



Système de biopuce optique en temps réel: application au diagnostic génétique

Nathalie Bassil

► To cite this version:

Nathalie Bassil. Système de biopuce optique en temps réel: application au diagnostic génétique. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. <NNT : >. <tel-00008933v2>

HAL Id: tel-00008933

<https://pastel.hal.science/tel-00008933v2>

Submitted on 11 May 2005

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.



HAL Authorization

UNIVERSITÉ DE PARIS SUD

Faculté de Sciences

École Doctorale Onde et Matière

Laboratoire Charles FABRY de l'Institut d'optique

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS SUD

Discipline : Optique appliquée à la biologie

Présentée et soutenue publiquement par

Nathalie BASSIL

Le 16 février 2005

SYSTÈME DE BIOPUCE OPTIQUE

EN TEMPS RÉEL:

Application au diagnostic génétique.

Directeurs de Thèse : Yves Lévy, Michael Canva

Jury

M. Michael. Canva

M. Arnaud Dubois :

Rapporteur

Mme Marie-Pierre Fontaine-Aupart

M. Michel Goossens

M. Thierry Livache :

Rapporteur

Mme Marie Claude Millot

*A tous ceux qui ont été là pour moi quand les ténèbres
m'ont aveuglée et que la nuit m'a couverte de son sombre
manteau,*

*A tous ceux qui, patiemment m'ont relevée et soutenu sans
me juger,*

*A tous ceux qui m'ont entouré et de mon séjour en ce pays
étranger ont fait un havre de paix et un jardin à cultiver,*

*A tous ceux qui m'ont accompagnée, tenu la main et
encouragée,*

*A mon pays blessé et meurtri, à mes parents et amis cet
ouvrage je le dédie.*

Remerciements

A la fin de toute œuvre et avant de tourner la page, il est bon de s'arrêter un moment et de remercier tous ceux qui ont contribué à sa réussite. Ainsi, je remercie Monsieur Pierre Chavel, Directeur du laboratoire Charles FABRY, qui m'a permis de réaliser ma thèse dans ses locaux.

J'exprime aussi ma profonde reconnaissance à **Yves Levy** mon directeur de thèse qui m'a accueilli dans son équipe appelée « Matériaux pour l'Optique Intégrée et Capteur » ainsi qu'à **Michael Canva** dont les conseils ont largement contribué à l'avancement des travaux.

J'adresse aussi mes remerciements à Françoise Martin qui m'a initié à l'utilisation du montage optique et à Allain Aide, technicien émérite toujours prêt à nous pourvoir de conseils et à résoudre les problèmes mécaniques que nous lui soumettons.

Je remercie aussi tous les collègues du laboratoire : Buntha de la salle blanche, les membres de l'atelier d'optique ainsi que tous les doctorants de ma promotion (Hélène, Manu, Pierre, Sylvie, Florence...) et tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé : Jean-Philippe, Evelyne, Sitapha...

Finalement, je n'oublie pas tous nos collaborateurs sans qui ce travail n'aurait pas abouti. Ainsi, je remercie spécialement **Madame Marie Claude Millot** *du Laboratoire de Recherche sur les Polymères CNRS UMRC 7581* pour son aide dans la mise au point de la chimie de surface, Messieurs **Michel Goossens**, **Serges Pissard**, ainsi que **Remy Narva**, **Sophie Michels** et **Virginie Courtois** de *l'hôpital Henri Mondor, Unité 468 de l'INSERM* qui ont mis à ma disposition l'appareillage et les connaissances nécessaires au développement de l'aspect biologique de cette thèse.

Résumé en français

Les puces à ADN, ont vu le jour à la fin du vingtième siècle. L'utilisation de l'Imagerie par Résonance des Plasmons de Surface dans de tels outils est très prometteuse. En effet, cette technique permet de suivre en temps réel et en parallèle, sans l'usage de marqueur, différentes interactions se déroulant sur une surface métallique. Elle nous a servi pour analyser les interactions ADN/ADN dans le but du diagnostic génétique. Pour cela nous avons fixé des molécules d'ADN biotinylées sur une surface d'or par l'intermédiaire d'une structure auto-assemblée composée successivement un acide thiolé, d'un polymère chargé positivement et de l'ExtrAvidine. L'analyse des interactions ADN/ADN montre que le système employé permet de distinguer la formation d'un double brin d'ADN totalement complémentaires de celle d'un double brin avec une mutation. Cette distinction est nette pour une délétion. Le cas plus subtil d'une substitution nous a poussé à examiner l'effet de la longueur des ADN sur la réponse optique du système. Cette étude a fait ressortir l'influence de la température de fusion des séquences sur le signal obtenu. La représentation des résultats en fonction de ce dernier paramètre a permis de les modéliser, d'expliquer la différence de comportement des diverses molécules utilisées et de prédire le résultat des hybridations entre oligonucléotides quelconques. Ainsi, pour valider notre modèle, nous avons conçu un ensemble de séquences capable de révéler six des plus fréquentes mutations de la mucoviscidose. Les résultats expérimentaux sont en bon accord avec les résultats théoriques. Les premiers essais de diagnostic génétique sont prometteurs.

Mots clés : Imagerie par résonance des plasmons de surface, multicouche auto-assemblée, puce à ADN, mutation, oligonucléotide, hybridation ADN/ADN, diagnostic génétique.

Abstract

Real time optical biochip system: Application to genetic diagnosis.

In the second half of the twentieth century, the world witnessed the birth of new technologies such as DNA biochips. The use of Surface Plasmon Resonance Imaging in those techniques is emerging nowadays. It allows following without using any marker, in real time and in parallel, the interactions taking place on a metal surface often made of gold. We exploit this imaging technique to analyze DNA/DNA interactions in order to achieve a genetic diagnosis. Therefore, we fixed single strands of biotinylated DNA on gold surfaces via a self-assembled structure composed successively by a mercaptoundecanoic acid, a positively charged polymer and an ExtrAvidin layer. The results obtained when studying DNA/DNA hybridization, show that the system optical response depends on the complementarity of DNA strands. As a matter of fact, we could easily determine the presence of a deletion meanwhile the single base mismatch was difficult to detect. To solve this problem we studied the effect of oligonucleotide's length. The results highlighted the importance of DNA's base composition and melting temperature. After representing the sensor's response as a function of DNA's melting temperature calculated under certain conditions of salt concentration, we were able to predict the hybridization signal for any single strand DNA used and to understand why it was difficult to detect the single base mismatch. Based on our prediction method we designed a set of oligonucléotides that allow the detection of six mutations located on the Cystic Fibrosis gene. The results obtained agreed with the calculated value and opened the way for the realization of a DNA chip for genetic diagnosis.

Key words: Surface Plasmon Resonance Imaging, Self-assembled layers, Oligonucleotide, DNA chips, Mutation, Oligonucleotide, DNA/DNA hybridization, Genetic diagnosis.

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
A.1 HISTORIQUE DES PUCES A ADN :	11
A.1.1 Découverte de l'ADN :	11
A.1.2 Origines des puces à ADN :	13
A.1.2.1 Genèse des puces à ADN :	13
A.1.3 Evolutions affectant les puces à ADN :	16
A.1.3.1 Les surfaces rigides [9] :	16
A.1.3.2 La synthèse des oligonucléotides :	16
A.1.3.3 Méthodes de lecture :	16
A.2 PLAN DE LA THESE	17
CHAPITRE I :	19
SYSTEMES DE LECTURE D'UNE PUCE A ADN.....	19
A METHODES DE LECTURE DES INTERACTIONS BIOLOGIQUES :	20
A.1 UNE METHODE DE CHOIX : LA FLUORESCENCE.	21
A.2 METHODES ELECTROCHIMIQUES :	23
A.2.1 Détecteurs potentiométriques :	24
A.2.2 Détecteurs ampérométriques :	25
A.2.3 Détecteurs conductimétriques :	26
A.3 METHODES ACOUSTIQUES :	26
A.4 METHODES OPTIQUES :	28
B LA RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE :	30
B.1 HISTORIQUE :	30
B.2 CARACTERISATION ET UTILISATION DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES DE SURFACE (PLASMON DE SURFACE) :	31
B.2.1 Propriétés des ondes plasmons :	31
B.2.2 Excitation des plasmons de surface :	33
B.2.2.1 Couplage par un prisme :	34
B.2.3 Mesure de l'épaisseur d'une couche biologique mince par RPS :	36
B.2.4 Sensibilité []:	40
B.3 CONFIGURATIONS POSSIBLES ET PROTOCOLE D'UTILISATION :	42

B.3.1	Montage en « mono-capteur » :	42
B.3.2	Montage pour l'imagerie en mode RPS : les multicapteurs :	45
CONCLUSION.....		49
CHAPITRE II :		50
TRAITEMENT CHIMIQUE DE LA SURFACE.....		50
A	ETAT DE L'ART DES TRAITEMENTS DE SURFACE :	52
A.1	SYNTHESE IN SITU :	52
A.2	LIAISON DIRECTE :	53
A.3	ÉLECTROPOLYMERISATION :	53
A.4	LIAISON INDIRECTE : UTILISATION D'UN SYSTEME INTERMEDIAIRE :	54
A.4.1	Système Avidine - Biotine :	54
A.4.2	Système de multicouches :	55
A.4.2.1	Les maleimides et les thiols :	55
A.4.2.2	Ester de NHS et amines :	57
A.4.2.3	Les thiocyanates et les amines :	59
A.4.2.4	Immobilisation par formation d'interactions électrostatiques :	60
B	FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE D'OR :	61
B.1	UTILISATION DE POLYMERES REACTIFS :	61
B.1.1	Description des polymères :	61
B.1.2	Protocoles et résultats :	62
B.2	DEVELOPPEMENT DE LA CHIMIE DE SURFACE UTILISEE DANS CETTE ETUDE :	65
B.2.1	Principe :	65
B.2.1.1	MUA :	65
B.2.1.2	PEI :	66
B.2.1.3	ExtrAvidine :	66
B.2.2	Préparation de la multicouche suivie sur le banc mono capteur :	67
B.2.3	Préparation de la multicouche dans un bécher :	71
B.2.4	Dépôt des oligonucléotides biotinylés :	71
B.2.4.1	Technique de dépôt :	71
B.2.4.2	Optimisations du procédé :	72
CONCLUSION.....		77

CHAPITRE III :	78
MATÉRIEL BIOLOGIQUE ET MUCOVISCIDOSE	78
A DESCRIPTION DU MATERIEL GENETIQUE :	80
A.1 QU'EST-CE QUE L'ADN ?	80
A.2 LES MUTATIONS ET LEURS EFFETS SUR LA STABILITE DU DOUBLE BRIN D'ADN :	84
A.2.1 Les délétions :	85
A.2.2 Les substitutions :	85
A.3 LA TEMPERATURE DE FUSION :	86
A.3.1 Définition de la Température de fusion (T_m) :	86
A.3.2 Paramètres influençant la température de fusion :	87
A.3.2.1 Influence de la séquence :	88
A.3.2.2 Influence de la composition de la solution :	89
A.3.3 Calcul de la température de fusion :	91
A.3.3.1 Formules proposées pour le calcul de la T_m :	91
A.3.3.2 Calcul théorique et comparaison :	95
B LA MUCOVISCIDOSE :	102
B.1 DESCRIPTION PHENOTYPIQUE [158-165] :	102
B.2 DIAGNOSTIC :	103
C DESCRIPTION GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE :	106
C.1 LE GENE DE LA MUCOVISCIDOSE :	106
C.2 TRANSMISSION DE LA MALADIE :	108
CONCLUSION :	109
CHAPITRE IV :	111
REALISATION D'UNE PUCE A ADN	111
A RAPPELS :	113
B FAISABILITE ET SPECIFICITE DU MULTICAPTEUR :	114
B.1 CHOIX DES SONDAS ET DES CIBLES :	114
B.2 DISTRIBUTION DES SEQUENCES SUR LA LAME :	116
B.3 PROTOCOLE EXPERIMENTAL:	117
B.3.1 Mise en route de l'expérience :	118

B.3.1.1	Enregistrement des courbes de réflectivité :	119
B.3.1.2	Choix de l'angle de travail :	123
B.3.1.3	Passivation de la surface :	124
B.3.2	<i>Étude de la spécificité et de la sélectivité du capteur:</i>	124
B.3.2.1	Passage en séquentiel :	125
B.3.2.2	Passage d'un mélange contenant plusieurs séquences :	135
RECAPITULATIF :		138
C OPTIMISATION DE LA DISCRIMINATION POUR UNE SUBSTITUTION :. 139		
C.1	CHOIX DES MUTATIONS ET CONCEPTION DES SONDAS :	139
C.2	PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET ANALYSE DES RESULTATS :	142
C.2.1	<i>Analyse des résultats en fonction de la longueur des oligonucléotides :</i>	151
C.2.2	<i>Analyse en fonction des T_m</i>	156
C.2.3	<i>Modélisation :</i>	161
RECAPITULATIF :		168
D ÉTUDE DE SIX MUTATIONS SUR L'EXON 10 : 169		
D.1	CONCEPTION DES SONDAS :	169
D.1.1	<i>Description de la stratégie :</i>	169
D.1.2	<i>Calcul des T_m :</i>	175
D.1.3	<i>Résultats théoriques :</i>	175
D.2	PREMIERES EXPERIENCES :	178
D.2.1	<i>Protocole expérimental :</i>	180
D.2.2	<i>Résultats expérimentaux :</i>	181
D.2.3	<i>Comparaison entre l'expérience et la théorie :</i>	182
RECAPITULATIF :		185
CONCLUSION :		186
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		187

Liste des annexes

ANNEXES.....	190
ANNEXE 1 : GLOSSAIRE :	190
ANNEXE 2 : PASSAGE DE L'ANGLE D'INCIDENCE INTERNE À L'ANGLE DE RASANCE EXTERNE :	193
ANNEXE 3 : CALCULS DE LA SENSIBILITE DE LA RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE : ...	195
ANNEXE 4 : PROTOCOLES D'UTILISATION DES POLYMERES PACl ET PMACl :	199
ANNEXE 5 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL POUR LA FONCTIONNALISATION DES LAMES D'OR : ..	203
ANNEXE 6 : QUELQUES CHIFFRES CLES :	207
ANNEXE 7 : PARAMETRES THERMODYNAMIQUES DES DIX PLUS PROCHE VOISIN :	208
ANNEXE 8 : MUCOVISCIDOSE, DISTRIBUTION DES 58 MUTATIONS LES PLUS FREQUENTES EN FRANCE :	210
ANNEXE 9 : POSITION DES MUTATIONS ETUDIEES SUR L'EXON 10 DU GENE CFTR :	213
ANNEXE 10 : LISTE DES OLIGONUCLEOTIDES POUR ETUDIER L'EFFET DE LA LONGUEUR :	215
ANNEXE 11 : LISTE DES OLIGONUCLEOTIDES POUR TESTER L'EFFET DE LA T _M	220
ANNEXE 12 : ETUDE THEORIQUE DES 6 MUTATIONS DE L'EXON 10	222
ANNEXE 13 : RESULTATS THEORIQUES ET EXPERIMENTAUX.....	231

TOUS LES MOTS FIGURANT DANS LE GLOSSAIRE SONT SOULIGNES DEUX FOIS DANS LE TEXTE.

Introduction

A l'interface entre la physique, la chimie et la biologie mes travaux de thèse consistent à réaliser un **système optique** capable d'analyser un grand nombre d'interaction bio moléculaires. J'ai étudié en particulier les réactions d'hybridation ADN/ADN dans le cadre du **diagnostic génétique** de la mucoviscidose, maladie grave et très fréquente en europe. Ce sujet pluridisciplinaire s'inscrit dans le cadre d'une discipline récente et en pleine effervescence : les puces à ADN ou biopuces. Il est donc important de connaître l'histoire de cette technologie et son évolution afin de mieux percevoir ses perspectives et son avenir et de mieux situer les travaux exposés dans ce manuscrit.

A.1 Historique des puces à ADN :

A.1.1 Découverte de l'ADN :

L'histoire de la génétique remonte au XIX^{ème} siècle, plus précisément à l'an 1865, quand Gregor Mendel établit les lois de la transmission des caractères héréditaires en observant des petits pois [1]. Une vingtaine d'années plus tard, en 1882, Walther Flemming observe pour la première fois, les acides nucléiques [2]. Le lien entre ces molécules et l'hérédité est démontré en 1944, soit soixante ans plus tard, par Oswald Avery, Colin McLeod et MacLyn McCarty [3]. Ils prouvèrent que l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) renferme le code biochimique de l'hérédité. En 1953, Watson et Crick décrivent la structure en double hélice de la molécule d'ADN [4]. Ce fut une véritable révolution dans le domaine de la génétique qui, depuis, se développa à grande vitesse et devint très populaire.

Les études qui suivirent les travaux de Watson et Crick, démontrèrent que les brins formant la double hélice pouvaient être séparés en augmentant la température ou en utilisant un milieu basique alors que le phénomène inverse, à savoir, l'appariement de deux brins séparés dépendait de la composition des simples brins mis en jeu et de leur degré de complémentarité. L'idée d'exploiter ces propriétés remarquables pour analyser les liaisons entre acides nucléiques, donna naissance à de nombreuses méthodes analytiques basées sur l'hybridation de brins d'ADN. Le champ d'application de ces techniques s'étend à un grand nombre de problèmes biologiques notamment : le séquençage du génome humain, l'étude de l'expression d'un gène ou la recherche des mutations ponctuelles responsables de certaines maladies.

Les puces à ADN font partie de ces nouvelles technologies basées sur la sélectivité de l'interaction entre deux acides nucléiques et dont le développement a été suscité par le séquençage du génome humain. Ce sont des systèmes miniaturisés capables d'analyser en parallèle un grand nombre d'informations génétiques différentes. Grâce à cette technique, il est devenu possible d'identifier et même de doser, en parallèle, un nombre considérable de séquences d'ADN contenues dans un échantillon biologique (sang, biopsie, aliments...). Pratiquement une puce à ADN est constituée d'une surface rigide d'environ 1cm² sur laquelle nous pouvons greffer jusqu'à 400 000 brins d'ADN. Un schéma illustrant la structure d'une telle puce est donnée à la Figure 1 ci-dessous.

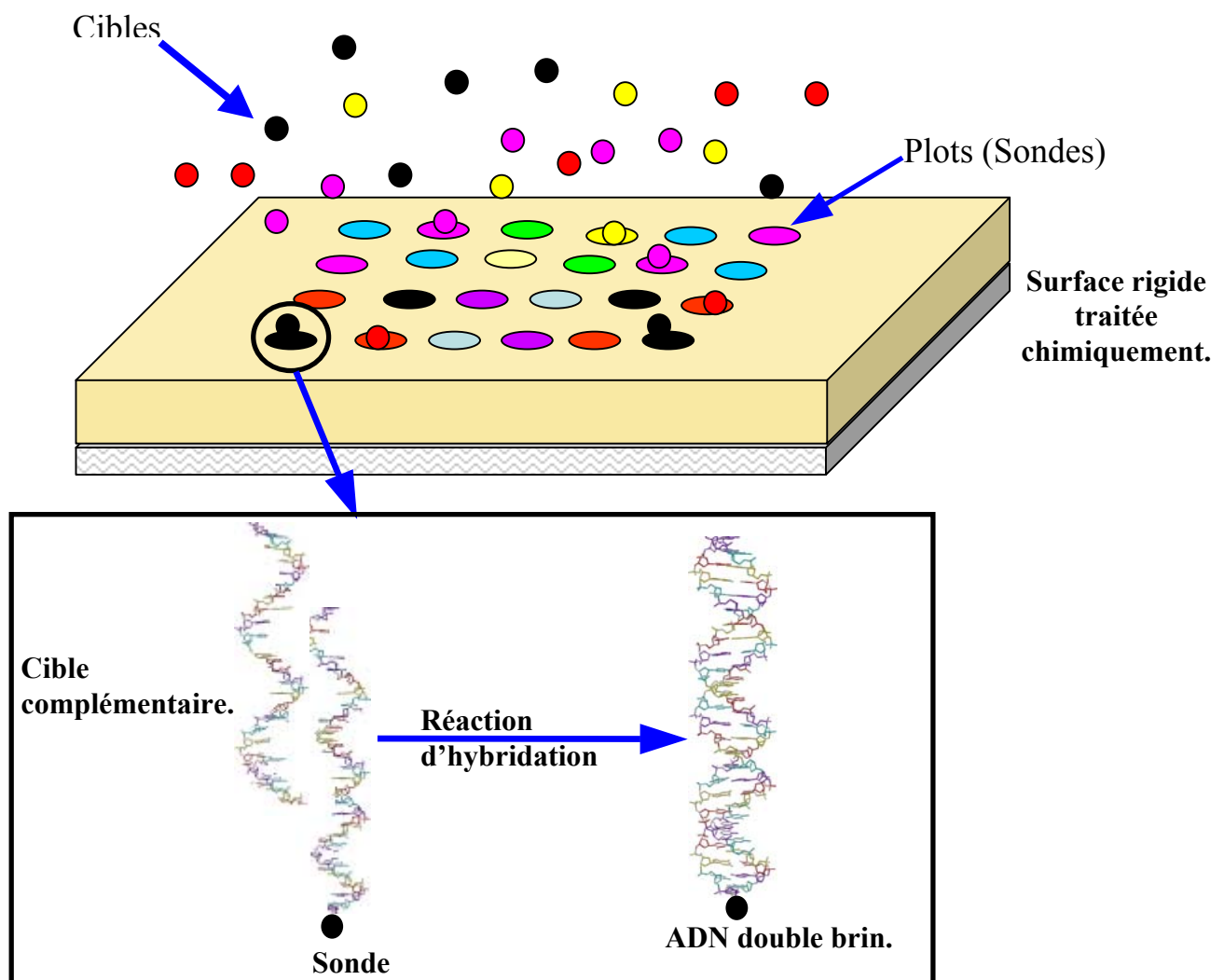


Figure 1: Schéma d'une puce à ADN. Des fragments d'ADN communément nommés sondes, sont fixés sur une surface rigide. Ils sont ensuite exposés à un mélange de différentes cibles. Chaque cible s'hybride à la sonde qui lui est totalement complémentaire.

A.1.2 Origines des puces à ADN :

Plusieurs méthodes analytiques exploitant l'hybridation moléculaire de l'ADN ont été développées. Les premières consistaient à étudier les hybridations entre ADN et ARN messagers afin d'analyser la diversité des séquences, de déterminer la concentration des ARN et aussi le degré d'expression d'un gène. En 1969, M.L. Pardue et J.Gall [5] parviennent à fixer des chromosomes sur une lame de microscope et à étudier leur hybridation avec des ARN messagers marqués par un élément radioactif. Cette réaction leur permet de localiser, par radiographie, la position de séquences spécifiques sur les chromosomes. Leur technique est à la base de la méthode FISH (Hybridation Fluorescente In Situ) développée dans le but de repérer, lors de la division cellulaire, des séquences spécifiques sur des chromosomes étendus sur une surface [6]. Une dizaine d'année plus tard, en 1972, Herbert Boyer et Stanley Cohen introduisent, pour la première fois, des ADN dans des bactéries par l'intermédiaire de plasmides [7] produisant ainsi les ADN recombinants. Au début des années 1970, les méthodes exploitant les ADN recombinants furent utilisées mais leur grand potentiel ne fut exploité qu'à partir de 1975 quand Grunstein et Hogness fournirent les moyens de détecter des séquences spécifiques dans les clones recombinés en appliquant l'hybridation moléculaire directement sur les colonies de bactéries lysées et fixées sur une membrane [8].

A.1.2.1 Genèse des puces à ADN :

Le besoin de mener des analyses à grande échelle se développa en parallèle. La technique de clonage des bactéries permit d'obtenir des librairies de clones. Et, au début des années 80 se développa la technique de fixation des ADN à forte densité sur des membranes de nylon ou de nitrocellulose selon des motifs bien définis. Ces techniques, les 'dots blots', sont les précurseurs des puces à ADN. Elles permirent l'analyse de plusieurs hybridations en parallèle. Il existe plusieurs méthodes pour fabriquer un 'dot blot' dont les plus connues sont : Southern, Northern et Western blots. Le principe de ces trois tests est le même mais leur application est différente. Le Southern blot porte le nom de E.M. Southern et consiste transférer les simples brins d'ADN ayant migré sur un gel d'agarose sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose. L'endroit, où l'espèce étudiée est localisée, s'appelle un plot. Les séquences d'ADN spécifiques sont ensuite identifiées par hybridation des ADN fixés sur la membrane (les sondes) avec des ADN marqués (les cibles). Quand les séquences sont complémentaires, les ADN marqués s'hybrident et peuvent être détectés. Les marqueurs utilisés dans ces techniques sont radioactifs. Le test Northern blot est identique au test Southern blot mais il est utilisé pour l'étude de l'interaction entre des sondes d'ARN et des

cibles d'ADN marqués. Dans un Western blot des protéines sont transférées à partir d'un gel polyacrylamide sur la surface de nylon ou de nitrocellulose et, dans ce cas, on étudie l'interaction entre des protéines fixées et des anticorps marqués.

Les supports utilisés dans la technique des 'dots blots', sont poreux ce qui permet de fixer une grande quantité d'acide nucléique sur une surface de faibles dimensions. De plus les pores fonctionnent comme des puits et empêchent les pertes latérales du volume d'acide nucléique appliqué. Cependant ces surfaces ne permettent pas la délimitation du contour des plots et le contrôle de la quantité d'oligonucléotide fixée.

Pour les besoins du Projet du Génome Humain (HGP), créé en 1990 par le département de l'énergie américain et l'Institut National de la Santé aux USA, dans le but du décryptage du génome, il a été nécessaire d'augmenter la capacité des dots blots, de délimiter le contour des plots et de contrôler leur taille et leur forme. Les membranes poreuses ne remplissaient pas ce cahier de charge et le passage d'un substrat flexible et poreux à un substrat rigide et imperméable s'est donc imposé. En effet, les surfaces rigides possèdent de nombreux avantages [9]. Leurs dimensions ne varient pas contrairement à celles des membranes perméables qui absorbent le solvant et ont tendance à raccourcir et à subir des distorsions lors du séchage. Cette stabilité facilite la localisation des plots et la détermination de leur forme et de leur dimension exacte. D'autre part les acides nucléiques fixés sur une surface rigide sont facilement accessibles ce qui diminue le temps nécessaire pour observer une hybridation efficace et évite les problèmes liés à la diffusion des produits et aux inhibitions stériques dues au confinement des sondes dans les pores des membranes. L'étape de rinçage est aussi plus efficace ce qui diminue le bruit de fond et améliore le rapport signal à bruit. Les faibles différences de signal provenant des différentes espèces déposées sur la surface sont donc facilement détectables. Finalement les supports rigides rendent la réalisation des biopuces rapide et automatisable.

Les premières puces à ADN ont vu le jour avec l'utilisation des supports rigides.

Pour pouvoir suivre les interactions biologiques se déroulant à la surface d'une puce à ADN nous avons besoin de trois composantes essentielles schématisées à la Figure 2. Nous y

retrouvons la surface solide siège des réactions biomoléculaires, un transducteur dont le rôle est de transformer le signal biologique en un signal physique mesurable et finalement un ordinateur pour rassembler les données et les analyser.

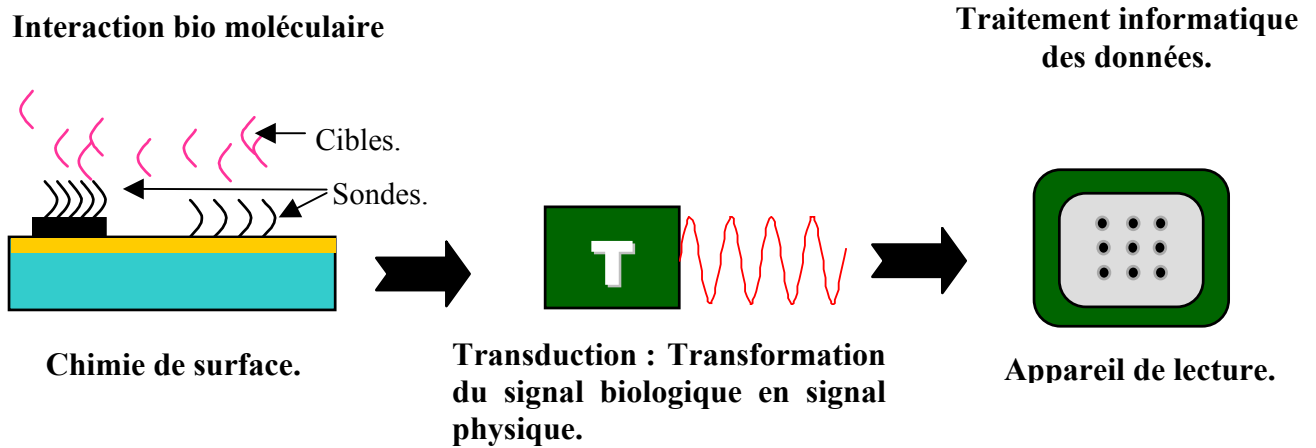


Figure 2: Différents composants d'une puce à ADN. Les interactions biomoléculaires se déroulant à la surface d'une puce à ADN sont traduites en un signal physique par un transducteur. Les signaux ainsi générés sont traités par un ordinateur.

Comme nous commençons à le pressentir, la construction d'une puce à ADN nécessite la collaboration entre scientifiques d'horizons très différents. En effet, l'élaboration de la puce comprend trois étapes cruciales qui sont regroupées sous les rubriques suivantes : la transduction c'est-à-dire la méthode transformant le signal biologique en signal physique détectable et quantifiable (cette partie est l'apanage des physiciens), la chimie de surface permettant la fixation des molécules étudiées sous une configuration matricielle (c'est là que se déploie le talent des chimistes), et le matériel biologique déterminant l'application choisie et orientant l'analyse des résultats (c'est à ce niveau qu'intervient le corps médical). Il est ainsi clair que, physiciens, chimistes, biochimistes, biologistes et médecins ont dû coordonner leurs efforts pour développer et exploiter au maximum cette nouvelle technologie très prometteuse vu son adaptabilité à divers complexes biologiques et ses vastes domaines d'applications (l'étude des gènes [10], les tests sanguins [11], la protéomique [12] la pharmacologie [13],...).

Décrivons maintenant, de façon brève, les principales évolutions advenues dans le cadre de cette technique. Elles affectent aussi bien la surface de base, que la technique de fixation des sondes et le système de transduction.

A.1.3 Evolutions affectant les puces à ADN :

A.1.3.1 Les surfaces rigides [9] :

Avec le début des années 90, les premières surfaces rigides employées furent les supports de verre avantageux par leur faible prix et la facilité avec laquelle nous pouvons les modifier pour fixer de façon covalente des oligonucléotides. Avec l'usage du verre, la détection par marquage radioactif n'est plus une méthode adéquate malgré sa très grande sensibilité. En effet, le rayonnement d'un marqueur radioactif couvre une très large surface. Or, sur le verre, la dimension des plots est faible et leur densité élevée. L'usage d'un tel marquage masque donc certains résultats. En d'autres termes malgré sa grande précision, la radioactivité n'a pas une résolution spatiale suffisante. Pour améliorer cette résolution, des marqueurs fluorescents sont utilisés. Sensible et à grande résolution spatiale, cette méthode présente aussi la possibilité de tester plusieurs espèces à la fois en utilisant simultanément, plusieurs fluorochromes. Elle permet aussi la mesure relative des rapports d'expression des différents ARN messagers étudiés.

D'autres supports furent aussi utilisés, citons-en le polypropylène connu pour sa flexibilité qui le rend malléable et facile à utiliser, ainsi que l'or qui est un métal non oxydable adaptable à certaines techniques de détection que nous verrons plus loin.

A.1.3.2 La synthèse des oligonucléotides :

La synthèse artificielle des oligonucléotides contribua à l'évolution rapide de cette nouvelle technologie. Elle permet de fixer des brins d'ADN pré synthétisés ou de les fabriquer directement sur la surface de la puce, c'est la synthèse in situ, proposée actuellement par la société Affymetrix. Cette technique combine les avantages de la synthèse en phase solide (un rendement très élevé et une très grande pureté du produit) et ceux de la chimie combinatoire (une large gamme de produits peuvent être fabriqués en peu d'étapes). D'un autre côté la synthèse préalable au dépôt, permet le contrôle de la qualité du produit utilisé ce qui est important dans le cadre du diagnostic effectué sur des puces à haute densité.

A.1.3.3 Méthodes de lecture :

De nos jours, se développent de nombreuses méthodes physiques pour la lecture des puces à ADN. La fluorescence occupe toujours la première place, cependant d'autres axes de recherche tendant à supprimer le marquage des cibles sont également à l'étude. La résonance des plasmons de surface émerge petit à petit parmi toutes ces méthodes et s'affirme par son

efficacité et par la simplicité de sa mise en œuvre. Un résumé rapide de ces méthodes est présenté plus loin dans ce manuscrit.

C'est dans ce cadre pluridisciplinaire, que prennent place mes travaux de thèse dont le but est de mettre au point une puce à ADN dédiée au diagnostic génétique de la mucoviscidose et basée sur l'imagerie par résonance des plasmons de surface d'une surface fonctionnalisée et structurée.

A.2 Plan de la thèse

Le premier chapitre de cet ouvrage décrit les différentes méthodes de lecture d'une puce à ADN et développe plus particulièrement le principe de base qui nous a servi au long des expériences : la Résonance des Plasmons de Surface (RPS) ainsi que l'imagerie par RPS. C'est donc, un chapitre dédié aux techniques développées pour l'enregistrement et l'analyse des résultats physiques obtenus suite à une interaction bio moléculaire. Il comportera aussi une description des deux montages optiques que j'ai utilisés au cours de mes années de thèse.

Ensuite, le deuxième chapitre s'attarde sur la chimie de surface utilisée pour fixer les ADN sondes. Ainsi, après un état de l'art décrivant les différentes techniques disponibles, nous décrivons le protocole de traitement des substrats que nous avons mis en place pour fonctionnaliser et structurer la surface.

