparatus capacities and minimum drop volumes. In order to overpass those limitations, we investigated an innovative polymeric support, PolyShrinkTM, as a support for DNA microarrays. PolyShrinkTM is a polystyrene-based polymer prepared under size-limitation which shrinks isotropically in plane by 60% upon heating. Such a remarkable property opened the path to the cost efficient and reproducible fabrication of microfluidic channels and components using such pre-stressed plastic sheets by Khine's group^{18, 19}. Moreover, our group recently demonstrated the ability of this polymer to bind proteins during the shrinking step and succeeded in the microarraying of antibodies and adhesion proteins dedicated to the development of immunoassays and cell-on-chip systems²⁰. The direct immobilization of oligonucleotides on PolyShrinkTM was demonstrated, however the amount of immobilized molecules appeared to be there a limiting parameter. Indeed, efficient immobilization of biomolecules on bare polystyrene is often hard to reach since the material is particularly inert and usually requires expensive surface activation techniques, such as oxygen plasma²¹. To promote oligonucleotide immobilization on PolyShrinkTM, we used a hydrogel-DNA droplet microarray, based on the chemistry developed by R  he's group¹⁵. The photopolymerization approach brings a cost-efficient strategy for the 3D oligonucleotides immobilization and confinement of oligonucleotides in a hydrophilic environment, and the remarkable size-reduction property of PolyShrinkTM led to a further miniaturization of the microdot array.

Figure 1 summarizes the main steps involved in the microdot array fabrication process. First, a mixed solution of the pre-polymer (PDMAA-co-1%VPA-co-1% 4-methacryloyoxybenzophenone) and oligoprobes in phosphate buffer saline is arrayed on the clean PolyShrinkTM surface using a piezoelectric spotter. Typical drop volume is 2 nL, giving 200 μm wide spots. The array is then dried at 70°C before UV irradiation (254 nm, 1 J), which activates the benzophenone groups previously incorporated in the pre-polymer. The absorption of a photon generates, through a $n-\pi^*$ transition, a diradicaloid triplet-state which reacts preferentially with unreactive C-H bonds. H-abstraction reactions result simultaneously in i) the crosslinking of PDMAA chains, ii) the anchoring of hydrogel spots onto the

polystyrene surface²², and iii) the covalent binding of oligonucleotides through the sugar part (Figure, insert), producing surface-attached hydrogel DNA spots in a single step. The benzophenone photolinker is here especially convenient thanks to its stability in water and under ambient light²³.

Finally, the polymerized array is washed thoroughly with distilled water to get rid of salts and non-polymerized pre-polymer and the PolyShrinkTM layer is heated at 163°C for 30s. The polymer sheet undergoes an isotropic planar shrinking with a concomitant increase of dots height, generating hydrogel-DNA microdots.

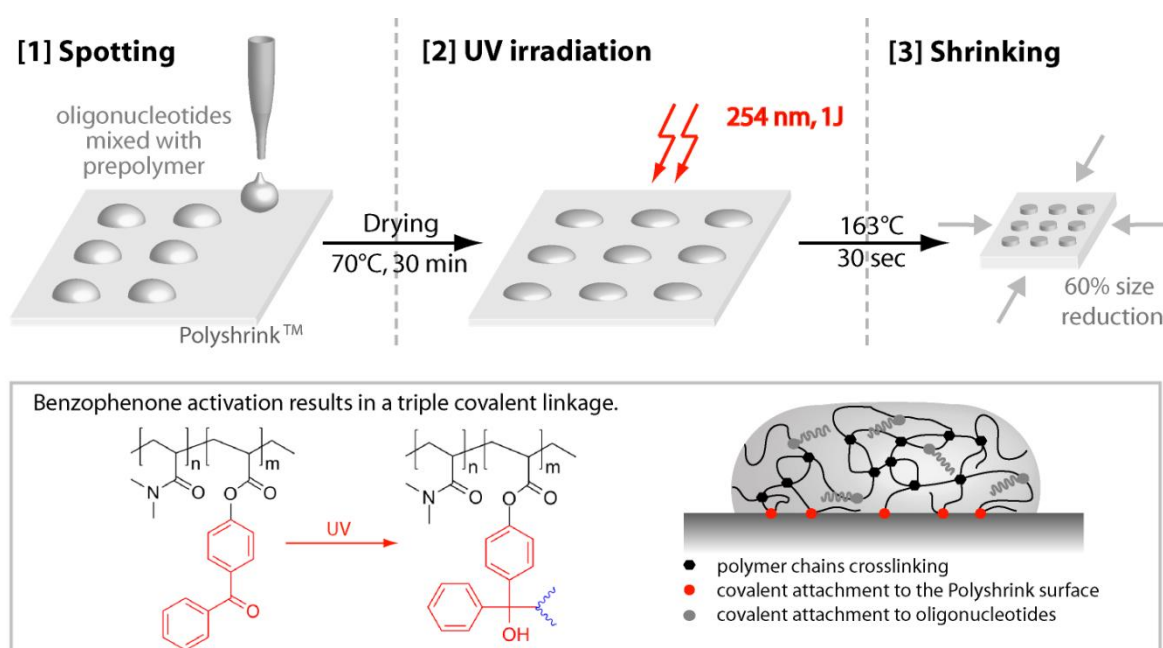


Figure 1 Microdots fabrication process. [1] The oligoprobes ($100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ in water), the pre-polymer solution (1 mg.mL^{-1}) and phosphate buffer saline (0.1 mol.L^{-1} , pH 7.4) were mixed in a 1:1:1 ratio. The resulting solution was arrayed using a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3, Scienion, Germany) on PolyShrinkTM sheets (Luckysquirrel, Belen, US), beforehand washed with ethanol and air-dried. [2] The matrix was air-dried at 70°C (30 min) and irradiated with UV (1J, 254 nm, Bio-Link® (BLX) lamp) for polymerization. [3] The matrix was washed thoroughly with milliQ water, air-dried and heated 30 sec at 163°C for shrinking.

The structure of the resulting microdots was studied by scanning electron microscopy and profilometry. Figure 2 (a) reports SEM pictures of a typical 2 nL hydrogel DNA drops array after shrinking and comparison of SEM images of the matrix structures before and after shrinking can be found in Figure S-1 (a) We observed a global 60% planar reduction of the PolyShrinkTM layer, whereas spots diameter reduction was only 40% (from 200 to 80 μm for 2 nL drops). This phenomenon can be attributed to the fact that only a part of the initial deposited material (the one in contact with the surface) is covalently bound to the shrinking

substrate. Then, when shrinking occurs, the bound hydrogel undergoes the whole shrinkage constraints whereas the rest of the dot shrinks only partially. Reducing drop volume to 0.4 nL enabled to decrease the final spot diameter down to 45 μm (Figure S-1 (c)). It is also worth noticing that the spots alignment and shape are perfectly maintained during shrinking.

Profilometry studies, illustrated in Figure 2 (b), enabled to evaluate the height of the dots. As expected²⁰, the height of spots drastically increases as the pre-stressed polystyrene support shrinks. Spots less than 200 nm thick lead to 6 μm thick 3D hydrogel microdots, in a highly reproducible way (CV=5.3% for 144 spots). Moreover, control experiments demonstrated that UV irradiation was essential for the anchoring of hydrogel dots onto the polystyrene surface and that the 3D structure stands washing steps (Figure S-2).

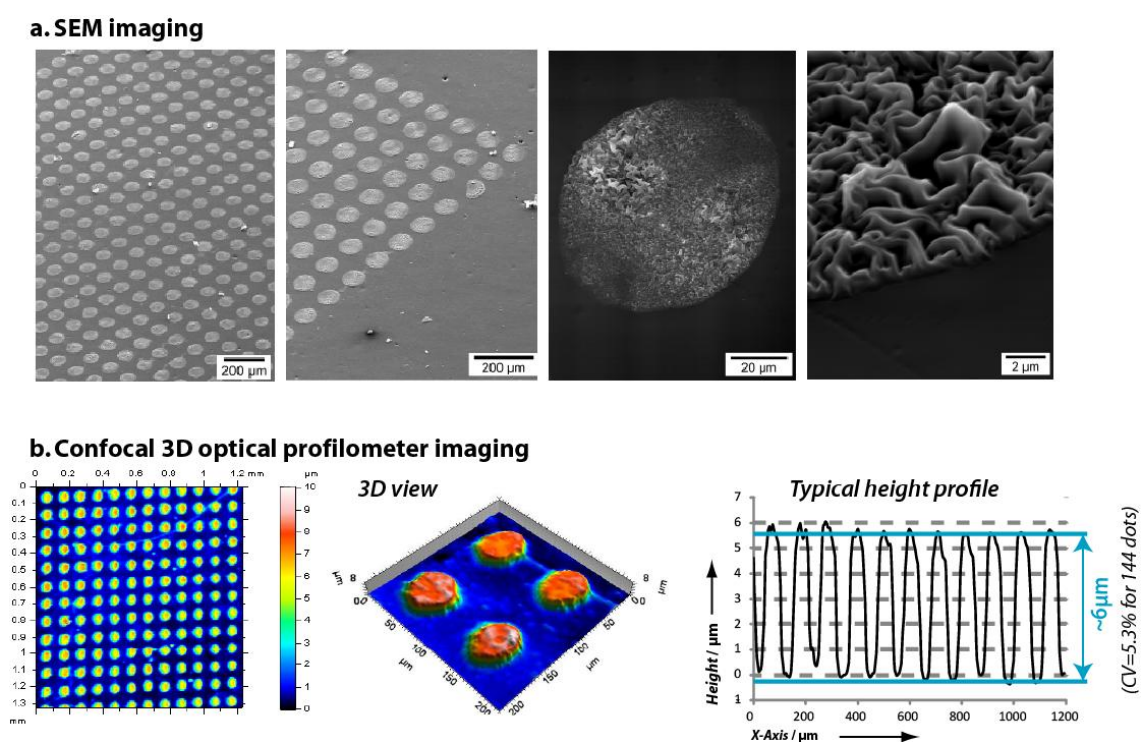


Figure 2 Study of microdots structures after shrinking (spotting conditions: 2 nL drops, spot to spot distance=500 μm , PolyShrinkTM). a. SEM imaging (Hitachi S800 FEG) b. Images obtained using a confocal 3D optical profilometer (NJ-Optimal, nanoJura, France)

The final dot structure appeared uneven with surface wrinkles, most likely appearing during the shrinking of the support (Figure 2 (a)). Because SEM imaging was performed under vacuum, the reported images correspond to gel dots in their xerogel state. The porosity of spots of the present hydrogel, but arrayed on PMMA, was previously demonstrated by R \ddot{u} he *et al.*¹⁵. In order to confirm the capacity of water uptake by our microdots after the shrinking step, profilometry studies were conducted under a thin water layer. Figure 3 compares the

dots' height in the xerogel and hydrogel states. When immersed in water, dot height (15-20 μm) was 3 times higher than in the dry state, suggesting that water uptake had occurred. A slight increase in dots diameter was also observed alongside, evidencing once again the possibility for the gel to follow only partially the shrinkage constraints.

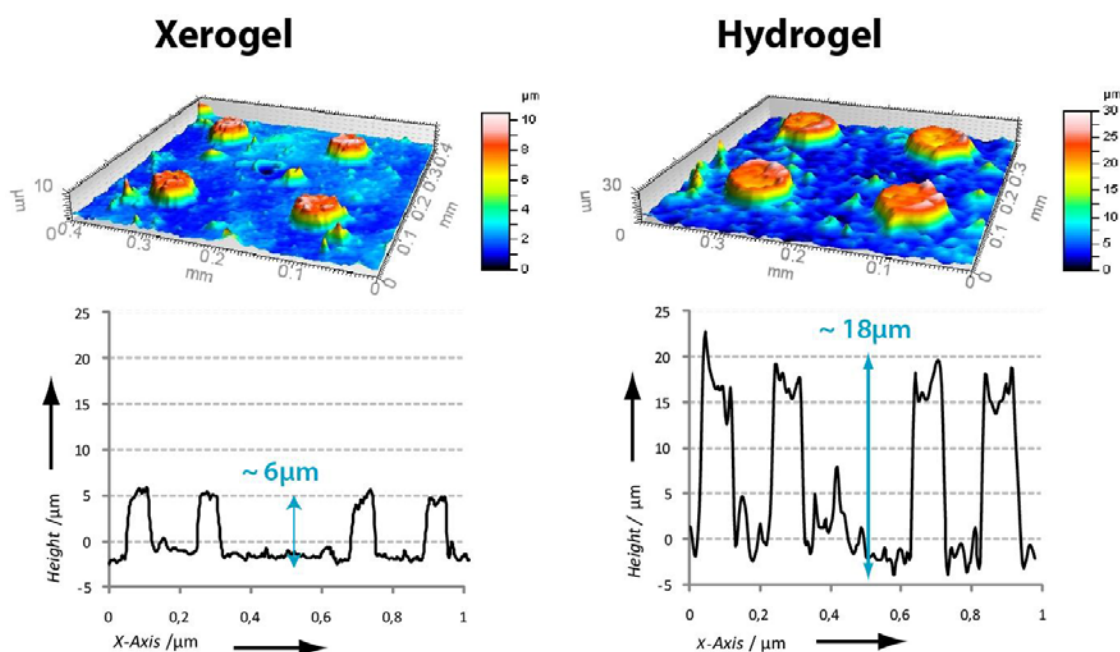


Figure 3 Compared profilometry results of microdots structures in the (left) xerogel and (right) hydrogel state (spotting conditions: 4 nL drops, spot to spot distance=1 mm, PolyShrinkTM) (up)3D view of typical dots obtained using a confocal 3D optical profilometer NJ-Optimal, nanoJura, France). (down) Corresponding height profiles of the spots.

The next part of our investigations aimed to demonstrate the efficient probe immobilization in the hydrogel dots and the availability of oligonucleotides for target detection. For that purpose, hybridization assays were performed on a couple of synthetic complementary oligonucleotides (26^{mer}), using an enzymatically enhanced optical detection of hybridization. Targets were biotinylated, enabling the labeling of hybridized dots by enzyme-labeled streptavidin.

A first batch of experiments involved horseradish peroxidase (HRP) as label together with a chemiluminescent substrate (SuperSignalTM solution, Pierce, France). The emission of a chemiluminescent signal on oligonucleotide-hydrogel microdots demonstrates both the immobilization of oligonucleotides in the gel network and their availability for target hybridization and detection (Figure 4 (a) (left)). No signal was observed either in the absence target or in bare hydrogel dots (no probe), guaranteeing the specificity of the detected signal.

Even though UV wavelengths are known to potentially damage thymine residues, specific hybridization on probes was here efficient. Furthermore the signals obtained on hydrogel-oligonucleotide microdots were compared to those obtained on a matrix of pure oligonucleotide irradiated in the same conditions (Figure 4 (a)). The detection on the hydrogel dots was more sensitive (Figure 4 (b)), indicating a higher probe density in the 3D network. Moreover, signals appeared more ‘concentrated’ in the dots and less blurry.

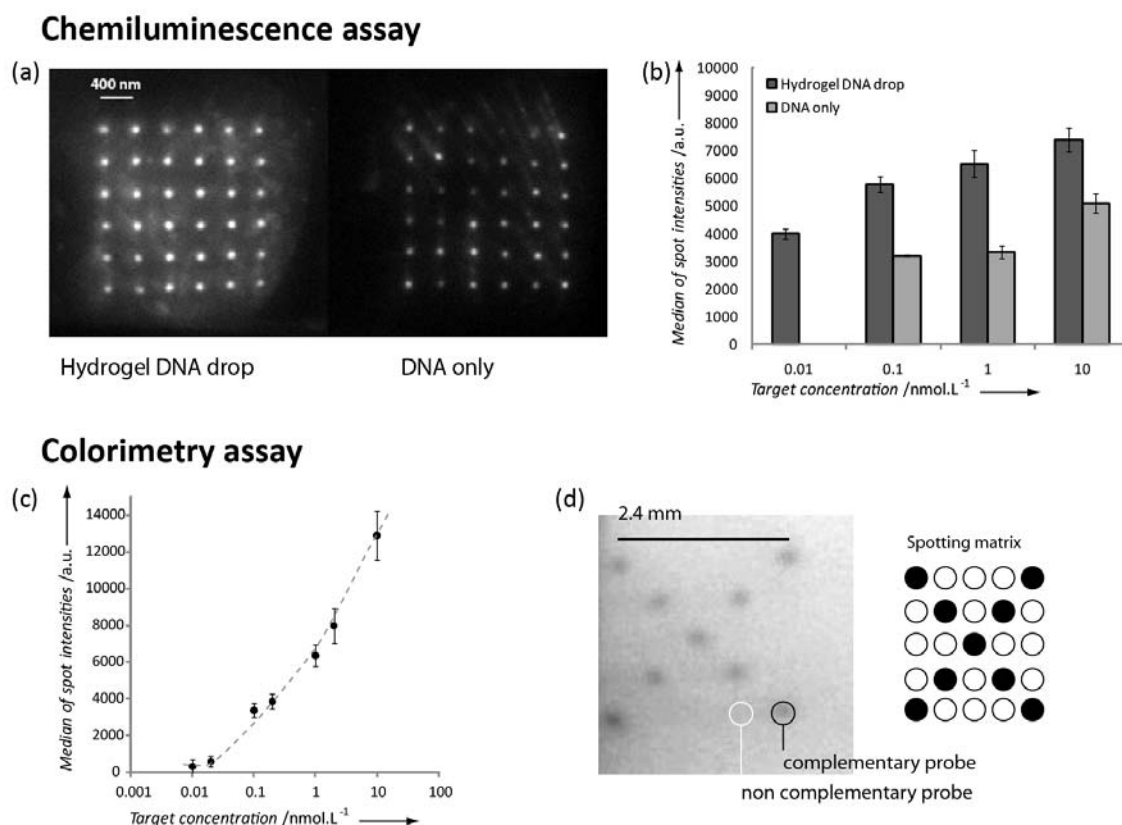


Figure 4 Hybridization assays using a couple of synthetic complementary oligonucleotides (probe sequence: NH₂-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC ; target sequence: biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA)

(a,b) Comparison between chemiluminescence signals obtained a hydrogel-oligonucleotides microdots array and a microarray of oligonucleotides only (concentration of oligonucleotides in spotting solution (33 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), irradiation, heating and assay conditions were identical in both cases). The emitted light was collected and integrated for 180 seconds using a charged coupled device (CCD) cooled camera light measurement system (EM-CCD, Hamamatsu).

(c) Calibration curves for colorimetric target detection on white PolyShrinkTM. The colorimetric signal was imaged (greyscale: from 0 to 65535 arbitrary units (a.u.); 2400 dpi) using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard).

(d) Colorimetric signal resulting for the hybridization of the target oligonucleotide on a 5*5 matrix of hydrogel dots containing either the complementary probe (black dots) or a non-complementary sequence (white dots TACTAACTTTGAGATTCCCGAGAT). Signal is observed only on the spots containing the complementary probe. Signal quantification was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation.

Finally, a white PolyShrinkTM support, useful to generate high contrast images, was used for low cost colorimetric hybridization assays on microdots. In that case, the labeling enzyme was alkaline phosphate (AP), used in conjunction with the BCIP/NBT (Sigma-Aldrich (Lyon, France) precipitating substrate and leading to a purple staining of positive spots. Once again the quantitative target detection was demonstrated (Figure 4 (c)). Moreover the specificity of target capture was demonstrated on a matrix of dots containing either the complementary probe or a non-complementary probe (Figure 4 (d)).

The hydrogel dots were here particularly interesting since the precipitating product gets trapped more efficiently in their 3D structure than on a flat surface microarray generating enhanced and well defined signals.

The proof-of-concept of hybridization assays on hydrogel-DNA microdot arrays on PolyShrinkTM was successfully demonstrated. Either chemiluminescence or colorimetry assays on hydrogel-oligonucleotide were shown to be quantitative and specific. Our next investigations will concern the feasibility and reliability of real samples testing on such microdots arrays, especially for SNP genotyping and will also intend to integrate this sensor into a complete microfluidic device.

Experimental section

4-methacryloyoxybenzophenone was synthesized as described elsewhere²⁴. PDMAA-co-1%VPA-co-1%4-methacryloyoxybenzophenone pre-polymer was synthesized using a statistical polymerization in toluene (60°C, 0.1wt % AIBN)¹⁵. Products were controlled by NMR and IR spectroscopy. For the preparation of spotting solutions, a 100 µmol.L⁻¹ solution of oligonucleotides in water (26mer, 5'-amino, Eurogentec (Belgium)) was mixed with the pre-polymer (1 mg.mL⁻¹ in water) and phosphate buffer saline (0.1 mol.L⁻¹, pH =7.4) in a 1:1:1 ratio. Solutions were stored in the dark at 4°C.

The protocol for oligonucleotide assays involved the following steps. The microarrays were saturated with a solution of VBSTA buffer (veronal buffer saline (0.1 mol.L⁻¹, pH 7.4) added of Tween 20 0.1% (v/v) and BSA 1% (w/v)) for 10 min à 37°C. Samples were diluted to the proper concentration in the saturation buffer and incubated on the array for 30 min at 37°C. The microarray was washed thoroughly with milliQ water before being incubated in the labeling solution (HRP-streptavidin or AP-streptavidin solution, 2µg.mL⁻¹) for 30 min at 37°C, washed and incubated with 10 µL of the enzyme substrate.

References

- (1) Rivet, C.; Lee, H.; Hirsch, A.; Hamilton, S.; Lu, H. *Chemical Engineering Science*. **2011**, *66*, 1490-1507.
- (2) Hook, A. L.; Voelcker, N. H.; Thissen, H. *Acta Biomaterialia*. **2009**, *5*, 2350-2370.
- (3) Becker, H.; Locascio, L. E. *Talanta*. **2002**, *56*, 267-287.
- (4) Becker, H.; Gärtner, C. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, *390*, 89-111.
- (5) Focke, M.; Kosse, D.; Müller, C.; Reinecke, H.; Zengerle, R.; von Stetten, F. *Lab on a Chip*. **2010**, *10*, 1365.
- (6) Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. *Progress in Polymer Science*. **2007**, *32*, 1205-1237.
- (7) Kopecek, J. *Biomaterials*. **2007**, *28*, 5185-5192.
- (8) Langer, R.; Peppas, N. A. *AIChE Journal*. **2003**, *49*, 2990-3006.
- (9) Oh, J. K.; Drumright, R.; Siegwart, D. J.; Matyjaszewski, K. *Progress in Polymer Science*. **2008**, *33*, 448-477.
- (10) Peppas, N. A.; Hilt, J. Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. *Advanced Materials*. **2006**, *18*, 1345-1360.
- (11) Beebe, D. J.; Moore, J. S.; Bauer, J. M.; Yu, Q.; Liu, R. H.; Devadoss, C.; Jo, B. H. *Nature*. **2000**, *404*, 588+.
- (12) Olsen, K.; Ross, D.; Tarlov, M. *Analytical Chemistry*. **2002**, *74*, 1436-1441.
- (13) Rubina, A. *Analytical Biochemistry*. **2004**, *325*, 92-106.
- (14) Pan, Z. Q.; Li, Y. Q.; Shan, Q.; Hong, X. H.; Zhou, D. R.; Zhang, M. H.; Chen, P.; Xiao, P. F.; Lu, Z. H. *Electrophoresis*. **2008**, *29*, 2424-2436.
- (15) Neumann, T.; Bonham, A. J.; Dame, G.; Berchtold, B.; Brandstetter, T.; Ruhe, J. *Analytical Chemistry*. **2010**, *82*.
- (16) Brandstetter, T.; Bohmer, S.; Prucker, O.; Bisse, E.; zur Hausen, A.; Alt-Morbe, J.; Ruhe, J. *Journal Of Virological Methods*. **2010**, *163*, 40-48.
- (17) Mader, A.; Riehle, U.; Brandstetter, T.; Stickeler, E.; zur Hausen, A.; Ruhe, J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2010**, *397*, 3533-3541.
- (18) Chen, C.-S.; Breslauer, D. N.; Luna, J. I.; Grimes, A.; Chin, W.-chun; Lee, L. P.; Khine, M. *Lab on a Chip*. **2008**, *8*, 622.
- (19) Taylor, D.; Dyer, D.; Lew, V.; Khine, M. *Lab on a Chip*. **2010**, *10*, 2472-2475.
- (20) Mandon, C. A.; Heyries, K. A.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Biosensors and Bioelectronics*. **2010**, *26*, 1218-1224.
- (21) Diaz-Quijada, G. A.; Peytavi, R.; Nantel, A.; Roy, E.; Bergeron, M. G.; Dumoulin, M. M.; Veres, T. *Lab on a Chip p*. **2007**, *7*, 856-862.
- (22) Dankbar, D. M.; Gauglitz, G. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2006**, *386*, 1967-1974.
- (23) Dorman, G.; Prestwich, G. D. *Biochemistry*. **1994**, *33*, 5661-5673.
- (24) Toomey, R.; Freidank, D.; Ruhe, J. *Macromolecules*. **2004**, *37*, 882-887.