Le troisième chapitre comportera un descriptif clinique et génétique de la mucoviscidose ainsi qu'un rappel biologique sur la structure, la forme et les propriétés des molécules d'ADN ce qui nous permettra de mieux comprendre les résultats expérimentaux exposés dans le quatrième chapitre.

Finalement, le quatrième chapitre montre la faisabilité d'un capteur multiparamétrique capable d'analyser en temps réel et en parallèle environ 200 interactions bio moléculaires, et ce, sans aucun marquage. La capacité de l'imagerie RPS à détecter une mutation ponctuelle a été démontrée. La modélisation de la réponse du système en fonction de la température de fusion des duplex formés en surface nous a permis de concevoir des sondes adaptées aux puces à ADN dédiées à la mucoviscidose. Nous avons appliqué cette stratégie aux six mutations les plus fréquentes de l'exon 10 du gène CFTR. Les résultats expérimentaux correspondent bien aux résultats prévus.

Une conclusion servira à récapituler les grandes lignes du manuscrit en mettant en relief l'originalité des résultats obtenus. Elle nous servira aussi pour annoncer les travaux futurs qui conduiront à la réalisation d'une puce à ADN pour le diagnostic de la mucoviscidose.

Ainsi, au cours de cette thèse, mon objectif était de réaliser **un système optique** pour le **diagnostic génétique**. Dans ce but, j'ai maîtrisé le montage optique conçu à cet effet et j'ai mis au point un traitement chimique qui prépare la surface à fixer les molécules biologiques étudiées. Je me suis aussi intéressée à l'étude des interactions ADN/ADN pour mettre au point une stratégie permettant de déceler la présence, en solution, d'un fragment d'ADN cible bien déterminé.

Dans ce manuscrit, le terme spécificité désigne l'absence d'interactions entre la cible et la surface de base alors que le mot sélectivité traduit la capacité du capteur à détecter sans ambiguïté une cible donnée, la sensibilité désigne les variations minimales de la grandeur mesurée (indice, épaisseur, concentration...) qui sont détectables par le système

Bonne lecture !

Chapitre I :

Systèmes de lecture d'une puce à ADN



A	METHODES DE LECTURE DES INTERACTIONS BIOLOGIQUES :	20
A.1	UNE METHODE DE CHOIX : LA FLUORESCENCE :	21
A.2	METHODES ELECTROCHIMIQUES :	23
A.2.1	Détecteurs potentiométriques :	24
A.2.2	Détecteurs ampérométriques :	25
A.2.3	Détecteurs conductimétriques :	26
A.3	METHODES ACOUSTIQUES :	26
A.4	METHODES OPTIQUES :	28
B	LA RESONANCE DES PLASMONS DE SURFACE :	30
B.1	HISTORIQUE :	30
B.2	CARACTERISATION ET UTILISATION DES ONDES ELECTROMAGNETIQUES DE SURFACE (PLASMON DE SURFACE) :	31
B.2.1	Propriétés des ondes plasmons :	31
B.2.2	Excitation des plasmons de surface :	33
B.2.2.1	Couplage par un prisme :	34
B.2.3	Mesure de l'épaisseur d'une couche biologique mince par RPS :	36
B.2.4	Sensibilité $[I]$:	40
B.3	CONFIGURATIONS POSSIBLES ET PROTOCOLE D'UTILISATION :	42
B.3.1	Montage en « mono-capteur » :	42
B.3.2	Montage pour l'imagerie en mode RPS : les multicapteurs :	45
	CONCLUSION :	49



Résumé :

Ce chapitre est consacré aux différents systèmes de lecture d'une biopuce. Il dresse en premier, un tableau des principales techniques mises en œuvre. Ensuite dans une seconde étape il détaille la résonance des plasmons de surface : son principe, ses avantages, sa sensibilité, ainsi que les différentes configurations sous lesquelles elle a été utilisée et son mode d'emploi.

A Méthodes de lecture des interactions biologiques :

Comme nous l'avons déjà vu dans l'introduction, les puces à ADN se présentent sous la forme de systèmes miniaturisés comprenant :

- **la puce** proprement dite, c'est-à-dire la surface de base sur laquelle sont fixées les molécules sondes et où se déroule un grand nombre d'interactions biomoléculaires. Un exemple de puces que nous trouvons sur le marché est donné par la Figure 3,
- **le transducteur**, c'est-à-dire le dispositif transformant le signal biologique en un signal analysable,
- et **l'appareil de lecture** qui rassemble les résultats et facilite leur exploitation.

Ce nouveau matériel est très précieux dans les domaines de recherche nécessitant l'identification ou la quantification d'une multitude de séquences spécifiques d'ADN noyées dans une solution complexe d'acides nucléiques. En effet, il permet de suivre en parallèle un très grand nombre d'hybridations.

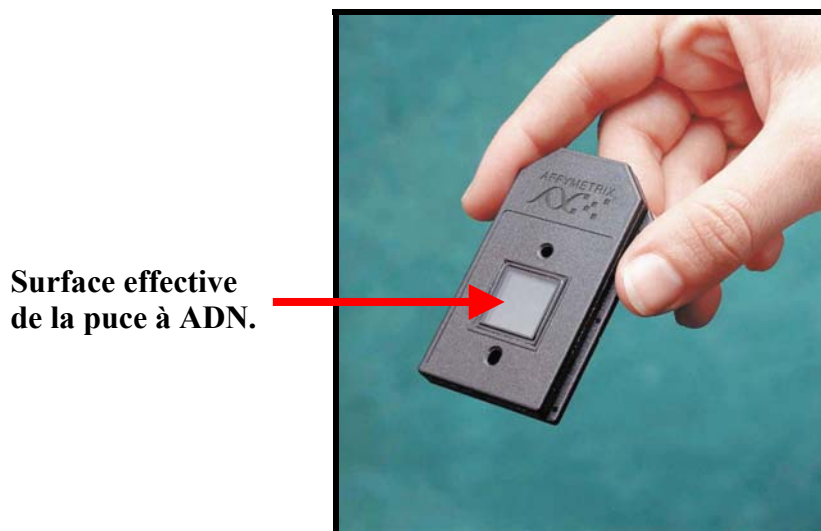


Figure 3: Exemple de puce à ADN de marque Affymetrix présente sur le marché. Les milliers d'interactions cibles/sondes se déroulent sur la surface effective indiquée par la flèche.

Dans cette partie du premier chapitre nous nous intéressons aux divers transducteurs développés pour la lecture des puces à ADN. En effet, plusieurs phénomènes physiques ont été exploités pour transformer le signal résultant d'une interaction bio moléculaire à la surface de la puce en un signal observable et quantifiable. L'utilisation d'un marqueur fluorescent est, de nos jours, la technique la plus répandue auprès des biologistes. Cependant, cette méthode possède plusieurs inconvénients : d'abord, les mesures en fluorescence se font de façon classique en point terminal, c'est à dire après la fin de l'interaction, ce qui empêche le suivi en temps réel des cinétiques et ne permet pas l'accès aux constantes d'affinité, d'association ou de dissociation ; en plus, dans certains cas, l'étape de marquage qui est nécessaire, risque de modifier les propriétés de certaines molécules très sensibles comme les protéines. Finalement cette technique est très coûteuse en produits et en temps. C'est pour cela que d'autres méthodes **électrochimiques**, **acoustiques** et **tout optique** permettant d'éviter toute modification moléculaire et de suivre en temps réel le déroulement des interactions entre ligands et récepteurs, se développent dans les laboratoires de recherche.

Après un très bref rappel exposant les principales techniques employées, nous présenterons le travail que nous avons développé sur la résonance des plasmons de surface, méthode tout optique, qui a été utilisée tout au long des expériences.

A.1 Une méthode de choix : la fluorescence.

Développée vers la fin des années 80, la détection par fluorescence reste la méthode la plus populaire dans le milieu médical. Plusieurs compagnies, dont les plus connues sont Affymetrix [14], Agilent [15] et Nanogen [16], commercialisent des instruments prêts à l'emploi et faciles à manipuler. Après avoir fixé différents fragments d'ADN sur une surface solide (en verre le plus souvent) et dans des matrices à forte densité de plots (ex : 1 plot tous les 16 μm sur une puce vendue par Affymetrix), le principe de la fluorescence (Figure 4) consiste à hybrider les sondes avec des séquences cibles marquées par un fluorophore. Les cibles peuvent être des fragments d'ADN dans le cas du séquençage et du diagnostic médical ou d'ARN dans le cas de l'étude de l'expression d'un gène. La puce obtenue est ensuite rincée pour éliminer toute fluorescence parasite puis lue par un scanner. Les régions fluorescentes indiquent les plots ayant réagi. Comme chaque plot correspond à une séquence d'ADN spécifique, nous pouvons remonter aux séquences fixées ou déterminer les gènes qui se sont exprimés, en nous référant à la complémentarité des fragments d'ADN.

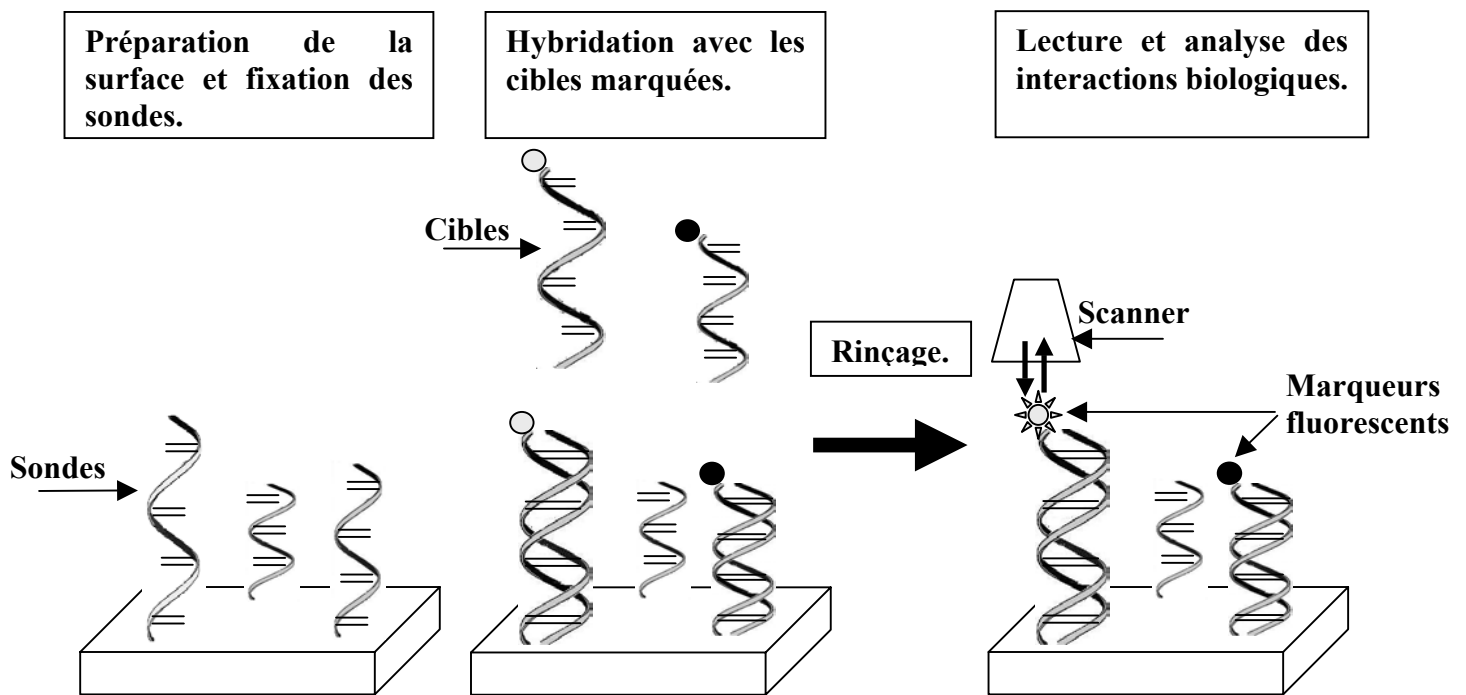


Figure 4: Principe de fonctionnement d'une puce à ADN basée sur la fluorescence. Les fragments d'ADN sondes fixés sur la surface sous forme de plots, sont hybridés à un mélange de cibles marquées par un fluorophore. A la fin de la réaction, la surface est rincée avec un tampon de faible salinité puis les plots fluorescents sont révélés par un scanner.

Des fluorophores sensibles à des longueurs d'onde différentes peuvent être simultanément utilisés. Ceci augmente la capacité d'analyse en parallèle de la puce et la rend plus adaptée à l'étude de l'expression d'un gène, en permettant une mesure relative des rapports d'expressions des différents ARN messagers.

Cette technique est très sensible, car elle permet de mesurer des quantités pouvant atteindre une concentration de l'ordre du pg/ml et est aussi applicable à l'étude des réactions antigène-anticorps. Cependant, malgré ces avantages, et comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, la fluorescence présente deux ennuis majeurs : d'une part, elle nécessite une étape de marquage qui est longue, onéreuse et pouvant entraîner la modification des propriétés du matériel biologique utilisé. D'autre part, elle ne permet pas le suivi en temps réel de la réaction. Nous perdons ainsi toutes les informations concernant les interactions se déroulant avant le rinçage. Ceci est préjudiciable notamment dans le cas où le complexe ligand/récepteur, qui se forme en présence des cibles, se dissocie à l'étape du lavage. C'est le cas, par exemple, des interactions entre des fragments d'ADN ayant une courte longueur (8 bases par exemple). En effet, le rinçage dissocie les duplex faiblement hybridés et ne laisse alors aucune cible fluorescente sur la surface. Nous avons alors tendance à croire qu'aucune

réaction n'a eu lieu. Ce qui n'est pas exact puisque les sondes et les cibles interagissent avant rinçage et que cette dernière étape détruit les duplex formés.

En ce qui concerne l'analyse des interactions en fonction du temps, l'excitation des fluorophores par un champ électromagnétique confiné sur la surface, a donné à la fluorescence une nouvelle compétitivité. En effet, par cette nouvelle technique, les molécules fluorescentes présentes en solution ne sont pas excitées, et donc, de ce fait, elles ne fluorescent pas : seules les molécules voisines de la surface sont détectées [17]. Ce mode d'utilisation de la fluorescence est encore au stade de développement dans les laboratoires.

Reste le problème du marquage. Pour le résoudre, les scientifiques développent des stratégies de transduction permettant d'observer en temps réel et en parallèle les interactions entre les cibles et les sondes en exploitant les variations des propriétés physiques de la surface de la puce. Ces modifications, dues à la formation du complexe ligand/récepteur, se traduisent par des changements **des propriétés électriques, de la masse** ainsi que **des propriétés optiques** de la surface. Comme les molécules utilisées, en particulier les fragments d'ADN, sont nanoscopiques, les variations qu'elles induisent sont faibles. Pour pouvoir les mesurer, les méthodes de transductions utilisées doivent les amplifier.

Voici donc, en bref, les méthodes d'analyse les plus répandues. Elles sont groupées en trois catégories : les méthodes **électrochimiques**, étudiant les variations de charge, les méthodes **acoustiques**, exploitant les variations de masse et les différentes méthodes **optiques**, mettant à profit les variations des propriétés optiques de la surface. Cette dernière catégorie de transducteurs sera décrite très brièvement car elle a été traitée de façon très détaillée dans la thèse d'Emmanuel Maillart, un autre doctorant de notre équipe [18].

A.2 Méthodes électrochimiques :

Les senseurs électrochimiques forment le groupe de capteurs le plus ancien. Ces détecteurs révèlent les interactions biologiques en enregistrant les variations de la densité de charges présente en solution ou sur une surface comprise entre deux électrodes. Ils sont classés en trois catégories [19]: les détecteurs **potentiométriques**, **ampérométriques** et **conductimétriques**. Initialement destinés à la détection des électrolytes et des métabolites contenus dans le sang, ces techniques sont adaptables à l'étude des interactions ADN/ADN [20].

A.2.1 Détecteurs potentiométriques :

Les détecteurs potentiométriques mesurent l'accumulation des charges électriques à la surface d'une électrode. Pratiquement cela se traduit par une mesure d'une différence de potentiel entre une électrode de mesure et une électrode de référence pour une intensité de courant nulle. Le principe de mesure est gouverné par l'équation de Nernst [21] qui relie la variation de potentiel au logarithme de la concentration des ions mesurés. Ces capteurs existent sous trois versions différentes :

Dans la première, les réactions qui se déroulent en solution produisent des ions spécifiques. Deux électrodes sont plongées dans la solution à analyser. L'une d'entre elles, l'électrode de mesure, est couverte d'une membrane sélective perméable aux ions produits. L'autre, l'électrode de référence, est imperméable. La différence de potentiel entre les deux électrodes est enregistrée. Elle permet d'analyser la réaction. Ce principe est connu sous le nom de ISE pour ion-selective membrane qui est notamment à la base des pH mètres (Figure 5).

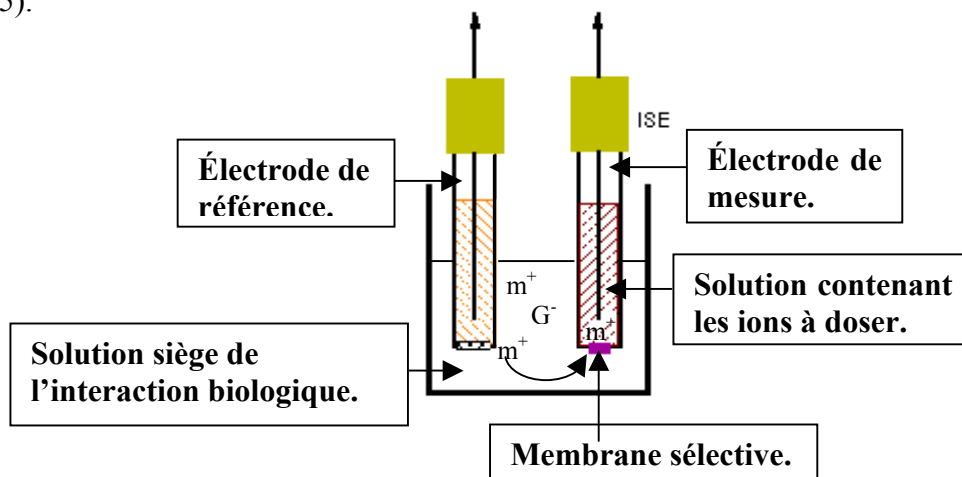


Figure 5: Principe de détection par ISE. Les interactions se déroulant en solutions produisent des ions spécifiques. Deux électrodes sont plongées dans cette solution. L'une d'entre elles, l'électrode de mesure, est couverte d'une membrane perméable aux ions formés. La deuxième, l'électrode de référence, est couverte d'une membrane imperméable. Les ions résultant de la réaction chimique traversent la membrane perméable et induisent une différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de mesure.

Dans la deuxième, les sondes sont directement fixées sur l'électrode de mesure qui constitue alors la surface où se déroule l'interaction. Elle détecte donc directement les accumulations de charges. Ces dernières sont reliées à la concentration des cibles. L'interaction est ainsi suivie en direct par une variation de potentiel.

Enfin, dans la troisième version, les sondes sont immobilisées sur la grille d'un transistor à effet de champ [22] (Figure 6). Lorsque la structure du transistor (un semi-conducteur (Si) recouvert d'un diélectrique (SiO_2)) est placée sous tension, un courant, sensible aux modifications de charges du semi-conducteur, circule entre la source et le drain. Or les interactions cibles/sondes entraînent une variation de la densité de charge à l'interface Si/SiO_2 . Une mesure de la variation de la tension, établie entre la grille et la source afin de maintenir constante la valeur du courant, permet donc de repérer les associations spécifiques entre sondes et cibles. Cette technique, remarquable par la simplicité de son principe de fonctionnement, a été mise au point au début des années 1970 [23]. Dans le cadre des interactions ADN/ADN, J. Fritz et al. [22] ont noté que ce type de capteur possède une limite de détection de 2nM.

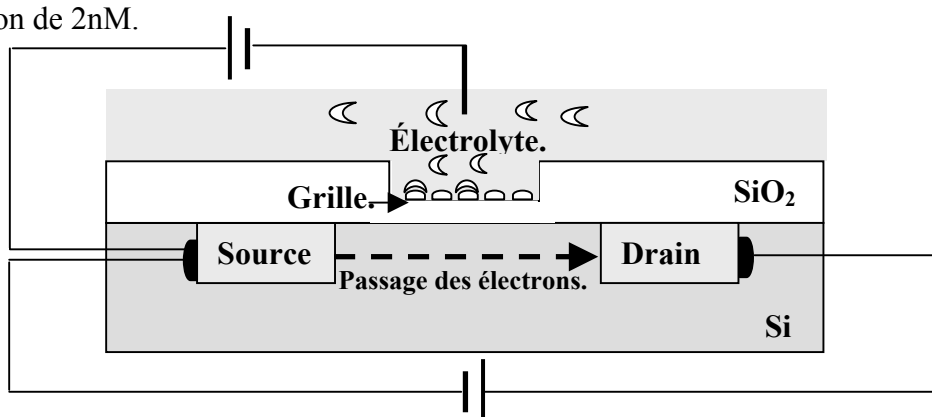


Figure 6: Détection par l'intermédiaire d'un transistor à effet de champ. Les sondes sont fixées sur la grille du transistor à effet de champs. Les interactions cibles/sondes sont suivies en temps réel sous forme de variation de potentiel entre la grille et la source.

Parmi les avantages des capteurs potentiométriques citons la simplicité de leur mode d'emploi ainsi que la petite taille des transistors à effet de champ. Cependant, toutes ces techniques, à l'exception du transistor à effet de champs, ont une faible sensibilité qui est typiquement de l'ordre du μM . En plus, le bruit de fond provenant des différents ions présents en solution est très élevé.

A.2.2 Détecteurs ampérométriques :

Les détecteurs ampérométriques [24] mesurent, à tension constante, la variation de courant généré par des réactions d'oxydoréduction se déroulant entre deux électrodes. L'une des électrodes est couverte d'une enzyme et la réaction enzymatique produit généralement des molécules d' H_2O_2 que l'on mesure. L'utilisation de ces capteurs pour étudier l'hybridation entre brins d'ADN est possible. En effet, l'oxydation de la guanine suffit pour induire le

courant nécessaire pour les mesures. Au niveau sensibilité, ces capteurs sont beaucoup plus sensibles que les capteurs potentiométriques. Leur limite de détection est de l'ordre de 10 nM.

A.2.3 Détecteurs conductimétriques :

Les détecteurs conductimétriques [25] mesurent quant à eux, les variations de la conductivité ou de l'impédance faisant suite à une interaction biochimique. Plusieurs approches ont été adoptées pour réaliser de tels appareils. L'une d'entre elles consiste à utiliser des enzymes pour augmenter ou diminuer les concentrations d'ions produits par la réaction étudiée. Une autre approche, qui paraît prometteuse, consiste à mesurer la capacitance en courant alternatif. Cette dernière dépend de l'épaisseur du milieu isolant formé par le complexe antigène-anticorps dans le cadre d'une étude en immunologie. Ces techniques sont très sensibles (30 pM) cependant elles sont particulièrement affectées par la température, par tout processus électrique se déroulant à la surface (exemple : processus de transport d'ions...) et par les interactions non-spécifiques.

Parmi ces trois types de détecteurs électrochimiques, les transistors à effet de champ ainsi que les capteurs ampérométriques sont les mieux adaptés aux interactions ADN/ADN. L'équipe de Mikkelsen a notamment démontré l'utilité de cette dernière technique dans la détection de la délétion $\Delta F508$ associée à 70% des malades atteints de mucoviscidose [26].

A.3 Méthodes acoustiques :

Les capteurs acoustiques (Figure 7) utilisent des matériaux piézoélectriques, en particulier les cristaux de quartz, dont les fréquences de résonance dépendent de la configuration du capteur [27] et de la fréquence du signal électrique qui leur est appliqué. Les changements de masse à la surface du cristal entraînent une diminution de sa fréquence d'oscillation. Les réactions peuvent ainsi être suivies en direct. Ces détecteurs, sensibles à une variation de masse de 10^{-1} à 10^{-2} ng, sont limités par les vibrations parasites extérieures au dispositif ainsi que par les impuretés contenues dans l'échantillon et qui entraînent des réactions non spécifiques.

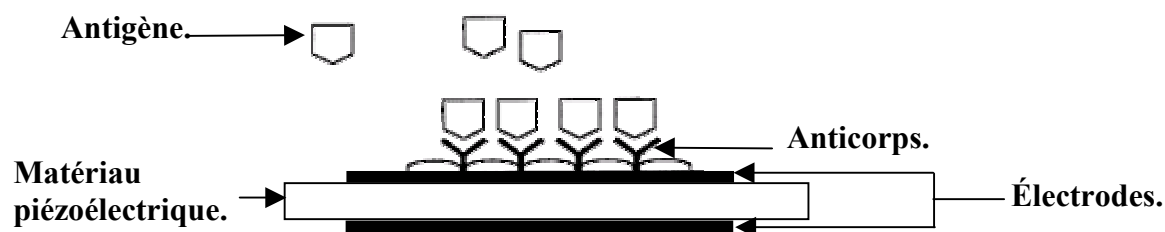


Figure 7: Schéma d'un détecteur acoustique. Les interactions biologiques se déroulant à la surface d'un détecteur acoustique entraînent une variation de la masse à la surface du matériau ce qui induit une diminution de sa fréquence de vibration. Le suivi de ces variations en temps réel, permet d'observer les interactions cibles/sondes.

Actuellement, l'utilisation des micro-leviers est une autre technique acoustique qui se développe [28] dans les laboratoires. Elle appartient au monde des nanotechnologies et consiste à mesurer les variations de masse résultant de l'interaction bio moléculaire sur la surface d'un micro levier. Ces perturbations se traduisent par une déflexion du bras de levier nanométrique (Figure 8) et par une variation de sa fréquence de vibration. Par exemple, dans le cas des interactions ADN/ADN, l'hybridation entraîne une augmentation de la masse déposée sur la surface supérieure du bras de levier. La tension exercée sur cette surface augmente et le bras de levier s'infléchit. La mesure de cette déflexion par l'intermédiaire d'un microscope à force atomique permet de suivre le déroulement de l'interaction. Le dépôt de masse change aussi la fréquence de vibration propre du bras de levier. Une excitation acousto-mécanique ou magnétique permet d'évaluer cette variation et de remonter à la masse déposée.

En combinant la mesure de la déflexion et celle de la variation de fréquence, J. Tamayo et al. ont pu observer une variation de masse de l'ordre du pg [29].

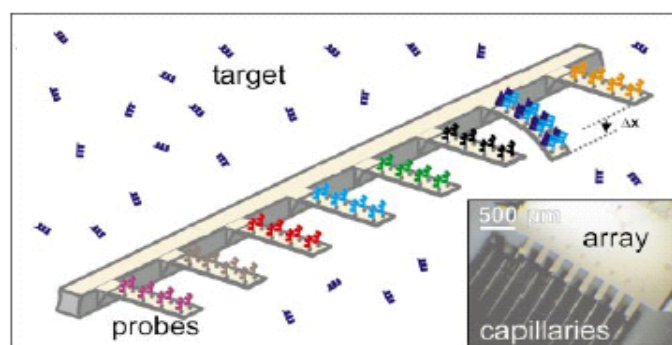


Figure 8 : Cette figure, tirée de la référence [29], illustre le fonctionnement des bio capteurs à bras de levier. Les fragments d'ADN sondes sont fixés sur des bras de leviers nanométriques. L'hybridation cible/sonde entraîne une augmentation de la masse déposée sur le levier par conséquent il s'infléchit et sa fréquence de vibration varie. La déflexion Δx est mesurée par microscopie à force atomique tandis que la variation de la fréquence de vibration est détectée en appliquant une excitation acousto-mécanique ou magnétique.

A.4 Méthodes optiques :

Les variations du coefficient d'absorption, de la fluorescence et de l'indice de réfraction de la surface d'un capteur affectent les propriétés optiques du faisceau lumineux qu'elle réfléchit (intensité, phase, polarisation...). Ces informations, transportées par la lumière, sont à la base des capteurs optiques qui forment le plus large groupe de transducteurs [30].

La majorité de ces capteurs (95 %), utilisent la technique de la fluorescence exposée plus haut. Les autres méthodes font appel à des phénomènes d'interférence en lumière monochromatique (FarField) ou poly-chromatique (système cannelé). Elles mesurent la variation de l'indice de réfraction induite, à la surface, par l'interaction biologique. Ceci revient à mesurer les effets sur la polarisation et sur la phase du faisceau réfléchi par la surface. Les capteurs optiques issus de cette dernière technologie sont basés sur l'ellipsométrie ou sur l'utilisation des ondes évanescentes (ex : **La Résonance des Plasmons de Surface, les miroirs résonants, les guides d'ondes...**).

Comme nous l'avons déjà mentionné, les diverses techniques optiques ont été exposées en détail dans la thèse d'Emmanuel Maillart, autre doctorant de notre équipe. C'est pourquoi nous nous contenterons de décrire dans cette thèse la résonance des plasmons de surface, méthode de transduction que nous avons utilisée dans toutes les expériences. Cette technique exploite les ondes évanescentes et a été mise au service de la biologie au début des années 1980 quand Liedberg et al. ont montré son efficacité dans la détection de gaz et de composants biochimiques [31]. Plusieurs sociétés dont la plus importante est Biacore AB (Suède) [32] ont investi dans le développement des instruments à base de la résonance des plasmons de surface et ont acquis un savoir-faire et une maîtrise du procédé qui rendent cette technologie de plus en plus facile à utiliser. L'introduction de ces appareils de mesure fonctionnant en mono capteur, dans les laboratoires de chimie, de biologie et même dans le monde médical a entraîné une véritable révolution dans l'étude des interactions bio moléculaires. En effet, cette technologie a permis de suivre en temps réel et sans aucun marquage des cibles, le déroulement des réactions biologiques entre un ligand et son récepteur et ainsi, de remonter aux caractéristiques des interactions observées (constantes d'association et de dissociation [33]) et aux propriétés des molécules étudiées (trouver la séquence d'ADN, la nature de l'anticorps...).

Ainsi, la résonance des plasmons de surface est de plus en plus implantée dans les laboratoires de recherche en raison de sa simplicité, de son élégance et de son large domaine d'application qui s'étend de la défense, à la détection des OGM [34], et même à la protéomique [35]. Nous l'avons utilisée sous deux configurations différentes : dans la première, l'analyse des interactions a été effectuée en mono capteur c'est à dire sur un plot unique et large (c'est le principe de l'appareil vendu par Biacore), et, dans la deuxième qui n'est autre que l'imagerie par résonance des plasmons de surface, l'étude a été menée en parallèle, sur plus d'une centaine de plots. Les paragraphes suivants expliquent le phénomène physique et décrivent les systèmes optiques mis en place au laboratoire ainsi que leur mode d'emploi.

B La Résonance des Plasmons de Surface :

La Résonance des Plasmons de Surface (RPS) est une technique optique exploitant les ondes électromagnétiques de surface pour sonder les variations de masse, d'indice, et d'épaisseur survenant à l'interface entre un métal et un diélectrique. Elle permet de suivre en temps réel, et sans aucun marquage, toute sorte d'interaction se déroulant sur une surface métallique. Dans les paragraphes suivants, après un bref historique, je décrirai les propriétés de l'onde électromagnétique de surface (les plasmons de surface), une technique d'excitation de ces ondes, ainsi que la sensibilité de la méthode et ses limites. J'aborderai aussi les différentes configurations que j'ai maîtrisées et utilisées pour suivre, au cours du temps, le traitement chimique de la surface ainsi que les interactions ADN/ADN. Finalement, je m'attarderai sur la description d'une extension de cette technique à l'étude de plusieurs interactions en parallèle. C'est l'imagerie par résonance des plasmons de surface utilisée dans le but d'une détection simultanée d'un grand nombre d'interactions se déroulant à des endroits différents de la surface.

B.1 Historique :

La Résonance des Plasmons de Surface est un phénomène optique découvert pour la première fois en 1902 par R.W. Wood. Alors qu'il observait le spectre d'une source continue de lumière blanche en utilisant un réseau de diffraction en réflexion, il a remarqué de fines bandes sombres dans le spectre diffracté [36]. L'interprétation théorique de cette anomalie a été donnée en 1941 par U. Fano qui l'a associée à l'onde électromagnétique de surface (plasmon de surface) se propageant à la surface du réseau [37]. En 1968 Otto [38] puis Kretschmann et Raether [39] ont mis au point deux configurations différentes pour exciter les plasmons de surface en utilisant la réflexion totale atténuée.

Suite à ces travaux, la résonance des plasmons de surface a été étudiée sous tous ses aspects et a fait l'objet de nombreuses recherches et publications. Ainsi Kochering et al. ont analysé les propriétés de la phase de l'onde plasmon [40], Boussad s'est intéressé à la grande résolution obtenue en employant la spectroscopie par résonance des plasmons de surface [41] tandis que l'équipe de Lampercht s'est penchée sur la propagation de l'onde plasmon dans des couches métalliques microscopiques [42]. Plus récemment encore, Kurihara a même émis une

nouvelle théorie dans le but d'élaborer des capteurs basés sur la résonance des plasmons de surface à l'interface entre un métal et un milieu diélectrique absorbant [43]. D'autre part, la revue Sensors and Actuators B a consacré à la Résonance des Plasmons de Surface un numéro spécial paru en 1999 [44].

Le domaine d'application de cette technique est large et très diversifié. Il s'étend de la détermination des indices et des épaisseurs des couches minces métalliques et organiques [45, 46] à son utilisation comme principe de base pour un capteur biologique capable de détecter des produits PCR [47], des interactions entre enzymes et substrat [48], des interactions antigènes/anticorps [49], des interactions ADN/protéines [50], des virus tel le SIDA [51]... L'avènement de l'imagerie par résonance des plasmons [52, 53, 54] de surface a élargi la capacité de cette méthode à l'étude en parallèle de quelques centaines d'interactions bio moléculaires. Cette nouvelle configuration rend la résonance des plasmons de surface de plus en plus adaptée aux besoins du monde biomédical qui cherche à tester un grand nombre de molécules d'un coup, vu le gain de temps et de produits que cela représente.