Supporting Information

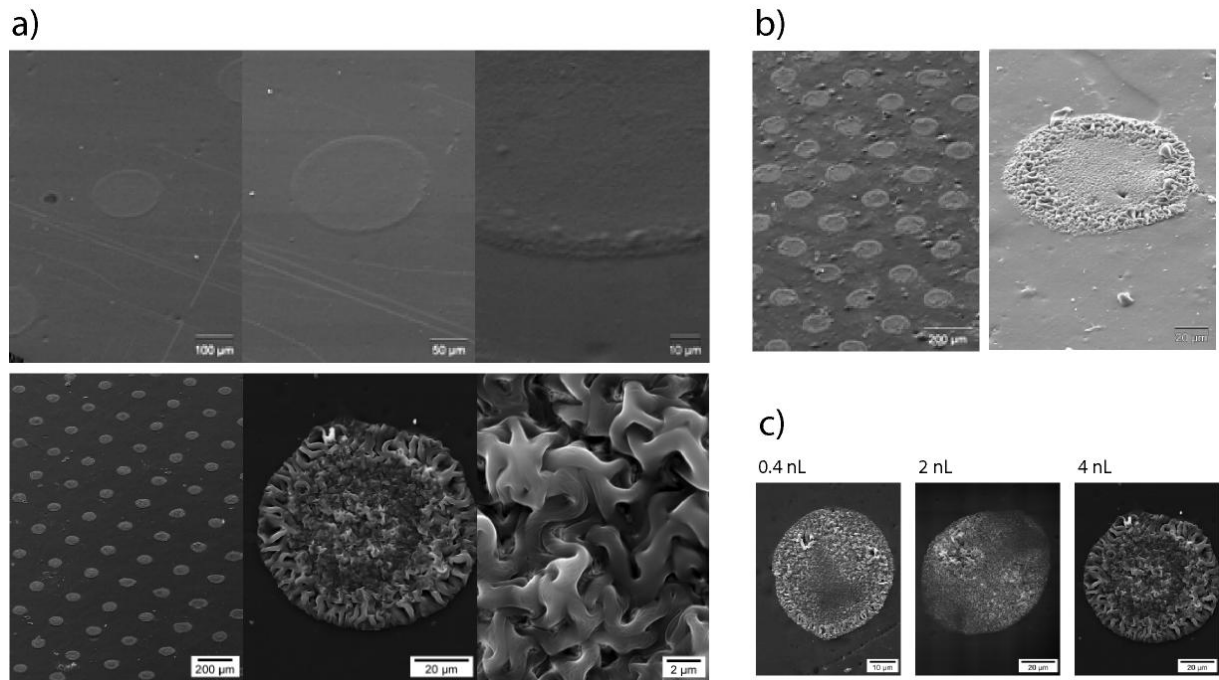


Figure S- 1 SEM imaging (Hitachi S800 FEG)

(a) Comparison of the microarray structure before (*up*) and after (*down*) shrinking (spotting conditions: 4 nL drops, spot to spot distance=1 mm, transparent PolyShrink™). **(b)** SEM pictures of microdots on a white PolyShrink™ sheet (spotting conditions: 4 nL drops, spot to spot distance=1 mm). **(c)** Influence of drop volume (transparent PolyShrink™)

From spot to microdot: structural changes

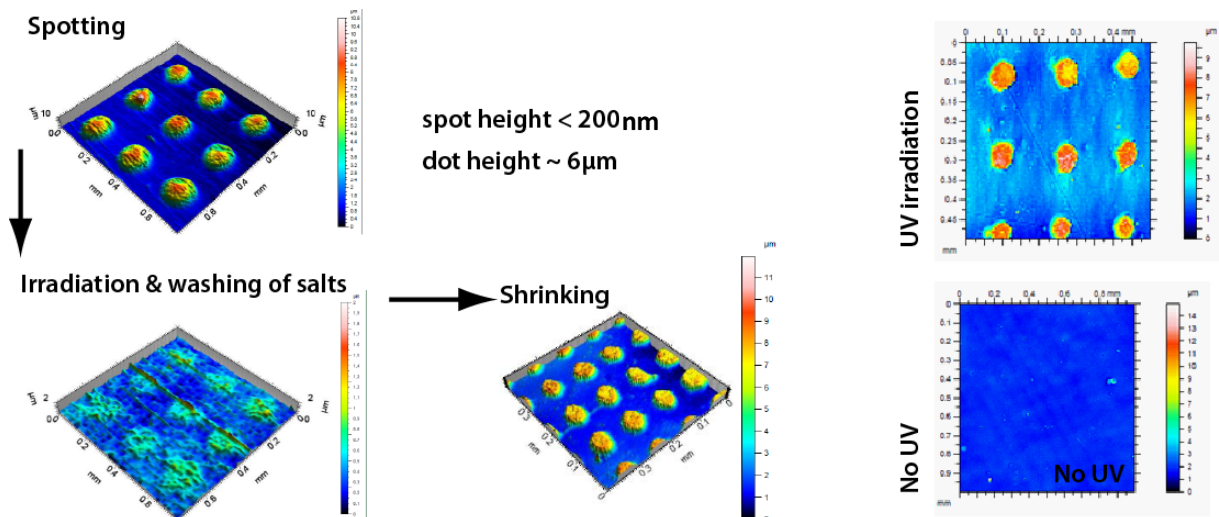


Figure S-2 Images obtained using a confocal 3D optical profilometer (NJ-Optimal, nanoJura, France). **(left)** Compared 3D views of microarray structure after UV irradiation, washing and shrinking.. **(right)** Effect of UV irradiation (measurements were performed after shrinking)

Chapitre 5. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Instruments

Appareil de dépôt non-contact BiochipArrayerI	Perkin Elmer
Appareil de dépôt non -ontact SciFlex Arrayer S3	Scienion
Automate de pipettage EVO 75.....	Tecan
Caméra CCD LAS 1000.....	Fujifilm
Caméra EM-CCD.....	Hamamatsu
Digidrop (mesure d'angle de contact)	GBX
Lampe UV	Bio-Link® (BLX)
MagnaPure LC (automate d'extraction d'ADN).....	Roche Diagnostics
Microscope optique	Zeiss
Profilomètre NJ Optimal	nanoJura
Spectromètre infrarouge 510 FT-IR	Nicollet
Spectromètre RMN DRX 400	Brüker
Thermocycleur TProfessional	Biometra

1.2. Logiciels

EVOWARE.....	Tecan
Image Gauge 4.0	Fujifilm
Genepix Pro 6.0.....	Molecular Devices
MountainsMap	nanoJura

1.3. Réactifs

1.3.1. Supports

Adhésif double-face 7966 WDL (medical grade)	3M
Plaque Multiscreen HTS-HA 96-puits	Millipore
Polyshrink TM	Lucky Squirrel
Membrane Ultrabind TM	Pall

1.3.2. Solvants et réactifs chimiques

Acide vinylphosphonique.....	Sigma-Aldrich
Acide p-benzoylbenzoïque	Sigma-Aldrich
Azobisisobutyronitrile (AIBN).....	Fluka
BCIP/NBT solution prête à l'emploi.....	Sigma-Aldrich
Bleu de bromophénol	Sigma-Aldrich
Borate de sodium.....	Sigma-Aldrich
Chlorure de calcium	Prolabo
Chlorure de méthacryloyle	Sigma-Aldrich

<i>N-N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide	Sigma-Aldrich
Diéthyléther.....	Sigma-Aldrich
Diéthylmalonyurée sodée (Véronal)	Prolabo
N,N-diméthylacrylamide.....	Alfa Aesar
Glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial)	Sigma-Aldrich
Hydrogénophosphate de sodium	Sigma-Aldrich
Hydroxybenzophénone	Sigma-Aldrich
<i>N</i> -hydroxysuccinimide	Sigma-Aldrich
Low-Cross Buffer	Candor Bioscience
Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione)	Sigma-Aldrich
Para-iodophénol	Sigma-Aldrich
Peroxyde d'hydrogène 30%	Prolabo
Polyoxyéthylènesorbitan monolauréate (tween 20)	Sigma-Aldrich
TMB Membrane Peroxidase Substrate System (3-Component)	KPL
Toluène anhydre.....	Sigma-Aldrich
Triéthylamine	Fluka

1.3.3. Oligonucléotides, protéines et enzymes

Albumine de sérum bovin (BSA).....	Sigma-Aldrich
Amorces de PCR (Tableau 5-2)	Eurogentec
Anticorps anti-CRP (clone C5)	Biodesign
Anticorps anti-CRP (clone C7) biotinylé	EXBIO
Anticorps anti IgG (H+L) de lapin marqués par la phosphatase alcaline, développés chez la chèvre	Jackson Immuno-Research
Anticorps monoclonaux anti IgE humaine marqués par la phosphatase alcaline, développés chez la souris	Sigma-Aldrich
Anticorps monoclonaux anti Lectine <i>Arachis hypogaea</i> développés chez le lapin ..	Sigma-Aldrich
Glucose oxydase extraite d' <i>Aspergillus Niger</i> . (GOx type X-S)	Sigma-Aldrich
Lectine d' <i>Arachis hypogaea</i> (issue de la cacahuète)	Sigma-Aldrich
Protéines allergènes recombinantes (Figure 5-10) et sérums réactifs	Paul Ehrlich Institute
Protéine C-réactive humaine	Biodesign
Séquence d'oligonucléotide (5'→3') biotine-(dT) ₁₆ -C ₆ -NH ₂	Eurogentec
Séquence d'oligonucléotide poly-(dT) ₁₆ marquée en 5' par la biotine (5') et par la benzophénone (3').....	Eurogentec
Séquence d'oligonucléotide (5'→3') NH ₂ -C ₆ -TTGAGGTGCATGTTTGTGCC.....	Eurogentec
Séquence d'oligonucléotide (5'→3') biotine-GG CAC AAA CAT GCA CCT CAA ..	Eurogentec
Sondes pour le génotypage érythrocytaire (Tableau 5-3)	Eurogentec
Streptavidine marquée par la phosphatase alcaline.....	Sigma-Aldrich
Streptavidine marquée par la peroxydase de raifort.....	Sigma-Aldrich

1.3.4. Tampons et solution

PBS (*Phosphate Buffer Saline*)

Tampon phosphate $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, NaCl $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 7,4

PBSTA (*Phosphate Buffer Saline Tween Albumine*)

Tampon phosphate $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, NaCl $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 7,4, Tween® 0,1 % (v/v), BSA 1 % (m/v)

VBS (*Veronal Buffer Saline*)

Tampon Véronal $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, NaCl $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 7,4 ou 8,5

PBSTA (*Veronal Buffer Saline Tween Albumine*)

Tampon Véronal $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, NaCl $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 7,4 ou 8,5, Tween® 0,1 % (v/v), BSA 1 % (m/v)

Solution de mesure de la chimiluminescence catalysée par la HRP : VBS (pH = 8,5) contenant $220 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de luminol, $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ de p-iodophénol et $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ d' H_2O_2

2. Méthodes

2.1. Dépôt liquide (faible volume) pour la fabrication de biopuces

Le volume des gouttes déposées sur le support lors du matriçage des sondes doivent être de l'ordre du nanolitre afin d'obtenir des plots (ou *spots*) d'un diamètre de l'ordre de 100 μm . Pour ce faire, une technique de dépôt liquide non-contact automatisée a été mise en œuvre (Cf. Chapitre 1, paragraphe 3.2). La solution à déposer est prélevée dans un capillaire en verre puis la mise sous tension d'un quartz piézoélectrique déclenche l'éjection de la goutte en créant une impulsion acoustique (Figure 5-1 (a)). Un bras articulé permet de venir positionner le capillaire de façon précise au niveau de la position ciblée (résolution en $(x,y) \sim 5 \mu\text{m}$) à une distance d'environ 500 μm de la surface. Différentes solutions peuvent être déposées successivement, sous forme d'un nombre variable de gouttes, l'automate disposant d'une station de lavage des capillaires. Une interface informatique permet de paramétrer les caractéristiques du dépôt : motif, position sur le support, volume des gouttes...

Dans le cas du dépôt sur plaque filtrante (Multiscreen HTS-HATM, Millipore[®]), le matriçage sur le support membranaire a été réalisé sur la face extérieure des puits (plaque posée à l'envers, ouverture des puits vers le bas) comme schématisé Figure 5-1 (b). Afin de visualiser les plots formés sur des surfaces blanches et contrôler leur qualité, un colorant (bleu de bromophénol 0,25 mg.ml^{-1}) a parfois été ajouté aux solutions incolores (encart Figure 5-1(b)).

Deux automates de dépôt non contact à système d'éjection piézoélectrique ont été utilisés pour la préparation de biopuces. Ils sont décrits Figure 5-2.

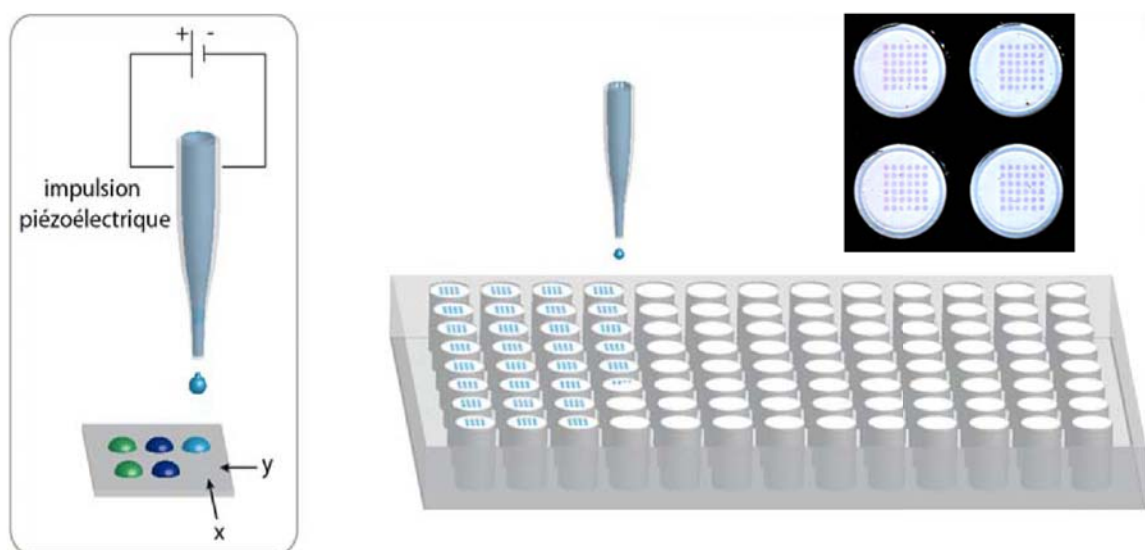


Figure 5-1 Principe du dépôt non contact de faibles volumes de liquides

(a) L'éjection d'une goutte de solution chargée dans le capillaire est provoquée par une impulsion électrique et permet de déposer la solution à une position (x,y) de la surface. (b) Cas particulier du matriçage sur plaque filtrante : la plaque est retournée afin de déposer les solutions sur la face envers du disque membranaire (face externe du fond de puits). L'encart présente une image typique des matrices obtenues en utilisant une coloration au bleu de bromophénol.

BioChip Arrayer (Perkin-Elmer)

L'appareil dispose de quatre capillaires en verre permettant le matricage de quatre solutions différentes en un seul cycle. Le volume typique de la goutte éjectée est 340 pL. Un capteur de pression permet de contrôler les différentes étapes de manipulations des échantillons liquides (prélèvement, éjection...). Il est possible d'ajuster les paramètres de l'impulsion piézoélectrique (tension appliquée, durée de l'impulsion) afin d'optimiser la vitesse et la forme de la goutte. L'automate est protégé par une enceinte ventilée (en surpression) permettant d'éviter la contamination par des poussières.

SciFlex Arrayer S3 (Sciencion, Allemagne)

L'automate disponible au laboratoire est équipé d'un seul capillaire de dépôt en verre. Avec l'aiguille proposée, la tension d'éjection et la fréquence utilisée ont permis d'obtenir une goutte de 500 pL. La manipulation des liquides repose cette fois sur un équilibrage passif des pressions. Plus récent que l'automate précédent, l'automate S3 possède une vitesse d'exécution et une précision nettement supérieures. Par ailleurs, une étape de contrôle qualité par imagerie optique permet de vérifier l'état de la goutte (forme, volume, présence de satellite, vitesse) au début et à la fin de matricage. Enfin les volumes d'échantillons nécessaires sont minimisés (~10 µl contre 100 µl dans le cas précédent).

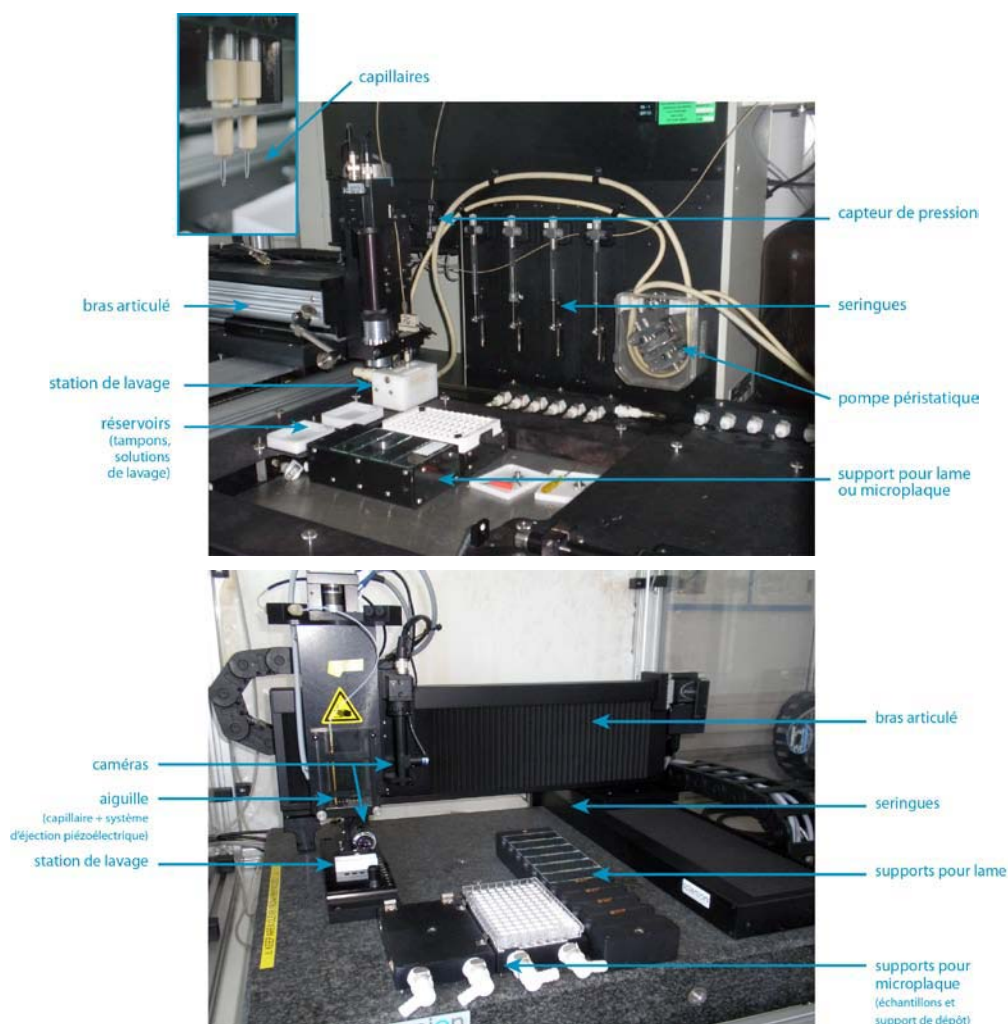


Figure 5-2 Automates de dépôt : (haut) Biochip Arrayer (Perkin-Elmer) ; (bas) SciFlex Arrayer S3 (Sciencion)

2.2. Activation de surface et greffage

2.2.1. Activation de surface par le glutaraldéhyde

Une solution de glutaraldéhyde (pentane-1,5-dial) à 2% (m/v) dans un tampon phosphate ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 5$) est déposée sur la surface à activer (typiquement $20 \mu\text{l}$ par cm^2). Le support est incubé 1 heure à 37°C en atmosphère humide puis rincé abondamment à l'eau distillée.

2.2.2. Photogreffage d'oligonucléotides sur le PolyShrink™

Activation des oligonucléotides par la benzophénone

Le mode opératoire, adapté de Dankbar et Gauglitz permettant la fonctionnalisation d'oligonucléotides présentant une terminaison amine est présenté Figure 5-3 (Dankbar et Gauglitz 2006).

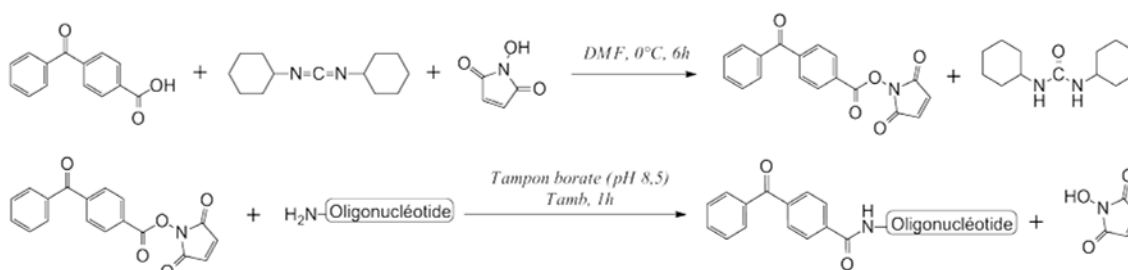


Figure 5-3 Voie d'activation des oligonucléotides par la benzophénone

L'acide p-benzoylbenzoïque ($0,10 \text{ mol.l}^{-1}$), le dicyclohexylcarbodiimide ($0,15 \text{ mol.l}^{-1}$) et le N-hydrosuccinimide ($0,11 \text{ mol.l}^{-1}$) sont mélangés dans 10 ml de diméthylformamide. Le mélange réactionnel est agité dans un bain d'eau glacée pendant 6 heures, puis le précipité blanc formé est éliminé par centrifugation. La solution d'acide p-benzoylbenzoïque activée ainsi produite est diluée à 0,5 % dans un tampon borate ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 8,5$). Les oligonucléotides ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) sont ajoutés au mélange et le milieu est agité 1 heure à température ambiante. Les oligonucléotides sont purifiés par précipitation dans l'éthanol (NaCl (3 mol.l^{-1})/éthanol (2:1000), puis éthanol à -20°C).

Photogreffage sur la surface de PolyShrink™

La solution de dépôt est préparée par dissolution des oligonucléotides activés (oligonucléotides activés synthétisés à partir de l'acide benzoylbenzoïque ou bien oligonucléotide activé commercial) dans un tampon PBS ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$). La concentration des oligonucléotides dans la solution de dépôt est typiquement de $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$. La solution est matriciée sur la surface de PolyShrink™ (volume déposé : 2 à 10 nl par plot; espacement entre les plots : 500 à 1000 μm) à l'aide d'un spotter piézoélectrique. Le support est ensuite irradié 30 minutes à 254 nm (lampe Bio-Link® (BLX)), puis soumis aux ultrasons dans de l'eau distillée (5 minutes) afin d'éliminer les sondes non greffées. Enfin, le support est cuit 30 secondes à 163°C afin d'induire la réduction isotropique.

2.2.3. Matrice de plots d'hydrogel et d'oligonucléotides

Synthèse de la 4-méthacryloxybenzophénone (4-MABP)

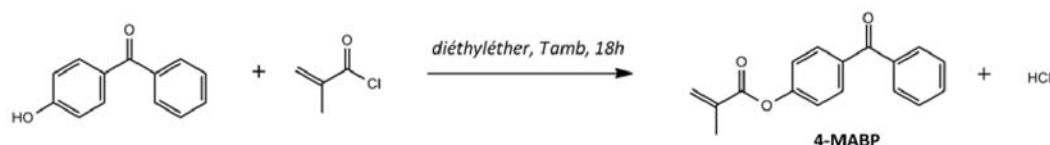


Figure 5-4 Synthèse de la 4-méthacryloxybenzophénone (4-MABP)

Le schéma de synthèse est présenté Figure 5-4. Dans un montage à reflux, 0,05 mol de 4-hydroxybenzophénone et 0,055 mol de triéthylamine sont introduits dans 50 ml de diéthyléther. A l'aide d'une ampoule de coulée, 0,05 mol de chlorure de méthacryloyle sont ajoutés goutte à goutte au milieu réactionnel sous agitation en 5 minutes (un bain de glace permet de refroidir le milieu si la réaction s'emballe). Le mélange est agité 18 heures à température ambiante. La triéthylamine permet de piéger l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction. A la fin de la réaction, 40 ml d'eau distillée sont ajoutés au milieu. La phase organique est lavée avec de l'eau distillée, séchée sur sulfate de magnésium anhydre puis le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit est conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

Le produit obtenu est analysé par spectroscopie IR et RMN ¹H.

- IR (comparaison au spectre de l'hydroxybenzophénone) : apparition des bandes $\nu(\text{C}=\text{C})$ à 1653 cm^{-1} et $\nu(\text{C}=\text{O ester})$ à 1737 cm^{-1} ; disparition de la bande $\nu(\text{OH})$ à 3110 cm^{-1} ;
- RMN ¹H (500 MHz) dans CD₃CN : $\delta = 1,95\text{ ppm}$ (CH₃-) ; 5,85- 6,34 ppm (H_{éthyléniques}) ; 6,93-7,70 ppm (H_{aromatiques}).

Synthèse du poly-(DMAA-co-1%VPA-co-1%MABP)

Le N,N-diméthylacrylamide est distillé sous pression réduite afin d'éliminer le stabilisateur du

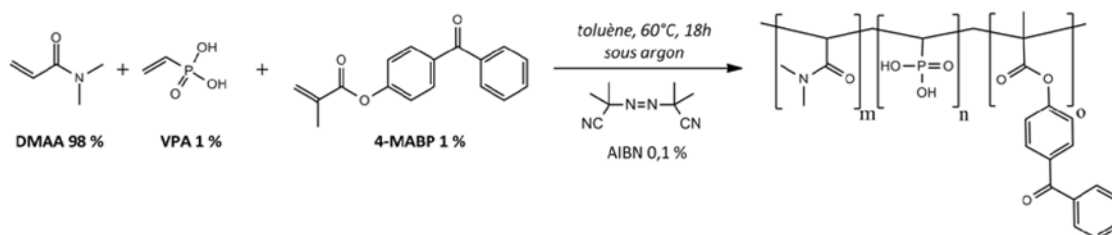


Figure 5-5 Synthèse du poly-(DMAA-co-1%VPA-co-1%MABP)

réactif. Les trois monomères sont mis en solution dans le toluène anhydre dans les proportions suivantes (en pourcentage de la masse totale) : N,N-diméthylacrylamide (DMAA) 98%, acide vinylphosphonique (VPA) 1%, 4-méthacryloxybenzophénone (4-MABP) 1%. 0,1% d'azobisisobutyronitrile (AIBN) sont introduits pour l'initiation de la polymérisation. Le milieu réactionnel est agité pendant 18 heures à 60°C, sous atmosphère d'argon. Le copolymère est précipité dans l'éthanol, filtré, puis le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le produit est par la suite conservé à 4°C à l'abri de la lumière.

Le produit obtenu est analysé par spectroscopie RMN ¹H (500 MHz) dans D₂O. Les signaux majoritaires sont ceux associés au monomère DMAA ($\delta = 1,20\text{ ppm}$ (CHCON) ; 1,60 ppm (CH₂) ; 3,1 ppm (N(CH₃)) ; la présence de signaux des H éthyléniques indiquent que tous les monomères n'ont pas réagi). On observe également les signaux associés à la 4-MABP ($\delta = 2,3\text{ ppm}$ (CHCO₂) ; 7,0 – 8,3 ppm (H_{aromatiques})).

Formation de la matrice de plots d'hydrogels

Les principales étapes du protocole sont résumées sur la Figure 5-6. La solution de dépôt est préparée en mélangeant des volumes égaux de (i) la solution mère d'oligonucléotides ($100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ dans de l'eau Milli-Q), (ii) la solution de pré-polymère (1 mg.ml^{-1} dans l'eau Milli-Q) et un tampon PBS ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$). [1] Cette solution est matricée à l'aide d'un appareil de dépôt non-contact piézoélectrique à la surface d'une feuille de PolyShrink™ au préalable lavée à l'éthanol et séchée sous air comprimé (volume déposé : 0,4 à 8 nl par plot; espacement entre les plots : 250 à 1000 μm). [2] La matrice est ensuite séchée 30 minutes à 70°C puis irradiée sous UV (1 J, 254 nm, lampe Bio-Link® (BLX)) afin d'induire la réticulation du gel. [3] Le support est ensuite lavé à l'eau Milli-Q, séché sous un flux d'air comprimé et enfin cuit 30 secondes à 163°C afin d'induire la réduction isotropique.