B.2 Caractérisation et utilisation des ondes électromagnétiques de surface (plasmon de surface) :

B.2.1 Propriétés des ondes plasmons :

Les plasmons de surface sont des ondes électromagnétiques se propageant à l'interface entre deux milieux de permittivité opposée en l'occurrence un métal et un diélectrique. La littérature traitant de la théorie ainsi que des méthodes d'excitation des plasmons et de leurs caractéristiques propres est abondante : citons-en deux ouvrages [55, 56]. En résumé le phénomène des plasmons de surface peut être décrit comme étant une oscillation longitudinale collective des électrons libres dans un métal. C'est donc une fluctuation de la densité de charge dans le temps et dans l'espace. D'après les lois de l'électromagnétisme, l'onde électromagnétique de surface (OES), résultant d'une telle fluctuation, présente une décroissance exponentielle de part et d'autre de l'interface, possède une polarisation transverse magnétique (TM) et se propage selon l'axe des X (Figure 9).

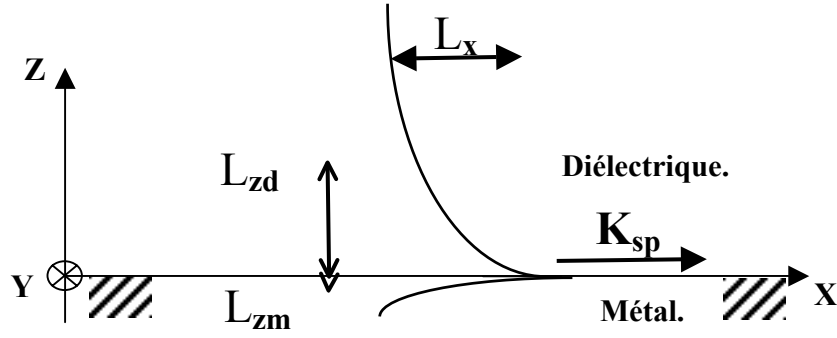


Figure 9: Profil de l'amplitude de l'onde plasmon se propageant sur l'interface métal diélectrique. Le champ est évanescents des deux côtés de l'interface et est concentré dans le milieu diélectrique. Une faible variation des propriétés optiques de ce milieu sera détectée par l'onde plasmon. Dans nos conditions expérimentales, L_x , L_{zd} et L_{zm} , sont typiquement de l'ordre de $10\ \mu\text{m}$, $100\ \text{nm}$ et $15\ \text{nm}$ respectivement. Le calcul de ces grandeurs est détaillé à la page suivante.

Etant évanescence, l'onde électromagnétique de surface se propage donc sur une distance limitée suivant l'axe des X et l'axe des Z. Elle est caractérisée par une longueur de propagation L_x et une profondeur de pénétration dans chacun du métal (L_{zm}) et du diélectrique (L_{zd}). Les profondeurs de pénétration ainsi que la longueur de propagation, correspondent à la distance où l'amplitude du champ vaut $1/e$ de sa valeur maximale. L_x représente la résolution spatiale de la méthode c'est-à-dire la dimension minimale nécessaire pour observer le phénomène. L_{zm} et L_{zd} , correspondent aux distances maximales pour lesquelles le champ évanescence est encore sensible à toute variation survenant respectivement dans les milieux métalliques et diélectriques. Ces grandeurs sont calculées à partir de l'expression du vecteur d'onde de l'onde plasmon donné par l'équation ci-dessous :

$$K_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad \text{Eq. 1}$$

Où ω représente la fréquence angulaire, c la célérité de la lumière dans le vide, ϵ_m et ϵ_d les permittivités respectives du métal et du diélectrique. ϵ_m étant un nombre complexe, la constante de propagation K_{sp} l'est aussi. Elle s'écrit alors $K_{sp} = k_r + jk_i$ où k_r et k_i sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire de K_{sp} . Les longueurs L_x , L_{zd} , L_{zm} ont pour expression :

$$L_x = \frac{c}{2\omega} \left\{ \text{Im} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \right\}^{-1} \quad \text{Eq. 2}$$

$$L_{zd} = \frac{c}{2\omega} \left\{ \text{Im} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_d^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \right\}^{-1} \quad \text{Eq. 3}$$

$$L_{zm} = \frac{c}{2\omega} \left\{ \text{Im} \left(\sqrt{\frac{\epsilon_m^2}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \right) \right\}^{-1} \quad \text{Eq. 4}$$

Exemple : Dans le cadre de nos expériences, nous utilisons une longueur d'onde $\lambda=660$ nm, un milieu diélectrique de permittivité $\epsilon_d = 1.78$ et de l'or de permittivité supposée égale à $\epsilon_m = -13.59 + j 0.95$. Nous obtenons ainsi une résolution spatiale $L_x = 7 \mu\text{m}$, une profondeur de pénétration dans le métal $L_{zm} = 13.3 \text{ nm}$, et dans le diélectrique $L_{zd} = 101.4 \text{ nm}$. La profondeur de pénétration dans le milieu diélectrique (L_{zd}), déterminant la sensibilité du système aux variations d'indice, est largement suffisante pour toutes les expériences exposées plus tard. En effet, nous cherchons à mesurer des variations de réflectivité causées par l'hybridation de fragments d'ADN compris entre 8 et 40 bases ce qui correspond à des variations d'épaisseurs dans le milieu diélectrique comprises entre 2.72 et 13.6 nm si les fragments déposés sont parfaitement alignés et tendus.

Comme nous pouvons le constater dans l'exemple, les profondeurs de pénétrations sont plus faibles dans le métal que dans le diélectrique ($L_{zm} < L_{zd}$), et le champ est confiné ($\approx 90\%$) au voisinage de l'interface métal/diélectrique du côté du diélectrique. L'onde plasmon est donc sensible à toute variation de l'indice de ce dernier milieu. Cette sensibilité est quantifiée plus tard dans le manuscrit.

B.2.2 Excitation des plasmons de surface :

Générer une onde plasmon revient à faire interagir un faisceau lumineux incident avec les ondes électromagnétiques de surface. Ceci est possible quand la composante longitudinale du vecteur d'onde incident ($k_x = \frac{\omega}{c} \sin(\varphi)$)* est égale au vecteur d'onde correspondant à l'onde plasmon (K_{sp} donné par Eq.1). Or, k_x est inférieur à K_{sp} , donc, les plasmons de surface ne peuvent pas être excités par une lumière directement incidente sur une surface métallique non rugueuse. Pour observer les ondes plasmons, il faut réaliser l'égalité $k_x = K_{sp}$ en augmentant la valeur de k_x . Ce but peut être atteint de deux façons :

* L'angle φ est défini à la Figure 10 de la page suivante.

- 1- en faisant passer la lumière incidente à travers un milieu d'indice de réfraction supérieur à celui du milieu diélectrique siège des ondes plasmons,
- 2- en gravant un réseau sur la surface métallique.

Nous détaillerons en particulier le premier cas qui consiste à exciter les plasmons en éclairant l'interface métal/diélectrique à travers un prisme. C'est le couplage par un prisme. Les autres cas sont bien décrits dans les deux ouvrages cités plus haut ainsi que dans la thèse d'Emmanuel Maillart [18].

B.2.2.1 Couplage par un prisme :

Pour coupler une onde lumineuse incidente aux ondes électromagnétiques de surface nous pouvons utiliser la configuration de Kretschmann ou celle d'Otto [56]. Dans notre laboratoire nous avons adopté celle de Kretschmann [39] représentée à la Figure 10.

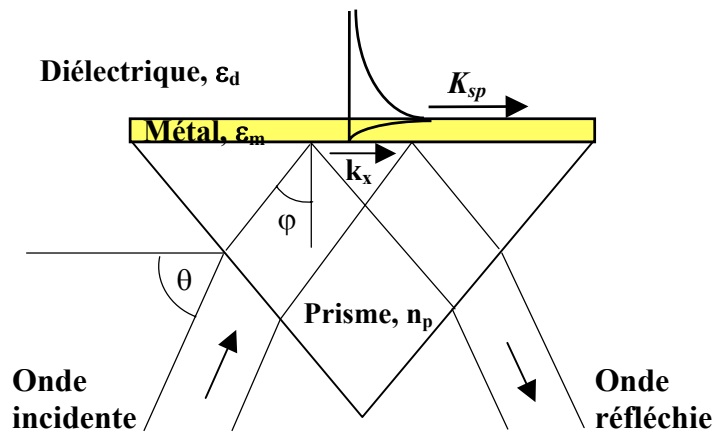


Figure 10 : Configuration de Kretschmann. Une onde électromagnétique polarisée TM se réfléchit totalement à l'interface prisme/métal sous un angle d'incidence interne égal à φ .

Pour un certain angle φ_0 la condition $n_p \sin(\varphi_0) = \text{Re}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right)$ est vérifiée et l'énergie

transportée par la lumière incidente est transférée aux modes plasmons de la surface métallique. On dit alors que l'onde lumineuse incidente est couplée aux ondes plasmons. L'angle θ est **l'angle de rasance externe** dont nous nous servons pour effectuer nos mesures expérimentales et tracer nos courbes théoriques. La relation entre θ et φ est donnée dans l'Annexe 2.

NB.: Pour des raisons pratiques, l'angle que nous avons mesuré expérimentalement est l'angle de rasance externe noté θ sur la figure précédente. De ce fait, les courbes théoriques et expérimentales, présentées dans ce manuscrit, ont été tracées en fonction de θ .

Dans cette configuration une couche mince d'or est déposée sur la base d'un prisme. Un faisceau lumineux polarisé transverse magnétique éclaire cette base où il subit une réflexion totale. La composante longitudinale du vecteur d'onde de la lumière incidente est ainsi amplifiée et vaut $k_x = n_p \frac{\omega}{c} \sin(\varphi)$ où n_p est l'indice du prisme, ω la fréquence de l'onde, c la célérité de la lumière, et φ l'angle d'incidence interne (Figure 10). Pour une certaine valeur de φ la condition d'accord de phase, traduite par l'équation :

$$n_p \sin(\varphi_0) = \text{Re}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right) \quad \text{Eq. 5}$$

est vérifiée. L'onde évanescente, produite à l'interface prisme/métal durant la réflexion totale, est alors couplée aux modes plasmons de la surface métallique. Les plasmons de surface sont ainsi créés. La formation de ces ondes est révélée par un pic d'absorption qui apparaît sur la courbe représentant la variation de l'intensité de l'onde réfléchie en fonction de l'angle d'incidence.

En d'autres termes, nous observons le phénomène de la résonance des plasmons de surface de la façon suivante : Une mince couche métallique est fixée à la base d'un prisme de verre d'indice n_p . Une onde électromagnétique incidente polarisée transverse magnétique (TM) traverse le prisme et se réfléchit sur sa base métallisée. Quand l'angle d'incidence interne vérifie la condition d'accord de phase (Eq. 5), l'énergie, transportée par les photons incidents, est transférée aux ondes plasmons. Ce transfert entraîne une diminution visible de l'intensité de l'onde réfléchie. En enregistrant la réflectivité en fonction de l'angle de rasance externe θ nous obtenons une **courbe de réflectivité** présentant un pic d'absorption à l'angle θ_0 . Un exemple théorique de ces courbes est représenté à la Figure 11.

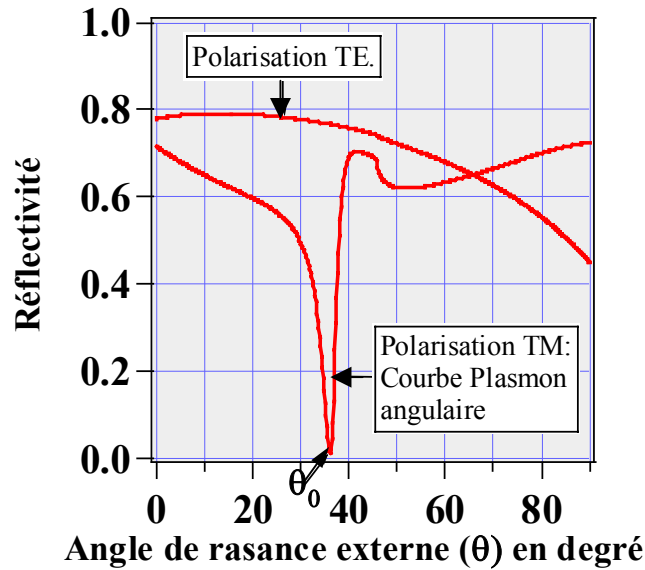


Figure 11: Courbes de réflectivité, tracées en choisissant une longueur d'onde incidente de 660 nm, une permittivité de l'or $\epsilon_m = -13.59 + j 0.95$, une épaisseur d'or = 48 nm et une permittivité du milieu diélectrique $\epsilon_d = 1.78$ correspondant à un indice $n_d = 1.334$. Le prisme utilisé a un indice de 1.720 et un angle au sommet de 60°. L'angle θ_0 correspond à l'angle auquel la lumière incidente polarisée transverse magnétique (TM) est couplée aux ondes plasmons. C'est l'angle de réflectivité minimale. La réflectivité en polarisation transverse électrique (TE) est aussi représentée en fonction de l'angle d'incidence. Elle met en évidence que les plasmons de surface sont uniquement observés en polarisation TM. La courbe de réflectivité tracée pour un faisceau incident polarisé TM, est aussi appelée courbe plasmon angulaire.

B.2.3 Mesure de l'épaisseur d'une couche biologique mince par RPS :

Comme nous l'avons vu précédemment, le champ électromagnétique des ondes plasmons pénètre dans le milieu diélectrique, et ses caractéristiques (L_x , L_{zd} , L_{zm}) dépendent de l'indice de réfraction de ce milieu. Il peut donc nous servir de sonde pour détecter, en les amplifiant, les variations d'indice survenant dans le milieu diélectrique. En effet, une très faible variation d'indice, associée à un dépôt de masse, entraîne une variation de l'angle vérifiant la condition d'accord de phase (Eq. 5) et donc un décalage de la courbe de réflectivité. Ce phénomène est illustré à la Figure 12 où nous avons représenté deux courbes de réflectivité. La première représente la réflectivité d'une mince couche d'or, fixée sur la base d'un prisme, avant le dépôt d'une couche de 2.5 nm d'ExtrAvidine, protéine que nous utiliserons tout au long de nos expériences. La deuxième, met en évidence le décalage de la courbe de réflectivité, de la même couche d'or, suite au dépôt d'une mono-couche de la protéine citée précédemment.

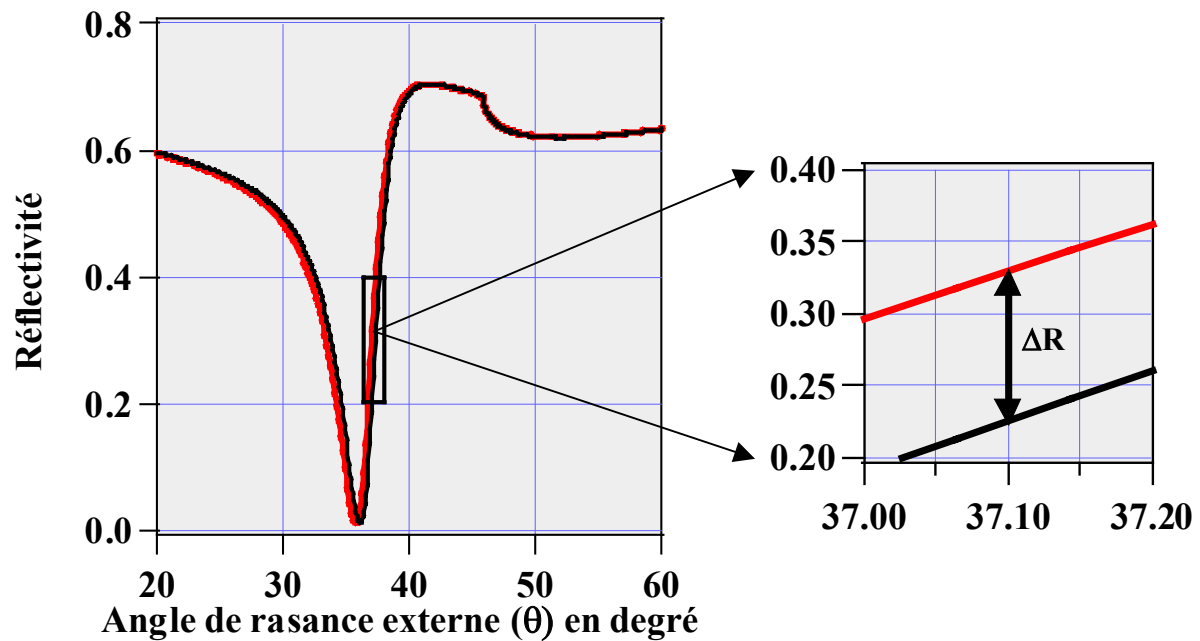


Figure 12: Cette figure représente deux courbes de réflectivité tracées pour une même couche d'or fixée sur la base d'un prisme d'indice 1.72 et d'angle au sommet 60°. Le prisme métallisé est éclairé par une lumière monochromatique de longueur d'onde égale à 660 nm. La courbe noire est obtenue avant le dépôt de 2.5 nm d'ExtrAvidine d'indice $n=1.45$ alors que la courbe rouge est enregistrée après le dépôt de la protéine (2.5 nm). La partie agrandie met en évidence le décalage des courbes ainsi que la variation de la réflectivité (ΔR) à angle fixe pour un milieu diélectrique de permittivité $\epsilon_d=1.78$.

Comme nous venons de le voir, pour un angle d'incidence interne fixe, le décalage du pic d'absorption se traduit par une variation de la réflectivité en fonction du temps. Les courbes ainsi obtenues sont nommées cinétiques. La figure ci-dessous montre la cinétique enregistrée lors de la fixation d'une mono-couche d'ExtrAvidine sur une surface d'or.

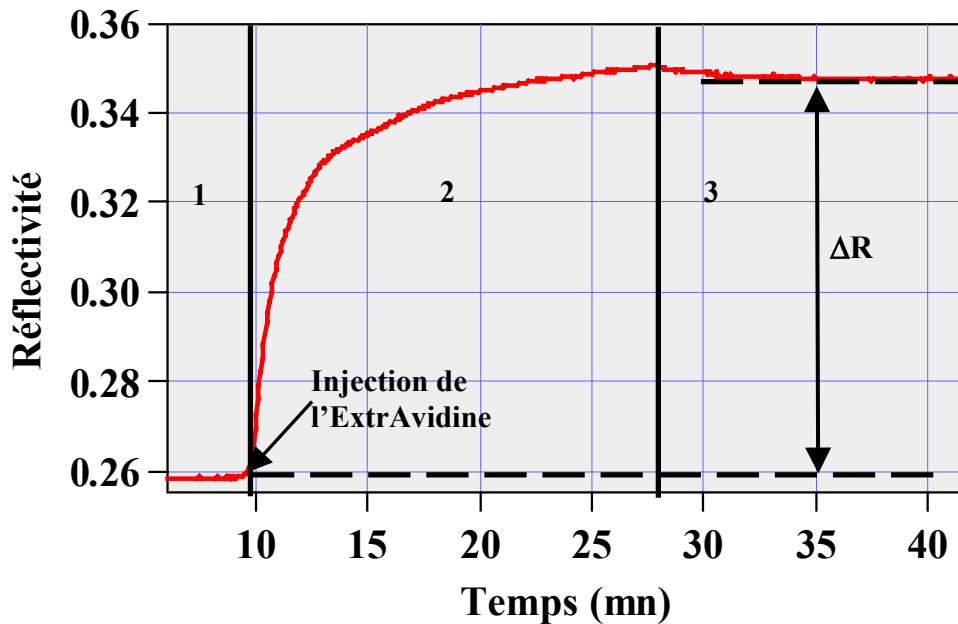


Figure 13 : Cinétique permettant de suivre en temps réel la fixation d'une mono-couche d'ExtrAvidine sur une surface en or. Pour enregistrer cette courbe expérimentale, nous avons fixé l'angle de rasance externe et relevé les valeurs de la réflectivité en fonction du temps. La courbe obtenue est divisée en trois parties. D'abord la surface est mise en contact avec la solution tampon afin mesurer l'intensité initiale qui servira de référence (1). Ensuite la solution d'ExtrAvidine est injectée sur l'or. Le dépôt de molécules se traduit par une augmentation de la réflectivité à angle fixe (2). Enfin, le tampon seul est de nouveau injecté. C'est la phase de rinçage durant laquelle les molécules mal fixées sont éliminées (3). Elle nous permet de mesurer la réflectivité finale dans les mêmes conditions que la réflectivité initiale

Vu l'allure de la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence interne et le caractère évanescent du champ électromagnétique de l'onde plasmon, l'augmentation de la réflectivité n'est pas toujours linéaire avec l'augmentation de l'épaisseur. En effet, en représentant la variation de la réflectivité (ΔR) en fonction de l'épaisseur, dans nos conditions expérimentales (indice du prisme=1.72, angle au sommet=60°, épaisseur de la couche d'or=48 nm, permittivité de l'or $\epsilon_m = -13.59 + j\,0.95$, permittivité du diélectrique=1.77, permittivité de la couche déposée=1.99), la courbe obtenue présente une saturation du signal dès que l'épaisseur déposée dépasse 40 nm Figure 14. En d'autres termes, quelle que soit l'épaisseur au-delà de 40 nm, nous observerons toujours une même variation de réflectivité (ΔR). Tout au long de nos expériences nous prendrons soin de ne pas déposer une épaisseur supérieure à 10 nm sur la surface d'or. Dans ces conditions, nous sommes sûrs de rester dans la région linéaire du graphe.

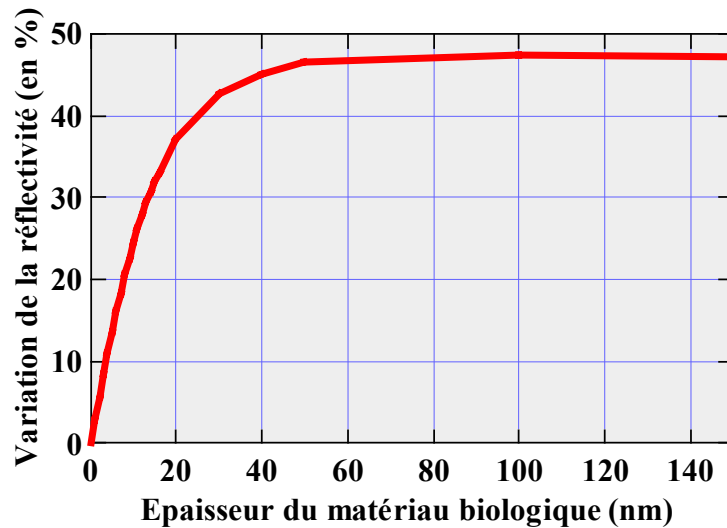


Figure 14 : Tracé de la réflectivité en fonction de l'épaisseur du matériau biologique déposé pour un prisme d'indice 1.72 éclairé par un laser à 660 nm, une couche de Cr d'épaisseur 2 nm, d'indice supposé 3.28-j 2.6, une couche d'or de 480 nm, d'indice supposé 0.128+j 3.689, un milieu biologique d'indice 1.41 et un milieu diélectrique d'indice 1.334.

La variation de la réflectivité nous permet de remonter à l'épaisseur et à la masse de la couche déposée sur la surface donc au nombre de molécules fixées. Dans le cas où la cinétique résulterait d'une interaction entre deux entités biologiques (anticorps/antigène, ADN/ADN...) dont l'une est ancrée sur la surface, le nombre de molécules déposées représente le nombre de molécules ayant réagi.

En effet, les variations d'indice et d'épaisseur sont liées à la densité de masse déposée à la surface par la relation

$$\Gamma = \frac{(n_f - n_d)e}{\frac{\partial n}{\partial c}} \quad (\text{Eq. 6}) [57]$$

avec Γ le taux de recouvrement exprimé en g/cm^2 , n_f l'indice de la couche adsorbée à la surface, n_d l'indice du milieu diélectrique, e l'épaisseur de la couche biologique et $\frac{\partial n}{\partial c}$ (en l/g) la variation de l'indice en fonction de la concentration.

Application numérique : Pour une mono-couche d'ExtrAvidine d'indice $n_f = 1.45$, d'épaisseur $e = 5 \text{ nm}$, de masse molaire 73000 daltons, un milieu diélectrique d'indice $n_d = 1.334$ et un $\frac{\partial n}{\partial c} = 0.18 \text{ ml/g}$ le taux de recouvrement est : $\Gamma = 3.22 \text{ ng}/\text{mm}^2$ soit 44 fmoles/ mm^2 .

L'effet de la variation de l'indice du diélectrique sur la condition de résonance des plasmons de surface est aussi visible autrement que par une variation d'intensité lumineuse. Il peut se traduire par une variation des différents paramètres optiques du faisceau lumineux tel la phase [58], le spectre [59] et l'angle plasmon [60]. L'interférométrie permet l'étude de la phase tandis que la spectroscopie permet de déterminer à angle fixe, quelle longueur d'onde a été absorbée et par suite de remonter à la variation d'indice à partir du décalage spectral qu'elle provoque. Ces deux techniques sont très sensibles et sont encore en phase de recherche dans les laboratoires. De son côté l'étude du décalage de l'angle plasmon empêche la détection en temps réel car elle nécessite un balayage angulaire qui consomme du temps.

B.2.4 Sensibilité* [61]:

La sensibilité nous donne les variations minimales de la grandeur mesurée (indice, épaisseur, concentration...) qui sont détectables par le système. Elle permet donc de savoir si la technique proposée est adaptée aux contraintes expérimentales. Dans le cadre de nos expériences, nous voulons observer des variations de réflectivité dues aux variations de l'épaisseur du milieu diélectrique. Dans ce but, nous fixons l'angle d'incidence θ et enregistrons la réflectivité en fonction du temps (Figure 13). Pour que la réaction analysée induise une variation optimale du signal mesuré, et donc, pour avoir la meilleure sensibilité, il faut se positionner à l'angle où une légère variation d'épaisseur engendre une grande variation de la réflectivité. Cet angle correspond à l'angle où la pente de la courbe $R = f(\theta)$ est maximale. Autrement dit, c'est l'angle pour lequel la dérivée $\frac{dR}{d\theta}$ est maximale. Cet angle de travail (θ_{tr}) est déterminé en dérivant la courbe de réflectivité. La Figure 15 ci-dessous met en parallèle deux graphes. Le premier est obtenu en soustrayant la courbe de réflectivité enregistrée après le dépôt d'une mono-couche de protéine d'épaisseur 5 nm de la courbe de réflectivité enregistrée sur l'or nu avant le dépôt. Ce graphe nous permet de déterminer l'angle auquel la variation d'épaisseur engendre une variation maximale de la réflectivité. Le deuxième illustre la dérivée de la courbe de réflectivité avant le dépôt de la protéine et nous permet de déterminer l'angle de travail. Cette figure montre la correspondance entre le maximum de la dérivée et le maximum de la variation (ΔR) et justifie ainsi le choix de l'angle de travail.

* Pour un calcul détaillé de la sensibilité du système se référer à l'Annexe°3 ainsi qu'à l'article de Yeatman paru en 1996 [61].

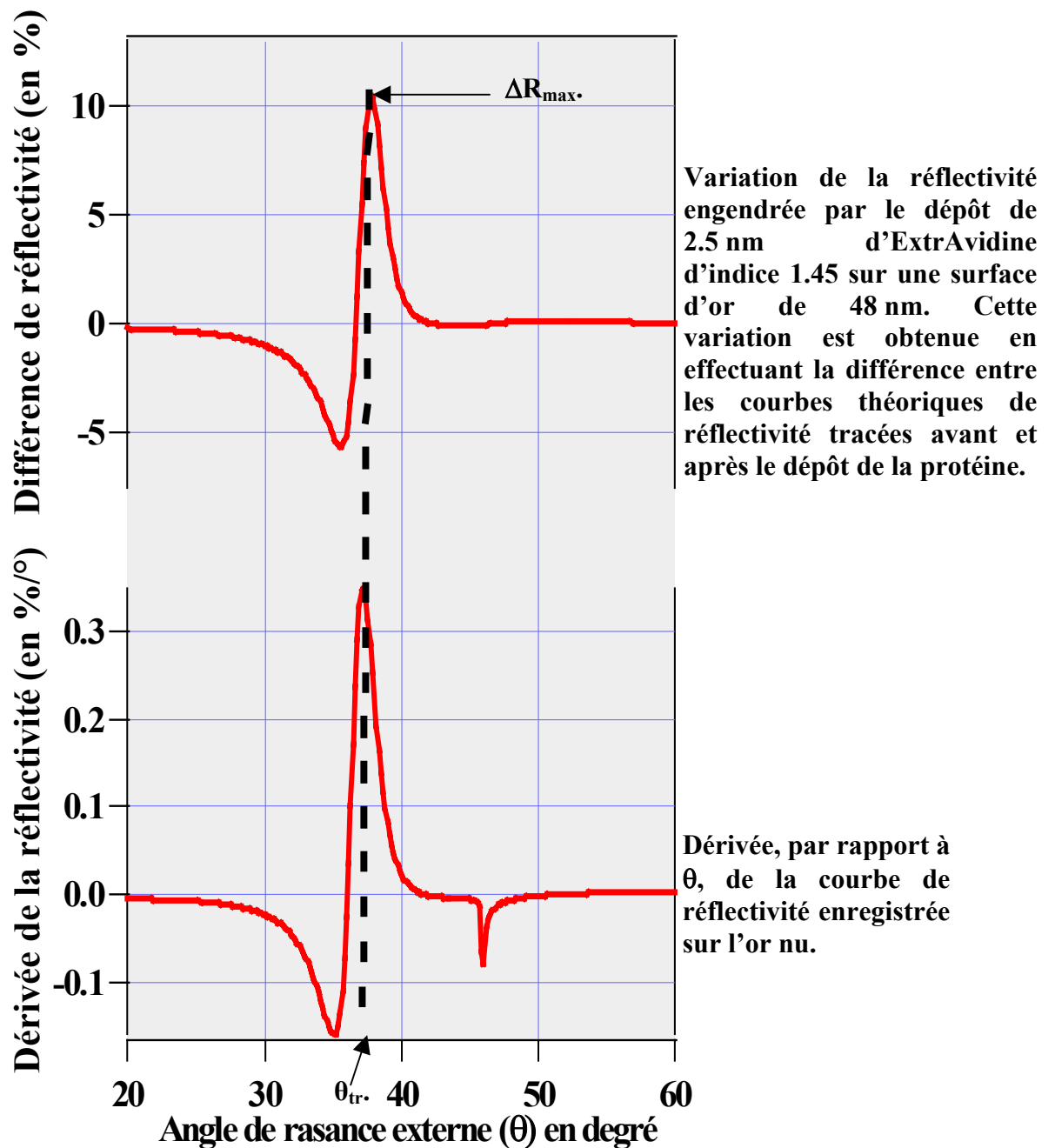


Figure 15: Correspondance entre l'angle où la dérivée de la courbe plasmon est maximale et l'angle où la variation de la réflectivité (ΔR) est maximale. Les calculs ont été effectués par l'intermédiaire d'un programme de calcul de réflectivité en considérant un prisme d'indice 1.72, une couche de chrome d'épaisseur 2 nm et de permittivité égale à $4.0 + j 17.06$, un film d'or d'épaisseur 48 nm, de permittivité $\epsilon_m = -13.59 + j 0.95$, un milieu diélectrique de permittivité $\epsilon_d = 1.78$ et une couche de protéine de permittivité égale à 2.10 et d'épaisseur 2.5 nm.

Expérimentalement, la valeur de la réflectivité à l'angle de travail θ_{tr} , obtenu après dérivation de la courbe plasmon, correspond au tiers de la partie linéaire la plus pentue de la courbe plasmon (le flanc droit). Pour cet angle la sensibilité des plasmons de surface est

maximale (Figure 15). Cette grandeur dépend de la longueur d'onde incidente ainsi que de l'indice des milieux métallique et diélectrique et du bruit.

Le calcul de la sensibilité effectué en dérivant l'expression de la réflectivité, est détaillé dans l'Annexe 3. Il montre que, pour une longueur d'onde de 660 nm, un milieu diélectrique d'indice 1.334, un métal de permittivité $\epsilon_m = -13.59 + j 0.95$ et un bruit de $5 \cdot 10^{-4}$, nous sommes capables d'observer un dépôt de molécules d'épaisseur minimale de 0.02 nm.

B.3 Configurations possibles et protocole d'utilisation :

La résonance des plasmons de surface est donc un phénomène physique susceptible d'être utilisé dans la fabrication des biopuces. Plusieurs méthodes de mesures ont été développées, les plus adaptées au biopuces sont le montage mono-capteur en interrogation angulaire et spectrale et le montage multicapteur en interrogation angulaire et spectrale. Ce paragraphe comporte une description des montages que nous avons utilisés au cours de nos expériences soit : le montage mono-capteur en interrogation angulaire ainsi que le montage multicapteur en interrogation angulaire. Un autre doctorant de notre équipe Pierre Lecaruyer s'intéresse de son côté au développement d'un multicapteur à interrogation spectrale.

B.3.1 Montage en « mono-capteur » :

Le montage mono-capteur en interrogation angulaire est présenté à la Figure 16. Il nous permet de suivre en temps réel les interactions se déroulant sur une surface unique et large. Les mesures effectuées, correspondent à une valeur moyenne sur une région possédant la même largeur que celle du faisceau lumineux éclairant la surface. Elles nous ont servi pour caractériser le traitement chimique des surfaces d'or et préparer ainsi, les expériences en multicapteur.