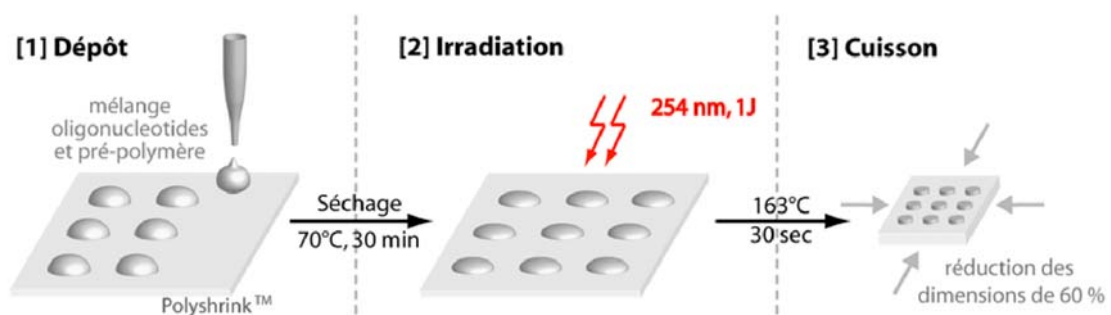


Figure 5-6 Préparation des plots mixtes hydrogel-oligonucléotides

2.3. Caractérisation des surfaces

2.3.1. Imagerie de surface

Profilomètre à capteur confocal

Un profilomètre NJ-Optimal à capteur confocal à haute résolution (nanoJura, France) a permis d'enregistrer des profils de hauteur et de réaliser une image en trois dimensions des surfaces considérées. L'appareil et son principe de fonctionnement sont présentés Figure 5-7. La hauteur de la surface à un point donné est déterminée à l'aide d'une technique d'aberration.

En pratique, un rayon de lumière blanche est dirigé sur la surface à l'aide d'une lentille à aberration chromatique axiale et du fait de cette aberration, le point de focalisation se trouve à des positions z différentes pour chaque longueur d'onde. La lumière réfléchie est envoyée à travers le sténopé au spectromètre qui fournit une courbe d'intensité du signal en fonction de la longueur d'onde : l'intensité maximale correspond à la longueur d'onde focalisée. La résolution en z est de l'ordre du nm. Le balayage en (x,y) permet d'obtenir une image complète de la surface par accumulation de profils avec une résolution de $\sim 2 \mu\text{m}$.

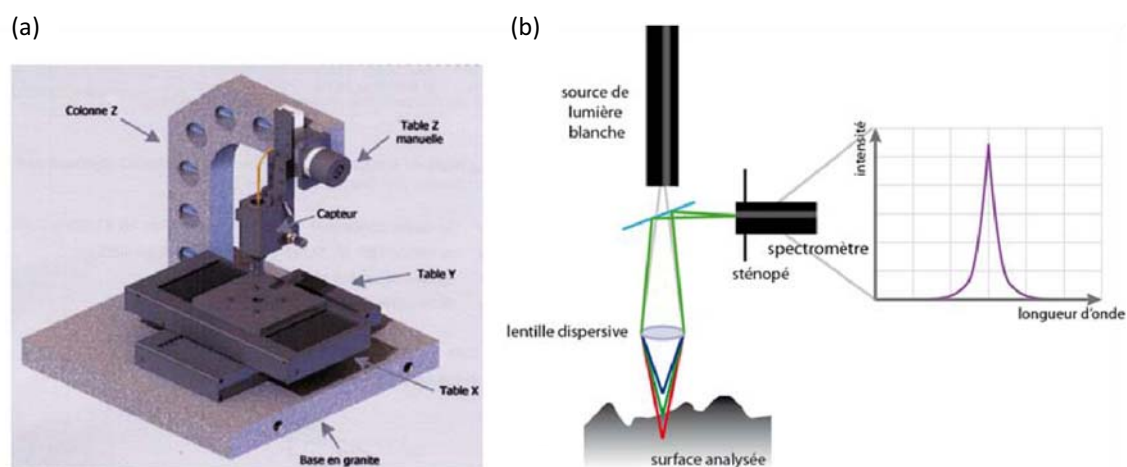


Figure 5-7 Système de métrologie de surface NJ-Optimal (nanoJura, France) à capteur confocal (a) Allure de l'appareil. (b) Principe de fonctionnement (technique d'aberration axiale).

Microscopie électronique à balayage

Les images de microscopie électronique à balayage ont été enregistrées sur un microscope Hitachi S800 FEG, fournissant une résolution de 2 nm à 30 kV pour une distance de travail de 5 mm et des tensions d'accélération possibles allant de 1 à 30 kV.

Un faisceau d'électrons projeté sur l'échantillon à analyser génère des électrons secondaires de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur amplifiant le signal. À chaque point d'impact sur le détecteur correspond un signal électrique dont l'intensité dépend de la nature et de la topographie de l'échantillon au point d'impact. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Pour les échantillons non conducteurs, il est nécessaire d'effectuer au préalable une métallisation de la surface, réalisée dans notre cas en déposant une couche or-palladium généralement d'une épaisseur de 4 nm.

2.3.2. Mesure d'angle de contact

Les surfaces ont été caractérisées par mesure d'angle de contact en utilisant un appareil « Digidrop-GBX », mis à disposition par le Dr. Puzenat à l'Institut de Recherche sur la Catalyse et l'Environnement. Une goutte d'eau ($\sim 5 \mu\text{l}$) est déposée sur la surface à l'aide d'une seringue (Figure 5-8) puis une caméra permet de suivre la forme de la goutte sur la surface et sa stabilisation. Un logiciel dédié permet la mesure de l'angle de contact moyen.

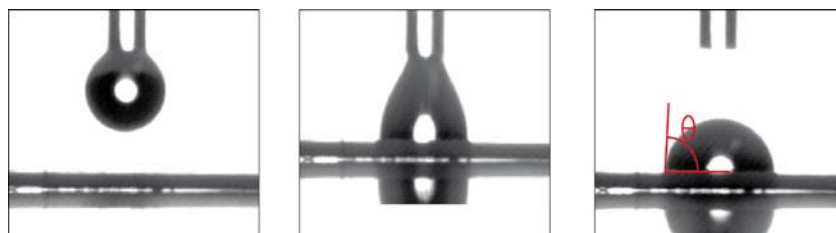


Figure 5-8 Dépôt d'une goutte d'eau pour la mesure de l'angle de contact. Une goutte d'eau ($\sim 5 \mu\text{l}$) est formée à l'extrémité d'un capillaire à l'aide d'une seringue. A l'aide d'un plateau mobile, la surface est amenée délicatement au contact de la goutte qui s'y dépose par capillarité.

2.4. Détection de l'interaction

2.4.1. Marquage et génération du signal

Fluorescence

Des molécules de straptavidine couplée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ont permis le marquage de cibles biotinylées ($\lambda_{\text{exc.}} = 490 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 520 \text{ nm}$).

Chimiluminescence

Les plots positifs (cibles capturées) sont marqués par la peroxydase de raifort (en général par l'intermédiaire du couple biotine / streptavidine).

Le signal de chimiluminescence est généré en déposant sur la surface soit :

- i. une solution de luminol ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$), p-iodophénol ($200 \mu\text{mol.l}^{-1}$) et peroxyde d'hydrogène ($500 \mu\text{mol.l}^{-1}$) dans du tampon Véronal (Véronal 0.1 mol.l^{-1} , NaCl 0.1 mol.l^{-1} , pH=8,5) ;
- ii. une solution de révélation commerciale *SuperSignal ELISA Femto maximum sensitivity substrate* (Thermoscientific, Pierce).

Suivant l'intensité du signal, son acquisition est effectuée sur des durées allant de quelques secondes à plusieurs minutes.

Colorimétrie

Deux marquages enzymatiques ont été utilisés (les structures des molécules et les mécanismes associés sont présentés au Chapitre 1, paragraphe 5.2.2). La durée de l'étape de révélation du signal colorimétrique est fonction de la quantité de cibles immobilisées.

- i. Les plots positifs (cibles capturées) sont marqués par la phosphatase alcaline (en général par l'intermédiaire du couple biotine / streptavidine). Le signal colorimétrique est généré en déposant sur la surface une solution de BCIP/NBT prête à l'emploi. La solution est initialement jaune pâle et un produit violet foncé précipite sur les plots marqués par la phosphatase alcaline. La réaction est stoppée par lavage du support avec un tampon PBS ou de l'eau distillée.
- ii. Les plots positifs (cibles capturées) sont marqués par la peroxydase de raifort (en général par l'intermédiaire du couple biotine/streptavidine). Le signal colorimétrique est généré en utilisant un kit commercial *TMB Membrane Peroxidase Substrate System (3-Component)* comprenant une solution contenant du TMB, une solution contenant du peroxyde d'hydrogène et une solution contenant un amplificateur permettant de promouvoir la précipitation du produit coloré. La solution est initialement jaune pâle et un produit bleu foncé précipite sur les plots marqués par la peroxydase de raifort. La réaction est stoppée par lavage du support avec de l'eau distillée.

2.4.2. Instrumentation

Caméra CCD

Pour les mesures de chimiluminescence, l'acquisition de la lumière émise à la surface des différentes puces est réalisée à l'aide d'une caméra à capteur CCD (*charged-coupled device*) refroidi à -30°C ou -65°C . Le refroidissement du capteur permet de réduire considérablement

le bruit de fond électronique, et il est alors possible de mesurer des intensités lumineuses très faibles sur une durée pouvant aller jusqu'à plusieurs dizaines de minutes. L'échantillon est placé dans une chambre noire isolée de la lumière extérieure et la mise au point est effectuée grâce à un système de plateau et de lentilles motorisés.

Deux caméras de ce type sont disponibles au laboratoire :

- i. une caméra CCD FUJIFILM® LAS-1000 équipée d'un thermo-module qui permet de refroidir le capteur à une température de -30°C ;
- ii. une caméra EM-CCD C9100-13 Hamamatsu équipée d'un module de refroidissement permettant d'atteindre une température de -65°C ; plus sensible et supérieure en gamme dynamique à la précédente, elle a de plus l'avantage de pouvoir être utilisée à différentes résolutions optiques grâce à un jeu d'objectifs.

Scanner de bureau

Un scanner de bureau plat HP Scanjet 3770 (Hewlett-Packard) au format A4 et équipé d'un capteur CCD a permis d'imager les signaux colorimétriques en couleurs réelles et en niveau de gris avec une résolution optique maximale de 2400 dpi.

Microscope optique

Dans le cas d'un marquage fluorescent, les puces ont été imagées en utilisant un microscope de fluorescence Zeiss équipé des filtres appropriés.

2.4.3. Analyse d'image

Les signaux de chimiluminescence ont été quantifiés en analysant les images acquises à l'aide du logiciel Image Gauge 4.0.

Afin de quantifier les intensités des signaux colorimétriques, les images en niveaux de gris enregistrées ont été analysées en utilisant le logiciel GenePix Pro 6.0 (Molecular Devices). L'intensité du signal sur un plot est calculée comme l'intensité médiane de l'ensemble des pixels inclus dans un cercle définissant le plot. Le bruit de fond est évalué de façon locale sur une couronne entourant le plot (Figure 5-9). Le signal résultant sur une sonde donné est calculé comme le signal moyen sur les différents réplicas. Dans certains cas, le contraste de l'image a été au préalable optimisé (la comparaison entre deux images nécessite toutefois des paramètres de contraste identique).

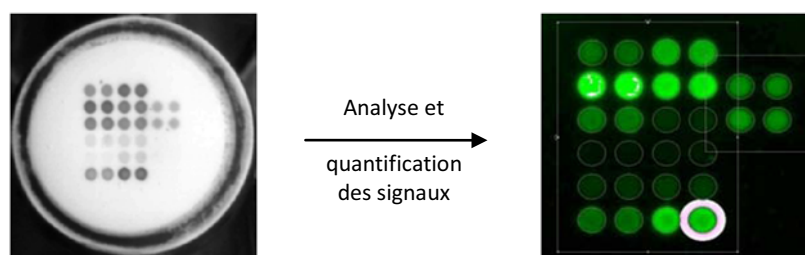


Figure 5-9 Analyse des signaux (GenePix Pro 6.0) L'image représentée à gauche en niveau de gris est un exemple de signal colorimétrique obtenu sur membrane. La même image est représentée à droite (en fausses couleurs) : la couronne blanche correspond à la zone de calcul du bruit de fond local pour le plot encerclé.

2.5. Protocole des tests sur puce

2.5.1. Test sur acides nucléiques (puce à oligonucléotides)

Test d'hybridation sur un couple modèle d'oligonucléotides synthétiques (colorimétrie ou chimiluminescence)

Le couple d'oligonucléotides suivant a été utilisé comme modèle sonde / cible :

- i. sonde : NH₂-C₆-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC (volume typique des gouttes pour le matricage 2,4 nl, espacement des plots 500 µm) ;
- ii. cible : biotine-GGCACAAACATGCACCTCAA.

En format haut-débit (membrane) : Après lavage de la membrane avec un tampon PBS (400 µl / puits, température ambiante), la membrane est saturée avec 200 µl de PBSTA (10 minutes, température ambiante). Les oligonucléotides cibles (à la concentration souhaitée) sont pré-incubés avec la streptavidine marquée par l'enzyme de détection (HRP, AP) à 2 µg.ml⁻¹ dans PBSTA (10 minutes, 37°C), puis cette solution est incubée sur la membrane (100 µl/puits, 30 minutes, 37°C). La membrane est lavée avec un tampon VBS, puis 200 µl d'une solution du substrat de l'enzyme sont ajoutés dans chaque puits à température ambiante afin de générer le signal coloré. Un lavage PBS permet de stopper le développement de la coloration.

Sur PolyShrinkTM (matrice de plots d'hydrogels) : Après lavage du support à l'eau distillée, celui-ci est saturé à l'aide d'un tampon VBSTA (20 µl/cm², 10 minutes, 37°C). Les oligonucléotides cibles sont dilués à la concentration souhaitée dans un tampon VBSTA puis incubés sur la matrice de sondes (20 µl/cm², 30 minutes, 37°C). Le support est lavé abondamment à l'eau distillée puis une solution de streptavidine marquée par l'enzyme utilisée pour la détection (HRP ou AP) à 1 µg.ml⁻¹ dans VBSTA est incubée sur la matrice (20 µl/cm², 30 minutes, 37°C). Le support est lavé abondamment à l'eau distillée puis une solution du substrat de l'enzyme est ajoutée afin de générer le signal (20 µl/cm², température ambiante).

Test colorimétrique de génotypage érythrocytaire

Le protocole des tests de génotypage érythrocytaire est détaillé au paragraphe 2.7.

2.5.2. Immunoessais (sur membrane)

Détection colorimétrique d'un allergène issu de la cacahuète (système modèle)

Matricage : Une solution de lectine d'*Arachis hypogaea* à 1 mg.ml⁻¹ est matricée sur la membrane pour former une matrice de 8x6 plots identiques (2,4 nl par plot).

Test sur puce : Après lavage avec un tampon PBS (400 µl / puits, température ambiante), la membrane est saturée avec 200 µl de PBSTA (10 minutes, température ambiante). La lectine (à la concentration souhaitée) et les anticorps secondaires (anticorps polyclonaux anti-IgG de lapin marqués par la phosphatase alcaline, à 2 µg.ml⁻¹) sont préincubés ensemble dans PBSTA (10 minutes, 37°C) puis cette solution est incubée sur la membrane (100 µl/puits, 30 minutes, 37°C). La membrane est lavée avec un tampon VBS, puis 200 µl de BCIP/NBT sont ajoutés dans chaque puits à température ambiante afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage PBS permet de stopper le développement de la coloration.

Détection colorimétrique multiparamétrique d'allergènes dans des sérums humains

Réactifs : Un panel de protéines allergènes recombinantes (en solution dans PBS) de cerise (rPru a4: 0,42 mg.ml⁻¹; rPru a1: 1,59 mg.ml⁻¹; rPru a3: 1,86 mg.ml⁻¹), pomme (rMal d1: 0,11 mg.ml⁻¹, rMal d3: 0,99 mg.ml⁻¹, rMal d4: 1,15 mg.ml⁻¹), noisette (rCor a1: 0,48 mg.ml⁻¹) et pollen de bouleau (rBet v1: 0,82 mg.ml⁻¹) ainsi que des extraits bruts de pomme (18 µg.ml⁻¹) et de cerise (419 µg.ml⁻¹) ont été fournis par le Dr. Stephan Scheurer (Paul Ehrlich Institute, Germany), de même qu'une série de sérums réactifs caractérisés par test ImmunoCAP.

Matrigage : Les différents allergènes et extraits sont matricés sans dilution préalable sur la membrane (2,4 nl par plot, espacement entre les plots 500 µm) en duplicat. La matrice est complétée par les deux contrôles positifs en triplicat (Figure 5-10).



Figure 5-10 Plan de dépôt des sondes pour le diagnostic allergique

Test sur puce : Après lavage avec un tampon PBS (400 µl / puits, température ambiante), la membrane est saturée avec 200 µl de PBSTA (10 minutes, température ambiante). Les échantillons de sérum dilués au dixième sont pré-incubés avec les anticorps secondaires (anticorps monoclonaux anti-IgE humaine marqués par la phosphatase alcaline) à 2 µg.ml⁻¹ dans PBSTA (10 minutes, 37°C) puis cette solution est incubée sur la membrane (100 µl/puits, 30 minutes, 37°C). La membrane est lavée avec un tampon VBS, puis 200 µl de BCIP/NBT sont ajoutés dans chaque puits à température ambiante afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage PBS permet de stopper le développement de la coloration.

Test sandwich : détection de la protéine C-réactive sur membrane

Matrigage des sondes : Les anticorps de capture monoclonaux anti-CRP clone C5 (100 µg.ml⁻¹) dans PBS (pH 7,4 ; 0,1mol.l⁻¹) sont matricés sur le support (2,4 nl par plot, espacement entre les plots 500 µm). La matrice est complétée par un ensemble de témoins positifs et négatifs.

Test sur puce : Après lavage avec un tampon VBS (400 µl / puits, température ambiante), la membrane est saturée avec 200 µl de Low Cross Buffer (10 minutes, température ambiante). Une solution contenant la protéine C-réactive (à la concentration souhaitée), l'anticorps secondaire monoclonal anti-CRP biotinylé clone C7 (à la concentration souhaitée), et la streptavidine marquée par la phosphatase alcaline (2 µg.ml⁻¹) dans un tampon Low Cross / VBS 1:5, est incubée sur la membrane (100 µl/puits, 30 minutes, 37°C). La membrane est lavée avec un tampon VBS (400 µl / puits, température ambiante), puis 200 µl de BCIP/NBT sont ajoutés dans chaque puits à température ambiante afin de générer le signal colorimétrique. Un lavage PBS permet de stopper le développement de la coloration.

2.6. Automatisation des tests colorimétriques sur plaque de filtration (96 puits)

2.6.1. Instrumentation

Les tests à haut-débit (microplaque 96 puits) ont été automatisés au moyen d'un automate Freedom EVO75 fabriqué par Tecan (Suisse) et présenté sur la Figure 5-11.

L'appareil est équipé des fonctionnalités suivantes :

- i. un bras manipulateur permet de déplacer microplaques et couvercles ;
- ii. un bras pipetteur permet le transfert des solutions entre les réservoirs et les microplaques par aspiration et éjection (volumes pris en charge : 10 μ l à 1 ml), ainsi que le mélange des solutions dans les micropuits ; il est possible d'utiliser un seul canal ou les 8 canaux de manière solidaire ;
- iii. un bloc chauffant (EchoTherm, Torrey Pines Scientific) ;
- iv. une station de filtration sous vide (Millipore®) permet l'élimination des échantillons par filtration lors de l'utilisation de plaques filtrantes (fond de puits membranaire).

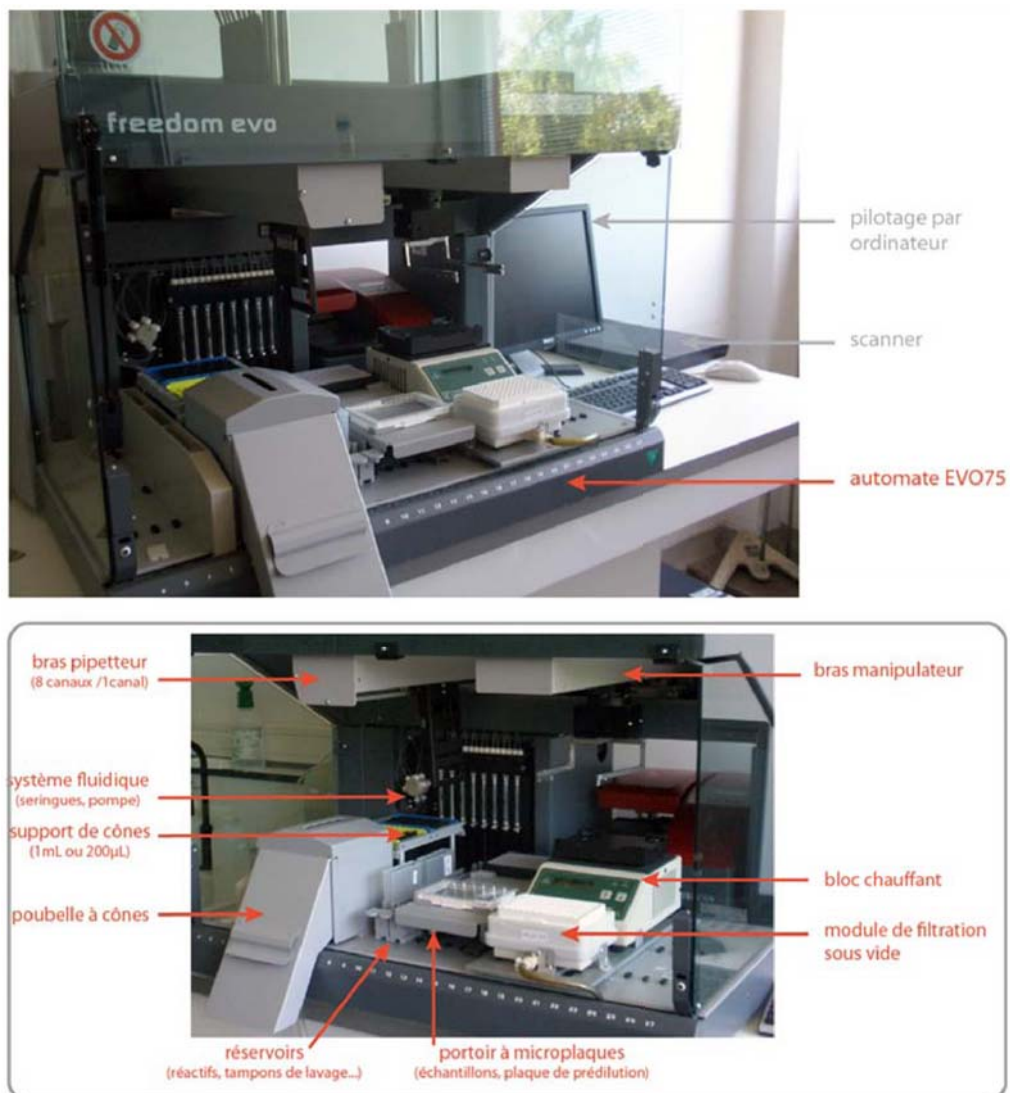


Figure 5-11 Automate EVO75 (Tecan) utilisé pour l'automatisation des tests à haut-débit

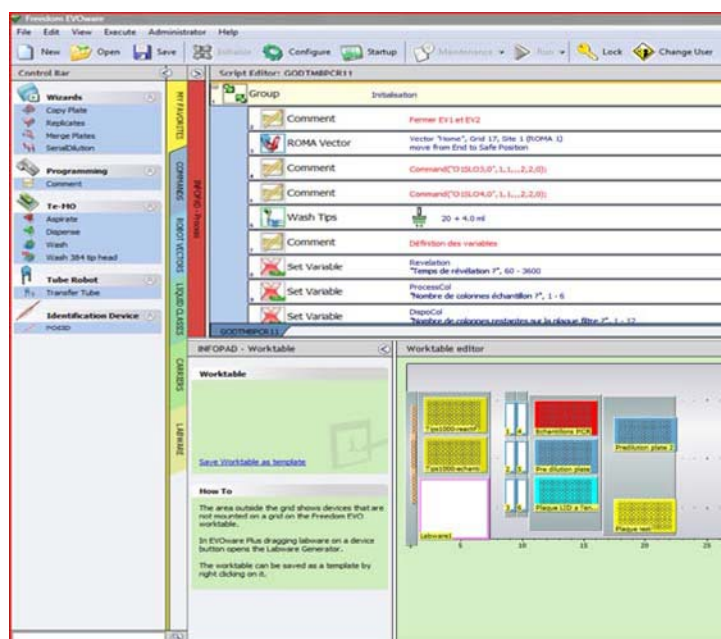


Figure 5-12 Capture d'écran du logiciel EvoWARE utilisé pour piloter l'automate. Sur la droite se trouvent la liste des commandes du protocole (en haut) et la table de travail (en bas).

L'automate est piloté par le logiciel dédié EVOWARE, Tecan (Figure 5-12). Il est associé à un scanner A4 de bureau classique pour l'imagerie des plaques après développement du signal colorimétrique.

2.6.2. Protocole

Deux types de procédures sont mis en jeu pour le traitement des plaques filtrantes.

- i. Dans le cas d'un lavage simple, le dépôt de la solution dans le puits se fait alors que l'aspiration est activée : les solutions sont directement aspirées à travers la membrane.
- ii. Lorsque la solution doit être incubée sur la membrane, on procède différemment : un premier volume de solution est déposé, puis aspiré à travers la membrane afin de charger la totalité de la membrane poreuse avec la solution et d'emmener les réactifs en contact avec les sondes immobilisées sur sa face externe. Un second volume de solution est déposé puis incubé le temps voulu sur la membrane.