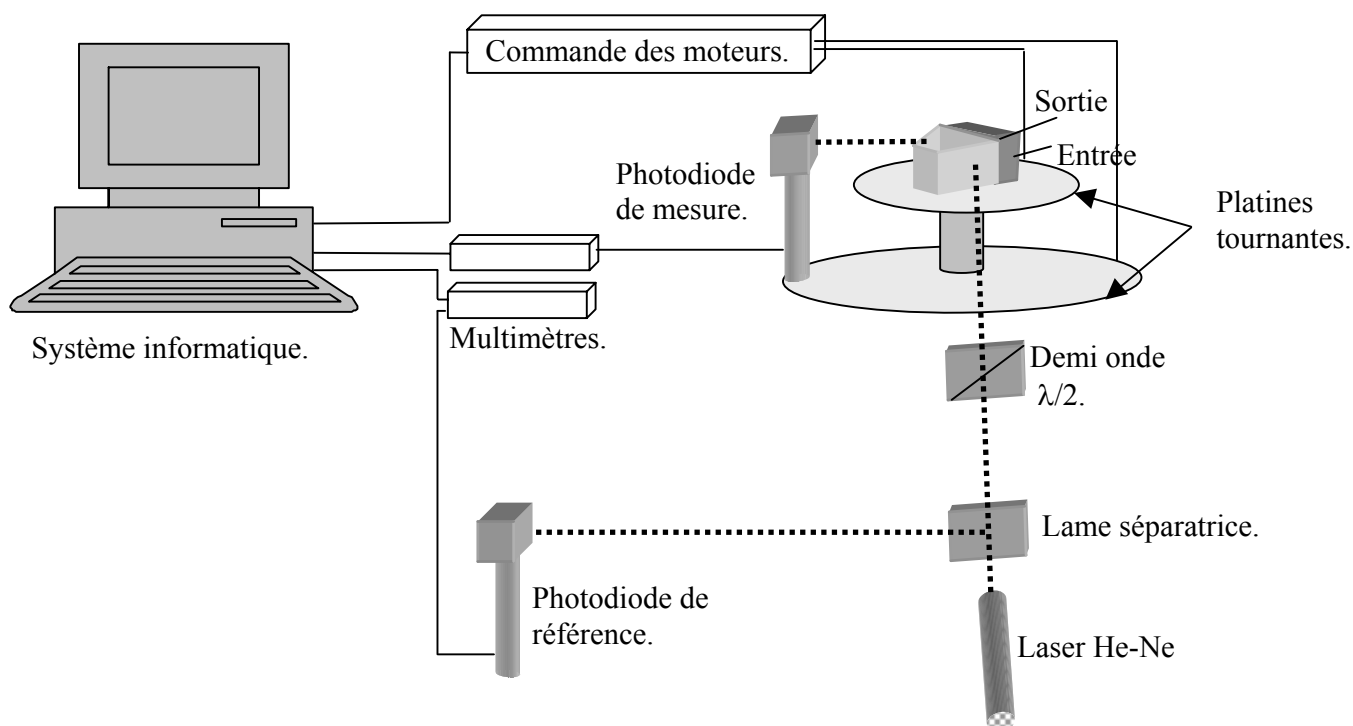


Figure 16 : Schéma du Montage mon-capteur en interrogation angulaire. Les platines tournantes, commandées par l'intermédiaire d'un programme LabView, nous permettent de varier l'angle d'incidence.

Pour effectuer les mesures nous disposons d'un laser He-Ne émettant à une longueur d'onde $\lambda=633$ nm. Le faisceau lumineux traverse une lame séparatrice. Il est alors partagé en deux moitiés. La première est dirigée vers une photodiode de référence pour suivre les fluctuations du faisceau de base et effectuer les corrections. La deuxième traverse une lame demi-onde afin d'obtenir une onde électromagnétique polarisée transverse magnétique (TM) ou transverse électrique (TE) puis éclaire une interface or-diélectrique à travers un prisme de couplage. Le faisceau réfléchi est recueilli par une photodiode de mesure qui permet d'enregistrer les plasmons et les cinétiques. Le prisme et la photodiode de mesure sont montés chacun sur une platine tournante commandée par ordinateur. Un programme développé sous LabView pilote l'acquisition du signal ainsi que la rotation synchronisée des platines tournantes. Ainsi, quand la platine portant le prisme tourne d'un angle α , la platine support de la photodiode tourne de 2α . Les produits chimiques ou biologiques à tester sont injectés dans une cuve accolée à la surface d'or, par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique ayant un débit réglable fixé à 70 $\mu\text{l/min}$.

L'utilisation de ce montage a toujours suivi le protocole ci-dessous :

- 1- Prendre une valeur “ à vide ” du rapport :

$$\frac{\text{Intensité mesurée par la photodiode de mesure}}{\text{Intensité mesurée par la photodiode de référence}}$$
 cette valeur nous permettra de vérifier que le rapport d'intensité entre les deux faisceaux.
- 2- Fixer la cuve sur la platine tournante.
- 3- Mettre en contact l'ensemble (prisme/surface d'or) avec la cuve.
- 4- Injecter, par l'intermédiaire de la pompe, une solution tampon dans la cuve.
- 5- Enregistrer une première courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence. La variation de cet angle est obtenue en pilotant la rotation synchronisée des platines tournantes par l'intermédiaire d'un programme LabView.
- 6- Se positionner à l'angle correspondant au tiers de la réflectivité maximale afin d'obtenir la sensibilité maximale.
- 7- Injecter la solution biologique ou chimique à analyser tout en enregistrant la cinétique de la réaction.
- 8- Rincer à l'aide de la solution tampon pour éliminer les molécules en excès.
- 9- Injecter tout produit que nous désirons analyser.
- 10- A la fin de l'expérience, injecter la solution tampon utilisée en premier et enregistrer une dernière courbe plasmon.

Bien que très utilisée, cette technique ne répond pas aux besoins médicaux d'analyse en parallèle, qui nécessitent l'étude simultanée de centaines voir des milliers d'interactions se déroulant sur une surface de quelques mm^2 . Plusieurs approches ont été testées pour adapter la résonance des plasmons de surface à ces demandes. La première a été développée par Biacore [32]. Elle consiste à détecter les interactions par l'intermédiaire d'une puce multicanaux (4 en tout) où la lumière réfléchiée par chaque canal est analysée séparément. Dans cette configuration nous sommes en présence de quatre mono-capteurs fonctionnant en parallèle. La deuxième approche permet de visualiser des réseaux bidimensionnels en éclairant l'interface par un faisceau monochromatique illuminant toute la zone utile de la puce. Les plasmons sont alors excités en tout point de la région éclairée et les interactions peuvent être suivies en parallèle, en temps réel et sans marquage par l'intermédiaire d'une caméra CCD. C'est l'imagerie par résonance de plasmons de surface, technique élégante, “ facile ” à mettre en œuvre et permettant la réalisation d'un multicapteur.

B.3.2 Montage pour l'imagerie en mode RPS : les multicapteurs :

L'imagerie RPS est le prolongement de la technique RPS utilisée en mono-capteur. Les premiers articles la mentionnant datent de 1988 [62] depuis, le nombre de publications utilisant cette nouvelle configuration n'a cessé d'augmenter comme par exemple les articles suivants [63,64,65].

Lorsqu'une interaction bio-moléculaire se produit en un endroit bien localisé, l'indice du milieu diélectrique est perturbé localement. L'utilisation de l'imagerie RPS nous permet de suivre, en parallèle, plusieurs perturbations se déroulant à des endroits différents de la surface. Pour cela, comme dans le cas des mono-capteurs, nous enregistrons, en chaque point de la surface, les variations de la réflectivité à angle fixe et pour une longueur d'onde donnée. L'aspect bidimensionnel de l'imagerie RPS provient essentiellement du fait que l'on étudie les variations de l'intensité lumineuse reçue par chaque pixel d'une caméra CCD. En effet, l'image de la surface se forme sur la caméra. L'intensité lumineuse reçue par chaque pixel traduit donc l'état de la zone dont il est l'image. Si une réaction bio moléculaire se produit dans cette région, l'indice du milieu diélectrique est perturbé, l'angle auquel nous observons les plasmons de surface se décale et l'intensité réfléchi, par cette zone varie. La caméra CCD enregistre donc les modulations spatiales de l'intensité du faisceau réfléchi. L'étude et l'optimisation de ce système ont fait l'objet de la thèse d'Emmanuel. Maillart [18].

Le montage optique, employé en imagerie, est décrit à la Figure 17 : La diode électroluminescente émet un faisceau lumineux divergent de longueur d'onde $\lambda=660$ nm et de largeur spectrale $\Delta\lambda=20$ nm. Après avoir traverser les lentilles de microscope le faisceau devient parallèle de diamètre 1 cm et de divergence de 2 mrad. Son passage par le polariseur détermine la polarisation de la lumière éclairant la surface métallique. Le miroir tournant commandé par ordinateur sert à faire varier l'angle d'incidence tout en gardant fixe le prisme et le système de détection. Le système afocal permet d'illuminer la même région de la surface quel que soit l'angle d'incidence. La lumière réfléchi par la base du prisme est guidée vers la caméra CCD par un deuxième système afocal. Le signal électronique est ensuite transmis à l'ordinateur puis analysé par un programme LabView développé au laboratoire. Ce programme permet de commander le moteur du miroir tournant, d'afficher les réflectivités en fonction de l'angle d'incidence, de calculer l'angle où la pente de la courbe plasmon est maximale, et ensuite de suivre, à angle fixe, les variations de la réflectivité en fonction du temps. Les produits à analyser sont injectés sur la surface par l'intermédiaire d'une pompe

péristaltique et à un débit réglable fixé à 70 $\mu\text{l}/\text{min}$ et circulent dans une cuve de volume 13 μl .

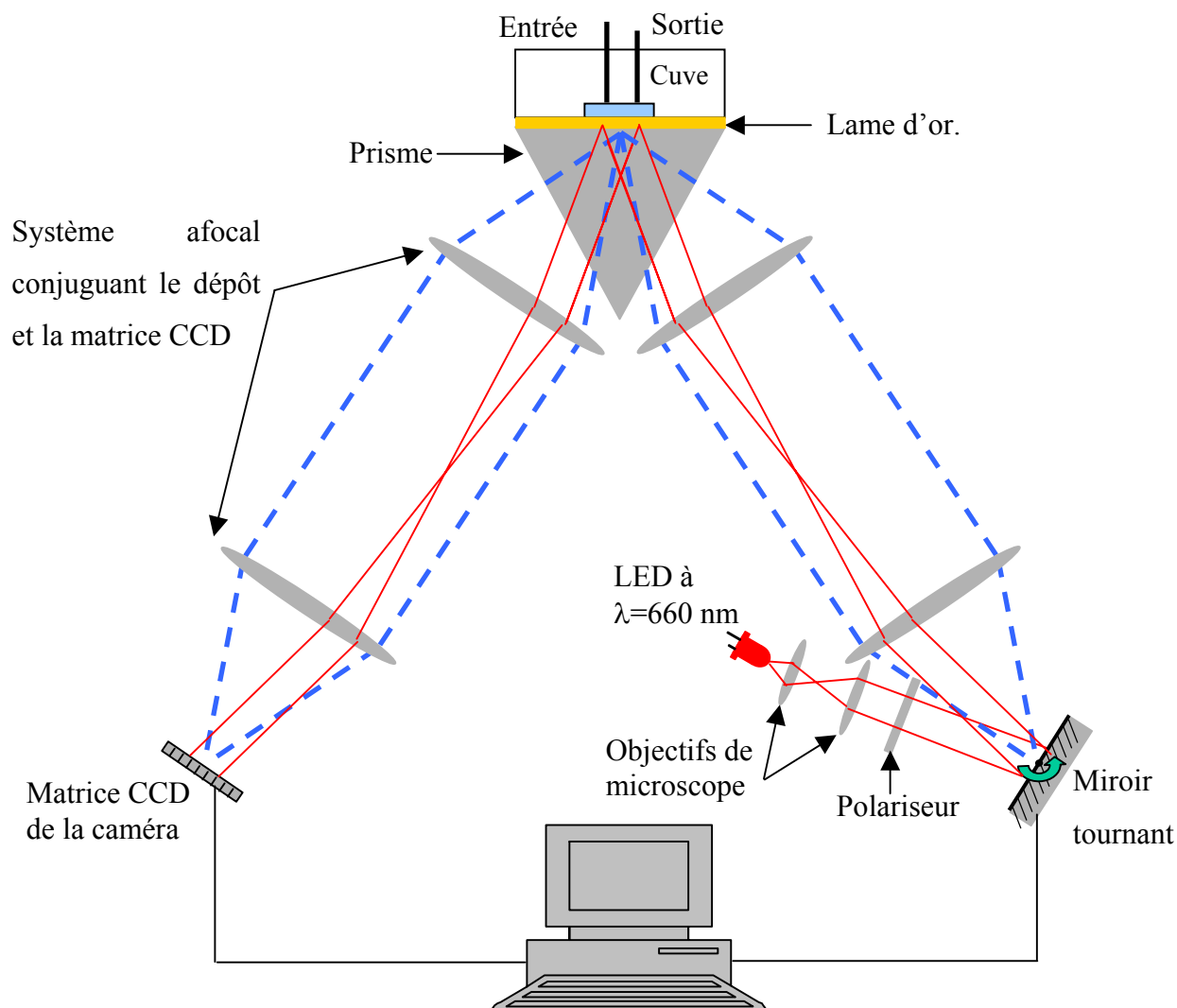


Figure 17 : Schéma du montage optique utilisé dans les expériences d'imagerie RPS. Les lignes en pointillé représentent l'origine de l'image recueillie par la caméra CCD. Un programme LabView, développé au laboratoire, permet d'acquérir les images, de piloter le miroir tournant, d'afficher les réflectivités en fonction de l'angle d'incidence, de calculer l'angle où la pente de la courbe plasmon est maximale, et enfin de suivre, à angle fixe, les variations de la réflectivité en fonction du temps.

Ce dispositif nous a permis de suivre, en temps réel et en parallèle, des interactions se déroulant sur des centaines de plots. Son protocole d'utilisation comporte les étapes suivantes :

- 1) Fixer l'ensemble (prisme/surface d'or) contre la cuve.

- 2) Prendre une image de la surface avant l'injection de tout liquide.
- 3) Sélectionner les régions de la surface dont nous voulons suivre l'évolution au cours du temps.
- 4) Injecter la solution tampon.
- 5) Couper le faisceau lumineux et enregistrer les niveaux de gris de la caméra par l'intermédiaire du programme développé sous LabView. Ils nous serviront de première référence dans le calcul de la réflectivité.
- 6) Déclencher la rotation du miroir tournant à partir du programme LabView et enregistrer la courbe représentant la réflectivité en fonction de l'angle de rasance externe (la rotation du miroir assure le balayage de l'angle d'incidence).
- 7) Se positionner à l'angle pour lequel la dérivée de la courbe de réflectivité est maximale.
- 8) Eclairer la surface d'or par un faisceau lumineux polarisé Transverse Electrique (TE) et enregistrer les niveaux de gris de la caméra. C'est notre deuxième référence.
- 9) Tourner le polariseur afin que le faisceau incident qui le traverse possède, à la sortie, une polarisation Transverse Magnétique.
- 10) Injecter la solution à analyser tout en enregistrant la cinétique de chaque région sélectionnée. La méthode de calcul des réflectivités est exposée plus loin dans ce manuscrit.
- 11) Rincer avec la solution tampon afin d'éliminer toute molécule mal fixée.

La présence, dans les laboratoires, de nombreux bio capteurs basés sur la fluorescence ainsi que la percée de Biacore au cours de cette dernière décennie ont fait grandir l'intérêt pour l'imagerie RPS qui combine les avantages de ces deux technologies à savoir : l'analyse en parallèle d'un très grand nombre d'interaction (avantage de la fluorescence) et l'obtention de nombreux paramètres concernant une seule interaction (avantage de l'appareil vendu par Biacore). Ce phénomène s'est traduit, depuis fin 2001, par la création d'entreprises dont le but est de commercialiser ce type d'appareils tel Windsor Scientific [66], GWC [67] (issue des travaux de R.M. Corn *et al.* [53, 68]), HTS Biosystems [69] (seule compagnie travaillant sur un système d'imagerie RPS couplé par réseau) ou encore Genoptics [70] (issue des travaux de P. Guédon *et al.* qui a fait partie notre équipe [71]). Pour l'instant, Windsor Scientific a annoncé le lancement de son dispositif d'imagerie RPS sous le nom d'IBIS iSPR en mars 2003. De son côté, Genoptics a commencé à commercialiser son appareil SPRiLAB en

septembre 2003. Cette concurrence, tant au niveau académique qu'industriel est un très bon indicateur de la potentialité d'un bio capteur basé sur l'imagerie RPS.

Conclusion

Plusieurs techniques ont été mises à contribution pour construire des capteurs biologiques. La première est la fluorescence, très sensible, mais nécessitant un marquage onéreux des molécules et fournissant un résultat à posteriori. Pour observer les réactions en temps réel et sans marquage les chercheurs essaient d'amplifier les variations de charge, de masse ou d'indice que cause l'ajout de molécules sur une surface donnée. C'est le développement des méthodes électroniques, acoustiques et optiques brièvement décrites dans cette partie. Parmi ces diverses méthodes la résonance des plasmons de surface prend une place de plus en plus importante. Elle permet de sonder en temps réel les variations de l'indice d'un diélectrique au voisinage d'une surface métallique. En effet, les plasmons de surface sont des ondes électromagnétiques se propageant à l'interface entre un métal et un diélectrique. L'une des méthodes utilisées pour les observer consiste à fixer l'interface métal/diélectrique sur la base d'un prisme puis, à éclairer la base métallisée du prisme par un faisceau lumineux polarisé Transverse Magnétique. Ce dernier se réfléchit sur l'interface. En traçant la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence la génération des plasmons se traduit par un pic d'absorption. Toute modification de l'indice et de l'épaisseur du milieu diélectrique se traduit par un décalage du pic d'absorption et donc, par une variation de la réflectivité pour un angle d'incidence fixe.

Cette dernière technologie nous permet de détecter des variations d'épaisseur de l'ordre de 0.02 nm et peut être adoptée sous diverses configurations. Au cours de ma thèse un montage mono capteur m'a servi pour l'élaboration de la chimie tandis que l'imagerie m'a été utile pour l'analyse en temps réel et en parallèle de 4 à 196 interactions ADN/ADN possibles. Les études menées se sont basées sur l'analyse de la variation de la réflectivité en fonction du temps pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixes.

Observer les interactions sur la surface d'or suppose la fixation de molécules biologiques sur ce métal. Diverses méthodes sont proposées et, au laboratoire nous en avons développé une qui est décrite dans la deuxième partie de cette thèse.

Chapitre II :

Traitement chimique de la surface.



A	ETAT DE L'ART DES TRAITEMENTS DE SURFACE :	52
A.1	SYNTHESE IN SITU :	52
A.2	LIAISON DIRECTE :	53
A.3	ÉLECTROPOLYMERISATION :	53
A.4	LIAISON INDIRECTE : UTILISATION D'UN SYSTEME INTERMEDIAIRE :	54
A.4.1	Système Avidine - Biotine :	54
A.4.2	Système de multicouches :	55
A.4.2.1	Les maleimides et les thiols :	55
A.4.2.2	Ester de NHS et amines :	57
A.4.2.3	Les thiocyanates et les amines :	59
A.4.2.4	Immobilisation par formation d'interactions électrostatiques :	60
B	FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE D'OR :	61
B.1	UTILISATION DE POLYMERES REACTIFS :	61
B.1.1	Description des polymères :	61
B.1.2	Protocoles et résultats :	62
B.2	DEVELOPPEMENT DE LA CHIMIE DE SURFACE UTILISEE DANS CETTE ETUDE :	65
B.2.1	Principe :	65
B.2.1.1	MUA :	65
B.2.1.2	PEI :	66
B.2.1.3	ExtrAvidine :	66
B.2.2	Préparation de la multicouche suivie sur le banc mono capteur :	67
B.2.3	Préparation de la multicouche dans un b�cher :	71
B.2.4	Dépôt des oligonucléotides biotinylés :	71
B.2.4.1	Technique de dépôt :	71
B.2.4.2	Optimisations du procédé :	72
	CONCLUSION :	77



Résumé :

Tout au long de cette partie je m'intéresserai aux traitements chimiques qui permettent de greffer des molécules d'ADN sur une surface. Ainsi après avoir fait un tour de table sur les méthodes de fixation actuelles je m'attarderai sur la description de la méthode d velopp e au laboratoire. Elle consiste à construire, sur une lame d'or, un ensemble de trois couches auto-assemblées qui permettront la fixation d'ADN simples brins par l'intermédiaire des couples ExtrAvidine-biotine. Je décrirai aussi le dépôt des sondes effectué par un robot de dépôt de marque Genetix ainsi que les diverses optimisations que nous avons effectu es.

La fixation de molécules biologiques sur des surfaces rigides et inorganiques dans le but d'observer des interactions entre sondes et cibles, demeure le talon d'Achille des puces à ADN. Mis à contribution dans la résolution de ce problème, les chimistes mettent au profit de cette nouvelle technologie tout matériau permettant de construire une surface stable, spécifique et régénérable si possible. La stabilité permet une bonne conservation des substrats et assure leur résistance aux divers traitements chimiques qui leur sont imposés. L'inertie par rapport aux produits biologiques utilisés permet de minimiser les interactions non spécifiques réduisant ainsi le bruit de fond susceptible de masquer le signal recherché. Finalement la régénération permet de diminuer le coût des tests menés, les adaptant ainsi à l'application clinique.

Dans cette partie, je décrirai les principales méthodes adoptées pour rendre fonctionnelle une surface inorganique, c'est-à-dire pour la rendre apte à fixer des molécules biologiques. Puis, je m'attarderai plus en détails sur la chimie de surface que nous avons développée et qui nous a servi tout au long des expériences. Pour terminer j'exposerai la technique de dépôt des plots ainsi que les différentes optimisations réalisées (densité de sonde et qualité des plots...).

A Etat de l'art des traitements de surface :

Pour fixer les molécules biologiques telles que les ADN, les idées ne manquent pas. Ainsi plusieurs techniques ont été développées. Nous pouvons les classer sous quatre rubriques : 1-la synthèse in situ,

2- les liaisons directes,

3- l'électropolymérisation

4-et les liaisons indirectes basées sur l'utilisation de multicouches.

A.1 Synthèse in situ :

La synthèse in situ, développée essentiellement par la société Affymétrie [72, 73, 74, 75] dans le cadre des puces à ADN lues par fluorescence, est effectuée sur une surface silanisée et nécessite plusieurs étapes. La surface est d'abord traitée avec une molécule bi-fonctionnelle présentant une extrémité OH protégée par un groupement photosensible. Ensuite elle est recouverte d'un masque et exposée au rayonnement ultraviolet. L'extrémité photosensible est alors détruite localement. La première base de la séquence choisie possédant, à son tour, une extrémité photosensible, est alors couplée à la zone déprotégée. L'opération est réitérée jusqu'à ce que les séquences d'ADN soient complètes (Figure 18).

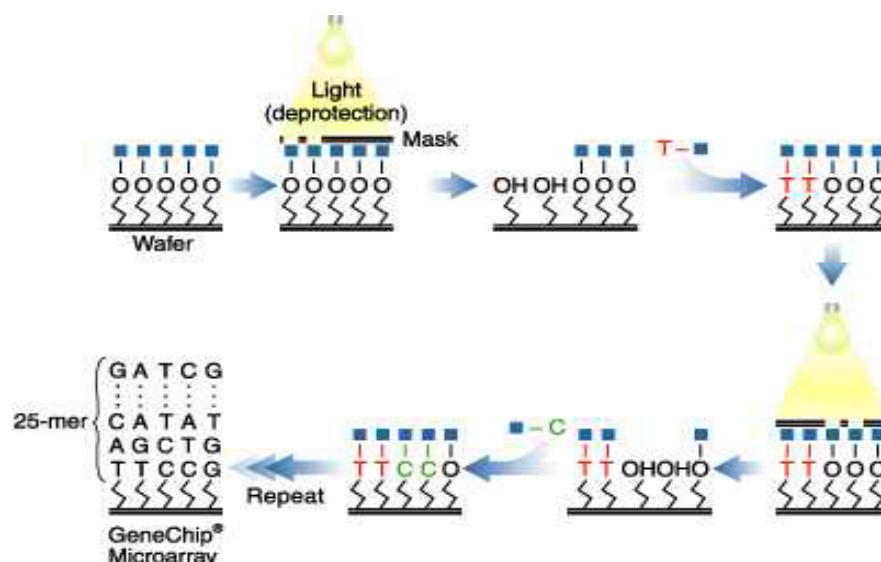


Figure 18: Principe de la synthèse in situ des sondes. (Graphique tiré du site : <http://www.affymetrix.com/technology/manufacturing/index.affx>).

A.2 Liaison directe :

Cette technique consiste à fixer directement, de façon stable et orientée, les molécules biologiques sur un support solide.

Dans le cas d'une surface or, la forte affinité entre ce métal et le groupement SH [76-77] a fait que les chimies de surface développées se sont basées sur des molécules possédant une extrémité thiol. En effet, la fonction thiol a été greffée sur les sondes [78, 79, 80] puis ces dernières ont été mises en contact avec la surface d'or pour former des mono couches uniformes. Après cette étape, le substrat est exposé à des thiols aliphatiques comme le mercaptohexanol afin d'éliminer les interactions non spécifiques, d'éviter les problèmes d'encombrement stérique, d'orienter les molécules et d'optimiser ainsi le rendement des réactions biologiques (Figure 19).

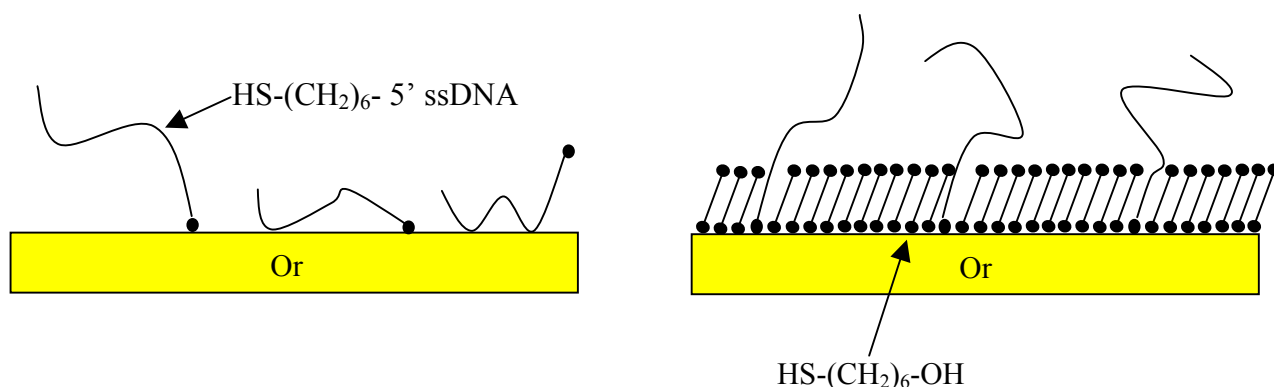


Figure 19: Schéma de la fixation directe des ADN thiolés simple brin sur une surface d'or.

Cette technique est facile à mettre en œuvre et est actuellement en voie de développement dans notre laboratoire.

A.3 Électropolymérisation :

Une autre façon de faire consiste à accrocher les molécules biologiques directement sur des monomères puis à polymériser ces derniers sur la surface. C'est le cas par exemple des polymères conducteurs [81-82] comme le polypyrrole, la polyaniline ou le polyphénol. Les avantages de ce dernier type de polymères sont nombreux :

- Leur préparation est facile et se fait en une seule étape.

- L'épaisseur du polymère peut être contrôlée par l'intermédiaire du potentiel mis en jeu lors de la polymérisation.
- Il est possible de créer un polymère sur une électrode de faible surface et de géométrie compliquée.
- Le volume d'électrolyte utilisé est faible (50 à 100 μ l).

Le polypyrrole (Figure 20) et ses dérivés sont les plus utilisés des polymères conducteurs à cause de la grande variété d'espèces moléculaires, dont l'ADN [71,83, 84, 85, 86, 87], pouvant se lier de façon covalente au groupement pyrrole.

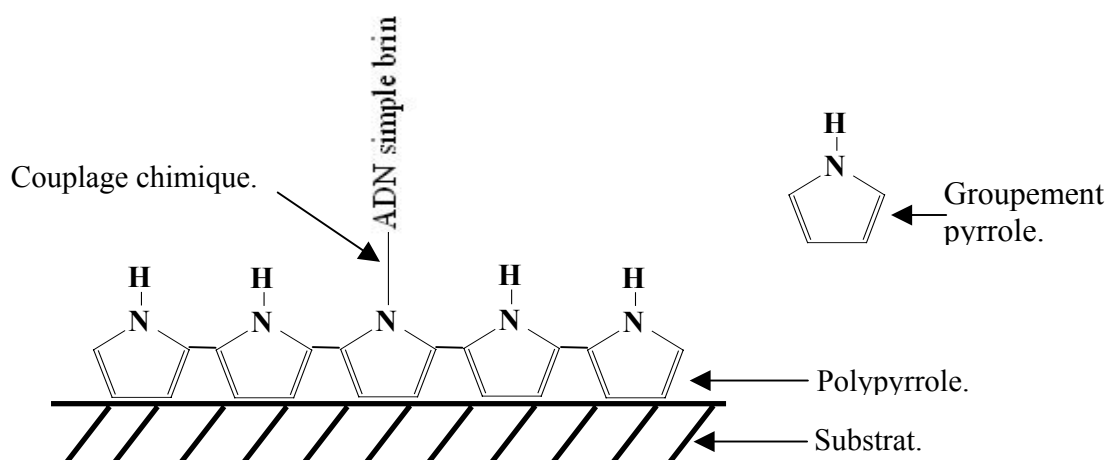


Figure 20: Représentation schématique d'un mono brin d'ADN fixé à la surface par l'intermédiaire d'un polymère conducteur : le poly pyrrole.

A.4 Liaison indirecte : utilisation d'un système intermédiaire :

La structure de la surface devient de plus en plus élaborée. Elle est formée de multicouches auto-assemblées mettant à profit la grande affinité entre des entités chimiques telles que l'Avidine et la biotine [88, 89, 90, 91], les maleimides et le thiol [92, 93], l'ester de NHS et les amines [94], les thiocyanates et les amines [95] ou même les liaisons électrostatiques [96].

A.4.1 Système Avidine - Biotine :

Le complexe Avidine-Biotine est très connu pour la grande affinité existant entre ces deux espèces ($K_{\text{aff}}=10^{15} \text{ M}^{-1}$ [97]). Il peut donc assurer une liaison stable entre une surface solide et des biomolécules. Les sondes biotinylées ont ainsi été greffées sur l'Avidine ou sur ses molécules dérivées (la Streptavidine, l'ExtrAvidine...). Ces protéines sont fixées sur la

surface par l'intermédiaire de différentes configurations. Elles ont été adsorbées de façon passive sur la surface [98, 99] ou même fixées de façon covalente sur un substrat recouvert d'une molécule assurant d'un côté la liaison avec la surface et de l'autre présentant une biotine capable de fixer la Streptavidine (exemple : Phospholipides biotinylés [100], Poly pyrrole [101], Sol-Gel [102], mélange de thiol biotinylé (BAT) et d'oxyde de polyéthylène (PEO) non biotinylé [103,104],...). L'utilisation du Poly pyrrole dans cette configuration a permis d'obtenir des surfaces régénérables au niveau du pyrrole biotinylé. C'est une voie très prometteuse.

A.4.2 Système de multicouches :

Un échafaudage de plusieurs couches est construit sur le support solide. Le dernier étage de cette construction chimique comporte :

- soit des groupements fonctionnels destinés à fixer de façon covalente les sondes par leur extrémité thiol ou amine
- soit des groupements fonctionnels permettant une fixation électrostatique des sondes.

A.4.2.1 Les maleimides et les thiols :

Il s'agit de fixer des sondes thiolées sur un substrat solide fonctionnalisé à l'aide de groupements maleimide. La liaison entre les maleimides et les thiols étant covalente, la fixation ainsi obtenue est très robuste. Le principe de base de cette chimie est donné à la Figure 21 :

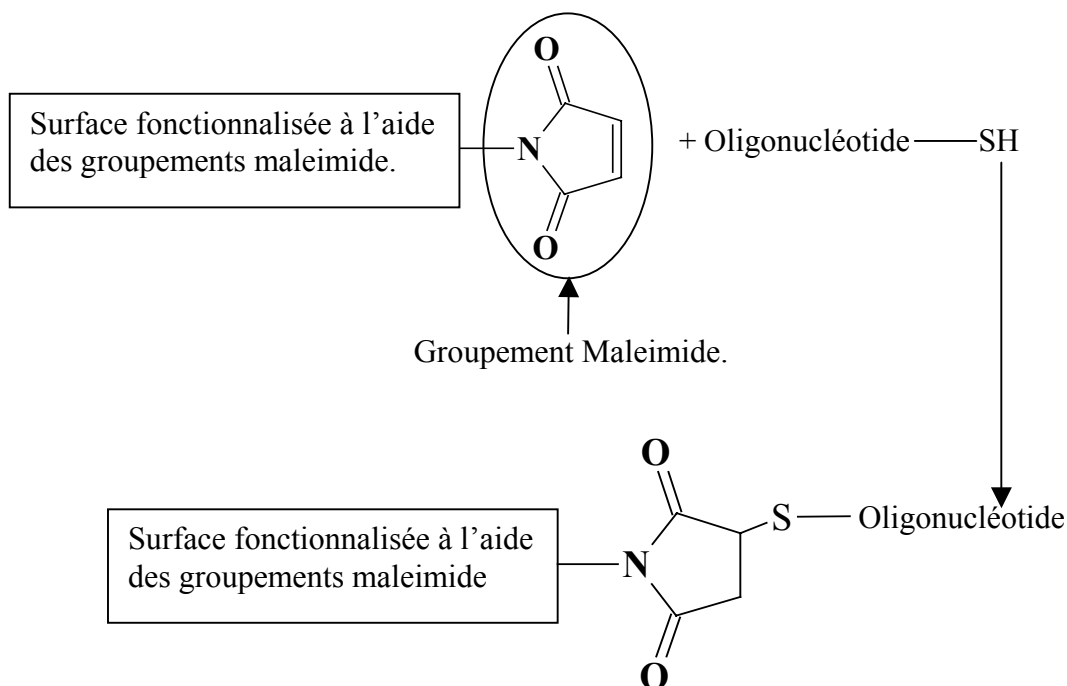


Figure 21: Principe de la fonctionnalisation de la surface à l'aide de groupements maleimide. Une surface fonctionnalisée par des groupements maleimide est mise en contact avec des biomolécules thiolées. Les groupements thiol interagissent de façon covalente avec les maleimides. Les biomolécules sont ainsi greffés sur la surface.

Des supports de silice [105, 106], d'or [107, 108, 109,] ou même des nanotubes de carbone [110] ont servi à la réalisation de ces expériences. Le traitement de la surface de base varie avec sa nature :

Les surfaces de silice sont d'abord couvertes par un composé chimique possédant une extrémité aminée. Ensuite une molécule bifonctionnelle (exemple : la sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane -1- carboxylate ou SSMCC [108]) interagit avec les amines d'une part et présente un groupement maleimide libre de l'autre. Elle joue ainsi le rôle d'une colle qui assure la liaison entre les molécules thiolées et la surface.

Les surfaces d'or subissent divers traitements préalables à la fixation des biomolécules thiolées. Cependant, la première couche adsorbée est toujours un thiol aliphatique tel l'acide 11-mercaptoundécanoïque (MUA) ou le 11-mercaptoundécylamine (MUAM). Quand la première couche fixée est le MUA, la surface est couverte par une deuxième couche de poly(L-lysine) présentant des terminaisons amines pouvant réagir avec les molécules bifonctionnelles telles les SSMCC. Finalement, nous nous retrouvons dans les mêmes conditions que pour les surfaces de silice et la suite du traitement est la même. Corn et al. se sont particulièrement intéressés à la fonctionnalisation des surfaces d'or dans la perspective d'une étude par résonance des plasmons de surface [111].

Finalement, dans une étude plus récente, des nanotubes de carbone ont aussi été utilisés pour fixer des ADN thiolés [110]. Ils ont été, dans ce but, fonctionnalisés par des groupements amines par l'intermédiaire des composés SOCl_2 (Chlorure de thionyle) et $\text{H}_2\text{NC}_2\text{H}_4\text{NH}_2$ (éthylène diamine). Le greffage des ADN thiolés se fait comme précédemment par l'intermédiaire d'une molécule bifonctionnelle réagissant avec les amines et possédant un groupement maleimide. Cette voie de recherche touche aux nanotechnologies et demeure très prometteuse.

A.4.2.2 Ester de NHS et amines :

Les amines font partie intégrante de la majorité des macromolécules biologiques. De ce fait l'élaboration d'une chimie de surface assurant une liaison covalente avec les groupements amine est très intéressante. Cette technique est utilisée pour greffer les molécules d'ADN aminées sur une surface. Le principe de base est schématisé à la Figure 22 :

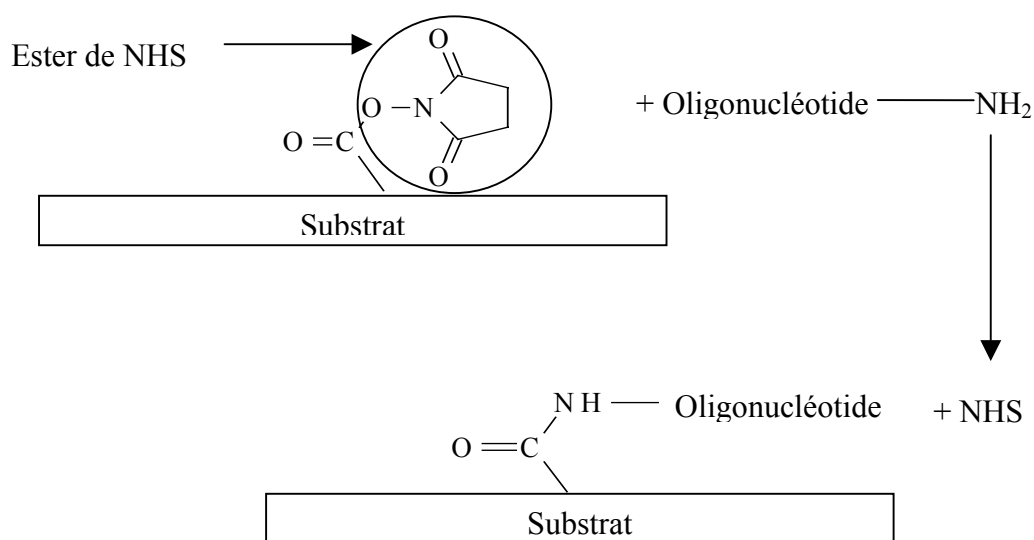


Figure 22: Principe de la fixation covalente des molécules aminées sur un substrat activé avec des esters de NHS. La grande réactivité entre les amines et groupements ester NHS assure la fixation des biomolécules sur la surface.

J'ai répertorié trois voies différentes pour greffer des molécules d'ADN aminées sur la surface par l'intermédiaire des interactions entre les esters de NHS et les amines. Elles sont présentées ci-dessous :

A.4.2.2.1 Fixation par l'intermédiaire du MUA :

Ce traitement est adapté aux surfaces d'or. En première étape, un composé thiolé comme le MUA [112] est fixé sur ce métal. La surface présente alors des groupements acide carboxylique qui seront activés par l'intermédiaire d'un mélange EDC/NHS (N-hydroxysuccinimide). L'EDC (un carbodiimide) joue le rôle de catalyseur et permet la fixation de la NHS sur la surface. Cette dernière possède ainsi des esters de NHS qui réagissent avec les amines des biomolécules. Une étape de passivation à l'éthanol amine est nécessaire afin d'empêcher toute réaction chimique indésirable.

A.4.2.2.2 Fixation par l'intermédiaire de différents polymères :

Nous avons relevé deux voies d'immobilisation des polymères sur une surface d'or :

La première consiste à fixer le carboxyméthyl Dextrane [113, 114, 115, 116] par l'intermédiaire d'un composé thiolé. Le polymère mis en jeu présente des radicaux COOH qui sont activés par une solution de NHS/EDC. L'étape d'activation laisse sur la surface des Esters de NHS capables de réagir avec les amines des molécules. Ces dernières sont alors emprisonnées dans une structure à trois dimensions [117-118].

La deuxième consiste à utiliser la cystéamine [94] comme tapis de base pour ancrer de façon covalente des polymères tel que polychlorure de méthacryloyle (PMACI). Après leur hydrolyse, ces polymères sont modifiés avec la solution NHS. Les fonctions Ester NHS ainsi créées et sont prêtes à fixer toute sonde aminée.

A.4.2.2.3 Les nanotubes de carbone :

Les nanotubes de carbone [119] ont, à leur tour, été mis à contribution pour fixer des ADN aminés. Leur traitement reste cependant complexe. Ils sont d'abord cuits à 430°C et exposés à l'air pendant une heure. Ensuite, ils sont traités à l' H_2SO_4 / HNO_3 puis activés par un mélange de sulfo-NHS/EDC qui favorise la fixation des ADN aminés.

A.4.2.3 Les thiocyanates et les amines :

Cette technique consiste à greffer des biomolécules aminées sur une surface présentant des groupements thiocyanate. Elle est applicable sur des surfaces de verre ou d'or.

A.4.2.3.1 Les surfaces de verres :

Les surfaces de verre sont d'abord couvertes par une couche mince de 3-aminopropyltriméthoxysilane. Ce traitement fixe sur le substrat des molécules aminées. Les amines sont, ensuite, activées par l'intermédiaire d'une solution 1,4-phénylène diisothiocyanate. Ce composé permet une fixation covalente des oligonucléotides aminés [95]. La figure ci dessous illustre la fixation d'ADN aminés sur de telles surfaces de verre :

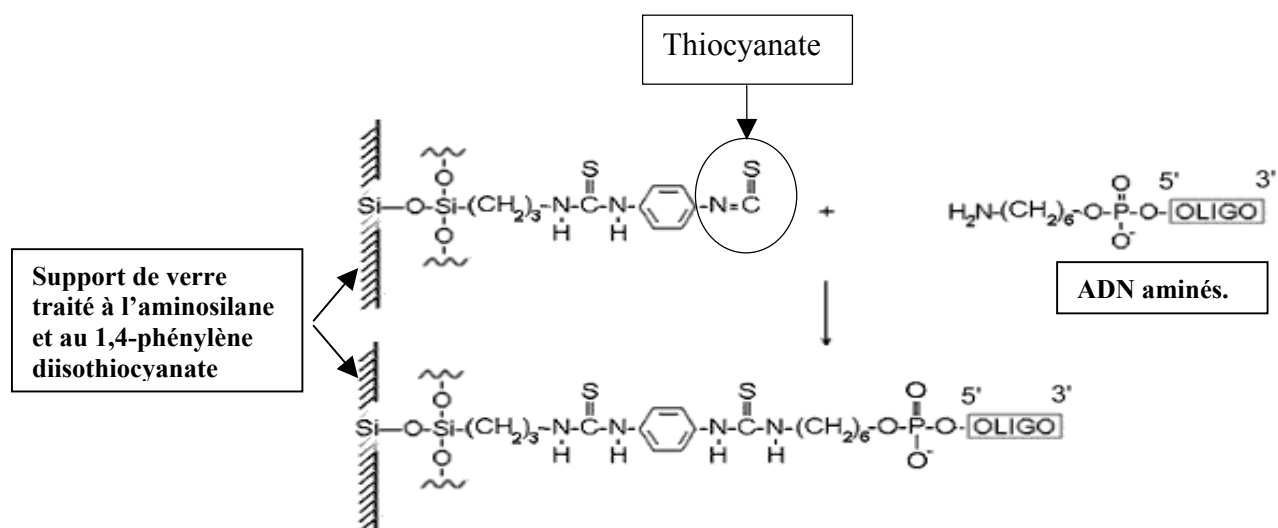


Figure 23: Traitement des surfaces de verre pour fixer des ADN aminés. Cette technique nécessite trois étapes successives : d'abord le verre est couvert par un film de 3-aminopropyltriméthoxysilane afin de fixer, sur la surface, des fonctions aminées, ensuite une molécule bi-fonctionnelle de 1,4-phénylène diisothiocyanate assure la jonction entre la surface traitée et l'oligonucléotide aminé. La fixation des ADN aminés constitue la dernière étape.

A.4.2.3.2 Les surfaces d'or :

Le traitement des surfaces d'or consiste en quatre étapes. Elle est d'abord couverte d'une couche de MUA sur laquelle est fixée une couche poly(L-lysine) de façon électrostatique. Ensuite, une solution 1,4-phénylène diisothiocyanate [120, 121] interagit avec les extrémités aminées du polymère. Ce dernier traitement assure la fixation covalentes des biomolécules aminées.

Les structures multicouches ainsi décrites ne sont pas les seules développées, il en existe d'autres comme par exemple celles basées sur les liaisons électrostatiques.

A.4.2.4 Immobilisation par formation d'interactions électrostatiques :

Cette technique se base sur la formation de liaisons électrostatiques entre des couches de polyélectrolytes de signe opposé. Ces structures alternées $(-/+)_n$ mettent en jeu aussi bien des polymères organiques comme le Poly(éthylène imine), et le chlorure de poly(dimethyldiallylammonium) [122] que des biomolécules comme l'ADN et les protéines [123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130]. Leurs applications envisagées se situent dans les domaines des bio capteurs, des bio membranes artificielles, de la bioélectronique et de l'optique non linéaire.

Ainsi, diverses techniques ont été mises en œuvre pour assurer une fixation robuste et efficace des sondes sur la surface. Parmi elles les multicouches ont eu un très grand succès. En effet, cette technique exploite l'affinité entre diverses molécules comme l'Avidine et la Biotine, les maleimides et les thiols ou les esters de NHS et les amines. Le couplage mettant en jeu les amines est bien adapté à l'ancrage des protéines tandis que l'utilisation des couples maleimide-thiols permet d'obtenir une surface très robuste. Finalement, le choix du système Avidine- Biotine est compatible avec l'utilisation des acides nucléiques et des protéines étant donné que ces entités peuvent facilement être biotinylées.

B Fonctionnalisation de la surface d'or :

B.1 Utilisation de polymères réactifs :

Le traitement chimique d'une surface la rendant apte à fixer des molécules biologiques est une étape critique dans la fabrication de la puce à ADN. Nous avons testé plusieurs techniques de préparation avant de choisir une structure adéquate. Les premières configurations mettaient en œuvre des polymères interagissant de façon covalente avec des radicaux aminés, citons par exemple le polychlorure d'Acryloyle (PACl) et le polychlorure de méthacryloyle (PMAcI). Les protocoles utilisés sont détaillés dans l'Annexe 4. Les résultats expérimentaux obtenus montrent de faibles rendements d'hybridation quelle que soit la configuration adoptée. Un résumé des expériences menées est présenté ci-dessous.

B.1.1 Description des polymères :

Les deux polymères testés présentent des similitudes qui nous ont permis de les décrire en parallèle. Nous présentons ci-dessous leur structure :

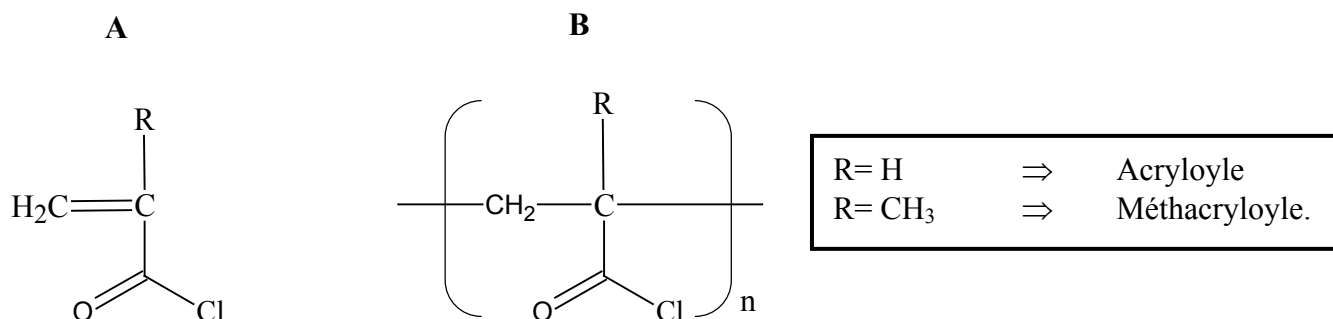


Figure 24: *A : Structure du monomère de PACl quand R=H et de PMAcI quand R=CH₃. B : Structure du polymère PACl (R=H) et PMAcI (R= CH₃).*

Masse Moléculaire Moyenne en Nombre PACl : Mn=14 000 g/mole.

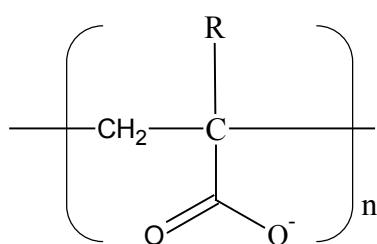
Masse Moléculaire Moyenne en Nombre PMAcI : Mn=20 000 g/mole.

B.1.2 Protocoles et résultats :

Dans ce paragraphe, je décris la démarche expérimentale que nous avons suivie dans le but d'utiliser les polymères cités plus haut pour mettre au point une chimie de surface capable de fixer des oligonucléotides en vue de la réalisation d'une puce à ADN pour le diagnostic génétique.

Ces protocoles sont valables pour chacun des deux polymères.

Le polymère est greffé sur la surface d'or via une couche de cystéamine
($\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$). Cette molécule bifonctionnelle se fixe sur l'or par l'intermédiaire de son thiol et accroche les polymères par son extrémité amine. Une fois immobilisé sur la surface, le polymère est hydrolysé à pH 8.5 dans un système clos à 40-45°C. Les groupements COCl sont alors remplacés par des groupements COO^- . Le polymère modifié se présente alors comme suit:



Avec $\text{R} = \text{H}$	$\Rightarrow$	Acryloyle
$\text{R} = \text{CH}_3$	$\Rightarrow$	Méthacryloyle.

Figure 25: Structure du polymère hydrolysé.

Après hydrolyse, le polymère est activé par la NHS en présence d'un carbodiimide EDC pour donner un Ester de NHS capable de fixer les molécules aminées. Après cette étape la surface d'or possède la structure suivante :

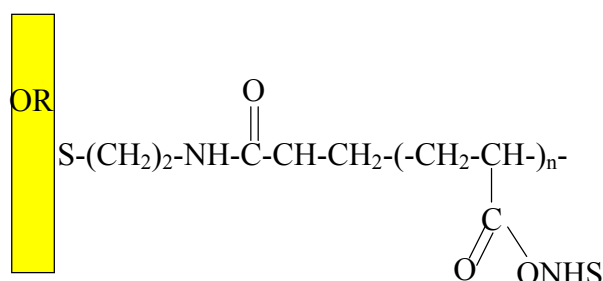


Figure 26: Structure de la surface d'or après activation du polymère greffé sur la cystéamine.

A ce stade elle est capable de réagir avec toute molécule aminée ; de ce fait deux voies sont envisageables pour y accrocher des oligonucléotides :

- 1) Fixer directement des oligonucléotides aminés sur le polymère. Dans ce cas la liaison entre les esters de NHS et les amines assure une fixation robuste des sondes. (Voie 1)
- 2) Fixer l'ExtrAvidine qui est une molécule aminée et puis accrocher des sondes biotinylées. Dans ces cas la liaison Avidine-Biotine assure le bon ancrage des fragments d'ADN. (Voie 2)

B.1.2.1.1 Voie 1 : Fixation par l'intermédiaire des amines :

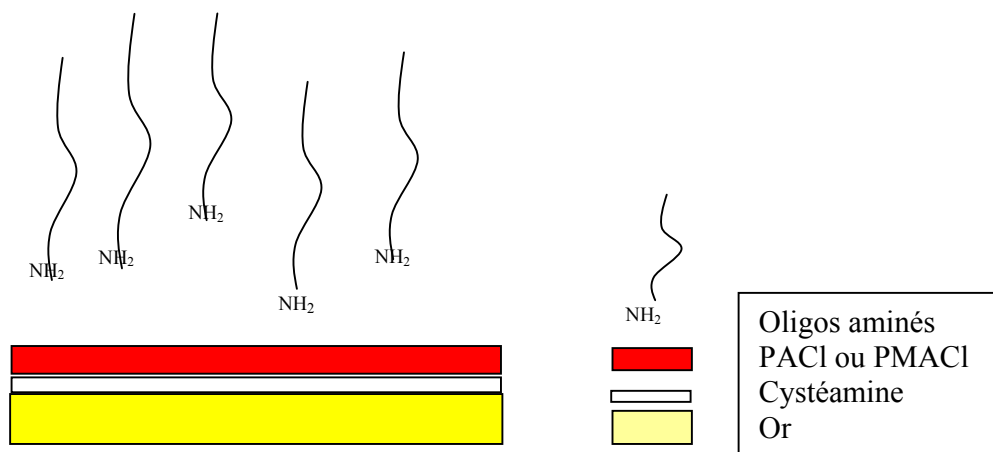


Figure 27: Fixation directe des oligonucléotides aminés sur une surface couverte d'un polymère (PACl ou PMACl) activé avec des esters de NHS.

Dans cette voie les oligonucléotides aminés dilués dans un tampon phosphate à 0.15 M en NaCl (pH=7.4), ont directement été mis en contact avec le polymère activé à la NHS/EDC. Cependant, dans ces conditions, nous fixions moins de 10 fmole/mm² ce qui correspond à un taux de fixation très faible. Plusieurs explications sont possibles, celle que nous avons exploitée suppose qu'après l'hydrolyse des fonctions chlorure d'Acyle et leur activation à la NHS, il reste des groupes carboxylate (COO⁻) sur la surface. Ces charges négatives repousseraient les oligonucléotides aminés eux aussi chargés négativement. Pour diminuer les répulsions électrostatiques, nous avons varié la concentration saline de la solution contenant les sondes aminées de 0.15 à 0.3M. Nous avons aussi essayé de favoriser le greffage par NH₂ en variant la concentration des sondes entre 0.1 g/l et 0.5 g/l soit entre 14 et 70 µM. Cependant, aucune amélioration de la fixation des oligonucléotides aminés n'a été observée.

B.1.2.1.2 Voie 2 : Fixation par l'intermédiaire du complexe Avidine-Biotine :

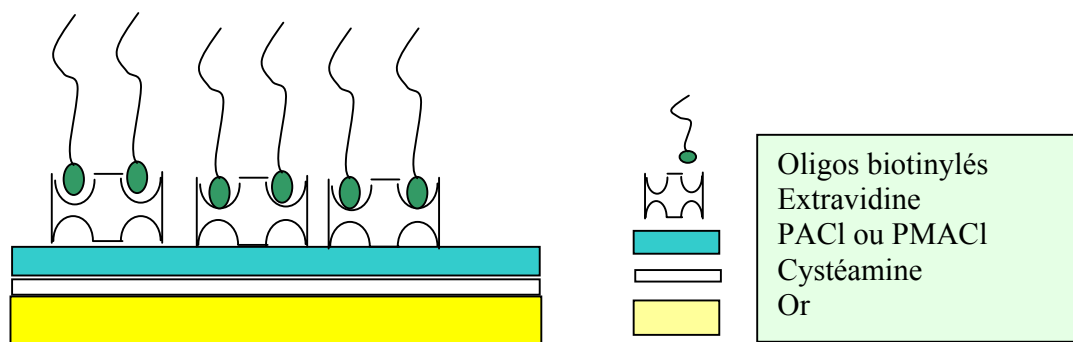


Figure 28: Structure de la surface. La cystéamine assure la fixation du polymère PACl ou PMACl sur la surface. Ce dernier est hydrolysé puis activé par une solution NHS/EDC. Il est ensuite exposé à une solution d'ExtrAvidine, une molécule aminée qui a une forte affinité à la biotine. En dernière étape les oligonucléotides biotinylés sont immobilisés sur la surface par l'intermédiaire des liaisons Avidine-Biotine.

Dans cette deuxième voie la forte affinité entre l'ExtrAvidine et la biotine assure l'ancrage des sondes biotinylées sur la surface d'or. La fixation de la protéine est suivie en direct en faisant circuler une solution à 0.2 g/l en ExtrAvidine dans la cuve du montage mono capteur. Nous avons ainsi obtenu un taux de recouvrement de 11 fmole/mm². Après la fixation de la protéine nous avons injecté dans la cuve, au cours des premières expériences, une solution d'éthanolamine (EA : $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$), dans le but de désactiver les esters de NHS n'ayant pas réagi et d'empêcher par ce fait, les réactions non spécifiques entre le polymère et les oligonucléotides. Cette étape a été suivie par la fixation de 36 fmole/mm² d'oligonucléotide biotinylé. Ensuite et pour être sûrs de l'absence d'interaction non spécifique nous avons injecté une cible non complémentaire à la sonde. Cette étude nous a permis de constater que la cible se fixait à la surface de façon non spécifique et avec un taux de recouvrement de 46 fmole/mm², supérieur au taux de recouvrement des sondes. Nous avons alors cherché à connaître la cause de ces interactions non spécifiques. Pour cela nous avons injecté le CP sur une surface d'or recouverte d'un polymère activé à l'NHS/EDC et désactivé à l'éthanolamine. Les résultats ont montré que la cible se fixait sur la surface désactivée. L'éthanolamine était mise en question. Nous l'avons alors remplacée par un tampon PBS de pH=8.5. Cette démarche nous a permis d'éviter les interactions non spécifiques cependant, le taux de recouvrement maximal en sondes biotinylées n'a pas dépassé 10 fmole/mm². Les

répulsions électrostatiques dues aux charges négatives présentent sur la surface après hydrolyse peuvent être tenues responsables de faible taux de fixation.

Résumé des résultats :

La fixation de l'ExtrAvidine n'a pas conduit à des résultats satisfaisants (Faible taux de fixation de l'ExtrAvidine et faible taux de fixation des sondes par rapport à la mono couche). Quant à la fixation directe des oligonucléotides aminés elle est empêchée par les répulsions électrostatiques entre les charges négatives du polymère et celle des oligonucléotides. Pour éviter les interactions électrostatiques, on pourrait envisager d'utiliser un polymère neutre après hydrolyse comme le polyvinylchloroformiate (PVOCI).

Vu le faible taux de fixation de molécules sondes et par suite le faible taux d'hybridation obtenu en employant les deux polymères décrits plus haut, nous les avons abandonnés. La stratégie que nous avons retenue, combine les liaisons électrostatiques et les liaisons Avidine- Biotine. Cette chimie de surface nous a donné la possibilité d'observer des interactions spécifiques et sélectives entre les différents brins d'ADN. La fonctionnalisation de la surface a été suivie en temps réel sur le banc mono capteur afin de caractériser les différentes couches formées, de vérifier la spécificité des interactions et de mettre au point un protocole d'utilisation adaptable à l'étude multiparamétrique.

B.2 Développement de la chimie de surface utilisée dans cette étude :

B.2.1 Principe :

La production des multicouches adoptées nécessite l'adsorption successive sur la surface d'or de trois produits commerciaux décrits ci-dessous :

B.2.1.1 MUA :

Le MUA (Figure 29) est un composé bifonctionnel choisi pour sa fonction thiol nécessaire à l'accrochage sur l'or, pour sa fonction carboxylique permettant la fixation électrostatique du poly(éthylène imine) et pour son bras espaceur suffisamment long pour former une mono-couche bien organisée en théorie [131]. Ce composé servira de base pour l'édifice chimique de la surface. Il possède la formule chimique suivante $C_{11}H_{22}O_2S$ (Figure 29) et une masse molaire de 218,4 g/mole. Il est soluble dans l'éthanol absolu.

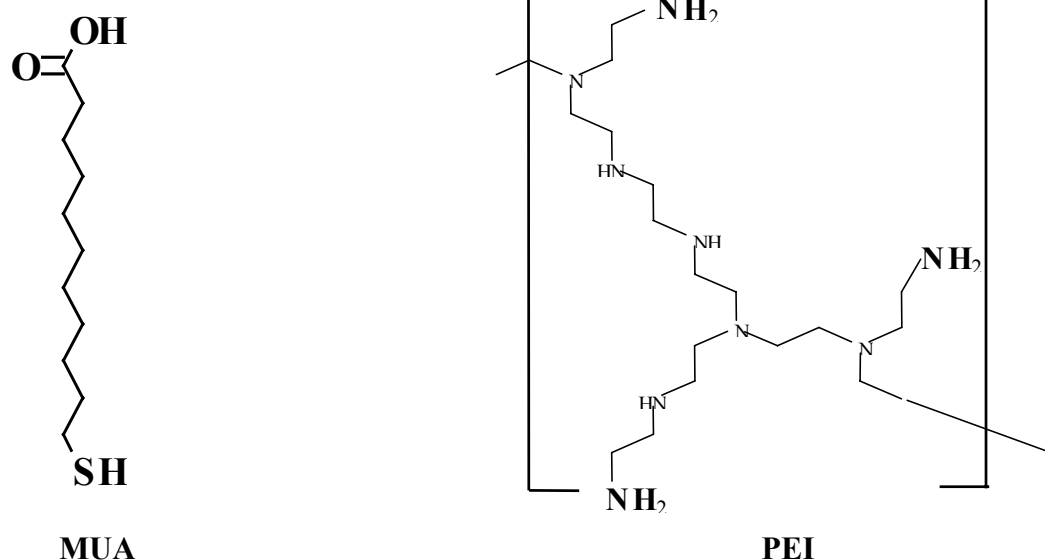


Figure 29: Structure du MUA et du PEI.

B.2.1.2 PEI :

Le poly(éthylène imine) ou (PEI) est un polymère poly cationique. Nous l'achetons sous sa forme non linéaire et avec une masse molaire élevée. Accroché de façon électrostatique au MUA, il joue le rôle du trait d'union entre l'ExtrAvidine chargée négativement à pH 7.4 et le MUA. Sa formule développée est donnée à la Figure 30. Il sera dissous dans l'eau ultra pure ou le PBS 1X*.

B.2.1.3 ExtrAvidine :

C'est une protéine dérivée de l'Avidine. Elle possède quatre sites de fixation spécifiques à la biotine (vitamine B8 ou aussi vitamine H), et présente la structure ci-dessous :

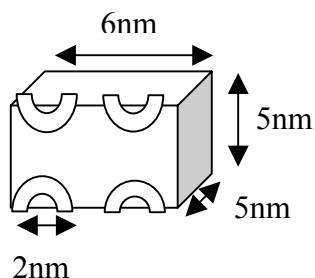


Figure 30: Structure et dimensions de l'ExtrAvidine.

* L'utilisation du tampon PBS 1X pH.7.4 est préférable à l'utilisation de l'eau ultra-pure car le pH de l'eau peut varier ce qui empêche la fixation du PEI sur le MUA.

Sa masse molaire est de 73000 g/mole. Elle est obtenue à partir de l'Avidine en déglycosylant les résidus d'Arginine. Son point isoélectrique (pI) est de 6.5. De ce fait, elle est chargée négativement à pH 7.4 contrairement à l'Avidine qui porte une charge nette positive pour cette valeur de pH. Finalement elle combine la spécificité ainsi que la forte affinité de l'Avidine pour la biotine et présente en plus de faibles interactions non spécifiques avec les oligonucléotides à pH 7.4. Elle sera dissoute dans le PBS 1X pH 7.4.

La structure finale de la surface fonctionnalisée est donnée par la Figure 31 et sa préparation est effectuée de deux façons différentes : en direct sur le banc 'mono capteur' ou en bûcher.

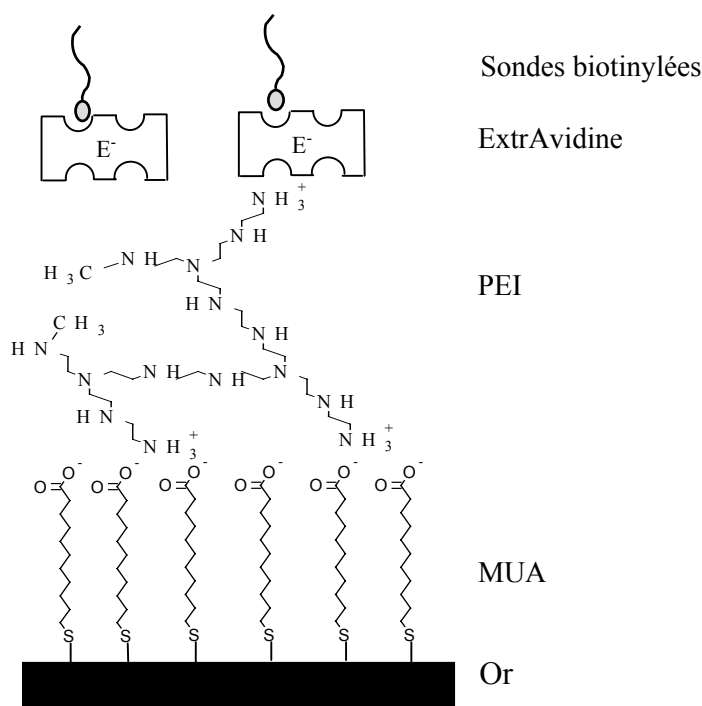


Figure 31: Structure chimique de la surface. Une mono couche de MUA sert de couche intermédiaire pour fixer le PEI sur la surface d'or. L'ExtrAvidine est fixée sur le PEI par l'intermédiaire des liaisons électrostatiques. Finalement les sondes biotinylées sont déposées sur la surface.

B.2.2 Préparation de la multicouche suivie sur le banc mono capteur :

Une lame de verre (25 x 25 cm) couverte de 2 nm de chrome et de 48 nm d'or, est nettoyée à l'alcool ultra pur et à l'eau puis plongée dans une solution alcoolique de MUA de concentration 0.22 g/l pendant une nuit entière. Durant cette étape une agitation horizontale continue permet d'homogénéiser la solution et de garantir ainsi une répartition uniforme du MUA sur la surface. La grande affinité de l'or pour les thiols assure la fixation du MUA.

Après trois rinçages à l'éthanol et trois rinçages à l'eau, l'excès de MUA est évacué. Le côté verre de la lame est séché et le substrat couplé à un prisme d'indice 1.515 et monté sur le banc « mono capteur ». Le but de cette opération est de caractériser la bicouche PEI-ExtrAvidine et d'observer, en temps réel (Figure 32), l'hybridation entre deux brins d'ADN complémentaires.

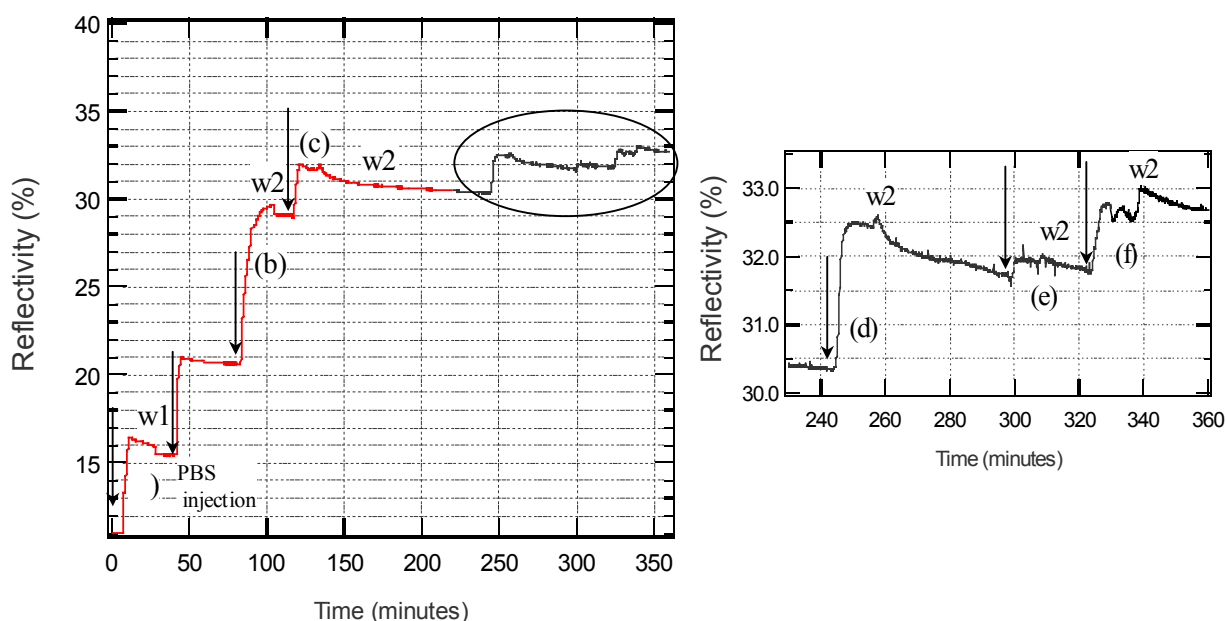


Figure 32: Suivi en direct, du traitement chimique d'une surface d'or modifiée avec du MUA et observation en temps réel de l'hybridation. La cinétique représente l'augmentation de la réflectivité suite à la fixation des molécules chimiques ou biologiques sur la couche de MUA. Après l'adsorption électrostatique du PEI (a), l'ExtrAvidine (0.2 g/l) (b) est injectée dans la cuve, la surface est ensuite exposée au CP (c) pour neutraliser les charges positives restantes du PEI. Une solution d'oligonucléotides biotinylés (15 μ M) (d) est introduite dans la cuve afin de fixer les brins d'ADN biotinylés sur l'ExtrAvidine. Une seconde injection de CP sert à vérifier l'absence d'interaction non spécifique (e). Finalement c'est l'hybridation avec des cibles totalement complémentaires à 15 μ M (f). w1 et w2 sont des étapes de rinçage à l'eau puis au PBS (respectivement). Les flèches indiquent les instants où les solutions sont injectées dans la cuve.