Les étapes générales du protocole, schématisées sur la Figure 5-13, sont les suivantes :

- i. lavage de la membrane (élimination des sondes non immobilisées) ;
- ii. saturation de la membrane (solution tampon contenant 1% m/v d'albumine de sérum bovin et 0,1% v/v de Tween 20®) ;
- iii. incubation thermostatée sur la membrane d'une solution cocktail contenant l'échantillon (cibles) et les molécules de marquage (éventuellement pré-incubés ensemble) ;
- iv. lavage de la membrane (élimination des cibles et marqueurs non capturés) ;
- v. incubation sur la membrane d'une solution de BCIP/NBT à température ambiante afin de générer un signal colorimétrique ;
- vi. lavage de la membrane (arrêt de la réaction de révélation) ;
- vii. acquisition à l'aide d'un scanner d'une image des membranes révélées (prise par dessous).

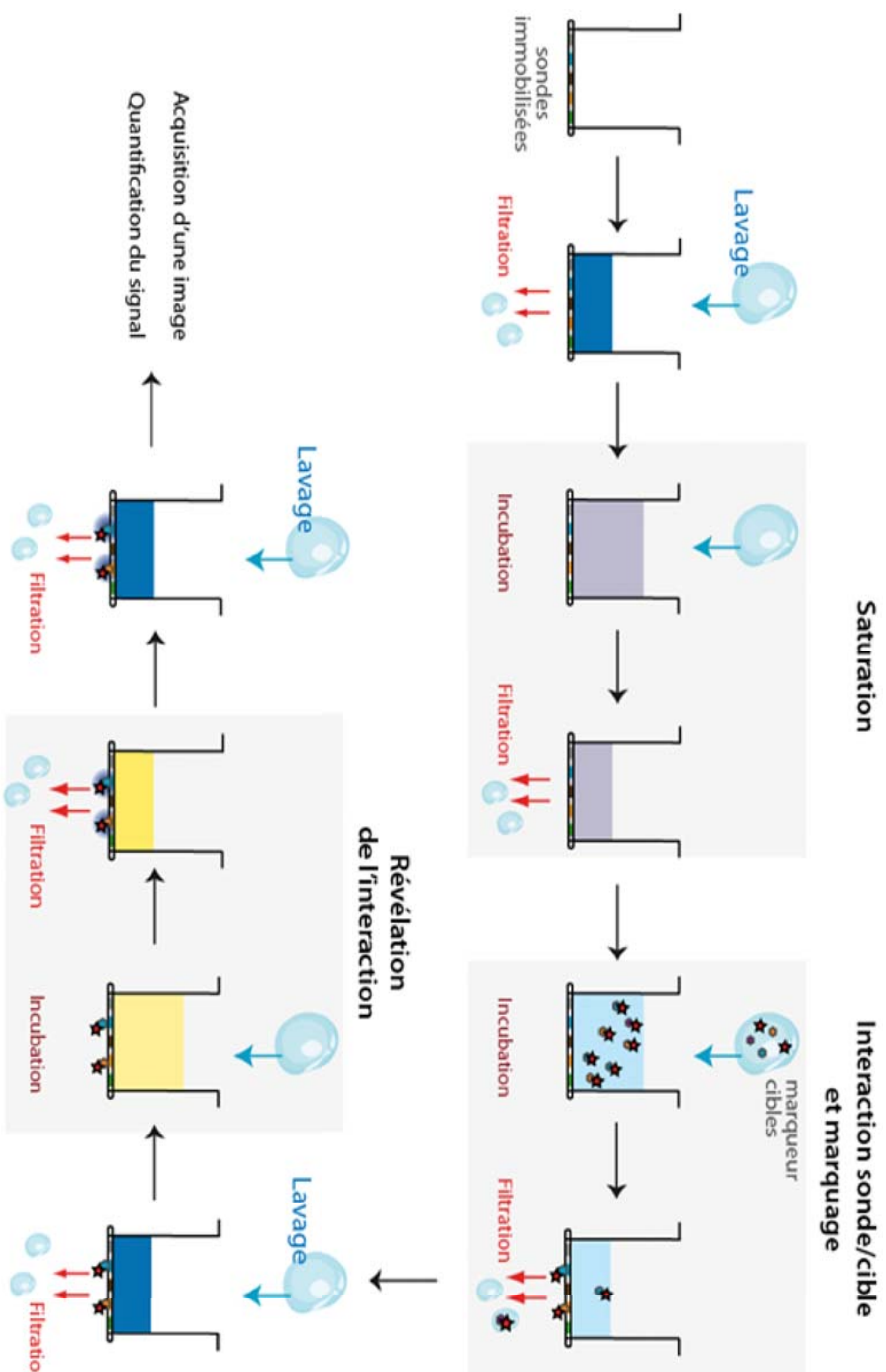


Figure 5-13

Protocole de filtration automatisé (détail pour un puits) (1) Une première étape de lavage permet d'éliminer les sondes non immobilisées (le vide est enclenché pendant l'ajout de la solution de lavage qui est directement filtrée à travers la membrane). (2) Une solution de saturation est incubée sur la membrane (~ 10 minutes) puis éliminée par filtration. (3) S'ensuit une incubation thermostatée d'une solution contenant à la fois les marqueurs et cibles sur la membrane. (4) Une deuxième étape de lavage permet d'éliminer les cibles et les marqueurs non capturés sur la matrice de sondes. (5) Enfin une solution de marquage (BCIP/NBT) est ajoutée sur la membrane afin de générer le signal colorimétrique. (6) Pour finir, un dernier lavage permet de stopper la réaction de coloration avant l'acquisition d'une image.

2.7. Tests de génotypage érythrocytaire

Le test de génotypage érythrocytaire implique deux phases successives : (i) une phase de préparation de l'échantillon à partir de l'échantillon de sang total (extraction de l'ADN génomique, amplification par PCR), puis (ii) la phase d'hybridation sur puce proprement dite (Figure 5-14).

2.7.1. Polymorphismes sélectionnés

Six SNP associés à quatre systèmes sanguins distincts et liés à des antigènes d'importance clinique ont été étudiés. Le Tableau 5-1 résume les caractéristiques des polymorphismes considérés et les notations correspondantes (en accord avec les recommandations de l'ISBT). A ceux-ci se sont rajoutés deux autres SNP associés aux systèmes Duffy et correspondant aux allèles rares *FY*X* et *FY*FY*.

Tableau 5-1 Polymorphismes étudiés

Système	SNP	Antigènes	Allèles
Kell (006)	T698C	KEL1	<i>KEL*1</i>
		KEL2	<i>KEL*2</i>
	T961C	KEL3	<i>KEL*3</i>
		KEL4	<i>KEL*4</i>
Kidd (009)	G838A	JK1	<i>JK*1</i>
		JK2	<i>JK*2</i>
Duffy (008)	G125A	FY1	<i>FY*1</i>
		FY2	<i>FY*2</i>
MNS (002)	C59T	MNS1	<i>MNS*1</i>
		MNS2	<i>MNS*2</i>
	T143C	MNS3	<i>MNS*3</i>
		MNS4	<i>MNS*4</i>

2.7.2. Préparation des échantillons

Banque d'échantillons phénotypés (ADN génomique)

Les échantillons de sang ont été collectés à l'EFS-RA avec consentement éclairé des donneurs puis utilisés sous couvert de l'anonymat. Les donneurs concernés sont en majorité de type caucasien.

L'ADN génomique a été extrait de l'échantillon en utilisant un extracteur automatique (MAGNA pure, Roche Diagnostics) qui procède à une lyse cellulaire puis isole l'ADN par complexation sur des billes magnétiques (concentration de l'ADN extrait = de 80 à 1500 ng.µl⁻¹). Le principe de l'extraction est résumé sur la Figure 5-15.

Amplification par PCR multiplexe

L'amplification par PCR permet d'obtenir d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie (~ million de copies en quelques heures) à partir d'un échantillon complexe et peu abondant. Le principe de cette technique enzymatique est rappelé Figure 5-16.

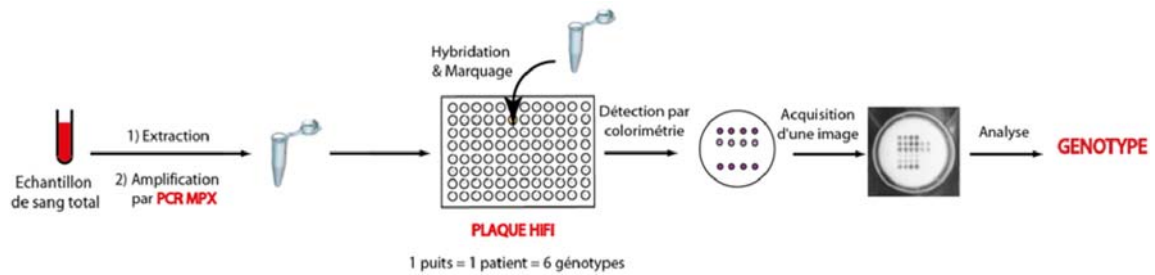


Figure 5-14 Vue d'ensemble du déroulement du test de génotypage érythrocytaire

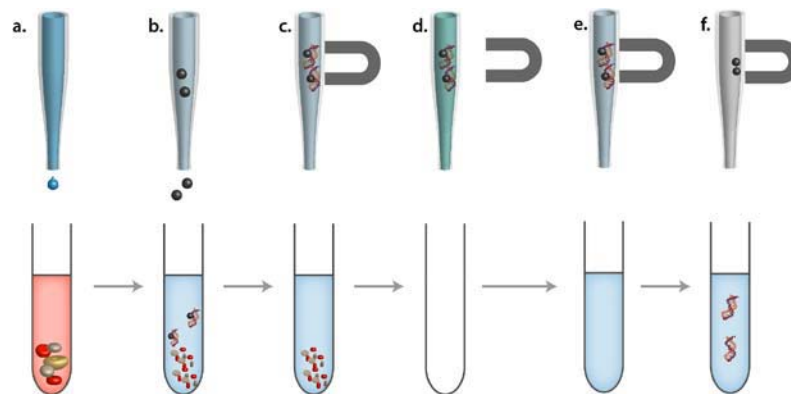


Figure 5-15 Principe de l'extraction d'ADN basée sur l'utilisation de particules magnétiques (source www.roche-applied-science.com) (a) L'addition d'un tampon de lyse et de la protéinase K à l'échantillon de sang total entraîne la lyse cellulaire et la digestion des protéines. (b) L'ADN se lie sur la surface des billes magnétiques ajoutés à l'échantillon. (c) Séparation magnétique du complexe billes-ADN. (d) Elimination des débris cellulaires par lavages intensifs. (e) Séparation magnétique du complexe billes-ADN. (f) L'ADN est élué à haute température et les particules magnétiques sont séparées du milieu.

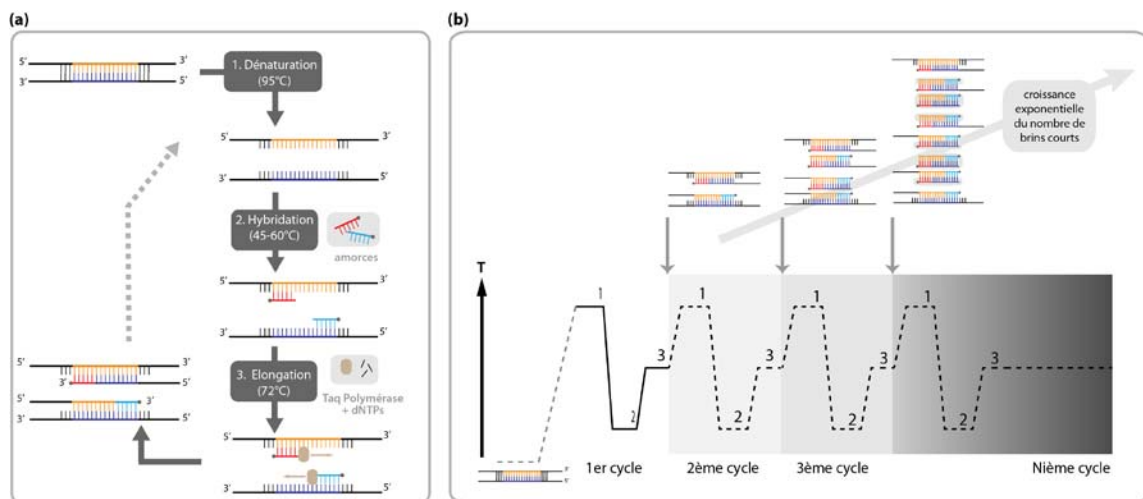


Figure 5-16 Principe de l'amplification par PCR (a). Déroulement du premier cycle de PCR : (1) L'échantillon est porté à 95°C afin d'obtenir deux brins d'ADN monocaténaire, c'est la phase de dénaturation. (2) La température est ramenée en dessous de la température de fusion des amorces (typiquement entre 45-60°C) afin que celles-ci s'hybrident sur les monobrin. Les deux amorces encadrent la zone à amplifier. (3) L'enzyme Taq Polymérase permet l'élongation des amorces en présence de dNTP (à 72°C). (b) Enchaînement des cycles : Ce cycle de réplication de trois étapes est répété N fois à l'identique, en utilisant les produits de chaque étape de synthèse comme matrices pour les étapes suivantes. A partir du 3^{ème} cycle, on obtient les brins courts recherchés. L'amplification obtenue est exponentielle et les brins courts s'accumulent très rapidement dans le milieu (2^N).

La technique de PCR multiplexe (PCR MPX) permet d'amplifier en une seule manipulation plusieurs séquences d'ADN simultanément, en utilisant un ensemble de couples d'amorces spécifiques de l'ensemble des séquences ciblées. Les séquences des amorces utilisées pour l'amplification des six SNP et les conditions d'amplification ont été optimisées à l'EFS-RA. L'utilisation d'une amorce *sens* marquée par une biotine en 5' permet de générer des amplicons eux-mêmes marqués. Les séquences des amorces sont rapportées dans le Tableau 5-2 (pour des raisons de propriété intellectuelle les amorces correspondant à *MNS*1* et *MNS*2* ne sont pas divulguées ici). Les amorces ont été synthétisées par Eurogentec (Belgique) avec une purification par HPLC sur colonne phase inverse.

La PCR MPX a été réalisée sur un thermocycleur Tprofessional (Biometra, Allemagne) en barrette de huit puits ou bien en plaque 96 puits. Les conditions d'amplification sont les suivantes : tampon PCR 10X (150 mmol.l⁻¹, Tris-HCl 500 mmol.l⁻¹, KCl 0,1 % Tween 20®), MgCl₂ (25 mmol.l⁻¹), dNTP (2,5 mmol.l⁻¹), Taq ADN Polymerase (5 unités par l). Les différentes amorces spécifiques sont introduites à des concentrations préalablement optimisées. Après activation de l'enzyme (93°C, 5 min), l'ADN subit 35 cycles comprenant chacun les étapes suivantes : (1) dénaturation (95°C, 20 s), (2) hybridation (57,5°C, 30 s) et (3) élongation (72°C, 30s).

Tableau 5-2 Amorces utilisées pour la PCR multiplexe

Système	Allèles amplifiés	Séquence de l'amorce (5' vers 3')	T _m (°C) (2AT+4GC)
Kell (006)	<i>KEL*1</i>	Biot - GGT AAA TGG ACT TCC TTA AAC TTT AAC CGA	58
	<i>KEL*2</i>	TGT GTC TTC GCC AGT GCA TC	55
	<i>KEL*3</i>	Biot - ACT CTT CCT TGT CAA TCT CCA TCA CTT	57
	<i>KEL*4</i>	CAT GCC CAC AGT CTT CTG GC	56
Kidd (009)	<i>JK*1</i>	Biot - CTC AGT CTT TCA GCC CCA TTT GA	55
	<i>JK*2</i>	AGC GCC ATG AAC ATT CCT CC	54
Duffy (008)	<i>FY*1</i>	Biot - ATG ATT CCT TCC CAG ATG GAG ACT ATG	58
	<i>FY*2</i>	TGC CCA CAG CCA GCT GT	52
MNS (002)	<i>MNS*3</i>	Biot - AGT GAA ACG ATG GAC AAG TTG TCC	56
	<i>MNS*4</i>	GATT CC AAA ATG ATTT TTT TTC TTT GCA CAT GT	56

Caractérisation

Les produits de PCR sont ensuite contrôlés par migration (20 min, 190 V) sur gel d'agarose à 2 % dans une cuve à électrophorèse suivie d'une révélation au bromure d'éthidium (Figure 5-17). La qualité de la PCR et la longueur des amplicons (entre 100 et 450 paires de bases) ont également été validées par électrophorèse capillaire. Pour des raisons de propriétés intellectuelles la longueur exacte des amplicons ne sera pas divulguée ici.

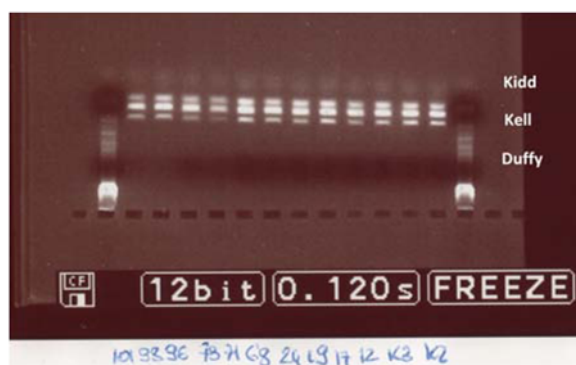


Figure 5-17 Exemple de contrôle de l'amplification sur gel d'agarose
Chaque colonne correspond à un produit de PCR distinct, sauf les deux colonnes externes qui correspondent à un marqueur de taille.

2.7.3. Test d'hybridation haut-débit

Sondes

Les séquences et caractéristiques des sondes utilisées sont détaillées dans le Tableau 5-3. Pour des raisons de propriété intellectuelle les séquences des sondes spécifiques des allèles *MNS*1*, *MNS*2*, *FY*FY*, *FY*NoFY*, *FY*X* et *FY*NoX* ne sont pas divulguées ici.

Tableau 5-3 Sondes utilisées pour la détection des polymorphismes étudiés

Système	Allèle	Séquence (5' vers 3')	Longueur (pb)	T _m (°C) (2AT+4GC)
KELL (006)	<i>KEL*1</i>	GTC TCA GCA TTC GGT TA-C ₆ -NH ₂	17	50
	<i>KEL*2</i>	TCT CAG CGT TCG GTT A-C ₆ -NH ₂	16	48
	<i>KEL*3</i>	GGA ACA GCC ATG AAG TGA-C ₆ -NH ₂	18	54
	<i>KEL*4</i>	GAA CAG CCG TGA AGT GA-C ₆ -NH ₂	17	52
KIDD (009)	<i>JK*1</i>	AGT AGA TGT CCT CAA ATG G-C ₆ -NH ₂	19	54
	<i>JK*2</i>	AGT AGA TGT TCT CAA ATG G-C ₆ -NH ₂	19	52
DUFFY (008)	<i>FY*1</i>	AGG TTG GCA CCA TAG TCT C-C ₆ -NH ₂	19	58
	<i>FY*2</i>	GGT TGG CAT CAT AGT CT-C ₆ -NH ₂	17	50
	<i>FY*NoX</i>		19	62
	<i>FY*X</i>		19	60
	<i>FY*NoFy</i>		19	56
	<i>FY*FY</i>		19	58
MNS (002)	<i>MNS*1</i>		21	56
	<i>MNS*2</i>		21	58
	<i>MNS*3</i>	ATA GGA GAA ATG GGA CAA CT T-C ₆ -NH ₂	21	58
	<i>MNS*4</i>	TAT AGG AGA AAC GGG ACA ACT TG-C ₆ -NH ₂	23	66

Matriçage sur le support

Les solutions de dépôt sont préparées en diluant les oligonucléotides sondes dans un tampon PBS (0,1 mol.l⁻¹, pH = 7,4). Les concentrations utilisées varient de 10 à 50 µmol.l⁻¹. Le support de dépôt est une microplaque à 96 puits de filtration (Multiscreen HTS-HA, Millipore). Un motif identique est matricé sur chaque fond de puits, sur la face externe de la membrane scellée.

Les solutions sont matricées sur le support par dépôt non-contact (volume déposé par plot : de 1 à 4 nl ; distance entre les plots $\sim 500 \mu\text{m}$). En plus des sondes spécifiques déposées en plusieurs répliques, un ensemble de plots de contrôle (négatif et positif) est également matricé sur la surface. La Figure 5-18 présente un plan de dépôt typique, répété dans chaque puits. La plaque fonctionnalisée avec les sondes sera nommée « plaque HiFi-Blood 96TM ».

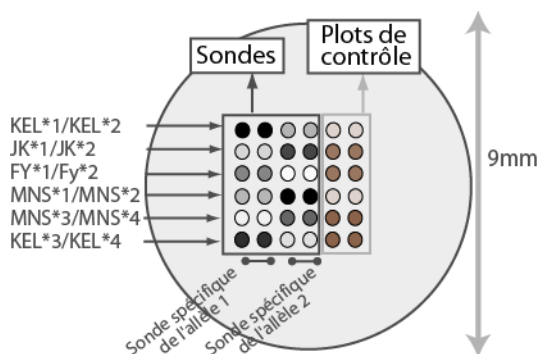


Figure 5-18 Plan de dépôt des sondes de génotypage érythrocytaire utilisé pour la validation à moyenne échelle

La fabrication des plaques utilisées pour la validation à moyenne échelle a été sous-traitée par Scienion (Allemagne), et réalisée également à l'aide d'un système de dépôt non-contact.

Test d'hybridation automatisé

Les tests d'hybridation haut-débit sont effectués suivant un protocole automatisé sur l'automate EVO 75 (Tecan) décrit précédemment (Cf. paragraphe 2.6.1). Les échantillons à analyser sont au préalable amplifiés par PCR MPX en utilisant un format de plaque à 96 puits. La plaque d'échantillons est transférée directement sur l'automate (sans purification) pour la phase d'hybridation sur la plaque HiFi-Blood 96TM (60 min pour 96 échantillons).

Chaque membrane est lavée avec 400 μl /puits de PBS (0,1 mol.l⁻¹, pH= 7,4) puis saturée 10 minutes à température ambiante avec 200 μl de PBSTA (PBS, Tween 20® 0,1% (v/v), BSA 1% (m/v)). Pendant ce temps, les échantillons sont dilués d'un facteur 5 dans une solution de streptavidine-phosphatase alcaline à 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ dans PBSTA et pré-incubés 10 minutes à 50°C. Les échantillons sont ensuite transférés sur la plaque HiFi-Blood 96TM et incubés 10 minutes à 50°C sur la membrane (hybridation et marquage). La membrane est rincée avec 400 μl de tampon Véronal (0,1 mol.l⁻¹, pH 8,5) puis 200 μl de solution de BCIP/NBT prête à l'emploi sont ajoutés dans chaque puits afin de générer le signal colorimétrique sur les plots positifs (~15 minutes à température ambiante).

Une image des membranes (fond de plaques) acquise grâce à un scanner de bureau permet la quantification et l'analyse des signaux colorimétriques.

Conclusion et perspectives

Outil d'analyse multiparamétrique haut-débit par détection colorimétrique

Les travaux menés dans cette thèse ont conduit à la mise au point d'un support d'analyse multiparamétrique haut-débit pour la réalisation de tests sur acides nucléiques et d'immunotests colorimétriques (*HiFi-assays*). Cette technologie a fait l'objet d'un dépôt de brevet.

L'outil développé se présente sous la forme d'une microplaque de filtration à 96 puits de dimension standard, chacun des puits permettant l'analyse multiparamétrique d'un échantillon. Ce format compatible avec les chaînes robotiques standard a permis l'automatisation du test donnant ainsi accès à un haut-débit d'analyse. Le fond de chaque puits est constitué d'une membrane poreuse (Multiscreen HTS-HA, Millipore®) à travers laquelle les échantillons peuvent être filtrés. En outre, celle-ci joue ici le rôle de support pour l'immobilisation d'une matrice de biomolécules sondes de basse densité (50 plots). La porosité du substrat permet une immobilisation en trois dimensions des sondes dans la membrane, ce qui génère une importante densité de sondes dans les plots et par conséquent une sensibilité accrue de la détection.

Ce type de plaque permet d'éliminer par filtration les échantillons et réactifs déposés dans les puits, créant une circulation unidirectionnelle des flux de réactifs qui minimise les contaminations. De plus, l'aspiration des échantillons à travers la membrane permet de faire passer la totalité d'un échantillon faiblement concentré en cible sur la matrice de sondes et donc d'améliorer la sensibilité de la détection. Une application de l'analyse d'échantillons de grand volume faiblement concentrés serait par exemple la détection de polluants en faible quantité pour le contrôle de la qualité de l'eau.

L'originalité de la méthode consiste en l'immobilisation des biomolécules sondes sur la face externe de la membrane scellée en fond de puits. L'application d'un vide permet de faire pénétrer les échantillons déposés dans les puits à l'intérieur de la membrane et d'amener les cibles au contact des sondes immobilisées sur la face externe. D'une part, cette technique de fabrication rend le matriçage des sondes et la lecture du signal plus aisés. D'autre part, une grande partie des contaminants reste piégée à l'intérieur du puits, ce qui entraîne une forte diminution du bruit de fond sur la face externe, résultat particulièrement appréciable dans le cas d'immunotests sur un sérum complexe.

Enfin, le support poreux s'est révélé particulièrement avantageux pour la détection par colorimétrie. Celle-ci repose sur le marquage des plots positifs par l'enzyme phosphatase alcaline, qui génère un produit coloré, en catalysant la dégradation du BCIP/NBT. Lorsque le produit coloré précipite, il est piégé dans le support poreux, ce qui permet d'obtenir des signaux plus intenses. Des gammes de détection dynamiques supérieures à deux décades ont pu être obtenues, résultat très satisfaisant dans le cas d'une détection colorimétrique.

Cet outil d'analyse haut-débit a été utilisé à la fois pour la mise en œuvre de tests d'hybridation et d'immunotests. L'étude de systèmes modèles a permis de démontrer qu'oligonucléotides et protéines pouvaient être immobilisés efficacement sur la membrane avec

une reproductibilité élevée (coefficient de variation ~5 %) et que la quantité de sondes sur le support pouvait être contrôlée. A priori, l'immobilisation des biomolécules sur la membrane repose sur des interactions faibles.

Deux applications particulières ont été étudiées : le génotypage érythrocytaire sur puce à oligonucléotides et le diagnostic allergique sur puce à protéines. Cette technologie est cependant adaptable à de nombreuses autres applications. Pour les tests d'hybridation on peut notamment envisager de la mettre en oeuvre pour la détection d'agents pathogènes et pour toute autre application de génotypage. Dans le cas des immunotests, nous avons déjà évoqué la détection d'auto-anticorps dirigés contre des marqueurs du cancer, mais elle pourrait également être appliquée à la détection d'infections virales.