La cuve est d'abord remplie d'eau. La rotation simultanée du prisme et de la photodiode de mesure permet de tracer la courbe plasmon en fonction de l'angle de rasance externe (Figure 10). Après avoir choisi l'angle de travail correspondant à la pente maximale de la courbe, nous enregistrons les cinétiques qui permettent de suivre en temps réel la fonctionnalisation de la surface. Une solution aqueuse* de poly(éthylène imine) à 2.5 g/l circule alors dans la cuve pendant une demi-heure. La fixation du PEI sur la surface est observée en temps réel (étape b de la Figure 32). Le rinçage à l'eau élimine tout ce qui n'est pas fixé. La surface est ensuite mise en contact avec le tampon PBS 1X. Nous pouvons

* Bien que j'aie toujours dilué le PEI dans l'eau je préconise de remplacer ce solvant par le tampon PBS 1X pH 7.4 qui assure une meilleure fixation du PEI sur le MUA.

maintenant fixer l'ExtrAvidine diluée dans ce dernier tampon à une concentration de 0.2 g/l. L'ExtrAvidine ayant un point isoélectrique de 6.5, est chargée négativement à pH 7.4. Elle peut alors se fixer sur le PEI par liaisons électrostatiques. La couche de protéine déposée n'est pas uniforme et ne couvre pas totalement le polymère. Les charges positives non masquées sont responsables d'interactions non spécifiques avec les molécules biologiques circulant au-dessus de la surface et donc d'un bruit de fond important. Pour s'en affranchir, une solution d'oligonucléotides non pertinents traverse la cuve. Ces molécules chargées négativement se fixent sur les charges positives encore libres du polymère, bloquant ainsi toute interaction non spécifique. L'ADN biotinylé est ensuite fixé sur les molécules d'ExtrAvidine. Un deuxième passage de l'oligonucléotide non pertinent sert à vérifier l'absence de toute interaction parasite. En dernier lieu la cible complémentaire à la sonde est mise en contact avec la surface neutralisée. L'hybridation se traduit par l'augmentation de l'intensité lumineuse. Chacune de ces étapes dure une vingtaine de minutes.

Comme nous l'avons déjà vu, chaque produit injecté dans la cuve, induit une variation de la réflectivité. Cette dernière est reliée à la variation de l'épaisseur et de l'indice du milieu. A leur tour, ces deux paramètres sont reliés à la masse déposée par unité de surface (c'est à dire au taux de recouvrement) (cf. Eq.6) et au nombre de molécules fixées par unité de surface aussi. Dans le tableau ci-dessous, nous regroupons les variations de la réflectivité engendrées par le dépôt du matériel biologique (ExtrAvidine, Oligonucléotide non pertinent, sondes biotinylées et cibles) sur la surface. Ces valeurs nous ont permis de remonter au taux de recouvrement et par suite au nombre de molécules déposées par unité de surface. Dans nos calculs du taux de recouvrement nous avons considéré la variation de l'indice en fonction de la concentration ($\frac{\partial n}{\partial c}$) est égale à 0.18 pour l'ExtrAvidine et 0.15 pour les oligonucléotides.

Nous avons pu ainsi déterminer que le taux d'hybridation entre les sondes biotinylées fixées sur la surface et les cibles complémentaires injectées, avoisine les 90%.

Caractéristique du Matériel				Données Expérimentales			
Couche	MW (g/mol)	Taille	Indice	Variation de la Réflectivité (% ± 0.1 %)	Taux de recouvrement Γ en (ng/mm ²)	Taux de recouvrement en (fmole/mm ²)	10 ⁹ Molécules/mm ²
ExtrAvidine	73000	5*5*6 nm ³	1.45	8.3	1.64	22	13
Séquence non-relevante (CP)	4895	16 bases	1.41	1.3	0.30	61	36
Sondes Biotinylées	6462	21 bases	1.41	1.3	0.30	46	28
Séquence non-relevante (CP)	4895	16 bases	1.41	0.1	0.02	5	3
Cible (spécifique)	4505	15 bases	1.41	0.8	0.19	42	25

Tableau 1: Tableau rassemblant les variations de réflectivité causées par le dépôt des différents produits biologiques utilisés (ExtrAvidine, CP, Sondes biotinylées et Cibles) sur la surface. Ces variations nous permettent de calculer le nombre de molécules fixées par unité de surface. Ainsi, nous remarquons qu'une molécule d'ExtrAvidine fixe en moyenne 2 sondes et que le taux d'hybridation entre les cibles et les sondes vaut 91%. Nous remarquons aussi que le CP injecté pour la deuxième fois ne se fixe pas sur la surface. Ce fait confirme la spécificité de l'hybridation.

Ainsi, le montage mono-capteur nous a servi pour maîtriser en direct la préparation de la surface et quantifier le taux d'hybridation. Cependant cette façon de fonctionnaliser la surface n'est pas adaptée à une production en série car elle consomme beaucoup de temps. En plus elle ne convient pas au dépôt de plots car :

- 1) la surface traitée correspond à la surface de la cuve soit un disque d'environ 0.5 cm² ; il faut donc bien calibrer le robot de dépôt pour que les plots soient déposés à l'intérieur de cette région,
- 2) la cuve laisse une trace sur l'or qui abîme la surface,
- 3) finalement nous pouvons difficilement nettoyer les traces de l'huile d'adaptation d'indice que nous utilisons pour fixer la lame sur le prisme. Ces traces introduisent une dispersion ce qui diminue la sensibilité du système.

Pour éviter tous les inconvénients de la méthode précédente, nous avons décidé de préparer les lames dans un bêcher. Par cette technique plus adaptée à la production en série, la totalité de la surface d'or est couverte de la tri-couche MUA-PEI-ExtrAvidine.

B.2.3 Préparation de la multicouche dans un b cher :

La lame de microscope de dimension 75 x 25 cm est pré ray e, à l'aide d'un dispositif fait maison, en 4 petites lamelles et nettoy e trois fois à l'alcool et trois fois à l'eau ultra pure. Puis, comme précédemment, elle est plong e dans une solution éthanolique de MUA à 0.22 g /l pendant 17h et agit e horizontalement. Ensuite, elle subit trois rinçages à l'EtOH absolu et trois rinçages à l'eau avant de baigner dans une solution aqueuse de PEI (2.5 g/l) pendant 50 minutes. L'agitation horizontale est maintenue pendant cette étape aussi. Au bout de ce temps la lame est rinc e trois fois à l'eau puis s ch e par centrifugation. Ensuite, 40  l d'une solution d'ExtrAvidine à 0.2 g/l sont déposés sur chacune des quatre petites lamelles.   l'aide d'une lame couvre-objet la goutte d'ExtrAvidine est  tal e sur la surface. Après trente minutes de contact la lame est tourn e sens dessus-dessous au dessus d'une solution de PBS 1X. La lame couvre-objet glisse et la surface est rinc e au PBS 1X. Un dernier rinçage à l'eau ultra pure permet d'éviter toute trace de sel lors du séchage. Cette dernière étape est aussi effectu e par centrifugation et la lame est enfin prête au dépôt. Le protocole détaillé de ces expériences est disponible dans l'Annexe 5. Suite à cette préparation nous pouvons déposer les différents oligonucléotides sondes sous forme de plot. Cette étape est décrite au paragraphe suivant.

B.2.4 Dépôt des oligonucléotides biotinylés :

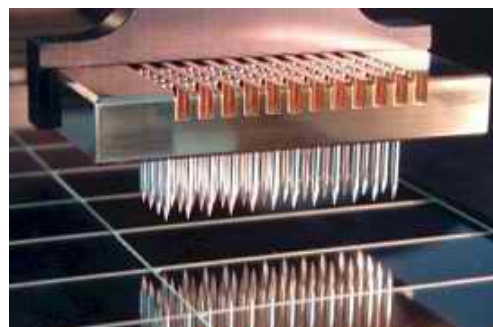
Dans ce paragraphe nous décrivons la démarche adopt e pour déposer les sondes biotinyl es sur la surface d'or fonctionnalisée. De ce fait, nous abordons la technique de dépôt ainsi que l'optimisation de la concentration des sondes, l'amélioration de la qualité des plots et l'optimisation de la distance entre la séquence utile de la sonde et la surface.

B.2.4.1 Technique de dépôt :

Les oligonucléotides biotinylés sont dilués dans une solution de PBS 1X avec de la bétaine (1.5 M), produit retardant l'évaporation. Le robot QArray de GENETIX, dont la photo est repr sent e à la Figure 33A, est utilisé pour les répartir sur la surface suivant les matrices d sir es. Dans le cadre de notre application, la partie du robot servant au dépôt des plots (la tête) est une aiguille pleine et pointue (Figure 33B).



(A)



(B)

Figure 33: (A) Photo du robot Qarray, (B) Photo des aiguilles pleines utilisées pour le dépôt.

Les produits biologiques sont répartis dans une plaque de 384 puits. L'aiguille plonge dans le puits puis dépose le produit sur la lame. L'opération est répétée jusqu'à ce que tous les plots d'une même espèce soient mis sur la surface. Ensuite l'aiguille subit deux lavages à l'eau dont le premier dure 4000 ms et le second 1500 ms suivis d'un lavage à l'alcool 70% qui dure 1750 ms. Un coup d'air comprimé (20 s) termine l'opération. L'aiguille sèche est prête à déposer les plots d'une seconde espèce.

Le dépôt se fait en atmosphère humide afin d'éviter le séchage rapide des plots déposés et de permettre ainsi temps au complexe ExtrAvidine - Biotine de se former en phase liquide. L'aiguille dépose trois fois le même produit au même endroit de la lame. Nous obtenons alors des plots de quelque nanolitres ayant un diamètre de 200 μm .

B.2.4.2 Optimisations du procédé :

B.2.4.2.1 Optimisation de la concentration des oligonucléotides sondes :

Pour optimiser la concentration de la solution déposée, nous avons entrepris des expériences en multicapteur. Deux types de sonde de séquences totalement distinctes et de 20 bases de long (sonde 1 et 4 cf. Tableau 3 page 115) ont été déposés sur la lame en six concentrations différentes chacune. Ces dernières étaient comprises entre 10^{-6} g/l soit $1.4 \cdot 10^{-4}$ μM et 2 g/l soit 280 μM . Les solutions déposées ont été préparées dans un tampon PBS sans bétaine car à cette époque nous étions encore à la recherche d'une solution pour améliorer la qualité des plots. Lors d'une même expérience nous avons étudié **l'effet de la concentration** des sondes pour **deux types** de sondes. Les cibles complémentaires à chacune

des sondes ont été testées séparément. Les résultats obtenus suite au passage d'une solution à 0.1 g/l soit 15 μ M en cible sont identiques et sont résumés à la (Figure 34).

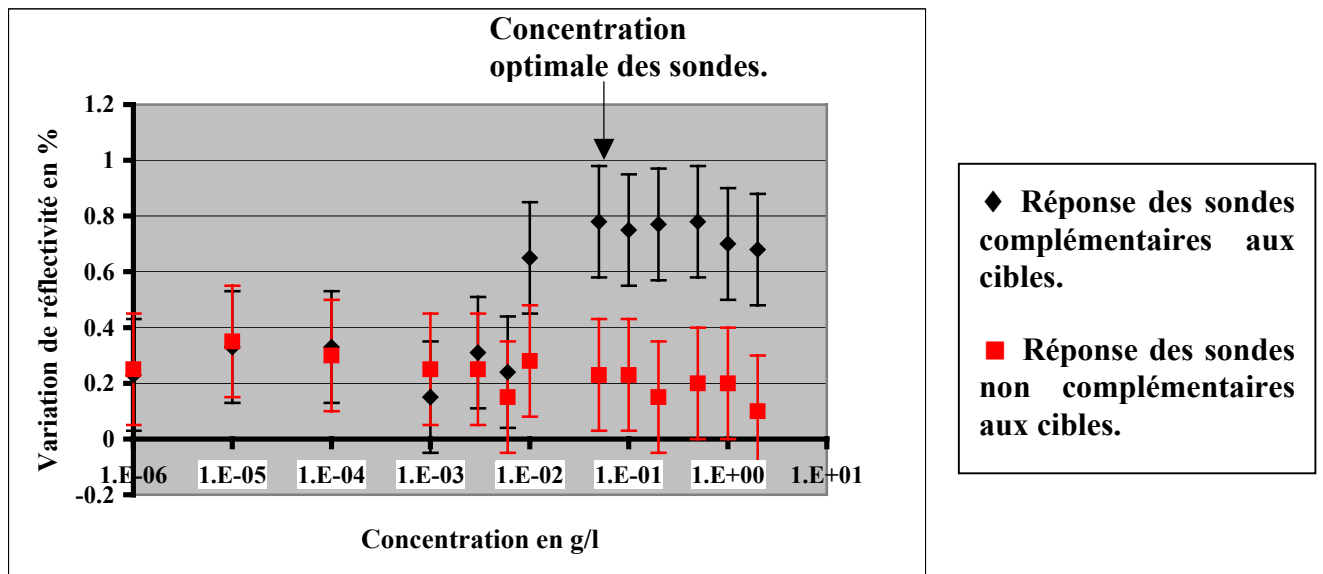


Figure 34: Figure représentant, en échelle logarithmique, l'effet de la concentration des sondes sur la réponse du capteur. Deux sondes différentes sont fixées sur la surface à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 2 g/l soit entre 1.4×10^{-4} et 280 μ M. La cible de 20 bases est testée à une concentration de 0.1 g/l soit 15 μ M.

La valeur optimale de la concentration des sondes a été trouvée égale à 0.05 g/l soit 7 μ M (Figure 34). Au-delà de cette concentration les sondes biotinylées non fixées à l'ExtraAvidine sont entraînées par le flux du tampon et forment, après hybridation, une queue de comète autour du plot (Figure 35) ce qui peut causer une contamination d'un plot à l'autre et donc de faux résultats et un bruit de fond important. Par contre si la concentration ≤ 0.01 g/l soit 1.4 μ M, le signal d'hybridation est faible (environ 0.2%) et il est identique pour les deux types de sondes testées. Le système perd alors sa sélectivité.

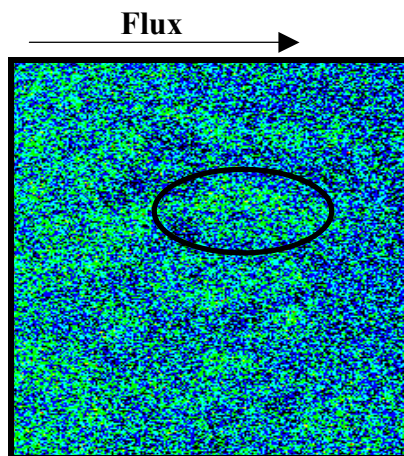


Figure 35: Image obtenue en soustrayant deux images acquises par la caméra lors du passage des cibles sur la surface. La zone encadrée montre la queue observée autour des plots où nous avons déposé des sondes à une concentration de 0.5 g/l soit 70 μ M.

B.2.4.2.2 Optimisation de la qualité des plots :

Au cours des premières expériences, les sondes ont été diluées dans un tampon PBS 1X sans bétaine. Les gouttes déposées séchaient rapidement laissant sur la surface des plots non uniformes et inhomogènes. L'ajout de la bétaine à 1.5 M, produit retardant l'évaporation, a eu pour effet d'améliorer la forme des plots ainsi que leur homogénéité. Ce qui nous a permis de mieux visualiser la dimension des plots et donc de mieux sélectionner les régions de la surface sur lesquelles nous cherchons à analyser les interactions bio moléculaires.

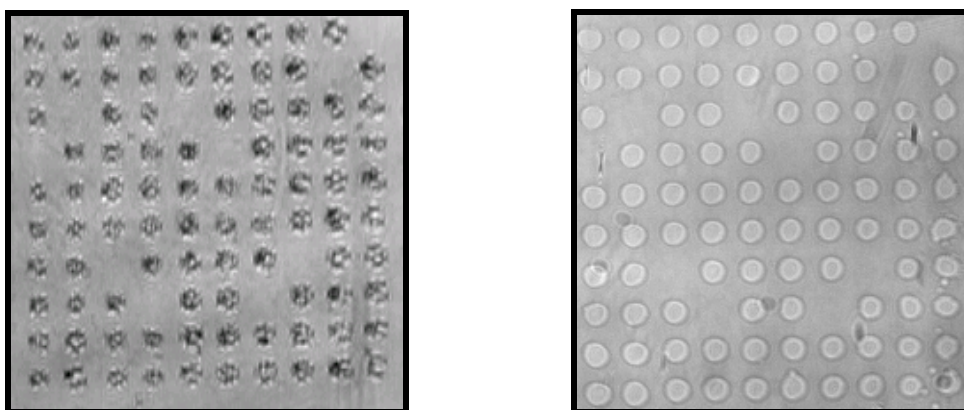


Figure 36: Photo des plots déposés dans un tampon PBS 1X sans bétaine (gauche) Photo des plots déposés dans un tampon PBS 1X avec bétaine 1.5 M (droite).

B.2.4.2.3 Optimisation du bras espaceur :

Les sondes biotinylées déposées sur la surface comportent trois parties : la biotine, un bras espaceur et une séquence utile qui s'hybride aux cibles. Le bras espaceur a pour rôle d'éloigner la séquence utile de la surface afin quelle soit plus accessible aux cibles.

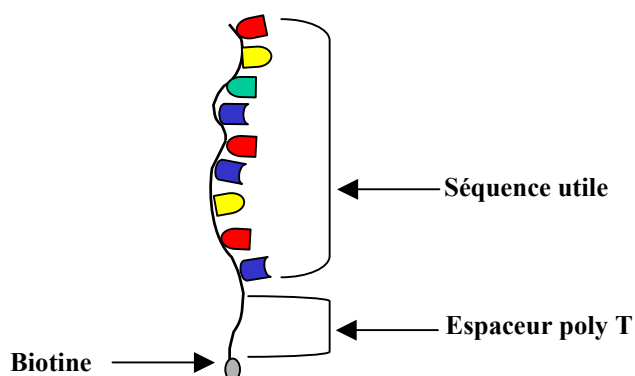
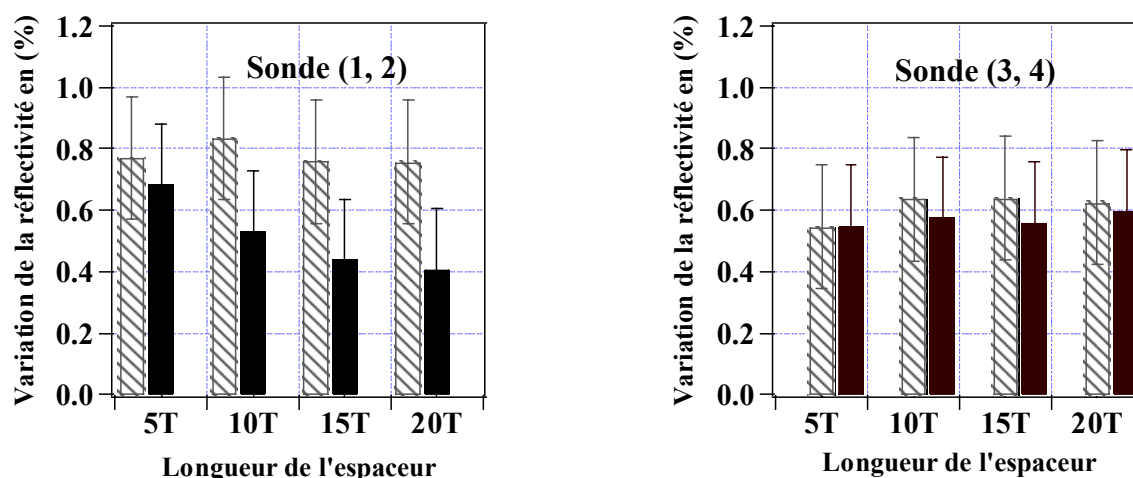


Figure 37: Les sondes utilisées sont composées de trois parties : la biotine, le bras espaceur qui sépare la séquence utile de la surface et la séquence utile qui s'hybride aux cibles.

Dans nos expériences nous avons choisi comme espaceur une succession de base Thymine (T). Pour évaluer l'effet de la longueur de ce bras, nous avons déposé sur une même surface fonctionnalisée et dans une matrice de 49 plots, quatre sondes (1, 2, 3, et 4 cf. Tableau 3 page 115) que nous groupons par paire (1, 2) et (3, 4). La longueur de bras espaceur de chaque sonde a été variée entre 5 bases T (5T) et 20 bases T (20T). Les deux séquences d'une même paire interagissent avec les mêmes cibles. La différence entre les séquences des sondes 3 et 4 est moins importante que la différence entre les séquences des sondes 1 et 2. Pour cela nous avons une plus grande difficulté à discriminer la réponse des sondes 3 et 4 que de discriminer celle des sondes 1 et 2. Quand l'une des séquences d'une même paire est totalement complémentaire à la cible injectée, la deuxième est dite partiellement complémentaire à cette même cible.

Les cibles complémentaires aux séquences utiles et de même longueur ont été injectées dans la cuve à une concentration de 15 μ M. Les résultats typiques obtenus sont représentés à la Figure 38 et montrent que la longueur du bras espaceur influe peu sur l'intensité du signal mesuré. Par contre son effet est plus important sur la capacité des sondes à s'hybrider **sélectivement** aux cibles qui leur sont totalement complémentaires. Une

longueur du bras espaceur égale à 15T permet d'optimiser la sélectivité du système. Nous en tiendrons compte lors des dernières expériences en multicapteur.



En hachuré : Variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes complémentaires aux cibles injectées.

En plein : Variation de la réflectivité au niveau des plots partiellement complémentaires aux cibles injectées.

Figure 38: Histogrammes représentant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sonde 1 et 2 (à gauche) et de plots de sonde 3 et 4 (à droite). Dans les deux cas nous remarquons que la longueur des bras espaceur influe peu sur la variation de réflectivité au niveau des plots de sondes totalement complémentaires aux cibles. Par contre, elle affecte de façon plus significative la réponse des plots de sondes partiellement complémentaires. Dans les deux cas un bras espaceur de 15T permet de mieux différencier la réponse des sondes totalement complémentaires aux cibles de celle des sondes partiellement complémentaires aux cibles.

Les surfaces ainsi fonctionnalisées sont conservées au réfrigérateur à 4°C dans des tubes en plastique. La durée de conservation maximale testée est de trois mois.

Conclusion

Dans la première partie de ce chapitre j'ai décrit de façon non exhaustive les différentes chimies de surface adaptées à la fixation des oligonucléotides sur des supports rigides. Je les ai ainsi classées en quatre catégories : la synthèse in situ des sondes, la fixation directe, l'électropolymérisation et la fixation indirecte. La première technique a été essentiellement développée par Affymetrix pour les puces à ADN lues par fluorescence. La seconde consiste à fixer de façon covalente, par l'intermédiaire d'une extrémité thiolée (resp. aminée), des mono-brins d'ADN un substrat en or (resp. sur une surface silanisée). La troisième met à contribution des monomères, comme le pyrrole, qui se polymérisent sur la surface métallique sous l'effet d'un potentiel électrique. Finalement la quatrième catégorie regroupe toutes les techniques mettant en jeu des auto-assemblages différents dont le but est de fixer les biomolécules sur une surface rigide en exploitant les affinités existant entre l'Avidine et la Biotine, les maleimides et les thiols, les ester de NHS et les amines, les thiocyanates et les amines ou même les liaisons électrostatiques. Parmi toutes ces techniques l'exploitation du système Avidine-Biotine est très populaire à cause de la grande affinité entre ces deux molécules qui assure une fixation robuste des sondes.

Dans notre laboratoire, après avoir vainement essayé d'immobiliser des oligonucléotides sur le PACl et PMACl, nous avons mis au point une fonctionnalisation des lames d'or par l'intermédiaire des liaisons électrostatiques entre l'acide mercapto-undécanoïque (MUA), un polymère non linéaire le polyéthylène imine (PEI) et l'ExtrAvidine. Le MUA qui est une molécule bifonctionnelle sert de tapis de base pour tout l'édifice. Il joue le rôle d'intermédiaire pour fixer le PEI sur l'or. L'ExtrAvidine, attachée électrostatiquement au PEI ancrera les sondes biotinylées. Ces dernières, préparées dans un tampon PBS 1X contenant 1.5 M de bétaine, sont déposées sur la surface par un robot de dépôt de marque Genetix, selon des motifs bien déterminés et à une concentration de 7 μ M.

Après avoir décrit la résonance des plasmons de surface et la chimie de surface adoptée et avant d'aborder les expériences réalisées, je décrirai, dans le troisième chapitre de cet ouvrage, la mucoviscidose, maladie qui nous intéresse, ainsi que le matériel biologique utilisé.

Chapitre III :

Matériel biologique et Mucoviscidose.



A	<u>DESCRIPTION DU MATERIEL GENETIQUE :</u>	80
A.1	<u>QU'EST-CE QUE L'ADN ?</u>	80
A.2	<u>LES MUTATIONS ET LEURS EFFETS SUR LA STABILITE DU DOUBLE BRIN D'ADN :</u>	84
A.2.1	<u>Les délétions :</u>	85
A.2.2	<u>Les substitutions :</u>	85
A.3	<u>LA TEMPERATURE DE FUSION :</u>	86
A.3.1	<u>Définition de la Température de fusion (Tm) :</u>	86
A.3.2	<u>Paramètres influençant la température de fusion :</u>	87
A.3.2.1	<u>Influence de la séquence :</u>	88
A.3.2.2	<u>Influence de la composition de la solution :</u>	89
A.3.3	<u>Calcul de la température de fusion :</u>	91
A.3.3.1	<u>Formules proposées pour le calcul de la Tm :</u>	91
A.3.3.2	<u>Calcul théorique et comparaison :</u>	95
B	<u>LA MUCOVISCIDOSE :</u>	102
B.1	<u>DESCRIPTION PHENOTYPIQUE [158-165] :</u>	102
B.2	<u>DIAGNOSTIC :</u>	103
C	<u>DESCRIPTION GENETIQUE DE LA MUCOVISCIDOSE :</u>	106
C.1	<u>LE GENE DE LA MUCOVISCIDOSE :</u>	106
C.2	<u>TRANSMISSION DE LA MALADIE :</u>	108
	<u>CONCLUSION :</u>	109



Résumé :

Ce chapitre a pour but de faire un rappel biologique concernant les molécules d'ADN, matériel biologique central de mes expériences. Il présente aussi une description brève de la mucoviscidose : son incidence, ses causes, comment la diagnostiquer ainsi que son mode de transmission.

Le paragraphe A est consacré à la description du matériel génétique. Le paragraphe B décrit brièvement la maladie qui nous intéresse et les tests qui permettent de la diagnostiquer alors que le paragraphe C expose son mode de transmission.

Au cours de la deuxième moitié du vingtième siècle, les techniques mises au point pour étudier et déchiffrer les molécules d'ADN se sont développées à grande vitesse. Le domaine d'application de ces nouvelles technologies est très vaste et il comprend notamment le dépistage des anomalies génétiques responsables de différentes maladies comme par exemple le cancer, la trisomie 21, la mucoviscidose et bien d'autres.

C'est dans ce cadre que se situent mes travaux de thèse dont le but est de réaliser un système optique pour le **diagnostic génétique** de la mucoviscidose. J'ai ainsi été amenée à manipuler des molécules d'ADN synthétiques tout au long de mes expériences. Pour cela il est important de faire un rappel sur la structure et les propriétés de ce matériel afin de mieux comprendre les phénomènes observés et analysés. De plus, comme nous étudions le cas spécifique de la mucoviscidose, il m'a semblé intéressant de présenter cette maladie génétique, les différentes méthodes de diagnostics disponibles ainsi que son mode de transmission.

A Description du matériel génétique :

A.1 Qu'est-ce que l'ADN ?

Décrite, en avril 1953, par Watson et Crick [4,132], la molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN) est la clé de la biologie moléculaire et des biotechnologies. Ces macromolécules, deviennent de plus en plus populaires et stimulent l'imagination de beaucoup de réalisateurs de films [133]. En fait, elles sont le support du programme génétique de tout être vivant [133-135]. Elles contrôlent la dynamique biochimique, la vie, la différenciation et la reproduction de chacune de nos cellules. De ce fait, l'expression des informations qu'elles recèlent définit la couleur de nos yeux, de nos cheveux, notre taille, la capacité de nos globules rouge à retenir l'oxygène... en somme, tout ce qui constitue nos caractères morphologiques, physiologiques ou biochimiques. Ces molécules sont aussi responsables de la transmission des caractères héréditaires d'une génération à l'autre, de l'unicité et de l'originalité de chaque individu [134, 135]. Quelle est leur structure ? De quoi sont-elles constituées ? Et quelles sont leurs propriétés ?

Après avoir analysé les photos de diffraction des rayons X prises par Rosalind. E. Franklin et M. Wilkins [133], Watson et Crick décrivent la molécule d'ADN comme étant un ensemble de deux chaînes enroulées en double hélice autour d'un même axe. Elle est semblable à une échelle tordue. Ses rampes sont formées d'une structure rigide mais flexible de sucres phosphatés et ses marches de paires de bases complémentaires (Figure 39). Le plan des bases est perpendiculaire à l'axe de l'hélice alors que le plan des résidus de sucre lui est parallèle [132]. Les bases, hydrophobes, sont ainsi protégées à l'intérieur de la structure tandis que les groupements phosphate, hydrophiles, sont exposés à l'extérieur et peuvent ainsi interagir avec l'eau et le milieu ambiant. Cette configuration correspond à une dépense énergétique minimale. Les deux chaînes sont antiparallèles et sont liées entre elles par l'intermédiaire de ponts d'hydrogène formés au niveau des bases qui se trouvent face à face.

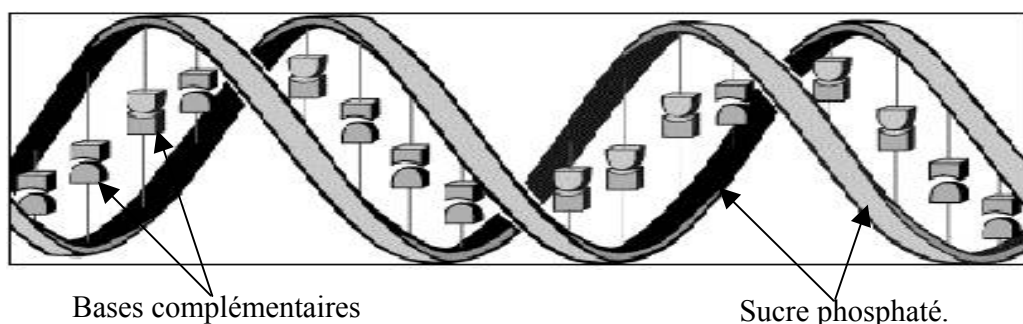


Figure 39: Schéma d'une double hélice d'ADN.

En tout, 4 bases forment notre alphabet génétique : l'Adénine A, la Cytosine C, la Thymine T et la Guanine G. Elles sont classées en bases puriques (A, G) et pyrimidiques (C, T) (Figure 40). Selon Watson et Crick, les bases se situent face à face entre les deux chaînes phosphatées, existent sous leur forme tautomérique la plus probable, et s'apparient par des ponts d'hydrogène de façon spécifique. Une base purique s'apparie toujours avec une base pyrimidique. D'autre part, comme le nombre d'Adénine (A) (respectivement de Guanine (G)) est toujours égal au nombre de Thymine (T) (respectivement de Cytosine (C)) [136, 137, 138], les deux paires de base rencontrées sont les paires A/T et G/C. Les ponts d'hydrogène s'établissent entre les groupements kéto (—C=O) et amine ainsi qu'entre les noyaux cycliques des bases. De ce fait, les bases G et C sont liées par trois ponts d'hydrogène tandis que les bases A et T sont liées par deux ponts d'hydrogène (Figure 41). La paire G/C est donc plus stable que la paire A/T. En d'autres termes, la séparation des bases G et C nécessite plus d'énergie que la séparation des bases A et T.

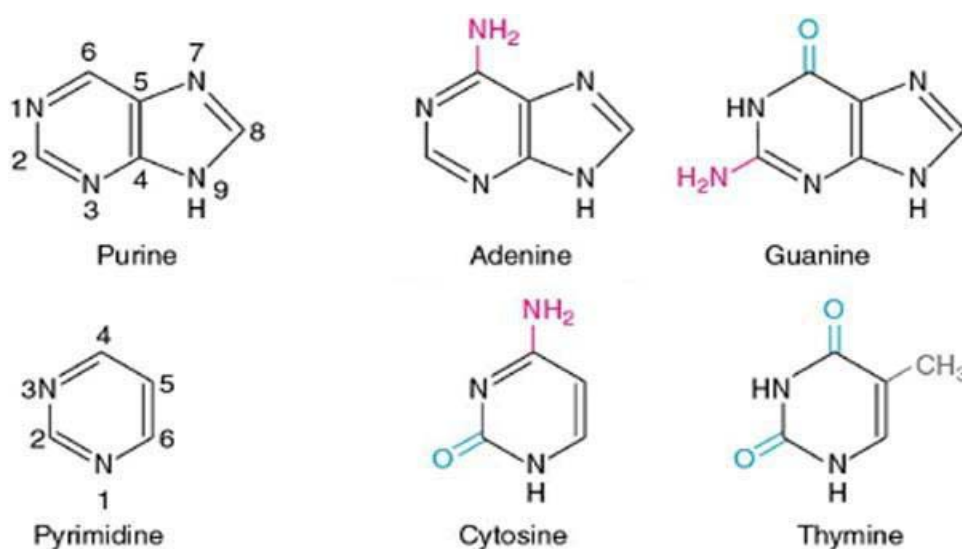


Figure 40: Structure des bases puriques (Adénine et Guanine) et pyrimidiques (Cytosine et Thymine).

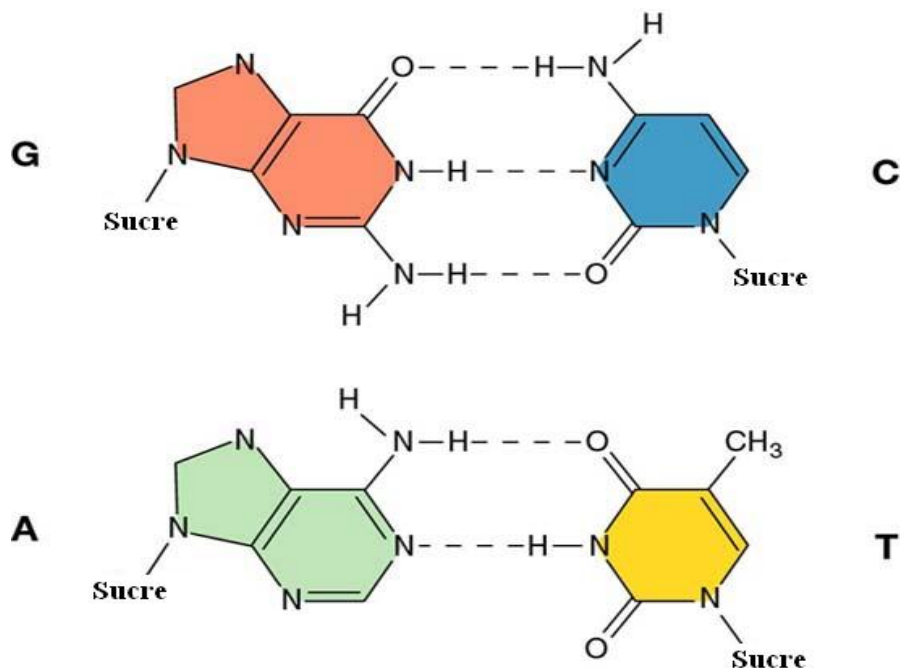


Figure 41: Schéma des liaisons par pont d'hydrogène entre base puriques et pyrimidiques. La Guanine (G) et la Cytosine (C) se lient par l'intermédiaire de trois ponts à hydrogène alors que l'Adénine (A) et la Thymines (T) s'associent par deux ponts à hydrogène.

Dans son état naturel, la double hélice d'ADN possède donc une structure qui, sous certaines conditions de température et de pH, peut être séparée en deux molécules complémentaires appelées mono brins d'ADN ou ADN simple brin. C'est la déshybridation. L'ADN simple brin est un polymère relativement fragile [134], formé d'une succession de bases greffées sur un squelette de sucres phosphatés. Chaque base munie d'un élément structural de sucre phosphaté (le désoxyribose) constitue une unité de base appelée nucléotide (Figure 42). À cause de la complémentarité des bases, la séquence d'un mono brin détermine automatiquement la séquence de l'autre. Les deux mono brins ainsi obtenus sont dits totalement complémentaires. L'appariement de deux mono brins est appelé **hybridation**.

Par convention, les séquences d'ADN sont toujours orientées dans le sens 5'→3', 5' et 3' étant les numéros des carbones dans la molécule de sucre (Figure 42). En effet la liaison de deux nucléotides est assurée par l'intermédiaire du radical OH à l'extrémité du carbone 3' et du triphosphate de l'extrémité 5'. Les deux mono brins complémentaires formant une double hélice se positionnent face à face dans des sens opposés (Figure 43). L'ordre avec lequel les

bases se succèdent est primordial pour l'expression des gènes : une simple inversion de nucléotide peut entraîner une maladie.

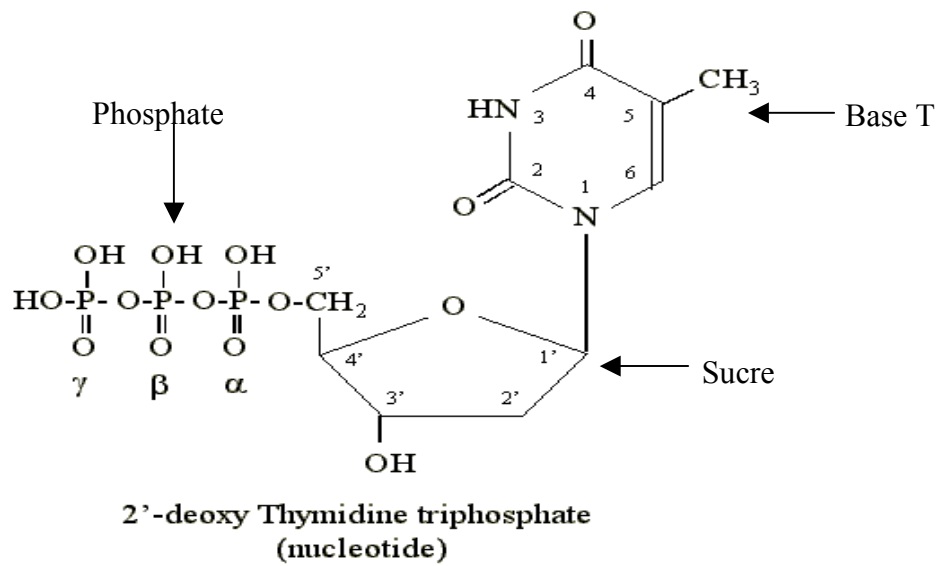


Figure 42 : Structure d'un nucléotide. Nous reconnaissons les trois éléments formant cette unité de base de l'ADN : Le phosphate, le sucre et la base.

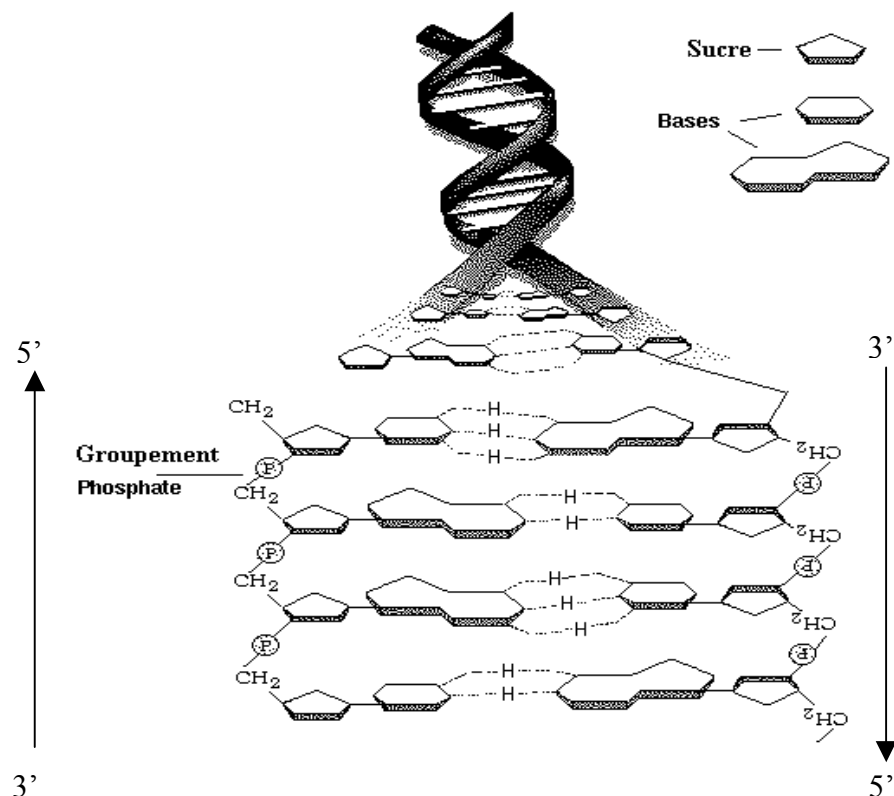


Figure 43 : Détail du double brin d'ADN. Les deux mono brins formant cette molécule sont liés entre elles par des ponts d'hydrogène et sont orientés en sens inverse (5'→3'/3'→5').

Quelques chiffres :

- ☀ Chez l'homme, une molécule d'ADN mesure 7 mètres et code environ 20 à 25 000 gènes.
- ☀ La distance entre deux bases consécutives est de 0.34 nm.
- ☀ Un tour de la double hélice compte 10 paires de bases.
- ☀ La double hélice fait 2 nm de diamètre.
- ☀ Le poids moyen des bases en Dalton est de 313,21 pour l'Adénine (A), 329,21 pour la guanine (G), 289.18 pour la cytosine (C) et 304,2 pour la Thymine (T) [139].

Nous pouvons synthétiser, in vitro, des fragments d'ADN qui correspondent à l'enchaînement spécifique de nucléotides et que nous appelons oligonucléotide. Par conséquent, l'oligonucléotide est une courte séquence d'ADN mono brin qu'on peut aussi nommer par le nombre de bases qui le constitue : par exemple, un oligonucléotide de 15 bases est aussi appelé un 15-mers. Comme toute séquence d'ADN, la lecture de la séquence de l'oligonucléotide se fait de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' qui est le sens d'élongation d'un fragment d'ADN. Au cours de la synthèse in vitro, l'une des extrémités peut être modifiée par différentes chimies : par exemple, on peut greffer en 5' une biotine ou une amine (NH₂) ou même un thiol. Les oligonucléotides sondes qui ont fait l'objet de mon étude ont tous été modifiés par une biotine à leur extrémité 5'.

A.2 Les mutations et leurs effets sur la stabilité du double brin d'ADN :

Avant de se diviser, la cellule réplique son ADN produisant ainsi deux copies identiques. Chaque copie est ensuite présente dans chaque cellule fille qui hérite de l'intégralité de l'information génétique de la cellule mère. La répllication de l'ADN doit donc être fiable et reproduire scrupuleusement la molécule initiale. Des mécanismes enzymatiques complexes assurent une vérification et une correction des éventuelles erreurs qui interviennent. Cependant, des anomalies peuvent se produire et ainsi modifier la séquence d'ADN : ce sont les mutations. **Les mutations sont donc des changements de nucléotides**

affectant une séquence d'ADN. Qu'elles soient ponctuelles (intervenant au niveau d'un nucléotide précis) ou qu'elles correspondent à des remaniements plus importants affectant des séquences plus ou moins longues telles que des délétions ou des inversions de plusieurs nucléotides, les mutations sont à l'origine de l'apparition de différentes versions modifiées d'un même gène. Certaines de ces versions ne causent aucune maladie, elles sont appelées des polymorphismes. D'autres, par contre, peuvent être responsables du développement de maladie.

Tout au long de mes expériences, je me suis intéressée à deux types de mutations : une délétion de trois oligonucléotides et une substitution (remplacement d'une base par une autre). Pour cela, les effets de ces deux anomalies sur l'hybridation de deux mono brins d'ADN seront décrits dans les paragraphes suivants.

A.2.1 Les délétions :

Ces mutations peuvent être plus ou moins importantes. Elles se traduisent par l'absence d'une ou de plusieurs bases.

Lors des expériences d'hybridation entre des oligonucléotides longs d'une vingtaine de bases, la présence d'une délétion déstabilise significativement un duplex partiellement complémentaire. Ceci affaiblit l'efficacité d'hybridation entre un mono brin et son complémentaire portant la délétion. Dans le cadre des puces à ADN, ce phénomène est facilement détecté. En effet, les duplex totalement complémentaires génèrent un signal d'hybridation supérieur à celui des duplex partiellement complémentaires portant la délétion. De même la température de fusion* du duplex partiellement complémentaire est inférieure à celle du duplex totalement complémentaire.

A.2.2 Les substitutions :

Nous parlons de substitution quand une base est remplacée par une autre.

Lors des expériences d'hybridation entre oligonucléotides, la présence d'une substitution entraîne la formation d'un mésappariement qui peut être : A/A, A/C, C/C, C/T, G/G, G/A, G/T ou T/T. L'effet d'un mésappariement sur la double hélice est plus ou moins important et dépend en grande partie des nucléotides voisins des bases mutées, de la position

* La notion de température de fusion est détaillée à la page 86

du mésappariement ainsi que de la longueur des séquences étudiées [140-142]. Il existe donc des mésappariements plus stables que d'autres.

L'étude menée par Ikuta et al. en 1987 sur des 19-mers [141] a montré que les mésappariements impliquant une guanine déstabilisent légèrement le double brin alors que ceux mettant en cause deux bases pyrimidiques (C ou T) la perturbent significativement. La position de la mutation ainsi que la stabilité de la paire de base non complémentaire mise en jeu sont aussi des facteurs importants dans la stabilité du duplex formé. Ainsi les paires G/A, G/T et G/G sont plus stables que les paires A/A, T/T, C/T, C/A [140, 141] et par la suite il sera plus facile de dénaturer un duplex avec un mésappariement C/A qu'un duplex avec un mésappariement G/T. Par ailleurs il a été démontré que la position de la mutation qui déstabilise le plus un duplex est le centre de la séquence [142, 143] et que les extrémités flottantes peuvent contribuer à la stabilité des double-brins formés [144].

L'appariement ou l'hybridation entre deux oligonucléotides non totalement complémentaires entraîne donc la formation d'un complexe de faible stabilité, c'est-à-dire que le double brin peut être plus facilement réduit en mono brin. C'est cette instabilité qui est exploitée dans les puces à ADN dédiées au diagnostic. Elle nous permet de distinguer un duplex totalement complémentaire d'un duplex avec une mutation. En effet, les duplex contenant un mésappariement sont discriminés par l'intermédiaire de deux moyens : la faible efficacité d'hybridation entre deux mono brins non complémentaires et la forte constante de dissociation. Le paramètre décrivant la stabilité d'un double brin est la température de fusion.

A.3 La température de fusion :

A.3.1 Définition de la Température de fusion (T_m) :

La température de fusion est le paramètre le plus important et le plus critique dans l'étude de la formation d'un double brin d'ADN. Elle représente la température à laquelle 50 % des molécules d'ADN sont présents sous la forme double brin. En d'autres termes, lorsque l'on chauffe une solution d'ADN double brin, la température de fusion correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN sont dénaturées.

Elle est déterminée en traçant l'absorbance de la solution en fonction de la température à 260 nm. À cette longueur d'onde, l'absorbance de l'ADN simple brin est supérieure à celle

de l'ADN double brin. La courbe obtenue a la forme d'un « S ». Son point d'inflexion correspond à la T_m (Figure 44 tirée de la référence 145).

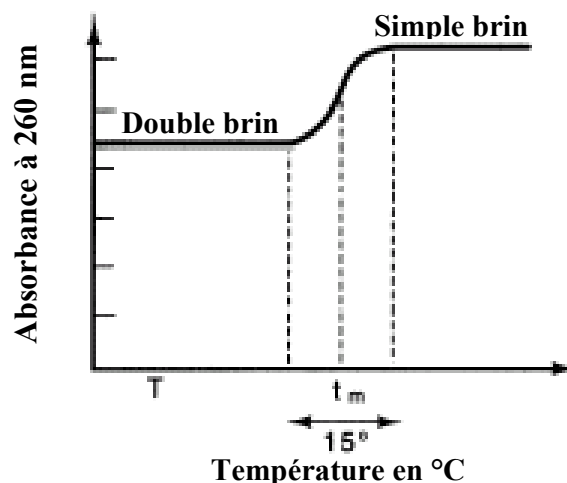


Figure 44: Méthode de détermination de la Température de fusion d'une solution d'ADN double brin. Elle consiste à mesurer l'absorbance d'une solution d'ADN double-brin à 260 nm et pour différentes températures.

La figure ci-dessous montre que la transition de l'état double brin à l'état simple brin se fait dans un intervalle de température de 15°C. Ce passage, dû à la rupture des ponts d'hydrogènes liants les bases complémentaires (3 entre les bases G, C et 2 entre les bases A, T), se fait donc de façon brutale pour une faible variation de la température autour de la T_m . Cette rupture de la double hélice libère les bases, seules composantes de l'ADN absorbant à 260 nm. Ces dernières ne se chevauchent plus et ne sont plus ordonnées dans des plans parallèles, comme c'est le cas dans les molécules double brin. La forme simple brin empêche donc les bases de se masquer mutuellement, ce qui se traduit par une augmentation de l'absorbance. La brutalité de la transition est due au caractère coopératif de la réaction. En effet, le processus est analogue à la rupture d'une "fermeture éclair" où toute force ne dépassant pas un certain seuil reste sans effet. Cependant, si d'aventure la force devient suffisante pour faire sauter l'un des crochetons, alors la fermeture éclair s'ouvre en totalité.

A.3.2 Paramètres influençant la température de fusion :

La température de fusion caractérise donc la stabilité de la double hélice. Elle dépend de plusieurs paramètres. Les plus importants sont la longueur de la séquence, la composition

en base et la concentration en sels de la solution. D'autres paramètres affectent aussi la T_m tels que l'ordre dans lequel les bases se succèdent, le nombre de bases complémentaires, la concentration en mono brins et la concentration de la solution en formamide.

A.3.2.1 Influence de la séquence :

La séquence des oligonucléotides influe sur la température de fusion par sa longueur, sa composition, l'ordre de succession des bases ainsi que par la présence de mésappariements. L'effet de chacun de ces facteurs est résumé ci-dessous.

1) La longueur de la séquence : Plus la séquence est longue, plus le nombre des liaisons hydrogène est grand, plus l'énergie requise pour la dénaturation d'un double brin est grande et donc plus la température de fusion est élevée. Pour tenir compte de l'effet de la longueur dans l'expression de la température de fusion, il faut ajouter un terme négatif inversement proportionnel au nombre de base de la séquence étudiée [145] comme dans l'équation 10 donnée plus loin.

L'effet de la longueur est important pour des oligonucléotides courts (<50 bases).

2) La composition de la séquence : Les bases C et G étant reliées par trois liaisons hydrogène, leur participation à la température de fusion est plus importante que celle des bases A/T. En effet, la T_m croît linéairement avec le nombre de paires base G+C et ce, pour des ADN suffisamment longs (>200 pb (paires de bases)) pour que l'influence de la longueur soit négligeable. Dans une solution à 0.8 M NaCl et à pH neutre, la température de fusion des ADN d'une longueur supérieure à 200 pb, peut être estimée par la relation suivante : $T_m = 69.3 + 0.41 * (\% \text{ G+C})$ [145]. Ainsi, un fragment d'ADN de 250 pb possédant un pourcentage de bases C et G égal à 60% aura une température de fusion $T_m = 69.5^\circ\text{C}$.

3) L'ordre des bases : La succession des bases et donc leur enchaînement affecte aussi la stabilité du double brin d'ADN. C'est un autre paramètre qui rentre en jeu dans le calcul des T_m . Il met à contribution des grandeurs thermodynamiques telles l'entropie, l'enthalpie et l'énergie libre de la molécule. Pour en tenir compte, la méthode dite du plus proche voisin, détaillée plus loin, est utilisée. Ce paramètre est pris en compte pour les oligonucléotides de moins de 50 bases.

4) Les mésappariements : La présence d'un mésappariement introduit une malformation locale au niveau du double brin. De ce fait, sa stabilité diminue. Empiriquement, l'abaissement observé est de **1 à 1.5°C pour 1% de mésappariement** pour des oligonucléotides de plus de 20 bases et de **5°C par mésappariement** pour des oligonucléotides de moins que 20 bases [142]. Ces modifications de T_m causées par les mésappariements, sont à la base de la détection de mutations ponctuelles avec les oligonucléotides synthétiques.

A.3.2.2 Influence de la composition de la solution :

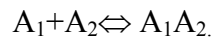
Les liaisons chimiques entre deux mono brins d'ADN, molécules chargées négativement, sont plus ou moins favorisées par la composition de la solution dans laquelle ces molécules sont dissoutes. Nous résumerons ci-dessous l'effet de la concentration saline de la solution, de sa concentration en ADN, de sa concentration en formamide ainsi que de son pH.

1) Effet de la concentration en sel : À forte concentration ($>1M$), les cations monovalents masquent les charges négatives des chaînes phosphatées diminuant ainsi les forces de répulsion entre deux mono brins d'ADN. Ce phénomène favorise l'hybridation des séquences complémentaires et augmente la T_m . Par contre, une diminution de la concentration saline est accompagnée par une diminution drastique de la T_m (une quinzaine de degrés Celsius par logarithme de concentration d'ions monovalents). En effet, les charges négatives des chaînes phosphatées ne sont plus masquées et les forces de répulsion électrostatiques gênent l'hybridation et favorisent la séparation des mono brins entraînant ainsi la diminution de la T_m . Dans l'expression de la T_m cette diminution est prise en compte par le biais du terme $+16.6 \cdot \log([NaCl])$ [145] pour des concentrations en sels $<1M$.

Pour exprimer l'effet du sel sur l'hybridation de deux molécules d'ADN, le terme utilisé en biologie moléculaire est celui de **stringence**. Une solution est d'autant plus stringente qu'elle est faiblement concentrée en sels et donc elle déstabilise le double brin. Cet effet de sel est utilisé pour augmenter la spécificité de reconnaissance des molécules d'ADN.

2) Effet de la concentration en ADN : L'hybridation entre deux séquences d'ADN mono brin est conditionnée par la présentation des oligonucléotides complémentaires

face à face. Ce phénomène aléatoire est régi par la fréquence de rencontres des molécules. Pour les ADN de grande longueur, le taux de rencontre de deux mono brins complémentaires, dans la position favorable, est faible à cause des problèmes de configuration (repliement, structure secondaire...). De ce fait, leur concentration influe peu sur la T_m . Par contre, pour les ADN de courte longueur (<50 bases), la concentration de l'espèce mise en jeu affecte l'équilibre comme prédit par l'équation :



La constante d'équilibre s'écrit:
$$K = \frac{[A_1 A_2]}{[A_1][A_2]} = \frac{\alpha (C_t / 2)}{((1-\alpha)(C_t / 2))^2} = \frac{\alpha}{(C_t / 2)(1-\alpha)^2}$$

avec :

- C_t (en Mole/l) la concentration totale de mono brins présents dans la solution et
- α la proportion des double-brins.

À la température de fusion la proportion α est égale à 0.5 (par définition) et la constante

d'équilibre vaut $K = \frac{4}{C_t}$. Elle intervient dans le calcul de la température de fusion

utilisant les variables thermodynamiques.

3) Effet de la présence de formamide : Ce composé diminue de façon notable la température de fusion et permet donc de diminuer les températures de travail lors des hybridations. Pour des fragments > 100 pb, l'abaissement de la température peut être estimé par la relation : $\Delta T_m = -0.6 \times (\% \text{ de formamide})$ [145]

La concentration de formamide habituellement utilisée est de 50% en volume ce qui correspond à un abaissement de 30°C.

4) Le pH de la solution peut ioniser les bases et détruire ainsi les liaisons d'hydrogène. Pour des pH n'appartenant pas à la gamme comprise entre 5 et 9, la température de fusion diminue rapidement. De même les solvants organiques tendent à diminuer la T_m .

A.3.3 Calcul de la température de fusion :

A.3.3.1 Formules proposées pour le calcul de la T_m :

Le calcul de la température de fusion reste encore empirique et, souvent, la meilleure façon de la déterminer est de procéder à la mesure de l'absorbance à 260 nm en fonction de la température. Cependant, plusieurs formules sont disponibles et nous pouvons les grouper sous trois rubriques distinctes : la formule classique, la formule empirique et la formule du plus proche voisins

A.3.3.1.1 Formule classique

Connue sous le nom de la formule de Wallace, elle permet un calcul rapide et approximatif de la température de fusion. Elle est surtout utilisée pour calculer la T_m des oligonucléotides mis en jeu lors d'une Polymerase Chain Reaction (PCR) et s'exprime comme suit [146] :

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) \quad (\text{Eq. 7})$$

avec : - A : le nombre de molécules Adénine présentes dans la séquence

- T : le nombre de molécules Thymines présentes dans la séquence
- G : le nombre de molécules Guanine présentes dans la séquence
- C : le nombre de molécules Cytosine présentes dans la séquence.

Pour calculer, avec cette méthode, la température de fusion d'un double brin présentant un non-appariement, deux techniques sont proposées. La première consiste à compter une contribution nulle par mésappariement et la deuxième consiste à appliquer la loi citée au point 4 du paragraphe A.3.2.1 de ce chapitre. C'est-à-dire que la température de fusion d'un double brin avec mésappariement est obtenue en retranchant 5°C par mésappariement pour les longueurs < 20 bases et 1°C par pourcentage de mésappariement pour les longueurs > 20 bases (bien que cette formule ne soit pas appliquée pour ces longueurs). Il est clair que cette dernière méthode ne prend pas en considération la nature du mésappariement et que la première donnera un écart constant quelle que soit la longueur des oligonucléotides étudiés (Il vaut 2°C quand une base A (ou T) est remplacée par une base G (ou C) et 4°C dans le cas contraire).

PrOligo, fournisseur d'oligonucléotides, utilise cette formule pour les séquences de longueur ≤ 20 bases tandis que pour les plus grandes longueurs c'est la formule du plus

proche voisin, exposée plus loin, qui est adoptée. Un autre site [147] applique cette formule pour les oligonucléotides compris entre 14 et 20 bases.

A.3.3.1.2 Formule empirique

Cette formule tient compte des différents paramètres affectant la température de fusion à savoir : le pourcentage de bases G et C dans la séquence, la salinité du milieu, la longueur de la séquence, le pourcentage de mésappariements ainsi que la concentration en formamide. Elle a pour expression [145, 147] :

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) + 16.6 \log_{10} [M] - \% \text{ Mésappariement} - \frac{675}{L} - 0.65(\% \text{ Formamide}) \quad (\text{Eq. 8})$$

avec [M] la concentration en sel en mole/litre et L la longueur en base de la séquence étudiée. Elle est valable pour les ADN de longueur inférieure à 100 pb [145].

Cette méthode tient compte de la présence d'un mésappariement ainsi que de la longueur des séquences utilisées.

A.3.3.1.3 Méthode du plus proche voisin :

La troisième formule est basée sur l'étude thermodynamique des courbes de dénaturation des double-brins d'ADN et est connue sous le nom de la méthode du plus proche voisin [148, 149, 150, 151, 152, 153]. Elle fait intervenir les paramètres thermodynamiques d'entropie (ΔS), d'enthalpie (ΔH) et d'énergie libre (ΔG). L'entropie nous renseigne sur le désordre du système, l'enthalpie donne une idée sur l'énergie qu'il faut fournir pour rompre les liaisons d'hydrogène pour une mole de produit et l'énergie libre traduit la spontanéité de la réaction. La formule utilisée a pour expression [153] :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln\left(\frac{C_t}{F}\right)} + f\left(Na^+\right) - 273.15. \quad (\text{Eq. 9})$$

Cette équation découle de l'expression thermodynamique de la constante d'équilibre :

$$K = \exp(-\Delta G / RT) = \exp(-(\Delta H - T\Delta S) / RT) \quad (\text{Eq. 10})$$

avec R la constante des gaz parfaits et T la température.

À la T_m et pour des séquences qui ne présentent pas de structures secondaires (c'est à dire qui ne se replient pas sur elle-même) $K = \frac{4}{C_t}$ (A.3.2.2) d'où :

$$\ln\left(\frac{C_t}{4}\right) = \frac{\Delta H - T_m \Delta S}{R T_m} \Rightarrow T_m = \frac{\Delta H}{\left(\Delta S + R \ln\left(\frac{C_t}{4}\right)\right)}. \quad (\text{Eq. 11})$$

Dans ces cas, la température de fusion est donnée en degré Kelvin. Pour la transformer en degré Celsius, il faut lui retrancher 273.15 et l'équation (Eq. 13) devient :

$$T_m = \frac{\Delta H}{\left(\Delta S + R \ln\left(\frac{C_t}{4}\right)\right)} - 273.15 \quad (\text{Eq. 12})$$

ΔH est exprimée en cal mol^{-1} , ΔS en $\text{cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$. R , la constante des gaz parfaits est égale à $1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{mol}^{-1}$.

Nous retrouvons ainsi le premier et le troisième terme de l'équation (Eq. 9). Pour retrouver tous les termes de cette dernière équation à partir de l'équation (Eq. 12) il faut lui rajouter un terme traduisant l'effet de la concentration saline de la solution (c'est la fonction $f(Na^+)$), et un coefficient correctif, F [148, 153], rendant compte de la concentration effective des séquences capables d'interagir. F vaut 1 si les séquences présentent des structures secondaires, 2 si l'une des séquences est en excès comme dans le cas des PCR asymétriques et 4 si les concentrations de deux mono brins sont égales. L'équation (Eq. 12) est valable pour une concentration de 1 M en sodium. Pour l'adapter à différentes concentrations salines, plusieurs corrections sont proposées et la fonction $f(Na^+)$ peut s'écrire sous la forme $16.6 * \log\left(\left[Na^+\right]\right)$ [154] ou encore $12.5 * \log\left(\left[Na^+\right]\right)$ [153] ou

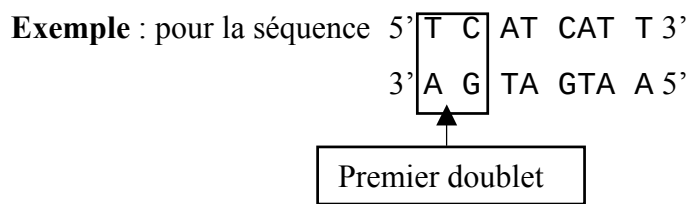
encore $16.6 * \log\left(\frac{\left[Na^+\right]}{1 + 0.7 \left[Na^+\right]}\right) + 3.85$ [153]. En 1998, John SantaLucia a proposé

d'introduire la correction directement dans le calcul de l'entropie, étant donné que ce dernier paramètre dépend de la concentration en sel. La formule proposée a pour expression [148] :

$$\Delta S\left(\left[Na^+\right]\right) = \Delta S[1M NaCl] + 0.368 \times (N) \times \ln\left(\left[Na^+\right]\right) \quad \dots\dots(\text{Eq. 13})$$

avec N le nombre de phosphate dans la séquence étudiée qui est égal au nombre de bases moins 1. Aucune correction n'a été proposée pour ΔH .

Dans la formule (Eq.12), la variation de l'entropie (ΔS) (respectivement de l'enthalpie ΔH) d'un oligonucléotide donné, est calculé en faisant la somme des (ΔS^0) (respectivement des (ΔH^0)) des doublets qui se succèdent et en tenant compte de l'énergie nécessaire pour initier la double hélice et de l'énergie liée à la symétrie d'axe C2 du double brin.



Les doublets qui se succèdent sont au nombre de 7 : TC/AG, CA/GT, AT/TA, TC/AG, CA/GT, AT/TA., TT/AA.

Pour calculer ΔS nous écrivons :

$$\Delta S = \Delta S^0(\text{initiation}) + \Delta S^0(\text{symétrie}) + \Delta S^0(\text{TC/AG}) + \Delta S^0(\text{CA/GT}) + \Delta S^0(\text{AT/TA}) + \Delta S^0(\text{TC/AG}) + \Delta S^0(\text{CA/GT}) + \Delta S^0(\text{AT/TA}) + \Delta S^0(\text{TT/AA}) \text{ d'où}$$

$$\Delta S = \Delta S^0(\text{initiation}) + \Delta S^0(\text{symétrie}) + 2\Delta S^0(\text{TC/AG}) + 2\Delta S^0(\text{CA/GT}) + 2\Delta S^0(\text{AT/TA}) + \Delta S^0(\text{TT/AA}).$$

Les bases sont prises 2 à 2 d'où le nom de plus proche voisin attribué à la technique. Cette méthode est aussi applicable à ΔG . Les paramètres thermodynamiques ΔS^0 des couples sont tabulés ainsi que le premier terme traduisant l'initiation de la double hélice et le deuxième terme traduisant la symétrie d'axe C2. Ils sont donnés pour une concentration de 1 M en NaCl.

Le terme d'initiation traduit la contribution des paires de bases terminales. Il existe deux paramètres d'initiation : l'un prend en compte l'influence des paires de base G/C et C/G (c'est le terme d'initiation G-C), l'autre celle des paires A/T et T/A (c'est le terme d'initiation A-T). Les couples G/C et C/G sont supposés avoir le même comportement (idem pour les

couples A/T et T/A). Pour calculer le terme d'initiation du double brin formé trois cas se présentent :

- 1- Les deux extrémités du duplex sont des paires G/C ou C/G : le terme d'initiation est alors égal à 2^* (terme d'initiation G-C).
- 2- Les deux extrémités du duplex sont des paires T/A ou A/T : le terme d'initiation est alors égal à 2^* (terme d'initiation A-T).
- 3- L'une des extrémités est une paire A-T et l'autre une paire G-C : le terme d'initiation est alors égal au (terme d'initiation G-C) + (terme d'initiation A-T).

Trois tables donnant les valeurs des paramètres thermodynamiques sont disponibles et sont données dans l'Annexe 7. La plus récente est celle donnée par John SantaLucia [155].