En outre, un ensemble d'anticorps a également été immobilisé sur la membrane, notamment pour la mise en oeuvre d'un test sandwich. Cet essai monoparamétrique a démontré la possibilité d'utiliser un anticorps immobilisé pour la détection de protéines par colorimétrie sur la membrane. Le passage à un test multiparamétrique nécessiterait cependant de nombreuses optimisations du fait des multiples interactions croisées pouvant survenir entre les différents anticorps.

Outil de génotypage érythrocytaire étendu haut-débit (test HiFi-Blood 96™)

Le génotypage érythrocytaire étendu a fait l'objet d'une étude approfondie. Un panel de 12 sondes a été immobilisé sur la membrane afin de permettre l'analyse de six polymorphismes d'un nucléotide (SNP) associés à 12 antigènes érythrocytaires cliniquement importants.

L'outil de génotypage étendu a été validé sur un panel de 293 donneurs en comparant les résultats de génotypage aux phénotypes obtenus par sérologie. Pour cinq polymorphismes sur six, les deux résultats furent en accord dans plus de 97 % des cas. Ces performances restent en-deçà de celles rapportées dans la littérature pour deux outils de génotypage érythrocytaire en voie d'industrialisation : HEA BeadChip™ (99,5% pour 2000 donneurs) et BloodChip® (99,9% pour 3000 donneurs). Cependant ces deux produits sont à un stade de développement nettement plus avancé que le test HiFi-Blood 96™ qui reste très prometteur à ce stade, d'autant plus que cet outil apporte une solution concurrentielle d'un point de vue économique.

Cette première validation réalisée à moyenne échelle a toutefois mis en évidence quelques lacunes de l'outil actuel. Tout d'abord, une performance insuffisante de l'analyse du polymorphisme associé aux antigènes MNS1 et MNS2 est à déplorer. Les intensités des signaux observés sont faibles ce qui induit un pourcentage d'erreur élevé lors de la quantification des intensités associées à ces deux sondes et résulte donc en une faible fiabilité du *score* calculé. Il est fort probable qu'un défaut de la PCR multiplexe soit à l'origine de cette faible réponse. Il sera nécessaire d'améliorer cette étape particulièrement délicate.

Par ailleurs, le panel de sondes utilisé pour l'analyse des antigènes FY1 et FY2 est apparu insuffisant. En effet, il est nécessaire d'inclure des sondes spécifiques des allèles rares *FY*X* et *FY*FY* à l'origine d'une expression faible ou silencieuse de l'antigène FY2. Deux couples de sondes ont d'ores et déjà été développés et soumis à une série de tests préliminaires sur des

échantillons porteurs des allèles *FY*X* et *FY*FY*. Les mutations correspondantes ont été détectées avec succès et ces quatre sondes seront intégrées à la matrice.

A court terme, des sondes spécifiques des antigènes RHC et RHE doivent également être mises au point. En ce qui concerne l'intégration de sondes spécifiques d'autres polymorphismes, notre objectif n'est pas l'intégration d'un large panel de sondes qui serait le plus exhaustif possible afin de couvrir un maximum de polymorphismes identifiés (comme cela a été fait notamment sur la plateforme BloodChip® qui analyse 128 SNP), mais plutôt de définir un ensemble limité d'antigènes associés à des anticorps cliniquement importants pour le groupe ethnique majoritairement étudié, à savoir le type caucasien en France. D'une part, la densité de plots limitée sur la surface restreint en effet le nombre de SNP qu'il est possible d'analyser par puits. D'autre part, l'analyse d'un nombre très élevé de paramètres entraînerait un surcoût important, et celui-ci ne pourrait être pris en charge par les banques du sang dans le cas d'un criblage à grande échelle. Par ailleurs, un avantage de cette technique est que la matrice de sondes immobilisées est facilement modifiable : le panel de sondes peut donc être facilement adapté aux spécificités du groupe ethnique étudié.

Enfin l'outil HiFi-Blood 96™ profite du support d'une jeune entreprise créée autour de cette technologie, AXO Science, et de la mise en place d'un projet financé par l'Agence Nationale pour la Recherche autour de ce sujet. Dans ce cadre, une étude à grande échelle va être mise en place, permettant l'élaboration des nouvelles sondes et l'amélioration du panel de références utilisé pour la détermination du génotypage. Cette étude vise également à obtenir la certification européenne pour la plaque de génotypage HiFi-Blood 96™. Pour cette étude, l'ensemble du test (extraction, génotypage et hybridation) sera automatisé. Par ailleurs, un logiciel d'analyse des signaux colorimétriques dédié au génotypage érythrocytaire est en cours de développement.

Supports d'immobilisation innovants pour tests colorimétriques

La deuxième partie des travaux s'est intéressée au développement de supports innovants pour l'immobilisation de biomolécules (principalement des oligonucléotides) pour la mise en œuvre de tests colorimétriques.

Dans un premier temps, les performances de tests d'hybridation haut-débit obtenues sur la membrane ont été comparées à deux autres matériaux. Le premier matériau considéré est une surface de polystyrène, support standard pour l'immobilisation de biomolécules pour les tests ELISA. Les résultats obtenus sur la surface de polystyrène brute furent médiocres. L'activation de la surface par des fonctionnalités aldéhyde a permis d'augmenter la densité de sondes sur la surface, mais les performances d'analyse sont restées bien en-deçà de celles atteintes avec la membrane.

Le deuxième matériau étudié fut un adhésif double-face. Si les signaux colorimétriques restent moins intenses que sur la membrane, ils dépassent largement ceux obtenus sur le polystyrène activé. Cependant, il a été montré que la densité de sondes sur le support adhésif était faible. La bonne sensibilité des tests colorimétriques peut s'expliquer par le fait que la couche d'adhésif,

poreuse, permet de retenir le précipité coloré qui se forme, ce qui n'est pas le cas des surfaces planes de polystyrène. Par ailleurs, les plots formés sur la surface d'adhésif ont des diamètres inférieurs à ceux obtenus sur la membrane ce qui permet d'atteindre des densités de plots plus élevées sur la surface sensible. En outre, les propriétés adhésives de ce support sont très intéressantes pour son intégration dans des systèmes miniaturisés.

Dans un second temps, un polymère particulier, le PolyShrinkTM, a été évalué comme support pour l'immobilisation d'oligonucléotides. Ce polymère à base de polystyrène a comme propriété de se réduire en taille de manière isotropique sous l'effet de la chaleur. Il offre ainsi une voie intéressante pour la fabrication de systèmes miniaturisés, permettant notamment de décroître la taille des plots de sondes formés à sa surface. L'immobilisation d'oligonucléotides sur la surface de PolyShrinkTM brute est apparue médiocre. Afin de la promouvoir, une stratégie d'immobilisation des biomolécules dans des plots d'hydrogels a été mise au point. Les oligonucléotides sont capturés *in situ* par couplage covalent, lors de la polymérisation du plot de gel. La réduction isotropique du support sous l'effet de la chaleur permet d'obtenir des plots de diamètre réduit (60 μm) mais d'une hauteur accrue (6 μm). Il a été démontré par des études en chimiluminescence et en colorimétrie, que les oligonucléotides ainsi greffés dans les plots restaient accessibles pour l'hybridation et permettaient la détection quantitative et spécifique d'une cible dans un échantillon. Une étude plus poussée reste toutefois nécessaire, notamment afin de déterminer avec précision la limite de détection du système.

Après la mise au point des conditions expérimentales sur un couple d'oligonucléotides sonde/cible modèle, les performances analytiques de ce système seront évaluées sur un échantillon réel, avec à terme pour objectif l'intégration d'une telle matrice dans un système miniaturisé.

Liste des publications associées à ces travaux de thèse

Publications

Robust, high-throughput solution for blood group genotyping.

Le Goff G., Brès J-C., Rigal D., Blum L., Marquette C. **2010**, *Anal. Chem.* (82), 6185-6192.

Multipurpose high-throughput filtering microarrays (HiFi) for DNA and protein assays.

Le Goff G., Desmet C., Brès J-C., Rigal D., Blum L., Marquette C. **2010**, *Biosens.Bioelec.* (26), 1142-1151.

Enhanced colorimetric detection on porous microarrays using *in-situ* substrate production.

Le Goff G., Blum L., Marquette C. **2011**, *Anal. Chem.*, 83 (9), 3610–3615

Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies.

Desmet C., Le Goff G., Brès J-C., Rigal D., Blum L. and Marquette C. **2011**, *Analyst*, accepté (cover)

Surface architectures for colorimetric microarrays.

Le Goff G., Corgier B., Mandon C., De Crozals G., Chaix C., Blum L., Marquette C. **2011**, soumis.

Adhesive microarrays for self-assembled multipurpose diagnostic tools.

Corgier B., Le Goff G., Mandon C., Blum L., Marquette C. **2011**, *Lab on Chip*, in press, DOI: 10.1039/C1LC20246D.

Brevets

A membrane based microarray device for high-throughput multianalyte detection.

Brevet N° FR09356049.8 et US61/2270 666), Numéro de publication international WO 2011/009893 A1.

Nouvelles surfaces adhésives pour l'immobilisation de ligands.

Demande de dépôt de brevet : N° FR11 50308 et BR069967/NJO/CCU.

Références

Albrecht H.O., Über die Chemiluminescenz des Aminophthalsäurehydrazides. *Zeitschrift für Physikalische Chemie- international journal of research in physical chemistry & chemical physics*, **1928**, 136, p.321-330

Alexandre I. *et al.*, Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, **2001**, 295 (1), p.1-8

Andersson O. *et al.*, Gradient Hydrogel Matrix for Microarray and Biosensor Applications: An Imaging SPR Study. *Biomacromolecules*, **2009**, 10 (1), p.142-148

Angenendt P. *et al.*, Toward optimized antibody microarrays: a comparison of current microarray support materials. *Analytical Biochemistry*, **2002**, 309 (2), p.253-260

Anstee D.J., Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood*, **2009**, 114 (2), p.248-256

Avent N.D., Large-scale blood group genotyping – clinical implications. *British Journal of Haematology*, **2009a**, 144 (1), p.3-13

Avent N.D. *et al.*, The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion*, **2007**, 47 (1 Suppl), p.40S-6S

Avent N.D., Large-scale blood group genotyping - clinical implications. *British Journal of Haematology*, **2009b**, 144 (1), p.3-13

Avent N.D. *et al.*, The Bloodgen Project of the European Union, 2003-2009. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.162-167

Aveyard J. *et al.*, One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. *Chemical Communications*, **2007**, (41), p.4251-4253

Bally M. *et al.*, Optical microarray biosensing techniques. *Surface and Interface Analysis*, **2006**, 38 (11), p.1442-1458

Bañuls M.-J. *et al.*, Chemical Derivatization of Compact Disc Polycarbonate Surfaces for SNP detection. *Bioconjugate Chemistry*, **2008**, 19 (3), p.665-672

Becker H. et Gärtner C., Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, 390 (1), p.89-111

Becker H. et Locascio L.E., Polymer microfluidic devices. *Talanta*, **2002**, 56 (2), p.267-287

Beebe D.J. *et al.*, Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, **2000**, 404 (6778), p.588-+

Beiboer S.H.W. *et al.*, Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*, **2005**, 45 (5), p.667-679

Bell P.A. *et al.*, SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *BioTechniques*, **2002**, Suppl, p.70-72, 74, 76-77

Bernard A. *et al.*, Microcontact Printing of Proteins. *Advanced Materials*, **2000**, 12 (14), p.1067-1070

Biophoenix, *Advances in the use of biomarkers in biochip and microarray testing - Innovative technologies, growth opportunities and the future market outlook*,

Blum L.J., *Bio- and chemi-luminescent sensors*, World Scientific. **1997**

- Brandstetter T. *et al.*, A polymer-based DNA biochip platform for human papilloma virus genotyping. *Journal Of Virological Methods*, **2010**, 163 (1), p.40-48
- Caelen I., Gao H. et Sigrist H., Protein density gradients on surfaces. *Langmuir*, **2002**, 18 (7), p.2463-2467
- Campàs M., DNA biochip arraying, detection and amplification strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2004**, 23 (1), p.49-62
- Campo A. et Bruce I.J., Substrate Patterning and Activation Strategies for DNA Chip Fabrication. Dans *Immobilisation of DNA on Chips I* (Éd.: C. Wittmann). Topics in Current Chemistry. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2005**, p. 77-111.
- Carter D.J. et Cary R.B., Lateral flow microarrays: a novel platform for rapid nucleic acid detection based on miniaturized lateral flow chromatography. *Nucleic Acids Research*, **2007**, 35 (10)
- Castilho L., The value of DNA analysis for antigens in the Duffy blood group system. *Transfusion*, **2007**, 47 (s1), p.28S-31S
- Castilho L. *et al.*, DNA-based typing of blood groups for the management of multiply-transfused sickle cell disease patients. *Transfusion*, **2002**, 42 (2), p.232-238
- Chen C.-S. *et al.*, Shrinky-Dink microfluidics: 3D polystyrene chips. *Lab on a Chip*, **2008**, 8 (4), p.622
- Chen L. *et al.*, Gel-pad microarrays templated by patterned porous silicon for dual-mode detection of proteins. *Lab on a Chip*, **2009**, 9 (6), p.756
- Cheng C.-M. *et al.*, Paper-Based ELISA. *Angewandte Chemie International Edition*, **2010**, 49 (28), p.4771-4774
- Clark L.C. Jr et Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1962**, 102, p.29-45
- Cretich M. *et al.*, Coating of nitrocellulose for colorimetric DNA microarrays. *Analytical Biochemistry*, **2010**, 397 (1), p.84-88
- Di Cristofaro J. *et al.*, Single PCR multiplex SNaPshot reaction for detection of eleven blood group nucleotide polymorphisms: optimization, validation, and one year of routine clinical use. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, **2010**, 12 (4), p.453-460
- Csaki A. *et al.*, The optical detection of individual DNA-conjugated gold nanoparticle labels after metal enhancement. *Nanotechnology*, **2003**, 14 (12), p.1262-1268
- Daniels G. et Reid M.E., Blood groups: the past 50 years. *Transfusion*, **2010**, 50 (2), p.281-289
- Daniels G.L., *Human Blood Groups* 2^e éd., Blackwell Publishing, Oxford.
- Daniels G.L., The molecular genetics of blood group polymorphism. *Human Genetics*, **2009**, 126 (6), p.729-742
- Daniels G.L. et Bromilow I., *Essential Guide to Human Blood groups*, Blackwell Publishing.
- Dankbar D.M. et Gauglitz G., A study on photolinkers used for biomolecule attachment to polymer surfaces. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 386 (7-8), p.1967-1974
- Deegan R.D. *et al.*, Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature*, **1997**, 389 (6653), p.827-829

- Denomme G.A. et Van Oene M., High-throughput multiplex single-nucleotide polymorphism analysis for red cell and platelet antigen genotypes. *Transfusion*, **2005**, 45 (5), p.660-666
- Denomme G.A., Single base extension in multiplex blood group genotyping. *Methods in Molecular Biology*, **2009**, 496, p.15-24
- Denomme G.A. et Flegel W.A., Applying molecular immunohematology discoveries to standards of practice in blood banks: now is the time. *Transfusion*, **2008**, 48 (11), p.2461-2475
- van Der Schoot C.E. *et al.*, Genotyping for red blood cell polymorphisms. *Vox Sanguinis*, **2009**, 96 (2), p.167-179
- van Der Schoot E., Veldhuisen B. et De Haas M., Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? -Opinion 5. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.234-235
- Diaz-Quijada G.A. *et al.*, Surface modification of thermoplastics? towards the plastic biochip for high throughput screening devices. *Lab on a Chip*, **2007**, 7 (7), p.856
- Dineva M.A. *et al.*, Simultaneous visual detection of multiple viral amplicons by dipstick assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **2005**, 43 (8), p.4015-4021
- Drago F., Karpasitou K. et Poli F., Microarray Beads for Identifying Blood Group Single Nucleotide Polymorphisms. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.157-160
- Dufva M., Fabrication of high quality microarrays. *Biomolecular Engineering*, **2005**, 22 (5-6), p.173-184
- Epstein J., Biran I. et Walt D., Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 469 (1), p.3-36
- Focke M. *et al.*, Lab-on-a-Foil: microfluidics on thin and flexible films. *Lab on a Chip*, **2010**, 10 (11), p.1365
- Fodor S. *et al.*, Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, **1991**, 251 (4995), p.767-773
- Fuentes M. *et al.*, Directed Covalent Immobilization of Aminated DNA Probes on Aminated Plates. *Biomacromolecules*, **2004**, 5 (3), p.883-888
- Glynou K. *et al.*, Oligonucleotide-Functionalized Gold Nanoparticles as Probes in a Dry-Reagent Strip Biosensor for DNA Analysis by Hybridization. *Analytical Chemistry*, **2003**, 75 (16), p.4155-4160
- Grasso V. *et al.*, Nanostructuring of a porous alumina matrix for a biomolecular microarray. *Nanotechnology*, **2006**, 17 (3), p.795-798
- Grimes A. *et al.*, Shrinky-Dink microfluidics: rapid generation of deep and rounded patterns. *Lab on a Chip*, **2008**, 8 (1), p.170
- Guelsin G.A.S. *et al.*, Benefits of blood group genotyping in multi-transfused patients from the south of Brazil. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, **2010**, 24 (5), p.311-316
- Halliwell C.M. et Cass A.E.G., A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces. *Analytical Chemistry*, **2001**, 73 (11), p.2476-2483
- Han A. *et al.*, Detection of analyte binding to microarrays using gold nanoparticle labels and a desktop scanner. *Lab on a Chip*, **2003**, 3 (4), p.329-332

- Hashmi G. *et al.*, A flexible array format for large-scale, rapid blood group DNA typing. *Transfusion*, **2005**, 45 (5), p.680-688
- Hashmi G. *et al.*, Determination of 24 minor red blood cell antigens for more than 2000 blood donors by high-throughput DNA analysis. *Transfusion*, **2007**, 47 (4), p.736-747
- Heyries K.A. *et al.*, Microfluidic biochip for chemiluminescent detection of allergen-specific antibodies. *Biosensors and Bioelectronics*, **2008**, 23 (12), p.1812-1818
- Heyries K.A., Marquette C.A. et Blum L.J., Straightforward Protein Immobilization on Sylgard 184 PDMS Microarray Surface. *Langmuir*, **2007**, 23 (8), p.4523-4527
- Hillyer C.D. *et al.*, Integrating Molecular Technologies for Red Blood Cell Typing and Compatibility Testing Into Blood Centers and Transfusion Services. *Transfusion Medicine Reviews*, **2008**, 22 (2), p.117-132
- Hook A.L., Voelcker N.H. et Thissen H., Patterned and switchable surfaces for biomolecular manipulation. *Acta Biomaterialia*, **2009**, 5 (7), p.2350-2370
- Huang R., Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system. *Journal of Immunological Methods*, **2001**, 255 (1-2), p.1-13
- Hustinx H. *et al.*, Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? - Opinion 2. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.228-229
- Hypolite C.L. *et al.*, Formation of microscale gradients of protein using heterobifunctional photolinkers. *Bioconjugate Chemistry*, **1997**, 8 (5), p.658-663
- Jonkheijm P. *et al.*, Chemical Strategies for Generating Protein Biochips. *Angewandte Chemie International Edition*, **2008**, 47 (50), p.9618-9647
- Kang M. *et al.*, Protein Capture in Silica Nanotube Membrane 3-D Microwell Arrays. *Analytical Chemistry*, **2005**, 77 (19), p.6243-6249
- Kappler-Gratias S. *et al.*, Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis: Application to the French panel of RBC reagents. *Transfusion Clinique et Biologique*, **2010**, 17 (3), p.165-167
- Kappler-Gratias S. *et al.*, Blood group genotyping by high-throughput DNA analysis applied to 356 reagent red blood cell samples. *Transfusion*, **2011**, 51 (1), p.36-42
- Karapitou K. *et al.*, Blood group genotyping for Jka/Jkb, Fya/Fyb, S/s, K/k, Kpa/Kpb, Jsa/Jsb, Coa/Cob, and Lua/Lub with microarray beads. *Transfusion*, **2008**, 48 (3), p.505-512
- Kim D.N., Lee W. et Koh W.G., Preparation of protein microarrays on non-fouling and hydrated poly(ethylene glycol) hydrogel substrates using photochemical surface modification. *Journal of Chemical Technological Biotechnol.*, **2009**, 84 (2), p.279-284
- Klapper E. *et al.*, Toward extended phenotype matching: a new operational paradigm for the transfusion service. *Transfusion*, **2010**, 50 (3), p.536-546
- Koch T. *et al.*, Photochemical immobilization of anthraquinone conjugated oligonucleotides and PCR amplicons on solid surfaces. *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, 11 (4), p.474-483
- Kopecek J., Hydrogel biomaterials: A smart future? *Biomaterials*, **2007**, 28 (34), p.5185-5192
- Kuckling D., Responsive hydrogel layers-from synthesis to applications. *Colloid Polymer Science*, **2009**, 287 (8), p.881-891

- Kuckling D. et Pareek P., Bilayer hydrogel assembly. *Polymer*, **2008**, 49 (6), p.1435-1439
- Kumar A. *et al.*, Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. *Progress in Polymer Science*, **2007**, 32 (10), p.1205-1237
- Kusnezow W. et Hoheisel J.D., Solid supports for microarray immunoassays. *Journal of Molecular Recognition*, **2003**, 16 (4), p.165-176
- Landsteiner K., Agglutination phenomena un normal human blood. *Wien Klin. Wochenschr.*, **1901**, 14, p.1132-1134
- Lange S.A. *et al.*, Microcontact Printing of DNA Molecules. *Analytical Chemistry*, **2004**, 76 (6), p.1641-1647
- Langer R. et Peppas N.A., Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology. *AIChE Journal*, **2003**, 49 (12), p.2990-3006
- Lapierre Y. *et al.*, The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*, **1990**, 30 (2), p.109-113
- Liang R.-Q., Tan C.-Y. et Ruan K.-C., Colorimetric detection of protein microarrays based on nanogold probe coupled with silver enhancement. *Journal of Immunological Methods*, **2004**, 285 (2), p.157-163
- van Lieshout R.M.L. *et al.*, Three-Dimensional Flow-Through Protein Platform. *Analytical Chemistry*, **2009**, 81 (13), p.5165-5171
- Litos I.K. *et al.*, Multianalyte, dipstick-type, nanoparticle-based DNA biosensor for visual genotyping of single-nucleotide polymorphisms. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24 (10), p.3135-3139
- Liu X.H. *et al.*, Photopatterning of antibodies on biosensors. *Bioconjugate Chemistry*, **2000**, 11 (6), p.755-761
- Luderer F. et Walschus U., Immobilization of Oligonucleotides for Biochemical Sensing by Self-Assembled Monolayers: Thiol-Organic Bonding on Gold and Silanization on Silica Surfaces. Dans *Immobilisation of DNA on Chips I* (Éd.: C. Wittmann). Topics in Current Chemistry. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2005**, p. 37-56.
- MacBeath G., Protein microarrays and proteomics. *Nature Genetics*, **2002**, 32 (Supp), p.526-532
- MacBeath G. et Schreiber S.L., Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science*, **2000**, 289 (5485), p.1760 -1763
- Mader A. *et al.*, Microarray-based amplification and detection of RNA by nucleic acid sequence based amplification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 397 (8), p.3533-3541
- Mandon C.A. *et al.*, Polyshrink(TM) based microfluidic chips and protein microarrays. *Biosensors and Bioelectronics*, **2010**, 26 (4), p.1218-1224
- Mao X., Ma Y., *et al.*, Disposable nucleic acid biosensors based on gold nanoparticle probes and lateral flow strip. *Analytical Chemistry*, **2009**, 81 (4), p.1660-8
- Mao X., Xu H., *et al.*, Molecular beacon-functionalized gold nanoparticles as probes in dry-reagent strip biosensor for DNA analysis. *Chemical Communications*, **2009**, (21), p.3065-3067
- Marcon L. *et al.*, Photochemical Immobilization of Proteins and Peptides on Benzophenone-Terminated Boron-Doped Diamond Surfaces. *Langmuir*, **2010**, 26 (2), p.1075-1080

- Marin V.L. *et al.*, Functional Assays of Membrane-Bound Proteins with SAMDI-TOF Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie International Edition*, **2007**, 46 (46), p.8796-8798
- Mark D. *et al.*, Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications. *Chemical Society Reviews*, **2010**, 39 (3), p.1153-1182
- Marquette C. A., Biochips: non-conventional strategies for biosensing elements immobilization. *Frontiers in Bioscience*, **2008**, 13 (13), p.382
- Marquette C.A. et Blum L.J., Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2006**, 385 (3), p.546-554
- Marquette C.A. et Blum L.J., Beads arraying and beads used in DNA chips. Dans *Immobilisation of DNA on Chips II* Topics in Current Chemistry. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2005**, p. 113-129.
- Marquette C.A. et Blum L.J., Direct immobilization in poly(dimethylsiloxane) for DNA, protein and enzyme fluidic biochips. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 506 (2), p.127-132
- Marquette C.A. *et al.*, Disposable screen-printed chemiluminescent biochips for the simultaneous determination of four point-of-care relevant proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 393 (4), p.1191-1198
- Matsudaira T. *et al.*, Automated Microfluidic Assay System for Autoantibodies Found in Autoimmune Diseases Using a Photoimmobilized Autoantigen Microarray. *Biotechnology Progress*, **2008**, 24 (6), p.1384-1392
- Mocanu D. *et al.*, Quantitative analysis of DNA hybridization in a flowthrough microarray for molecular testing. *Analytical Biochemistry*, **2008**, 380 (1), p.84-90
- Monteiro F. *et al.*, Technologies involved in molecular blood group genotyping. *ISBT Science Series*, **2011**, 6 (1), p.1-6
- Montpetit A. *et al.*, High-throughput molecular profiling of blood donors for minor red blood cell and platelet antigens. *Transfusion*, **2006**, 46 (5), p.841-848
- Nahar P., Wali N.M. et Gandhi R.P., Light-induced activation of an inert surface for covalent immobilization of a protein ligand. *Analytical Biochemistry*, **2001**, 294 (2), p.148-153
- Neumann T. *et al.*, Temperature and Time-Resolved Total Internal Reflectance Fluorescence Analysis of Reusable DNA Hydrogel Chips. *Analytical Chemistry*, **2010**, 82 (14), p.6124-6131
- Ngom B. *et al.*, Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**, 397 (3), p.1113-1135
- Nguyen D. *et al.*, Better shrinkage than Shrinky-Dinks. *Lab on a Chip*, **2010**, 10 (12), p.1623
- Niemeyer C.M., Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie-International Edition*, **2001**, 40 (22), p.4128-4158
- Oh J.K. *et al.*, The development of microgels/nanogels for drug delivery applications. *Progress in Polymer Science*, **2008**, 33 (4), p.448-477
- Olsen K., Ross D. et Tarlov M., Immobilization of DNA hydrogel plugs in microfluidic channels. *Analytical Chemistry*, **2002**, 74 (6), p.1436-1441

- Olsson M.L. *et al.*, The Fyx phenotype is associated with a missense mutation in the Fyb allele predicting Arg89Cys in the Duffy glycoprotein. *British Journal of Haematology*, **1998**, 103 (4), p.1184-1191
- Palacajornsuk P. *et al.*, Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method. *Transfusion*, **2009**, 49 (4), p.740-749
- Pan Z.Q. *et al.*, Fabrication of 3-D gel microarrays directly with raw polymerase chain reaction products by heat-directed polymerization. *Electrophoresis*, **2008**, 29 (11), p.2424-2436
- Pandey A. et Mann M., Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, **2000**, 405 (6788), p.837-846
- Pasquarelli A., Biochips: Technologies and applications. *Materials Science and Engineering: C*, **2008**, 28 (4), p.495-508
- Peppas N.A. *et al.*, Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials*, **2006**, 18 (11), p.1345-1360
- Perreault J. *et al.*, Set-up and routine use of a database of 10 555 genotyped blood donors to facilitate the screening of compatible blood components for alloimmunized patients. *Vox Sanguinis*, **2009**, 97 (1), p.61-68
- Perrin A., A combined oligonucleotide and protein microarray for the codetection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections. *Analytical Biochemistry*, **2003**, 322 (2), p.148-155
- Petersen J. *et al.*, Detection of mutations in the beta-globin gene by colorimetric staining of DNA microarrays visualized by a flatbed scanner. *Analytical Biochemistry*, **2007**, 360 (1), p.169-171
- Peyrard T. *et al.*, Les phénotypes érythrocytaires rares : un enjeu de santé publique. *Transfusion Clinique et Biologique*, **2008**, 15 (3), p.109-119
- Phizicky E. *et al.*, Protein analysis on a proteomic scale. *Nature*, **2003**, 422 (6928), p.208-215
- Poole J. et Daniels G.L., Blood Group Antibodies and Their Significance in Transfusion Medicine. *Transfusion Medicine Reviews*, **2007**, 21 (1), p.58-71
- Posthuma-Trumpie G.A., Korf J. et Amerongen A., Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**, 393 (2), p.569-582
- Pu Q. *et al.*, On-Chip Micropatterning of Plastic (Cyclic Olefin Copolymer, COC) Microfluidic Channels for the Fabrication of Biomolecule Microarrays Using Photografting Methods. *Langmuir*, **2007**, 23 (3), p.1577-1583
- Reid M.E., Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification. *Transfusion*, **2003**, 43 (12), p.1748-1757
- Reid M.E. *et al.*, DNA from blood samples can be used to genotype patients who have recently received a transfusion. *Transfusion*, **2000**, 40 (1), p.48-53
- Reid M.E. et Lomas-Francis C., *The blood groups antigens factsbook 2^e éd.*, Academic Press, Elsevier, London / San Diego.
- Renberg B. *et al.*, Serial DNA immobilization in micro- and extended nanospace channels. *Lab on a Chip*, **2009**, 9 (11), p.1517-23

- Rivet C. *et al.*, Microfluidics for medical diagnostics and biosensors. *Chemical Engineering Science*, **2011**, 66 (7), p.1490-1507
- Rubina A.Y. *et al.*, Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production. *Analytical Biochemistry*, **2004**, 325 (1), p.92-106
- Schena M. *et al.*, Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, **1995**, 270 (5235), p.467-470
- Schönitzer D., Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? - Opinion 3. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.230-231
- Service R.F., Protein Arrays Step Out of DNA's Shadow. *Science*, **2000**, 289 (5485), p.1673
- Sia S.K. et Whitesides G.M., Microfluidic devices fabricated in Poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, **2003**, 24 (21), p.3563-3576
- Situma C., Hashimoto M. et Soper S.A., Merging microfluidics with microarray-based bioassays. *Biomolecular Engineering*, **2006**, 23 (5), p.213-231
- Smith C.L., Milea J.S. et Nguyen G.H., Immobilization of Nucleic Acids Using Biotin-Strept(avidin) Systems. Dans *Immobilisation of DNA on Chips II* (Éd.: C. Wittmann). Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **2006**, p. 63-90.
- Sollier K. *et al.*, « Print-n-Shrink » technology for the rapid production of microfluidic chips and protein microarrays. *Lab on a Chip*, **2009**, 9 (24), p.3489
- Stillman B.A. et Tonkinson J.L., FAST slides: a novel surface for microarrays. *BioTechniques*, **2000**, 29 (3), p.630-635
- St-Louis M. *et al.*, Génotypage de 21 000 donneurs de sang au Québec et analyse du RHD. *Transfusion Clinique et Biologique*, **2010**, 17 (4), p.242-248
- Storhoff J.J. *et al.*, Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, 19 (8), p.875-883
- Storry J.R. *et al.*, International Society of Blood Transfusion Working Party on red cell immunogenetics and blood group terminology: Berlin report. *Vox Sanguinis*, **2011**, 101 (1), p.77-82
- Storry J.R. et Olsson M.L., Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? – Opinion 4. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.232-233
- Szunerits S. *et al.*, Photografting and patterning of oligonucleotides on benzophenone-modified boron-doped diamond. *Chemical Communications*, **2007**, (27), p.2793-2795
- Tang J. et Xiao P.F., Polymerizing immobilization of acrylamide-modified nucleic acids and its application. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24 (7), p.1817-1824
- Taylor D. *et al.*, Shrink film patterning by craft cutter: complete plastic chips with high resolution/high-aspect ratio channel. *Lab on a Chip*, **2010**, 10 (18), p.2472-2475
- Thaxton C.S., Georganopoulou D.G. et Mirkin C.A., Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. *Clinica Chimica Acta*, **2006**, 363 (1-2), p.120-126
- Thorpe G.H. et Kricka L.J., Enhanced chemiluminescent reactions catalyzed by horseradish peroxidase. *Methods in Enzymology*, **1986**, 133, p.331-353
- Tsougeni K. *et al.*, Plasma Nanotextured PMMA Surfaces for Protein Arrays: Increased Protein

Binding and Enhanced Detection Sensitivity. *Langmuir*, **2010**, 26 (17), p.13883-13891

Veldhuisen B., van der Schoot C.E. et de Haas M., Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening. *Vox Sanguinis*, **2009**, 97 (3), p.198-206

Wacker R., Schröder H. et Niemeyer C.M., Performance of antibody microarrays fabricated by either DNA-directed immobilization, direct spotting, or streptavidin–biotin attachment: a comparative study. *Analytical Biochemistry*, **2004**, 330 (2), p.281-287

Wagner F.F., Will Genotyping Replace Serology in Future Routine Blood Grouping? – Opinion 1. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, **2009**, 36 (3), p.226-227

Weinrich D. *et al.*, Applications of Protein Biochips in Biomedical and Biotechnological Research. *Angewandte Chemie International Edition*, **2009**, 48 (42), p.7744-7751

Westhoff C.M. et Sloan S.R., Molecular Genotyping in Transfusion Medicine. *Clinical Chemistry*, **2008**, 54 (12), p.1948-1950

Zammatteo N. *et al.*, Comparison between Different Strategies of Covalent Attachment of DNA to Glass Surfaces to Build DNA Microarrays. *Analytical Biochemistry*, **2000**, 280 (1), p.143-150

Zimring J.C. *et al.*, Current problems and future directions of transfusion-induced alloimmunization: summary of an NHLBI working group. *Transfusion*, **2011**, 51 (2), p.435-441

Annexes

Analyst

Interdisciplinary detection science

www.rsc.org/analyst

Volume 136 | Number 14 | 21 July 2011 | Pages 2869–3024

Cyclin B1	-----	22.2%
Cyclin D1	-----	0.0%
Complement factor H	---	5.6%
c-myc	-----	1.1%
NY-ESO-1	-----	6.7%
PSA	-----	0.0%

IMP1	-----	27.8%
Her2/neu	-----	5.6%
p53	-----	33.3%
p62	-----	5.6%
Survivin	-----	5.6%
Koc	-----	0.0%



ISSN 0003-2654

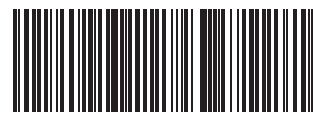
RSC Publishing

PAPER

C. A. Marquette *et al.*
Multiplexed immunoassay for the rapid
detection of anti-tumor-associated
antigens antibodies



International Year of
CHEMISTRY
2011



0003-2654 (2011) 136:14;1-8

Multiplexed immunoassay for the rapid detection of anti-tumor-associated antigens antibodies

C. Desmet,^a G. C. Le Goff,^a J.-C. Brès,^b D. Rigal,^b L. J. Blum^a and C. A. Marquette^{*a}

Received 14th February 2011, Accepted 23rd May 2011

DOI: 10.1039/c1an15121e

TAA (tumor-associated antigens) microarrays were designed to detect auto-antibodies directly in patient sera. Twelve different probes were chosen according to their described occurrence in cancer pathologies (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA). Microarrays of these 12 proteins were immobilized within the nitrocellulose/cellulose acetate membrane of a 96-well filtering microtiter plate bottom. The captured auto-antibodies were detected using a staining approach based on alkaline phosphatase labeling. Thus, the presence of specific auto-antibodies in samples was visualized through the positive staining of the corresponding TAA spots. The TAA HiFi microarrays were shown to be able to capture specific purified anti-TAA antibodies. In real samples, 9 proteins from the 12 TAAs panel were shown to generate specific signal and 5 antigens (p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc) were shown to have interaction with more than 10% of the positive sera from cancer patients. This protein subpanel was proven to be able to detect 72.2% of the cancer patients tested (within a 34 panel of 18 patients and 16 healthy donors).

Introduction

Cancer remains the major public health problem in developed countries, after cardiovascular diseases, with currently 25 million persons concerned worldwide. In a 2008 WHO report, the number of incident cases of cancer was estimated to 12.4 million (6.7 million men and 5.7 million women).¹ Within this large patient population, more than 60% lost their fight against cancer, mainly because of late pathology detection.² Indeed, noninvasive tumor diagnoses are usually performed using imaging techniques, really useful for pathology follow-up, but rarely accurate enough to detect tumors in their early development stage.

In order to cope with this issue, oncologists required innovative and noninvasive early detection methods. In this context, cancer molecular diagnosis based on serum profiling is a particularly attractive concept since a single draw of blood would allow the identification of different cancers. Here, tumor-associated antigens (TAAs) are of great interest because their serological or cellular level variations induce auto-immune responses, early during the tumor development.³ Therefore, the detection of aberrant levels of auto-antibodies against TAAs in serum might provide a powerful early diagnosis tool.⁴

Although the mechanisms leading to auto-antibody production in cancer patients are not completely deciphered, the available data show that most TAAs are proteins whose deregulation could lead to tumorigenesis. The most obvious ones are tumor suppressor gene products (p53⁵ and Her2/neu⁶), or cell cycle control proteins (cyclin B1 or cyclin D1), whose auto-immunity has been reported in cancer patients.⁷ Koc, p62 and IMP-1, three proteins containing similar RNA-binding motifs, were identified as well as TAAs since their mRNAs were over-expressed in cancer cells and specific auto-antibodies were detected in patient sera.^{8,9} Other miscellaneous TAAs were also described such as the anti-apoptotic cellular protein survivin,^{10,11} the oncogene product c-myc,^{12,13} the calcium-dependent cell–cell adhesion glycoprotein P-cadherin,¹⁴ the phosphoglycerate kinase-1,¹⁵ the prostate specific antigen^{16,17} and the differentiation and cancer testis antigen NY-ESO-1.¹⁸

Each of these auto-antibodies can be detected in patients' sera using monoparametric immunoassays such as the traditional ELISA.^{19,20} This classical approach was used to demonstrate the diagnosis benefit of the concept. However, working routinely with single parameter format assays would be highly expensive and time consuming for clinicians since each specific antibody will have to be measured in a separate assay. Furthermore, the number of samples to analyze is constantly increased, generating a real demand for new multiplex and high-throughput assay tools. Recently, our group proposed a cost effective solution to overcome such issues using a multipurpose microarray based platform for multiparametric and high-throughput filtration assays (HiFi-assays) (Fig. 1).²¹ Combining the multiparametric

^aEquipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires, Université Lyon 1—CNRS 5246 ICBMS, Bâtiment CPE—43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; christophe.marquette@axoscience.com

^bEtablissement Français du Sang Rhône-Alpes, Lyon, France

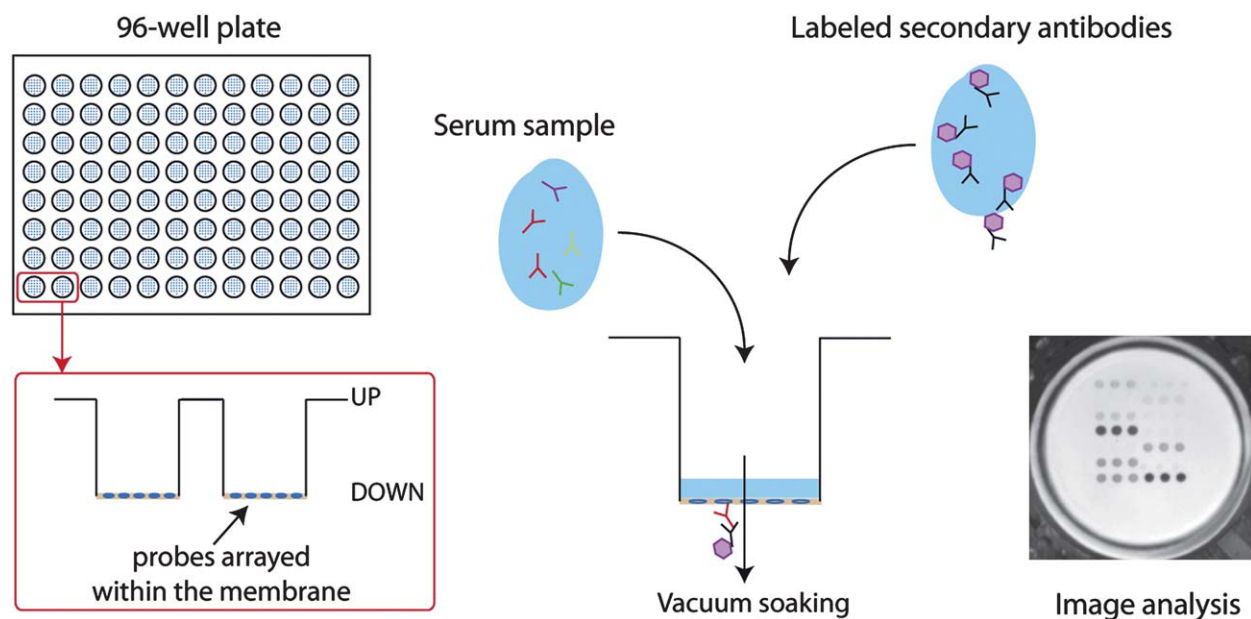


Fig. 1 HiFi-assay design and filtering protocol. The probes are spotted onto the membrane bottom and immobilized within the membrane material (nitrocellulose/cellulose acetate). Inset: a typical flat bed scanner image of the stained positive spots.

performances of microarray technology with a 96-well format standard for robotic, this fully automated diagnostic tool permitted very high-throughput processing of samples in clinical laboratory conditions.

Of course the multiplex membrane such as dot blotting assay or peptide mapping already exists. The innovation is here to produce a diagnosis tool in a complete automated format for the detection of autoantibodies in complex samples. The use of a multiparametric assay presents several advantages for cancer diagnosis, allowing the detection of a panel of auto-antibodies in a single assay format and enabling to reduce not only the assay duration but also the sample and reagent volumes. In the present report, a proof of concept of this approach for the early diagnosis of cancer is presented based on the multiplex detection of auto-antibodies against 12 TAAs (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA). The potential use of the system for cancer detection was demonstrated on a panel of cancer patients. The benefit of combining the detection of five anti-TAA auto-antibodies (p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc) was evidenced by a prediction rate of 72.2%.

Materials and methods

Antigens, antibodies and reagents

Recombinant full length Cyclin B1, Cyclin D1 and p53 were supplied by Santa Cruz Biotechnology (USA). Polyclonal anti-Complement Factor H antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-cyclin B1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-cyclin D1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-c-myc antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-IMP1 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-p62 antibodies developed in rabbit, polyclonal anti-survivin antibodies developed in rabbit, monoclonal anti-Her2/neu antibodies (clone 4B8) developed in mouse, monoclonal anti-NY-ESO-1 antibodies (clone E978)

developed in mouse, monoclonal anti-p53 antibodies (clone DO-7) developed in mouse, bovine serum albumin (BSA) and Complement Factor H (CFH) were obtained from Sigma-Aldrich (France). c-myc, IMP1, p62 and survivin were purchased from Proscience (USA). Recombinant Her2/neu was obtained from Alpha Diagnostic International (USA). IMP3 was supplied by Abnova (Taiwan). Recombinant full length NY-ESO-1 was purchased from Spring Bioscience (USA). Prostate Specific Antigen (PSA) was obtained from EXBIO (Czech Republic).

Alkaline phosphatase-labeled anti-human IgG antibodies developed in goat, alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG antibodies developed in goat and alkaline phosphatase-labeled anti-mouse IgG antibodies developed in goat were supplied by Jackson Immuno-Research (USA).

Antigen microarrays preparation

Multiscreen-HA 96-well plates bottomed with a nitrocellulose/cellulose acetate membrane were purchased from Millipore (USA). Antigens were spotted in phosphate-buffered saline (PBS, 100 mmol L⁻¹, pH 7.4) with addition of 1 mg mL⁻¹ bromophenol blue as a spotting control. 2.4 nL drops of antigen solution were arrayed (AXO Science, <http://www.axoscience.com>), with a 500 μ m spot to spot pitch, on the membrane backside using a noncontact printer (BioChip Arrayer BCA1, Perkin-Elmer, USA). Fifteen different probes were deposited in a 45-spot matrix (Fig. 2) composed of 3 replicates of each TAAs, 3 replicates of positive controls (alkaline phosphatase-labeled anti-rabbit IgG antibody), 3 replicates of labeling controls (human IgG) and 3 replicates of non-specific interaction controls (bovine serum albumin).

Automated filtration assays

Automated filtration assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, France) specially equipped with a plate filtration unit

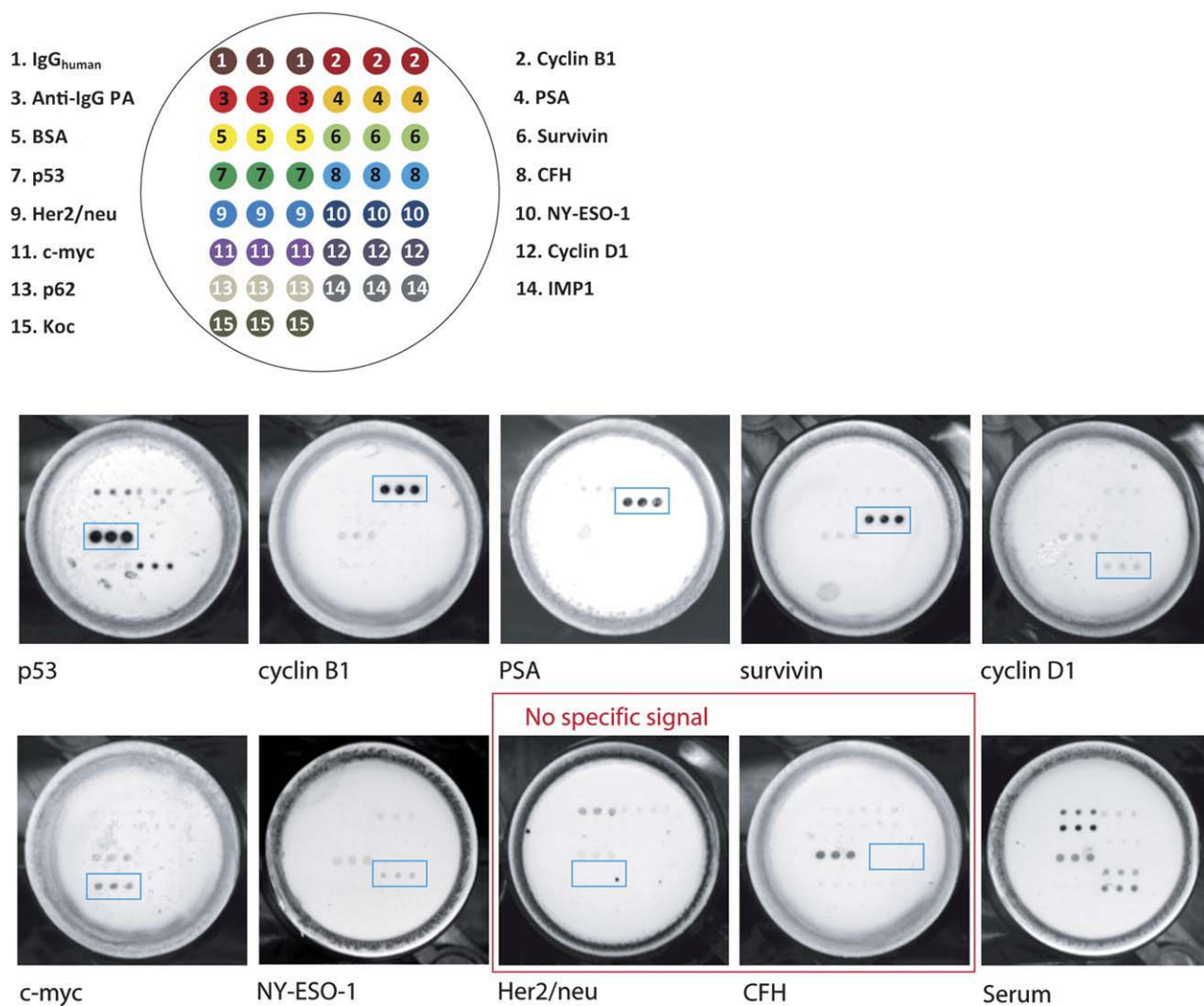


Fig. 2 The HiFi TAA microarray. The TAAs spotting pattern (one 5 mm² array per well, 6 × 8 spots, 12 specific probes and 3 controls) and the flatbed scanner images of 10 membranes incubated with the different purified antibodies or with a cancer patient serum.

and a heater. The vacuum soaking duration was finely controlled in order to generate the most reproducible results. The filtering protocol involved the following steps. Membranes were washed with PBS and saturated with LowCross Buffer (Candor Bioscience, Germany) as a blocking agent to minimize non-specific background signal. Meanwhile, serum samples were pre-incubated in LowCross Buffer on the heater unit at 37 °C for 10 minutes, then transferred to each microwell and incubated on the membrane for interaction during one hour. Alkaline phosphatase labeled anti-human IgG antibodies at a concentration of 0.6 μg mL⁻¹ in LowCross Buffer were subsequently incubated at 37 °C on the membranes for one hour. The membranes were washed with Veronal Buffer Saline (100 mmol L⁻¹, pH 8.5). Finally, 200 μL of a BCIP/NBT ready-to-use solution (Sigma-Aldrich, France) were added in each well for signal generation at room temperature for 20 minutes. The original color of the BCIP/NBT solution was light yellow whereas the product of the enzymatic reaction generates a purple precipitate on positive spots.

The complete protocol duration was 90 minutes, whatever the number of parameter determined.

Data analysis

The microtiter plate bottom was imaged using an ordinary flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in grayscale (from 0 to 65 535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution. Image analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 5.0 software (Axon Instrument). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity of a given TAA was calculated as the mean intensity of all replicates.

Results

The present report describes the proof of concept of a colorimetric multiplex detection of anti-TAA auto-antibodies for the early diagnosis of cancer. In the multiplex immunoassay test proposed here, the membrane bottom of the 96-well microtiter plate plays a double role: on the one hand it enables a filtering

protocol for processing samples and reagents (Fig. 1) and on the other hand it is the immobilization support for protein probes microarrays (one 5 mm² array per well, 6 × 8 spots, 12 specific probes and 3 controls (Fig. 2)). TAA microarrays were designed to detect auto-antibodies directly in patient sera. The different probes were chosen according to their described occurrence in cancer pathologies. Only 12 TAAs were then selected (Cyclin B1, Cyclin D1, Complement factor H, c-myc, IMP1, p53, p62, survivin, Her2/neu, Koc, NY-ESO-1 and PSA) in order to (i) keep the results analysis simple and efficient, and (ii) make the multiplex immunoassay selective enough to differentiate cancer sera from healthy patients. All these proteins were immobilized within the nitrocellulose/cellulose acetate membrane of a 96-well filtering microtiter plate bottom, using non-covalent interactions. Controlling the availability of these immobilized probes for specific interactions, their spotting reproducibility, the assay conditions and the reactivity of the antigen microarrays toward human auto-antibodies is an absolute requirement.

In order to keep the system as simple as possible, the captured auto-antibodies were detected using the highly effective staining approach based on alkaline phosphatase labeling. Thus, the presence of specific auto-antibodies in samples was visualized through the positive staining of the corresponding TAA spots and was quantified using grayscale analysis (from a flatbed scanner image).

Immobilized probes microarray efficiency

In order to evaluate the reactivity of the immobilized TAA probes, series of experiments were performed using purified commercially available antibodies. In this preliminary study, anti-cyclin B1, anti-cyclin D1, anti-complement factor H, anti-c-myc, anti-p53, anti-survivin, anti-Her2/neu, anti-NY-ESO-1 and anti-PSA purified antibodies were tested on TAA microarrays. From the 9 antibody/TAA interactions tested, Her2/neu and CFH were the only ones which did not generate any specific signal (Fig. 2). This lack of reactivity can be explained either by a miss-orientation of the protein probe inside the membrane (no access to the protein epitope) or a partial or complete unfolding of the TAA once immobilized. As it will be demonstrated later on, these two proteins were able to generate specific signal from serum sample (see Table 1). This lack of reactivity toward the purified antibodies might then be more related to a lack of reactivity of the commercial antibodies themselves.

Typical images obtained by scanning the microarrays after the colorimetric staining of the positive spots are presented in Fig. 2. As a matter of fact, the signal-to-noise ratios of the positive spots are high (from 38.2 for p53 to 4.7 for cyclin D1), thanks to the strong colorimetric signals located at the spot positions, and to the very low background generated from the membrane material. The signal intensity varied between the different probes, as a consequence of the affinity difference between the purified

antibodies. This last point might be of great importance if one planned to compare the different auto-antibody levels of one patient. However, in the present multiplex TAA immunoassay approach, no global normalization is required: each auto-antibody level is used separately for the comparison and ranking of samples. These different TAA probes response toward specific antibodies will then not impact the final application.

In the field of protein microarrays, the quality and robustness of the spotting is a key factor for the achievement of reliable analytical systems. The reproducibility of the signal on each spot family was then first investigated in order to evaluate the spotting quality. A very good mean variability of 2.23% was found between triplicate spots. The microarray to microarray reproducibility was also evaluated on 7 different wells. The calculated mean variation coefficients of positive probe spots were 7.66% and 13.3% for the higher and the weaker signals, respectively.

Once the reactivity of the immobilized probes validated, the capacity to detect anti-TAA auto-antibodies in human sera on the TAA microarrays was evaluated. Fig. 2 presents a typical image of a stained membrane after its incubation with a serum from a prostate cancer patient. As can be seen, specific spots were positively stained within the TAAs panel (p53, NY-ESO-1, cyclin B1 and cyclin D1) while the negative control (BSA) remained unstained and the positive controls (human IgG and alkaline phosphatase labelled antibodies) were stained.

From all these preliminary studies, our TAA microarray system seems to be suitable for the detection of anti-TAA auto-antibodies.

Nevertheless, when it comes to the determination of auto-antibodies in cancer patient sera, the sample dilution must be carefully selected in order to be able to detect any auto-antibody concentration increasing in relation to TAA protein deregulation during tumorigenesis. Therefore, different sample dilutions were tested on the system (1 : 10, 1 : 20, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 500, 1 : 1000 and 1 : 5000), in order to determine the proper serum dilution to be used in assays. From the stained membrane images obtained, specific signals for each dilution were measured and the corresponding numerical data used to build saturation curves (Fig. 3) for each positive protein (here p53, NY-ESO-1, p62 and IMP1). Obviously, in order not to saturate the immobilized probes with the serum antibodies while keeping the strongest signal, the sample required at least a 1 : 500 dilution. In practical, two dilutions were used for the following studies, 1 : 500 and 1 : 2000. The 1 : 500 dilution was used as to produce the highest signal without saturation and the 1 : 2000 dilution used to make sure that, for a particular sample, a clear difference was observed between two different dilutions.

Auto-antibodies detection

HiFi TAA microarrays were used for the characterization of a panel of cancer patients and healthy donors. Serum samples

Table 1 Occurrence of the positive ranking of healthy donor and cancer patient for each TAA

Antigen	Cyclin B1	PSA	Survivin	p53	c-myc	Her2/neu	NY-ESO-1	CFH	Cyclin D1	p62	IMP-1	Koc
Healthy donor occurrence(%)	0	6.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cancer patient occurrence(%)	22.2	0	5.6	33.3	11.1	5.6	16.7	5.6	0	5.6	27.8	0

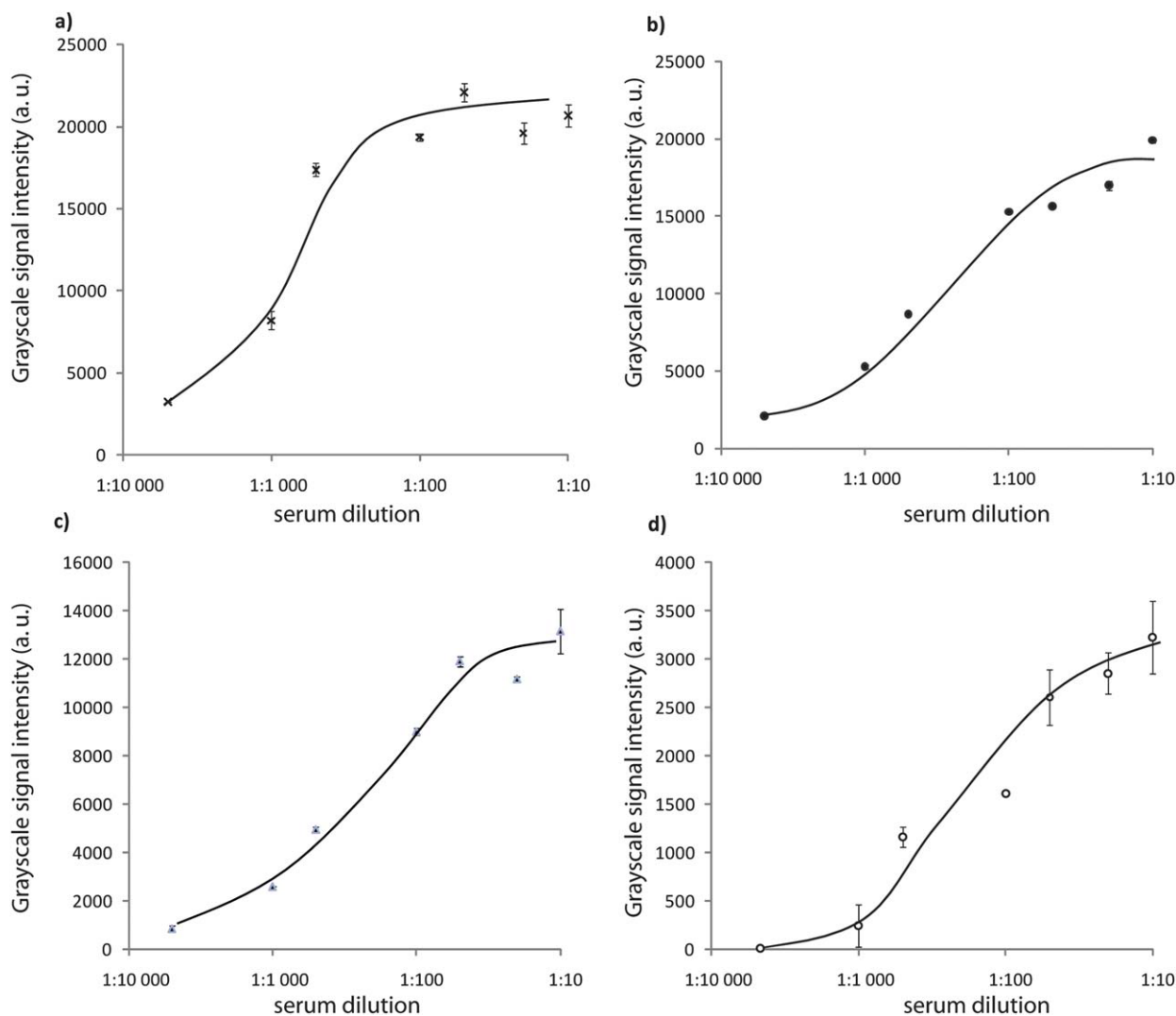


Fig. 3 Sample dilution optimization. (a) Response of the p53 spots, (b) response of the NY-ESO-1 spots, (c) response of the p62 spots and (d) response of the IMP1 spots. All the points are triplicates and performed on a prostate cancer patient.

from 32 clinically confirmed cancer patients (breast and prostate) and 16 healthy donors (93% males, 7% female; between 19 and 36 years old), collected by the Etablissement Français du Sang between 2003 and 2009, were used in this proof of concept study.

In a first set of experiments, healthy donor sera were used to calibrate the system and calculate cut-off values. For each sample, the auto-antibody responses to the immobilized TAA were quantified using the grayscale signal obtained from each spot of the TAA microarray. Then, using the numerical data, cut-off values were calculated, for each TAA, as the mean signal of all normal sera + 3SD.

In a second row of tests, cancer patient sera were analyzed using the TAA microarray. The obtained images were quantified and the resulting values compared to the previously calculated cut-offs. The different samples were then easily classified in two distinct populations, *i.e.* positive or negative toward a specified TAA. An overview of this ranking is given in Table 1.

The first observation is that 3 proteins (PSA, cyclin D1 and Koc) from the 12 TAAs panel did not generate any response from the cancer patient sera. In contrast PSA was generating

false positive from the healthy donors' population. This latter observation is quite surprising since almost 50% of the tested patients were clinically diagnosed for prostate cancer. The anti-PSA auto-antibodies level was then expected to be elevated in their sera. Apparently, the immobilized PSA, which reacts perfectly with purified antibodies (see Fig. 2) was not able to interact with anti-PSA auto-antibodies in sera. Consequently, PSA, cyclin D1 and Koc were removed from the TAA panel for all the subsequent experiments.

Then, from the 9 remaining TAAs, 5 were shown to be able to identify more than 10% of the positive sera from cancer patients. These proteins, *i.e.* p53, NY-ESO-1, IMP1, cyclin B1 and c-myc, were then chosen as reliable predicting parameters and included in a TAA subpanel. Fig. 4 presents the responses of the healthy donor and cancer patient sera to this panel of 5 proteins, together with the above mentioned cut-off values and a summary of the auto-antibodies occurrence toward the subpanel in patient sera (Fig. 4, table).

These last results clearly demonstrate, just like the Shi *et al.* work before using conventional ELISA,²⁰ that the use of TAAs

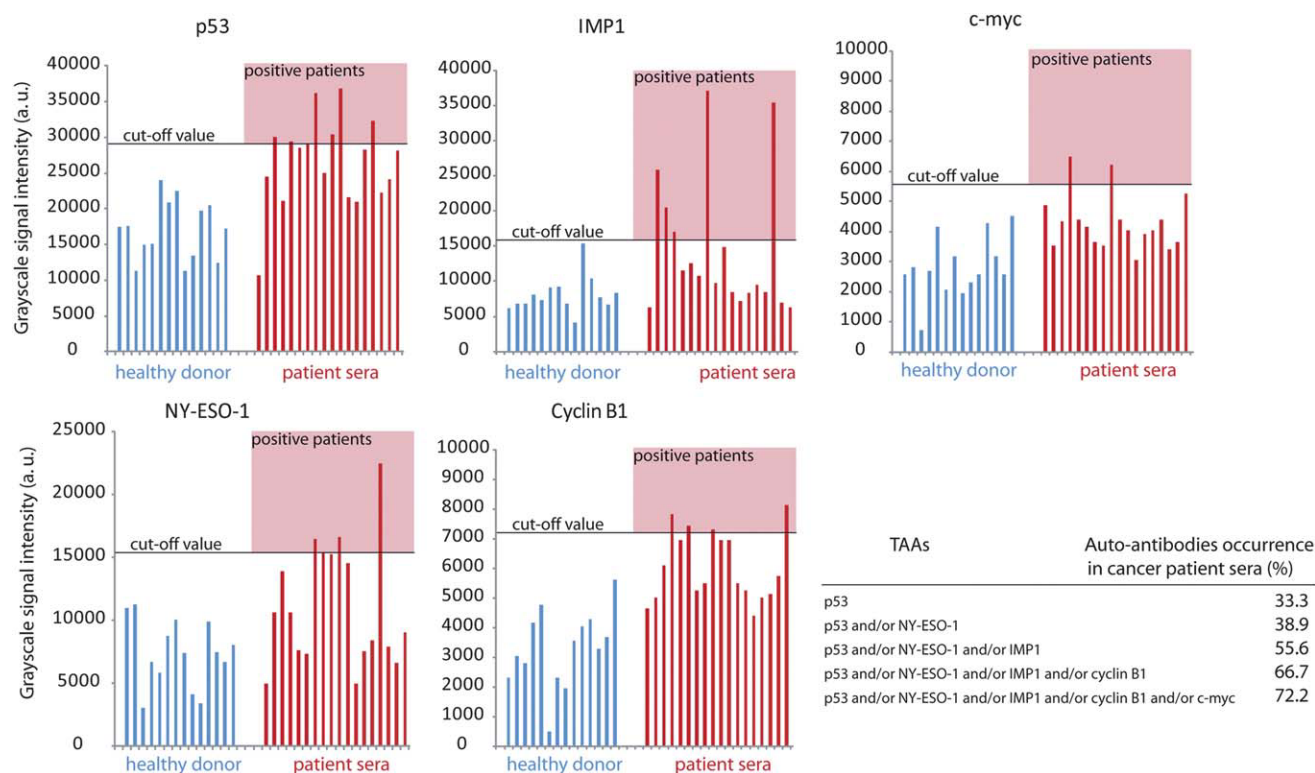


Fig. 4 Multiplex detection of anti-TAA auto-antibodies. Healthy donor and cancer patient serological responses toward the selected 5 TAAs subpanel (sample dilution 1 : 500). Cut-off values were calculated, for each TAA, as the mean signal of all healthy donor sera + 3SD. Inset: added occurrence of the auto-antibodies in cancer patient sera.

panel, instead of an isolated single parameter, results in an increase in the prediction efficiency of positive patients. Indeed, the addition of the positive samples toward NY-ESO-1 and p53 increased the predicting percentage of positive patients from 33.3 to 38.9%. Then, adding again the IMP-1, the cyclin B1 and the c-myc responding samples enabled the increase in this predicting value to 55.6%, 66.7%, and to 72.2%, respectively. Finally, using only a 5 TAAs subpanel, 72.2% of cancer patients were ranked positive, using a single experiment.

Conclusions

Elaboration of innovative and noninvasive tools to help oncologists in the diagnosis and treatment of cancer is nowadays a great challenge. An effective and reliable device would allow helping them in numerous tasks, such as early and differential diagnosis of tumors, choice of treatment strategy, prognosis, follow-up of tumor progression, and estimation of therapeutic efficiency. In this context, high-throughput and multiplex detection of various auto-antibodies in blood samples would be a major advance.

In this study, we evaluated the performance, characteristics and applicability of a new fully automated multiplex immunoassay that enables the simultaneous detection of auto-antibodies against different TAAs, specifically present in cancer patient sera. Several probes must be used in order to differentiate cancer patients from healthy donors. Indeed, all of the cancer patients exhibit specific auto-immunity against the different antigens and for example some of the cancer patients tested in the present

study (27.8%) had no detectable auto-antibodies against any of the selected probe.

Besides, some of these selected probes were shown to be not reliable, because of their lack of specificity/reactivity toward the present cancer patient auto-antibodies. In fact, 2 probes of the panel (Koc and cyclin D1) did not give any positive signal for cancer patients. Another probe, PSA, not only did not permit to define any positive sample from patients, but also generated a false-positive result from a healthy donor serum. These data demonstrated the advantageous use of a multiple antigen panel in increasing the sensitivity of auto-antibody detection in cancer sera. In order to improve the diagnosis efficiency of the immunoassay, it would be necessary to implement the TAA panel with complementary antigens. Moreover, testing a larger population of healthy sera would enable the calculation of more accurate cut-off values for each probe, and would therefore permit to avoid false-positive results.

As a final remark, it has to be mentioned that in the present study no differentiation was made between the patients affected by breast or prostate cancer on the basis of the TAAs microarray response. In other words, no cancer specific profile was identified using the actual TAAs panel. However, by tuning the antigen panel using proteins more specific of a type of cancer, it would be conceivable to differentiate cancers. Numerous biomarkers specific of a particular cancer type were already described.²² By testing these markers on normal and patients sera of identified cancer types, it would be possible to determine if these new combinations of markers can be accurate diagnosis tools.

Notes and references

- 1 *World Cancer Report*, ed. P. Boyle and B. Levin, World Health Organisation and International Agency for Research on Cancer, 2008.
- 2 J. D. Wulfsberg, L. A. Liotta and E. F. Petricoin, *Nat. Rev. Cancer*, 2003, **3**, 267–275.
- 3 C. A. Casiano, M. Mediavilla-Varela and E. M. Tan, *Mol. Cell. Proteomics*, 2006, **5**, 1745–1759.
- 4 J. Qiu, J. Madoz-Gurpide, D. E. Misek, R. Kuick, D. E. Brenner, G. Michailidis, B. B. Haab, G. S. Omenn and S. Hanash, *J. Proteome Res.*, 2004, **3**, 261.
- 5 T. Soussi, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1777–1788.
- 6 M. L. Disis, E. Calenoff, G. McLaughlin, A. E. Murphy, W. Chen, B. Groner, M. Jeschke, N. Lydon, E. McGlynn, R. B. Livingston, R. Moe and M. A. Cheever, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 16–20.
- 7 G. Covini, E. K. L. Chan, M. Nishioka, S. A. Morshed, S. I. Reed and E. M. Tan, *Hepatology*, 1997, **25**, 75–80.
- 8 M. L. Lu, R. M. Nakamura, E. D. Dent, J. Y. Zhang, F. C. Nielsen, J. Christiansen, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Am. J. Pathol.*, 2001, **159**, 945–953.
- 9 J. Y. Zhang, E. K. L. Chan, X. X. Peng, M. L. Lu, X. Wang, F. Mueller and E. M. Tan, *Clin. Immunol.*, 2001, **100**, 149–156.
- 10 G. Ambrosini, C. Adida and D. C. Altieri, *Nat. Med.*, 1997, **3**, 917–921.
- 11 J. Rohayem, P. Diestelkoetter, B. Weigle, A. Oehmichen, M. Schmitz, J. Mehlhorn, K. Conrad and E. P. Rieber, *Cancer Res.*, 2000, **60**, 1815–1817.
- 12 K. Benmahrez, D. Thierry, I. Sorokine, A. Dannamuller and M. Kohiyama, *Br. J. Cancer*, 1988, **57**, 529–534.
- 13 K. B. Marcu, S. A. Bossone and A. J. Patel, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, **61**, 809–860.
- 14 G. Turashvili, S. E. McKinney, O. Goktepe, S. C. Leung, D. G. Huntsman, K. A. Gelmon, G. Los, P. A. Rejto and S. A. J. R. Aparicio, *Mod. Pathol.*, Advance Online.
- 15 T. H. Patwa, C. Li, L. M. Poisson, H.-Y. Kim, M. Pal, D. Ghosh, D. M. Simeone and D. M. Lubman, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 2215.
- 16 D. G. McNeel, L. D. Nguyen, B. E. Storer, R. Vessella, P. H. Lange and M. L. Disis, *J. Urol.*, 2000, **164**, 1825–1829.
- 17 M. K. Brawer, M. P. Chetner, J. Beatie, D. M. Buchner, R. L. Vessella and P. H. Lange, *J. Urol.*, 1992, **147**, 841–845.
- 18 E. Jager, S. Gnjatic, Y. Nagata, E. Stockert, D. Jager, J. Karbach, A. Neumann, J. Rieckenberg, Y. T. Chen, G. Ritter, E. Hoffman, M. Arand, L. J. Old and A. Knuth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 12198–12203.
- 19 J. Y. Zhang, C. A. Casiano, X. X. Peng, J. A. Koziol, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, 2003, **12**, 136–143.
- 20 F.-D. Shi, J.-Y. Zhang, D. Liu, A. Rearden, M. Elliot, D. Nachtsheim, T. Daniels, C. A. Casiano, M. J. Heeb, E. K. L. Chan and E. M. Tan, *Prostate*, 2005, **63**, 252.
- 21 G. C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 6185–6192.
- 22 F. M. Brichory, D. E. Misek, A. M. Yim, M. C. Krause, T. J. Giordano, D. G. Beer and S. M. Hanash, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 9824–9829.

Cite this: DOI: 10.1039/c1lc20246d

www.rsc.org/loc

Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools†

Benjamin P. Corgier, Céline A. Mandon, Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette*

Received 23rd March 2011, Accepted 14th June 2011

DOI: 10.1039/c1lc20246d

We are reporting here a new technology for the straightforward production of integrated microarrays. The approach is based on the use of adhesive supports enabling (i) the immobilization of biomolecules as microarrays (up to 2500 spots per cm²) and (ii) the easy assembly of these microarrays with complex 3D structures such as 96-well bottomless microplates or polymer and glass microfluidic networks. The analytical performances of the system were demonstrated for sandwich protein detection (C-reactive protein) and hybridization assays, both in classical 96-well microplate format and microfluidic environment.

Introduction

Modern analytical systems now benefit from both microarrays and microfluidics recent developments.¹ However, the combination of both techniques is not trouble-free and the compatibility between microfabrication technologies and the integrity of the immobilized biological molecules is rare. Obvious examples of this bottleneck are the recurrent difficulties in spotting biological probes on a surface and subsequently processing this surface with bonding or activation techniques: assembly efficiency, components alignment, biomolecules degradation, *etc.* In most cases, only expensive advanced techniques are available (plasma oxidation, UV photopatterning, anodic bonding, *etc.*).^{2–4} Furthermore, these techniques are harmful for biological entities which are the key element of a bioassay device.

Recently, soft polymer moulding technologies such as the “Print-n-Shrink” or the “macromolecule to PDMS transfer” approaches have brought new solutions. These techniques enable one to spot proteins directly during the fabrication process of the microdevice, producing then microarrays and 3D microsystems in a single step.^{5–7}

However such integrative fabrication approaches remain exceptional and new immobilization concepts are still required to allow for the easy interfacing between microarrays and microsystems, leading to microdevices with reliable, robust and sensitive analytical properties.

In this article, we report the immobilization of proteins and DNA on standard polymeric adhesive supports and the application of this technique to multiple diagnosis devices fabrication.

The aim of this innovative biomolecule immobilization process is to allow the easy assembly of the arrayed adhesive flat support with any microsystem (from widely used 96-well plates to complex microfluidic devices, from polystyrene to glass substrates). The so-called polymeric adhesive supports are defined as pressure sensitive adhesives (PSA) coated on one or both sides of a solid film (usually a polyester based film).⁸ These polymers are designed to strongly adhere to the surface without any chemical activation. Indeed, by gently pressing the adhesive sheet against the surface, the adhesive polymer adapts itself to the roughness of the target materials, increasing the contact surface, and strongly sticks to the material.⁹

We will demonstrate the efficiency of biomolecules immobilization on acrylic based PSA and reveal the technological breakthrough achieved in the field of biosensing layer integration within microsystems.

Materials and methods

See the ESI†

Results

Concept: microarray spotting on adhesive film

The interest of using adhesive film for the development of miniaturised analytical systems is dual; all at once, it can be directly used as an immobilization support for probe molecules and, it can provide straightforward device assembly through direct lamination. Moreover, the flatness of the adhesive support affords simplicity of use for spotting with an automated spotter, allowing fast and precise movements close to the surface.

The selected adhesive polymer is also here of benefit to the colorimetric readout (using alkaline phosphatase conjugate–target molecules) since it facilitates the detection of the positive spots staining by giving an excellent optical contrast on the white

Laboratoire de Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires, Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire, Université Lyon1 – CNRS 5246 ICBMS, Bat. CPE – 43 Bd du 11 Nov., 69622 Villeurbanne, France. E-mail: christophe.marquette@univ-lyon1.fr; Fax: +334 72 44 79 70; Tel: +334 72 43 13 69

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c1lc20246d

surface. Moreover, the textured polymeric property of the adhesive also helps the local overconcentration of the insoluble coloured product. Indeed, scanning electronic microscopy image of the adhesive (ESI†, Fig. 1) clearly demonstrates the large developed surface of the polymer. Thus, a large amount of probes, and consequently of labeled molecules, are concentrated within a small geometrical area, leading then to a higher signal intensity per surface unit.

In the present system, this staining of positive spots is detected, right after the test, using a simple office flatbed scanner.

In order to evaluate the biomolecule immobilization efficiency onto the selected adhesive polymer, a first series of experiments was performed. Two different assay formats (oligonucleotide hybridization or C-reactive protein (CRP) sandwich detection) were tested, based either on an immobilized oligonucleotide

probe or on an immobilized monoclonal antibody. For the amino-modified oligonucleotide immobilization, we found that an activation of the adhesive surface with the crosslinking agent glutaraldehyde was a benefit. The PSA surface was first coated with glutaraldehyde which subsequently reacted with the primary amine function of the probes. This process leads to the immobilization of orientated oligonucleotide probes, generating a 3-time increase in the colorimetric greyscale level (data not show). On the contrary, for the immobilization of protein probes of large molecular weight, the adhesive and hydrophobic properties of the material are suspected to cause adhesion of the biomolecules, just like previously demonstrated by our group onto polydimethylsiloxane surfaces.¹⁰

Fig. 1 describes the prepared microarray patterns and presents typical test result images. As can be seen, in both cases the immobilized biomolecules were active and available for interaction with their specific target. Moreover, only the specific spots were stained, proof of the specificity of the interaction with the immobilized probes and of the low non-specific adsorption of the different reagents on adhesive polymers in the presence of LowCross buffer. The spot to spot reproducibility was evaluated using the average signal and the standard deviation of each array. For oligonucleotide based assays, an average grayscale signal of 57 719 a.u. (target concentration: 0.3 nmol L⁻¹) was found with a standard deviation of 4.5%. For antibodies-based assays, an average grayscale signal of 43 200 a.u. (target concentration: 300 ng mL⁻¹) was found with a standard deviation of 4.2%.

To demonstrate the efficiency of hybridization of real sample targets onto the developed adhesive array, a multiplexed assay useful for blood group genotyping¹¹ was performed. Here, target molecules were 100–250 bp long PCR products obtained through multiplex PCR of whole blood extracted DNA. The target sequences were specific to 3 single nucleotide polymorphisms (SNP) associated with clinically important blood group antigens (Kell, Kidd and Duffy systems). The selectivity towards detection of SNPs in the target sequences was achieved by carrying out hybridization at 55 °C. As can be seen in Fig. 1c, a perfect match between the expected and the observed genotypes was obtained, proof of the efficiency of hybridization in the presence of DNA molecules used for molecular diagnostics.

To push further the evaluation of biomolecule microarrays preparation using adhesive, the maximum reachable spots density on the support was investigated. For that purpose, microarrays of increasing density were prepared using a spotting solution composed of BSA (1 mg mL⁻¹) and bromophenol blue (0.25 mg mL⁻¹). Fig. S2 of the ESI† presents the highest reachable density. This microarray comprises 900 spots of 400 pL (spot diameter = 60 μm, pitch = 200 μm) on a 0.36 cm² area, resulting in a spot density of more than 2500 spots per cm². Such a high density for spotted biomolecules is achievable due to the surface hydrophobicity of the adhesive which avoids lateral spreading of the deposited drops (contact angle: 99°).

Adhesive microarray assembly, integration with microsystems

Three different approaches, meeting three different analytical purposes, were used to integrate the spotted adhesive microarrays into microsystems (Fig. 2). The bottomless 96-well microtiter plate is suitable for automation and compatible with

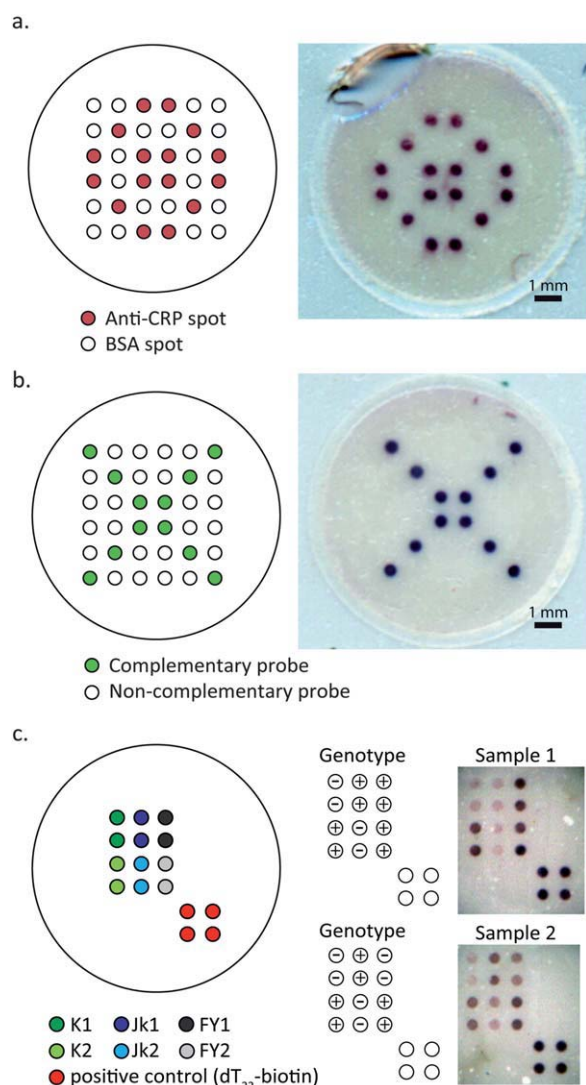


Fig. 1 (a) CRP and (b) oligonucleotide specific spotted patterns and test result images onto adhesive polymer. For CRP detection, a sandwich assay was performed using 300 ng mL⁻¹ of target protein. For oligonucleotide detection, a target concentration of 0.3 nmol L⁻¹ was used. (c) A blood group genotyping assay based on the detection of SNPs. Test results of two samples having different genotypes.

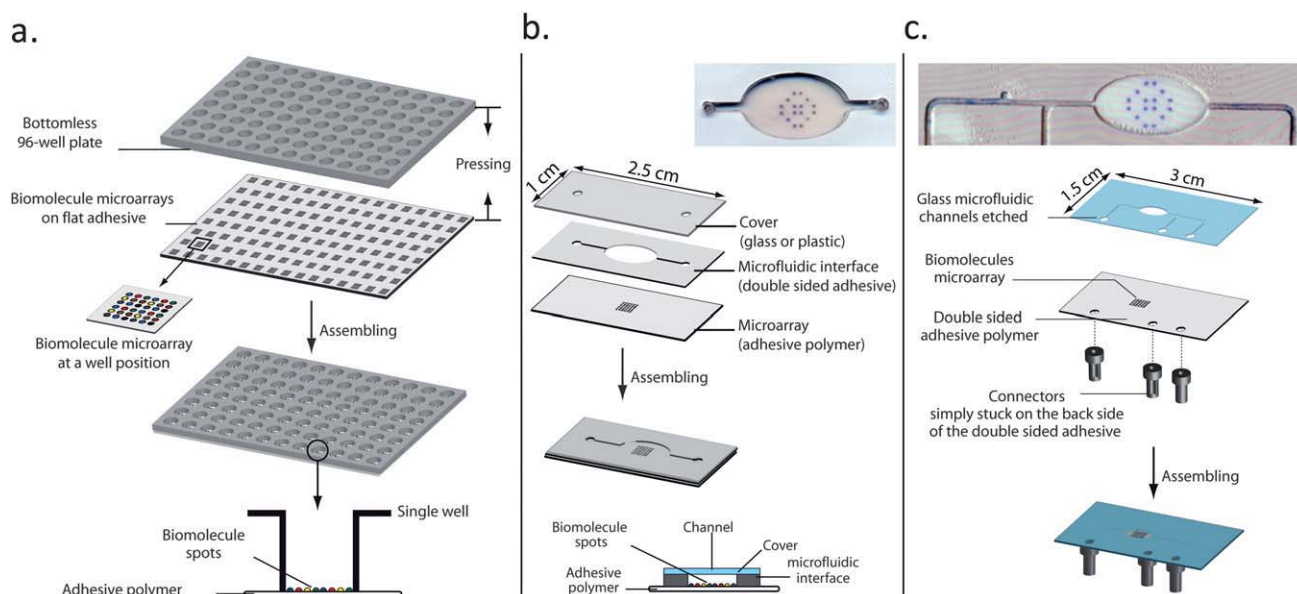


Fig. 2 The range of assembling possibilities of the adhesive microarrays. (a) Assembly with a bottomless 96-well plate, (b) assembly with a simple double side tape microfluidic network and (c) assembly with a glass etched microfluidic network.

most of the analytical equipments. The double sided adhesive microfluidic channel system allows the flexibility of device conception, the ease of use and low volume consumption. The adhesive and glass etched assembled device brings the advantage of simplicity with a two components system.

Assembling with bottomless 96-well plate. A $8.5\text{ cm} \times 12.8\text{ cm}$ white adhesive support (standard dimensions of a 96-well plate) was used for the spotting of the biomolecules. Despite its size, the flatness of the substrate provides a convenient spotting achievement using an automated spotter. The assembling of a bottomless 96-well plate and microarrays of biomolecules spotted on the adhesive support was successfully performed (Fig. 2a). Thanks to the adhesive property of the support, a light pressure (100 g cm^{-2}) allows a robust sealing of the wells. A microarray of biomolecules is thus present in each well. The assay is then performed as with a classical 96-well plate, using a robotised platform for solution dispensing, incubation, revelation and washing steps. The adhesive property of the PSA does not decrease over time, even with frequent incubations and washes. It is also possible to heat the 96-well plate mounted with an adhesive bottom at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for specific target hybridization without observing any leakage. The analytical results obtained with such systems will be discussed below.

Assembling with double sided adhesive microfluidic channel. A first piece of white double sided adhesive was used for biomolecule immobilization and a second adhesive piece was cut through for microfluidic layer production. For the latter, a desktop digital craft cutter (Silhouette SD Quickcutz®, US) was used to cut the microfluidic channels directly in a piece of double sided adhesive. The channels were designed with the help of a DXF format drawing software.¹² The two adhesive pieces were stuck together by applying a gentle pressure, (100 g cm^{-2}). Fig. 2b presents the assembled microarray, the fluidic channel and a transparent top

cover. A picture of a stained microarray for CRP detection is presented at the top of Fig. 2b. Analytical results will be discussed below.

Assembling with glass etched microfluidic channels. This device was simply composed of two layers. One is composed of a protein microarray spotted on the surface of the polymeric adhesive support and a second one is made of a glass etched microfluidic network (Fig. 2c). Interestingly, the double sided adhesive part allows fixing the fluidic connections on the backside of the system. Therefore the fluidic connecting holes were simply punched before assembling with the etched glass slide. No analytical results will be presented for this device, but the feasibility was demonstrated, particularly in term of sealing efficiency. Thus, the assembled system was demonstrated leak-free for flow rates up to $100\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$.

Assay performances

Since the efficiency of biomolecule immobilization on adhesive surface was demonstrated, the subsequent step of this proof of concept study was the evaluation of the analytical performances of the adhesive microarrays.

CRP detection on adhesive bottom 96-well plate. With the objective of producing high-throughput compatible multiparameter tests on adhesive support, 96 CRP specific microarrays (see Fig. 1a) were spotted on a $7\text{ cm} \times 11\text{ cm}$ adhesive sheet and simply assembled with a bottomless 96-microwell plate. The 96-well plate format enables compatibility with full automation of the assay procedure, *i.e.* washing, incubation and staining steps. This automated protocol was handled by an EVO75 platform and used for the detection of various concentrations of free CRP.

After colorimetric images acquisition, a calibration curve was built from the quantification of the spot median greyscale values

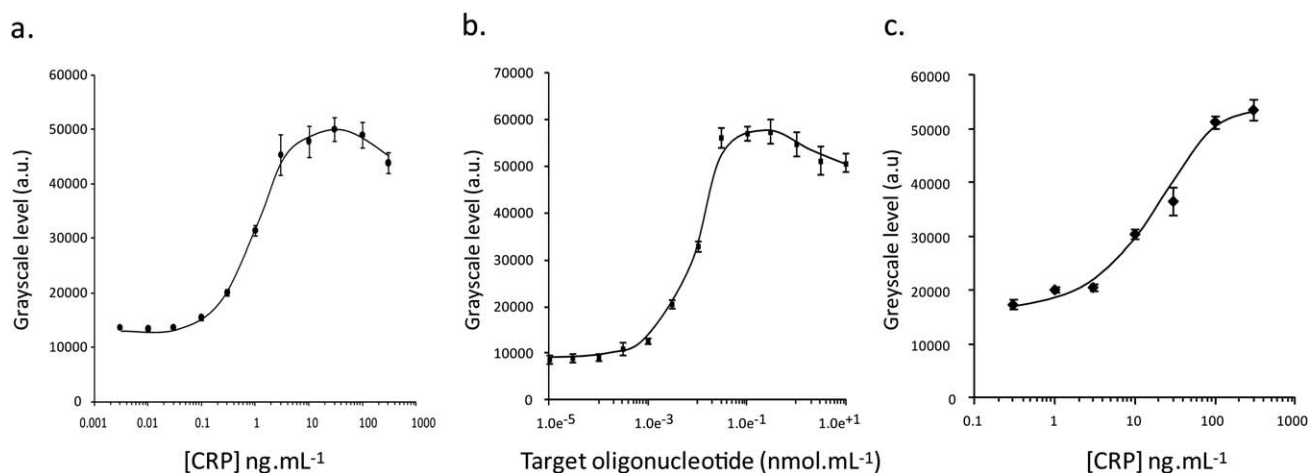


Fig. 3 The analytical performances of the assembled systems. (a) C-reactive protein detection onto the adhesive 96-well microplate, (b) oligonucleotide target sequence detection onto the adhesive 96-well microplate and (c) C-reactive protein detection within the integrated adhesive microarray (Fig. 2b).

obtained in the presence of different concentrations of the target protein (Fig. 3a). Very interesting analytical parameters were obtained for the CRP detection, with a limit of detection (calculated for a signal to noise ratio value of 3) of 0.1 ng mL⁻¹ and a detection ranging over two orders of magnitude at least. These analytical performances match up well with the CRP clinically relevant threshold (8 $\mu\text{g mL}^{-1}$)¹³ and go beyond the classical ELISA tests on polystyrene 96-well plates 62.5 ng mL⁻¹ for the Abazyme [USA] kit, 1 ng mL⁻¹ for the Kalon Biological kit [UK] and 1 ng mL⁻¹ for the Calbiotech [USA] kit.

Oligonucleotide probe detection on adhesive bottom 96-well plate. Keeping in mind that high-throughput oligonucleotide based assays can be of great interest in numerous routine genotyping applications (blood group determination,¹¹ pathogen detection, animal sexing, *etc.*), the proof of concept of the quantitative detection of target oligonucleotide was performed onto the 96-well plate format. Once again, 96 microarrays composed of complementary and non-complementary sequences (Fig. 1b) were spotted on an adhesive sheet and assembled with a bottomless microplate. The target sequence calibration curve obtained using a completely automated protocol is presented in Fig. 3b. As can be seen, the detection was possible over two orders of magnitude at least with an achievable sub-picomolar (0.4 pM) limit of detection (calculated for a signal to noise ratio value of 3). Such a low limit of detection is remarkable using a colorimetric method and not a high sensitivity fluorescence scanner. In the present system, the staining of the positive spots using a precipitating enzyme label product shall have benefited from the 3D polymeric structure of the adhesive polymer. Indeed, the insoluble coloured product might be more efficiently trapped at the rough and sticky surface of our adhesive polymer than at the surface of a flat and non-adhesive surface (polystyrene for example).

CRP detection on integrated adhesive microarray. As a final proof of concept, the straightforward assembling of a monochannel microfluidic device with adhesive microarray for CRP detection was demonstrated. The microfluidic part was made of a double sided adhesive material cut out using a desktop craft

cutter (from a DXF design). The system was covered with a 1 mm thick transparent plastic sheet (Lexan Cristal 80330, Cadillac Plastic [UK]) in which fluidic connections were drilled.

The CRP assay described above for the bottomless assembled system was used for the evaluation of the analytical performances of the integrated adhesive microarray. The calibration curve obtained using quantification of the colorimetric staining of the positive spots is presented in Fig. 3c. A limit of detection (calculated for a signal to noise ratio value of 3) of 1 ng mL⁻¹ was obtained with a detection ranging over two orders of magnitude. As discussed before for the 96-well adhesive system, these analytical performances were highly compatible with the targeted application.

Conclusions

An innovative approach has been described for the production of protein and oligonucleotide microarrays, fully compatible with any subsequent integration into complete analytical systems. The developed technology is based on the use of adhesive surfaces (single or double sided) for the immobilization of the active biomolecules.

The choice of this adhesive support brings two new properties to classical microarrays; (i) a direct and efficient immobilization of the probe molecules and (ii) a fast and easy integration of the immobilized microarrays through adhesive bonding, without any pre-treatment of the support or the assembled parts. The use of this high grade polymer dramatically decreases the cost of the system compared to classical membrane immobilization (13 € m^{-2} for the medical grade 3 M adhesive film compared to 200 € m^{-2} for a high affinity membrane).

These properties are unique in the field of microarrays and biochips and we believe that such a technology will open the path to the intensification of low cost and efficient testing.¹⁴

Acknowledgements

This research was supported by a Marie Curie International Outgoing Fellowship within the 7th European Community Framework Program (IOF 221507). We would like to acknowledge

funding from the European Research Agency, the CNRS, the University Lyon1 and the ANR. AXO Science (www.axoscience.com) is acknowledged for material and expertise sharing.

Notes and references

- 1 G. M. Whitesides, *Nature*, 2006, **442**, 368–373.
- 2 X.-h. Liu, H.-k. Wang, J. N. Herron and G. D. Prestwich, *Bioconjugate Chem.*, 2000, **11**, 755–761.
- 3 J. Raj, G. Herzog, M. Manning, C. Volcke, B. D. MacCraith, S. Ballantyne, M. Thompson and D. W. M. Arrigan, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 2654–2658.
- 4 S. K. Sia and G. M. Whitesides, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3563–3576.
- 5 K. Sollier, C. A. Mandon, K. A. Heyries, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Lab Chip*, 2009, 3489–3494.
- 6 K. A. Heyries, C. A. Mandon, L. Ceriotti, J. Ponti, P. Colpo, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Biosens. Bioelectron.*, 2009, **24**, 1146–1152.
- 7 D. Taylor, D. Dyer, V. Lew and M. Khine, *Lab Chip*, 2010, **10**, 2472–2475.
- 8 K. R. Shull, *Mater. Sci. Eng., R*, 2002, **36**, 1–45.
- 9 K. L. Johnson, K. Kendall and A. D. Roberts, *Proc. R. Soc. London, Ser. A*, 1971, **324**, 301–313.
- 10 K. A. Heyries, C. A. Marquette and L. c. J. Blum, *Langmuir*, 2007, **23**, 4523–4527.
- 11 G. C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 6185–6192.
- 12 P. K. Yuen and V. N. Goral, *Lab Chip*, 2010, **10**, 384–387.
- 13 W. L. Roberts, L. Moulton, T. C. Law, G. Farrow, M. Cooper-Anderson, J. Savory and N. Rifai, *Clin. Chem.*, 2001, **47**, 418–425.
- 14 B. P. Corgier, G. C. Le Goff, C. A. Mandon, L. J. Blum and C. A. Marquette, Patent No. FR1150308, 2011.

Adhesive microarrays for multipurpose diagnostic tools

Benjamin P. Corgier, Céline A. Mandon, Gaëlle C. Le Goff, Loïc J. Blum and Christophe A. Marquette*

5 Materials and methods

Materials

Synthetic oligonucleotide probes were supplied by Eurogentec (Belgium): 5'-NH₂-C₆-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC-3', 5'-NH₂-C₆-ATCTCGGGAATCTCAATGTTAGT-3' and 5'-Biotin-GGCACAAACATGCACCTCAA-3'. Alkaline phosphatase-conjugated streptavidin, BCIP/NBT (4-bromo-5-chloroindolyl phosphate/ nitro-blue tetrazolium) ready-to-use solution, bovine serum albumin (BSA), polyoxyethylene-sorbitan monolaureate (Tween20) and peroxidase-conjugated streptavidin were purchased from Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l (Lyon, France). Sodium nitrite and Veronal (diethylmalonylurea sodium) were obtained from Prolabo (Fontenay Sous Bois, France). C-reactive protein (CRP) from human fluid was obtained from Bodesign International (Meridian Life Science Inc., Saco, USA). All buffers and aqueous solutions were prepared with distilled demineralised (d.d.) water.

The bottomless 96-well plates were purchased from Greiner bio-one SAS (Courtaboeuf, France). White double sided adhesive 7966WDL, medical grade was obtained from 3M (France).

Spotting procedure

For oligonucleotide microarrays preparation, the 5'-amino modified 20^{mer} sequences (complementary 5'-NH₂-C₆-TTGAGGTGCATGTTTGTGCC-3' and non-complementary 5'-NH₂-C₆-ATCTCGGGAATCTCAATGTTAGT-3') were prepared in acetate buffer 0.1 mol.L⁻¹, KCl 0.1 mol.L⁻¹, bromophenol blue 0.25 mg.mL⁻¹, pH 5.5 to reach a final concentration of 50 μmol.L⁻¹.

For CRP specific microarrays, anti-CRP monoclonal antibodies (C5 clone from Bodesign International [Meridian Life Science Inc., Saco, USA]) and BSA (as negative control) were prepared at a concentration of 500 μg.mL⁻¹ in acetate buffer 0.1 mol.L⁻¹, KCl 0.1 mol.L⁻¹, bromophenol blue 0.25 mg.mL⁻¹, pH 5.5.

These solutions were spotted as 3.2 nL drops (pitch = 600 μm) on the flat adhesive polymer 3M 7966WDL using a piezoelectric spotter (sciFLEXARRAYER S3, SCIENION, Germany). The substrate was air-dried at room temperature and was then ready to be used.

45 Oligonucleotide assay on adhesive bottom 96-well plate

Oligonucleotide assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a heater. For all experiments, the protocol involved the following steps. i) Wells were washed with phosphate buffer saline (PBS, 0.1 mol.L⁻¹, NaCl, 0.15 mol.L⁻¹, pH 7.4) and saturated with PBS mixed with

LowCross Buffer 1:5(v:v) (Candor Bioscience, Wangen, Germany). ii) Samples (biotinylated probes) were transferred to the wells and incubated for 30 min at 37°C. iii) The wells were then loaded with the alkaline phosphatase-conjugated streptavidin solution (2 μg.mL⁻¹) and incubated for 30 min at 37°C. iv) Finally, 200 μL of BCIP/NBT substrate solution were added in each well for signal generation. Wells were washed with PBS after hybridization, labelling and signal generation steps. The microtiter plate bottom was imaged using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution.

For blood group genotyping, the protocol was similar except for the hybridization temperature which was raised to 55°C to achieve selectivity. Blood samples were prepared according to reference ¹.

CRP assay on adhesive bottom 96-well plate

CRP assays were carried out on an EVO75 robot (TECAN, Switzerland) equipped with a heater. For all experiments, the protocol involved the following steps; i) Wells were washed with PBS and saturated with PBS mixed with LowCross Buffer 1:5(v:v) (Candor Bioscience, Wangen, Germany); ii) Samples (CRP protein) were mixed with biotinylated anti-CRP (C7 clone from EXBIO, Czech Republic) at a concentration of 0.1 μg.mL⁻¹ and alkaline phosphatase-conjugated streptavidin at a concentration of 1 μg.mL⁻¹, transferred to the wells and incubated for 1 hour at 37°C; iii) Finally, 200 μL of BCIP/NBT substrate solution were added in each well and incubated 15 minutes for signal generation. iv) Wells were washed with PBS after incubation, labelling and signal generation steps. The microtiter plate bottom was imaged using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65535 arbitrary units (a.u.)) with a 2400 dpi resolution.

85 CRP assay on integrated adhesive microarray

CRP assays were carried out within a laminated microfluidic system composed of one adhesive layer supporting anti-CRP microarray, one double adhesive layer in which a microchannel and an incubation chamber were cut out using a desktop digital craft cutter (Silhouette SD Quickutz[®], US)² and one cover layer (glass or plastic) equipped with two drilled apertures for fluid inlet and outlet.

For the assay, the different solutions were injected using a micropipette directly in microsystem inlet. The protocol involved the following steps; i) Injection of 200 μL of PBS; ii) Injection of 200 μL of PBS added of LowCross Buffer 1:5(v:v) (Candor Bioscience, Wangen Germany); iii) Injection of 200 μL of samples (CRP protein) mixed with biotinylated anti-CRP (C7

clone) at a concentration of $0.1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and alkaline phosphatase-conjugated streptavidin at a concentration of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, and incubation for 30 minutes at 37°C ; iv) Finally, $200 \mu\text{L}$ of BCIP/NBT substrate solution were injected for signal generation and incubated for 15 minutes. The chambers were washed with PBS after incubation, labelling and signal generation steps.

The entire system was then imaged using a flatbed scanner (HP Scanjet 3770, Hewlett-Packard) in greyscale (from 0 to 65535 arbitrary units [a.u.]) with a 2400 dpi resolution.

Data analysis

Images analysis (signal quantification) was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices France, St Grégoire, France). The signal intensity per spot was calculated as the median intensity for all pixels included in a circular feature defining the spot and corrected using a local background evaluation. The resulting net specific intensity on a given probe was calculated as the mean intensity for all replicate spots.

Complementary results

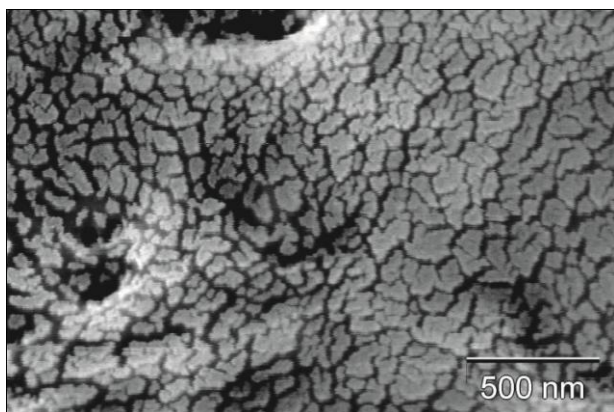


Fig. 1 a) SEM picture of a bare acrylic based polymeric adhesive surface. (15kV under vacuum)

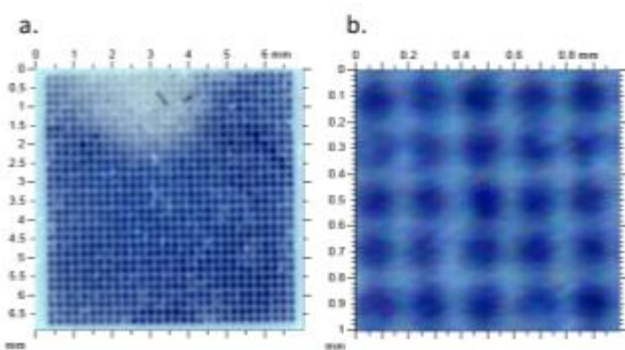


Fig. 2 a) 30x30 spots microarray (900 spots) with a $200 \mu\text{m}$ pitch.
b) Further magnification of the array

1. G. C. Le Goff, J.-C. Brès, D. Rigal, L. J. Blum and C. A. Marquette, *Anal Chem*, 2010, **82**, 6185-6192.

2. P. K. Yuen and V. N. Goral, *Lab Chip*, 2010, **10**, 384-387.

Résumé

Les travaux présentés dans cette thèse s'intéressent à l'immobilisation de biomolécules pour le développement d'outils d'analyse multiparamétrique pour la caractérisation d'échantillons biologiques et le diagnostic, sur un support de type biopuce couplé à une détection colorimétrique.

Un premier axe de recherche concerne le développement de tests d'hybridation d'acides nucléiques et d'immunotests à haut-débit automatisés sur plaque de filtration. Cette méthode a permis la mise au point d'un test de génotypage automatisé pour le dépistage transfusionnel haut-débit (génotypage érythrocytaire étendu) en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes (EFS-RA). Il permet d'analyser 96 échantillons en quatre heures, et de caractériser six génotypes par échantillon. Cet outil a fait l'objet d'une validation sur un panel de 293 donneurs.

La seconde partie des travaux présentés s'intéresse au développement d'un procédé d'immobilisation d'oligonucléotides sur un polymère particulier (PolyshrinkTM) pour l'élaboration d'un système d'analyse miniaturisé. Plusieurs stratégies d'activation ont été envisagées et ont abouti à la mise au point d'une technique d'immobilisation d'oligonucléotides *in situ* dans des plots d'hydrogel. La méthode de fabrication permet d'obtenir une matrice de plots d'hydrogel de 60 µm de diamètre et d'une hauteur de 6 µm en moyenne. En outre, il a été démontré que les oligonucléotides immobilisés dans les plots pouvaient détecter de façon quantitative et sélective les cibles complémentaires présentes dans l'échantillon analysé en utilisant une détection par colorimétrie ou par chimiluminescence.

Biomolecule immobilisation for multiparametric analysis on biochips. Application to high-throughput blood group genotyping.

Abstract

The work reported in this thesis focuses on biomolecules immobilization for the development of multiparametric analysis tools on a biochip coupled with a colorimetric detection, applied to the characterization of biological samples and to diagnosis.

The first concern was the development of high-throughput automated hybridization tests and immunotests on a filtration plate. This method led to the elaboration of an automated platform for extended blood group genotyping in collaboration with the Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes (EFS-RA). It enables to analyze 96 samples in four hours and to characterize six genotypes per sample. Its analytical performances were validated on a panel of 293 blood donors.

The second part of this work aimed to elaborate a new strategy for oligonucleotide immobilization on an innovative polymer (PolyshrinkTM) for the development of miniaturized analysis systems. Several approaches were evaluated and led to an *in-situ* immobilization of oligonucleotides in hydrogel dots technique. This method leads to 6 µm hydrogel dots with a diameter of 60 µm. Moreover it was demonstrated that such immobilized oligonucleotides were able to detect targets specifically and quantitatively using either a chemiluminescent or a colorimetric detection.

Discipline

Chimie

Mots-clés

allergie ; biopuce ; colorimétrie ; diagnostic ; génotypage érythrocytaire ; haut-débit ; hydrogel ; membrane ; polymorphisme d'un nucléotide ; PolyshrinkTM ; puce à ADN ; puce à protéines

Keywords

allergy ; biochip ; blood group genotyping ; colorimetry ; diagnosis ; DNA chip ; high-throughput ; hydrogel ; membrane ; PolyshrinkTM ; protein chip ; single nucleotide polymorphism

Laboratoire d'accueil

Equipe Génie Enzymatique, Membranes Biomimétiques et Assemblages Supramoléculaires
Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires
UMR Université Claude-Bernard Lyon 1 - CNRS 5246 ICBMS
Bâtiment CPE, 43, bd du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne, Cedex, France.