A.3.3.2 Calcul théorique et comparaison :

Nous avons utilisé ces trois formules (classique : Eq. 9, empirique : Eq. 10 et plus proche voisin : Eq. 11 où nous avons pris en compte l'influence du sel dans le calcul de ΔS) ainsi que le programme Hyther [156], mis à disposition sur Internet par John SantaLucia, pour calculer les températures de fusion des hybrides totalement et partiellement complémentaires formés par les sondes et les cibles liées à la substitution M470V de la mucoviscidose (cf. Annexe 10). Nous avons opté pour cette mutation car elle fait partie de l'étude sur l'effet de la longueur (cf. paragraphe C du chapitre IV p. p. 139) et car, comme nous le verrons plus loin, le comportement des cibles sauvages (notées **3***) et mutées (notées **4***) n'est pas le même. Nous avons ainsi calculé les températures de fusion qui correspondent aux longueurs de duplex allant de 8 à 39 bases et ce dans une solution à 0.16 M en NaCl, 15.5 μ M en oligonucléotides et 0% en formamide.

Comme nous l'avons déjà mentionné, pour la méthode classique, nous avons calculé la T_m du duplex possédant une mutation de deux façons différentes. La première consistait à considérer la contribution du mésappariement comme nulle (méthode 1) et la deuxième à enlever 1°C par pourcentage de mésappariement pour les fragments de plus de 20 bases et 5°C par mésappariement pour les oligonucléotides de moins de 20 bases (méthode 2). Les résultats obtenus sont illustrés à la Figure 45(A) pour les différentes longueurs des cibles **3*** et à la Figure 45(B) pour les différentes longueurs des cibles **4***. L'application du modèle empirique (formule Eq.10), du modèle du plus proche voisin (équation Eq.11) ainsi que des

calculs d'Hyther sont illustrés par la Figure 46 pour les cibles 3* et par la Figure 47 pour les cibles 4*.

Dans tous les graphes, le terme "Match" désigne l'hybridation entre deux mono brins totalement complémentaires alors que le terme "Mismatch" désigne l'hybridation entre deux mono brins partiellement complémentaires.

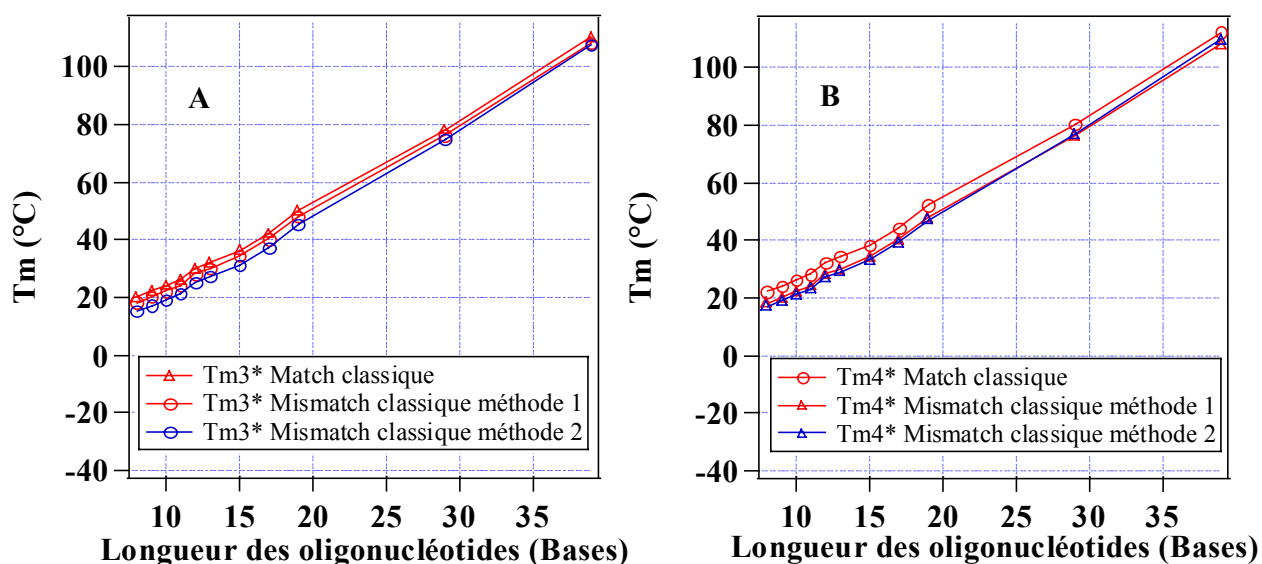


Figure 45: Calcul des T_m d'après la méthode classique $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$. La présence d'un mésappariement a été prise en compte en lui attribuant une contribution nulle (méthode 1), puis constante et égale à -5°C pour des longueurs < 20 bases et -1°C par pourcentage de mésappariement pour des longueurs > 20 bases (méthode 2). Le graphe A illustre le calcul pour les cibles 3* tandis que le graphe B illustre le calcul pour les cibles 4*.

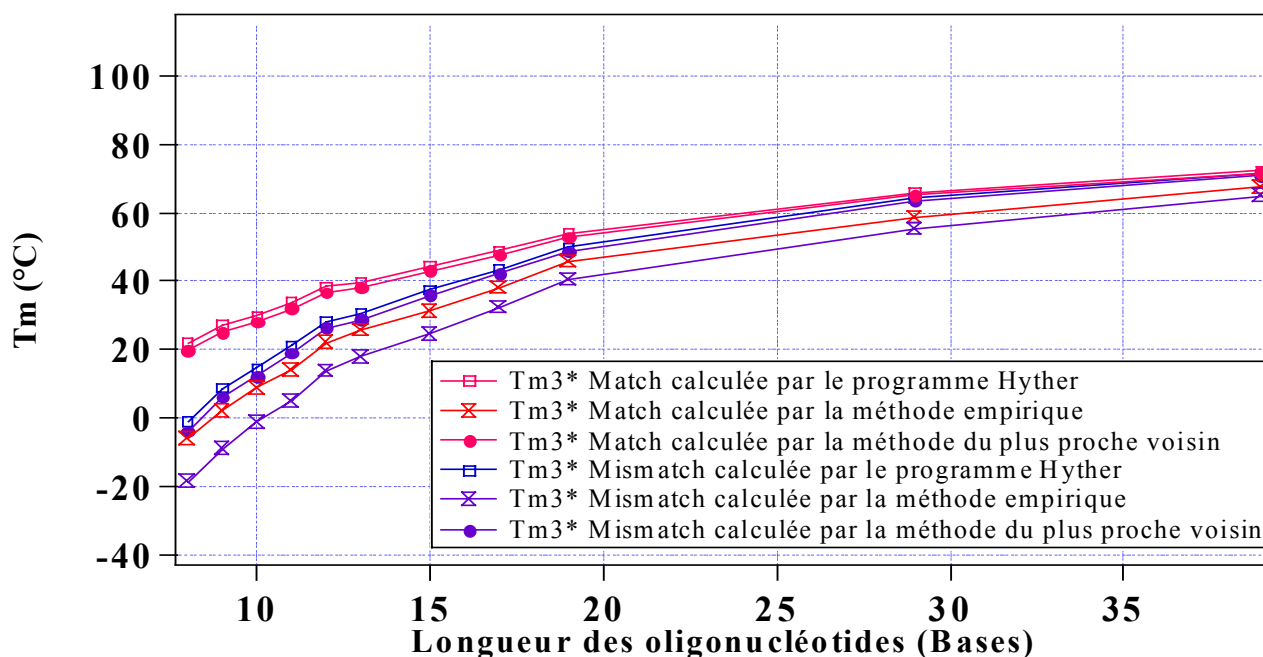


Figure 46: Calcul de la température de fusion pour les différentes longueurs des cibles 3* d'après les calculs d'Hyther□, la méthode empirique×et la méthode des plus proches voisins●

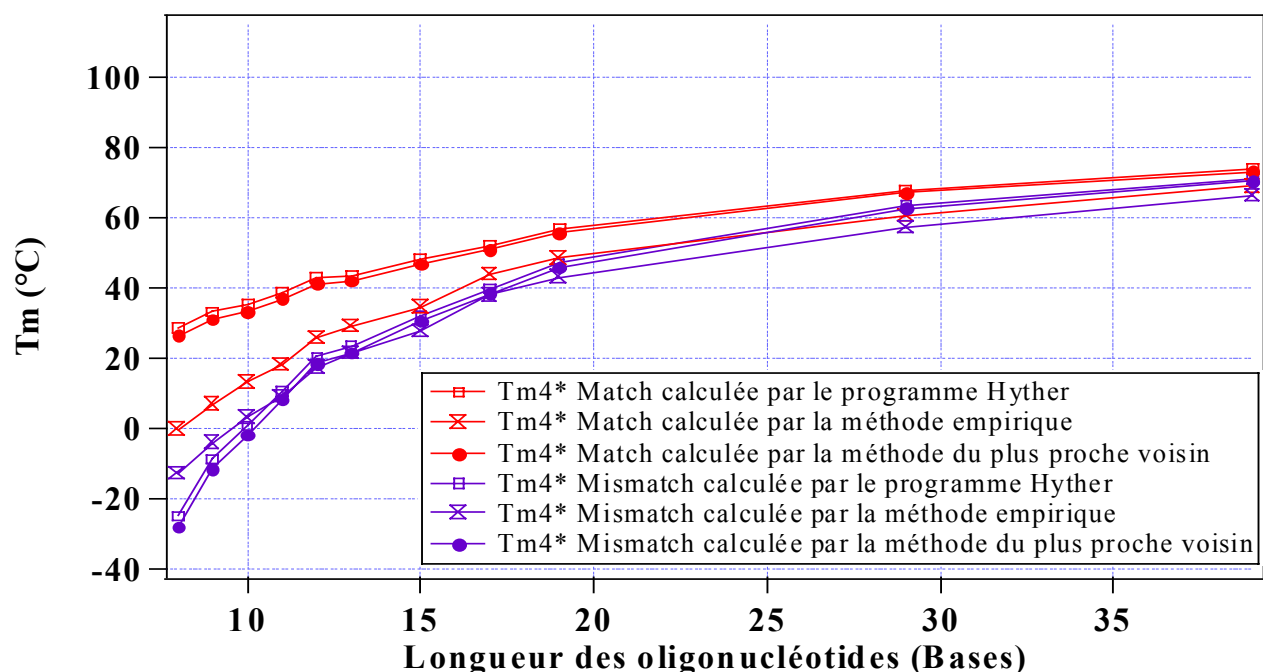


Figure 47: Calcul de la température de fusion pour les différentes longueurs des cibles 4* d'après les calculs d'Hyther□, la méthode empirique×et la méthode des plus proches voisins●

Sur chacun des graphes ci-dessus sont représentées, en fonction de la longueur du duplex, les températures de fusion des double-brins totalement complémentaires (Match) ainsi

que celles des hybrides avec un mésappariement au centre. Les graphes de la Figure 45 affichent une croissance linéaire en fonction de la longueur alors que les graphes des deux figures précédentes (Figure 46 et Figure 47) montrent une température de fusion qui sature pour les grands oligonucléotides. Les calculs d'Hyther ainsi que ceux obtenus par la méthode des plus proches voisins sont identiques à 2°C près, mais ils diffèrent du calcul empirique. Toutefois, l'écart entre les différentes courbes, se resserre quand la longueur des duplex augmente. Il est clair que les résultats obtenus par la méthode classique divergent de ceux obtenus par les trois autres méthodes surtout pour les longueurs dépassant 20 bases. C'est ce qui fait que certains l'appliquent pour les oligonucléotides ≥ 20 bases.

Ces quatre graphes mettent ainsi en évidence le fait que les quatre méthodes donnent des résultats différents pour le calcul d'une même grandeur. En effet, les T_m calculées par la méthode classique sont comprises entre 20 et 115°C, celles calculées par la méthode empirique appartiennent à l'intervalle $[-10, 70]$ tandis que celles trouvées par le programme Hyther et la méthode du plus proche voisin sont confinées dans l'intervalle $[20, 74^\circ\text{C}]$. La valeur de la température de fusion calculée dépend donc de la formule utilisée, d'où l'importance du choix d'une méthode adaptée aux besoins de l'expérience. Pour les grandes longueurs (>39 bases) la méthode empirique et celle des plus proches voisins ont un écart inférieur à 5°C : nous pouvons dire qu'elles deviennent équivalentes.

En ce qui concerne la température de fusion du mésappariement nous remarquons qu'elle diffère aussi, d'un calcul à l'autre. Cependant, tous les graphiques montrent qu'elle s'approche de la température du double brin parfaitement complémentaire pour les grandes longueurs.

Les longueurs des sondes et des cibles que nous allons considérer dans notre étude au paragraphe C du chapitre IV, varient entre 8 et 39 bases. Dans cette zone, les valeurs des T_m calculées par les quatre méthodes sont différentes. Pour mieux comparer les résultats et choisir la méthode adaptée à nos besoins expérimentaux, nous avons représenté les écarts des T_m entre un duplex parfaitement complémentaire et un duplex avec mutation, en fonction de la température de fusion du double brin totalement complémentaire. Les graphes obtenus pour chacune des formules sont représentés à la Figure 48 (A-D).

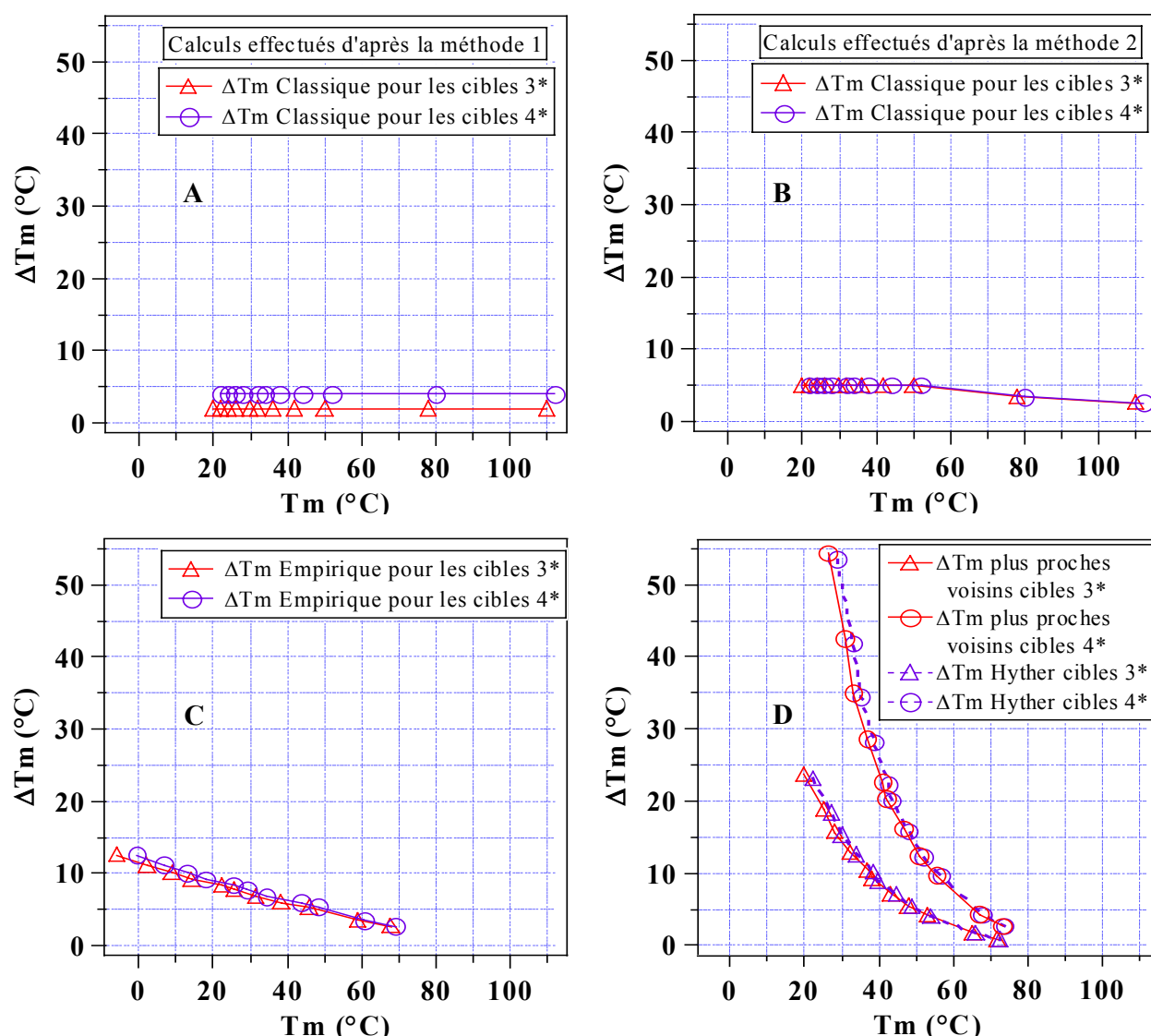


Figure 48: Représentation ΔT_m en fonction du T_m parfaitement complémentaire. A : Calculs effectués d'après la méthode classique (Eq. 9) en comptant 0 pour le mésappariement. B : Calculs effectués d'après la méthode classique en retranchant 5°C par mésappariement pour les oligonucléotides < 20 bases et 1°C par pourcentage de mésappariement pour les oligonucléotides > 20 bases. C : Calculs effectués d'après la formule (Eq.10). D : Calculs effectués d'après la méthode des plus proches voisins (Eq.14) et d'après le programme Hyther.

L'augmentation de la température de fusion de la séquence totalement complémentaire est accompagnée d'une baisse de la ΔT_m , sauf dans le cas où l'écart est considéré constant par défaut. Ce phénomène est prévisible, car l'augmentation de la T_m est dû, dans notre cas, à un accroissement de la longueur de la double hélice et donc du nombre de liaisons stabilisant la double hélice. Plus la chaîne est longue, plus le nombre de liaisons hydrogène est grand et

moins le mésappariement déstabilise la séquence. En d'autres termes, l'instabilité du mésappariement est masquée par les nombreuses liaisons entre bases complémentaires.

Un autre point attire l'attention, c'est la différence entre un mésappariement G/T (correspondant à l'interaction entre les cibles 3* et les sondes 4 biot 470V, Annexe 10) et un mésappariement A/C (correspondant à l'interaction entre les cibles 4* et les sondes 3 biot 470M, Annexe 10). En effet, dans tous les modèles, sauf dans le cas où l'écart des T_m est considéré constant (Figure 48 B), le mésappariement A/C déstabilise plus que les autres, l'oligonucléotide double brin. Il est donc cohérent d'observer une meilleure discrimination quand la surface est exposée à la cible 4* que quand elle est exposée à la cible 3*. Cependant cette différence n'est pas aussi significative sur le graphe de la Figure 48 C (calcul selon la formule empirique) que le graphe de la Figure 48 D (calcul selon le plus proche voisin et selon Hyther).

Vu les résultats de nos expériences (paragraphe C du chapitre IV p. 139) qui traduisent une grande différence de comportement entre les cibles 3* et 4* nous avons choisi de calculer les températures de fusion de toutes nos séquences en utilisant le programme Hyther [156].

Le premier calcul effectué consistait à vérifier l'effet de la position de la mutation sur la déstabilisation du double brin. En effet, comme nous l'avons déjà vu, il a été démontré par Gotho et al. [142] que la position de la mutation au voisinage du centre de la séquence déstabilise au maximum le double-brin. Les calculs effectués, dans le cas de la substitution M470V, par l'intermédiaire du programme Hyther nous ont permis de constater que l'effet de la position de la mutation ponctuelle n'est pas critique (Figure 49) comme le mentionnait A.V.Fotin [157]. Il suffit de se positionner loin des extrémités de la séquence pour obtenir un écart maximal de T_m entre double brin parfaitement complémentaire et double brin avec mésappariement. L'écart de T_m , traduisant la déstabilisation du double brin :

- est quasiment nul pour les grandes longueurs (39 bases sur le graphe),
- présente la forme de chapeau pour les oligonucléotides plus courts (19 bases)
- présente un maximum très peu marqué au centre pour les faibles longueurs (8 bases).

Choisir une mutation au centre est donc une stratégie satisfaisante étant donné qu'elle permet une optimisation de l'écart de T_m pour les courtes longueurs.

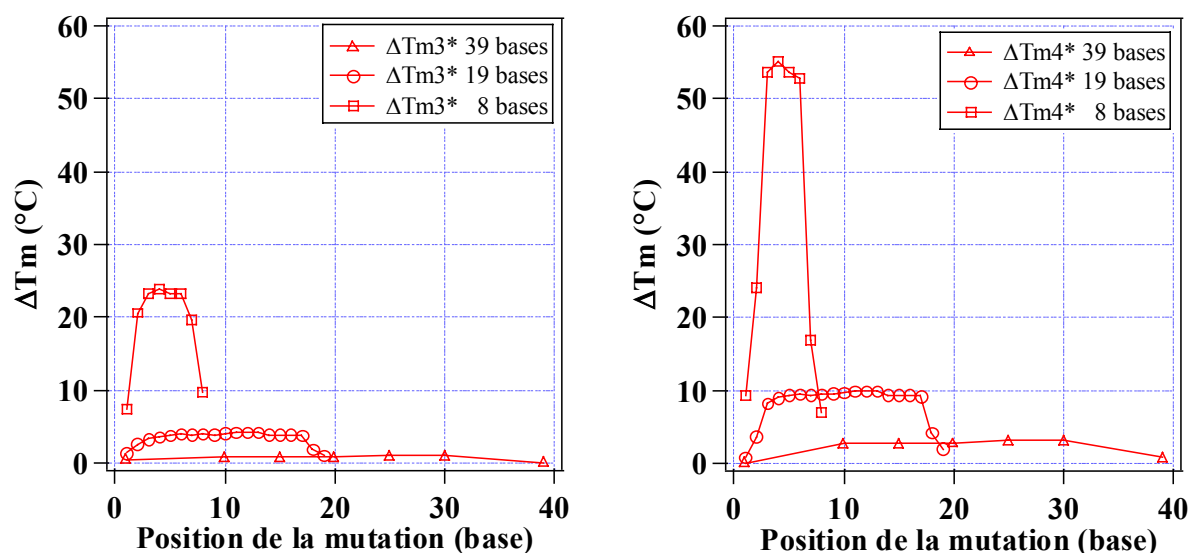


Figure 49 : Effet de la position du mésappariement sur la T_m d'un double brin d'ADN. Cas des oligonucléotides 3* (A) et 4* (B).

Le deuxième calcul que nous avons effectué par l'intermédiaire d'Hyther est celui de la température de fusion de tous les duplex où les sondes et les cibles utilisées ont des longueurs égales. Il est présenté au paragraphe C.2.2 du chapitre IV page 156.

Après cette description du matériel génétique, présentons brièvement la mucoviscidose, maladie à laquelle nous avons choisi d'appliquer notre technique de diagnostic.

B La mucoviscidose :

B.1 Description phénotypique [158-165] :

La mucoviscidose [158-165, 170, 171], “ Fibrose Kystique du pancréas ” pour les Canadiens ou encore “ Cystic Fibrosis ” pour les Anglo-saxons, est une maladie héréditaire grave, létale et non contagieuse. Elle se traduit par une altération des épithéliums sécrétoires et en particulier par la production de mucus déshydraté induisant l’obstruction d’un grand nombre de canaux. De ce fait, différents organes sont affectés : le système respiratoire, le tube digestif et ses annexes (pancréas, foie, et voies biliaires) ainsi que les glandes sudoripares et le tractus génital. Toujours transmise conjointement par les deux parents, elle est présente dès la conception et peut se manifester aussi bien chez le nourrisson que chez l’adulte. Son diagnostic peut être fait au cours des deux premières années de vie sur l’association de troubles respiratoires et d’une diarrhée chronique.

Le trouble principal lié à cette maladie est la texture anormale du mucus. En fait chez les individus normaux le mucus, sécrété par les glandes muqueuses, est fluide. Il a pour rôle de lubrifier les organes et de garder clairs les poumons et les voies respiratoires en évacuant les microbes et les poussières. Chez une personne malade, le mucus est visqueux et tend à bloquer les conduits des organes. Il forme ainsi des bouchons qui provoquent la plupart des symptômes de la maladie.

Le deuxième signe révélateur de la mucoviscidose, dont la trace est repérée dans la littérature médicale, est la teneur élevée en sel de la sueur. Ainsi l’on retrouve au XVII^{ème} siècle des récits relatant l’histoire des enfants “ au baiser salé ”. En 1953, le professeur DI SANT AGNESE propose le test de la sueur [159, 160] comme moyen de diagnostic spécifique de la maladie. Ce test est encore utilisé de nos jours.

Décrite pour la première fois en 1936 par le professeur FANCONI qui lui donne le nom de mucoviscidose (mucus + viscosité), cette maladie atteint de façon hétérogène les populations de différentes origines. Elle est très fréquente dans la population européenne. Son incidence est de 1 enfant malade sur 2000 à 3000 naissances vivantes. Les personnes hétérozygotes sont saines mais porteuses d’une mutation sur un des deux allèles du gène muté. Elles sont évaluées à une personne sur 25. Elle est beaucoup plus rare chez les

personnes originaires d'Afrique (1 cas sur 17 000 naissances vivantes) et chez celles originaires d'Asie (incidence inconnue mais probablement très faible) [161]. Quelques chiffres clés tirés de la page Web de l'association SOS mucoviscidose [162] sont donnés en Annexe 6 pour montrer l'impact de cette maladie en France.

B.2 Diagnostic :

La mucoviscidose est une maladie difficile à diagnostiquer car ses symptômes, très nombreux, sont en commun avec d'autres maladies.

A l'heure actuelle le test de la sueur [159-161, 163, 164, 165] est l'examen de référence le plus fiable. Il consiste à stimuler la peau avec une électrode, les glandes sudoripares produisent alors de la sueur. Quelques gouttes de ce liquide sont ainsi recueillies sur un papier filtre. Elles servent au dosage du taux de Cl^- . Un taux supérieur à 60 mmole/l établit le diagnostic mais il faut au moins trois mesures anormales pour affirmer le résultat.

Pour les couples à risque (c'est à dire qui ont déjà eu des cas de personnes atteintes par la mucoviscidose dans leur famille), l'évolution de la biologie moléculaire permet d'envisager un diagnostic anténatal dans le cadre d'un conseil génétique par un médecin. Ce diagnostic très précoce, est réalisé par l'étude des produits de la biopsie du trophoblaste (villosités chorales du placenta) à la 10^{ème} semaine de grossesse ou par l'étude de l'activité des enzymes intestinales du fœtus dans le liquide amniotique ponctionné à la 18^{ème} semaine de grossesse. Ce diagnostic permet une prise en charge dès la naissance de l'enfant malade ce qui rend le traitement plus efficace.

De nombreuses méthodes sont utilisées pour rechercher les mutations du gène associé à la mucoviscidose. Une technique communément employée est le test génétique PCR/OLA (Oligonucleotide ligation assay)/ SCS (Sequence-Coded Separation) [166] développé par la société ABBOTT [167, 168]. Il permet la recherche de 31 mutations du gène CFTR et le diagnostic de 87% [169] des malades appartenant à la population européenne. Ce test associe trois techniques : La PCR (Polymerase Chain Reaction) très répandue dans le milieu médical, la technique OLA qui consiste à lier deux fragments d'ADN hybridés à un même simple brin (Figure 50) et l'électrophorèse qui sépare les fragments d'ADN de tailles différentes. Le déroulement du test s'effectue alors en quatre étapes :

- 1 L'ADN du patient est d'abord amplifié par PCR.

- 2 Le produit résultant de la PCR et représentant l'ADN du patient est exposé à trois cibles : la cible mutée, la cible normale et la cible commune. Les cibles normales et mutées diffèrent par leur taille et par la base se situant à leur extrémité 3'. Elles représentent les deux allèles de la séquence étudiée. Leur queue, assurant la différence de mobilité, est composée d'oxyde de Pentaéthylène (PEO). La cible commune est marquée par un fluorophore dont la couleur diffère d'une mutation à l'autre.
- 3 Le produit PCR obtenu à la fin de l'étape précédente, est mis en présence de la ligase, enzyme qui assure la jonction entre les extrémités des deux cibles totalement hybridées.
- 4 À la fin de la ligation, le double brin obtenu est dénaturé puis analysé par électrophorèse pour déterminer sa taille. L'analyse par un scanner permet de déterminer la nature du fluorophore associé aux fragments obtenus. La taille de ces fragments et la nature du fluorophore permettent de déterminer la présence ou non des 31 mutations détectées par l'outil. Ce test ne couvre pas la totalité des mutations de la mucoviscidose de plus il est cher et consomme du temps et du personnel.

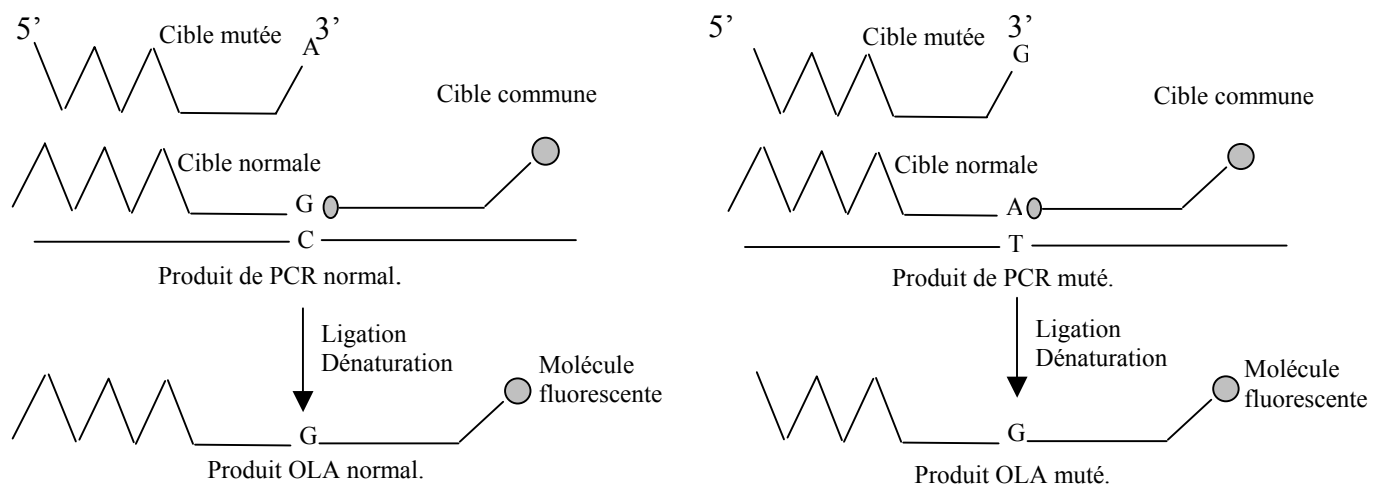


Figure 50: Principe de la technique OLA. Les fragments PCR obtenus sur l'ADN de patient sont dénaturés et mélangés à trois cibles différentes : La cible normale qui est totalement complémentaire à la séquence normale du gène, la cible mutée qui est totalement complémentaire à la séquence mutée du gène et une cible commune marquée par un fluorophore. Les longueurs des cibles normales et mutées sont différentes. Après hybridation la ligase lie les deux fragments d'oligonucléotides hybridés au fragment de PCR. Ce produit est analysé par électrophorèse et visualisé grâce à la présence de fluorophore. La taille du fragment obtenu permet de déterminer la présence ou l'absence de la mutation.

Le test OLA/SCS est le test de référence auquel nous devons comparer la biopuce que nous sommes entrain de mettre au point.

L'espérance de vie des malades a augmenté suite au diagnostic précoce, à des traitements mieux adaptés et à la découverte du gène responsable de cette maladie. En effet, l'âge moyen de survie des enfants atteints de fibrose kystique était de 6 mois en 1938, de 5 ans en 1950, de 11 ans en 1966 et de nos jours il atteint les 35 ans [159]. La courbe décrivant l'évolution de cette espérance de vie entre 1960 et 2000 est représentée dans l'Annexe 6.

C Description génétique de la mucoviscidose :

C.1 Le gène de la mucoviscidose :

En 1989, des chercheurs canadiens découvrent le gène impliqué dans le développement de la mucoviscidose : c'est le gène codant pour un régulateur transmembranaire CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator). C'est un grand gène d'environ 250 Kbases situé sur le bras long du chromosome 7 (Figure 51) et composé de 27 exons [164, 170, 171].

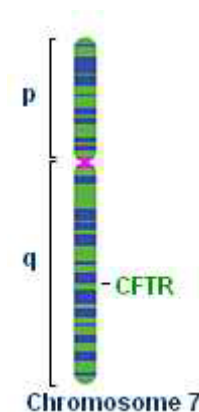


Figure 51: Position du gène CFTR sur le chromosome 7. La partie p correspond au bras court du chromosome alors que la partie q correspond au bras long.

Il est transcrit en un ARN messager qui permet la synthèse d'une protéine constituée de 1480 acides aminés. Une légère modification de la séquence du gène CFTR peut altérer le fonctionnement de la protéine fabriquée et conduire au développement de la mucoviscidose. De nos jours, les chercheurs ont identifié plus de 1000 mutations dans ce gène qui sont responsables de cette maladie [172].

La majorité des défauts moléculaires du gène CFTR sont des mutations dites ponctuelles car elles touchent uniquement un nucléotide. Les autres types de mutations peuvent être des délétions de taille plus ou moins grande. La fréquence de ces mutations varie énormément d'un groupe géographique à l'autre et d'une ethnie à l'autre. Cependant la grande majorité de ces altérations chromosomiques sont dites " privées " car elles n'atteignent qu'un nombre limité d'individus. **En France, la mutation la plus fréquente** est la délétion

$\Delta F508$ (67 à 70 % des cas) qui se traduit au niveau du gène par l'absence de trois bases et, au niveau de la protéine par l'absence d'une phénylalanine en position 508. **Sept** autres mutations dépassent le seuil de 1% et les autres mutations sont très rares [173]. Le graphe ci-dessous montre l'évolution du pourcentage de malades dépistés en fonction du nombre de mutations recherchées. Il a été tracé en considérant les 58 mutations les plus fréquentes en France. Ces données ont été obtenues auprès du docteur E. Giraudon de l'hôpital Henri Mondor en juillet 2003 et sont présentées dans l'Annexe 8.

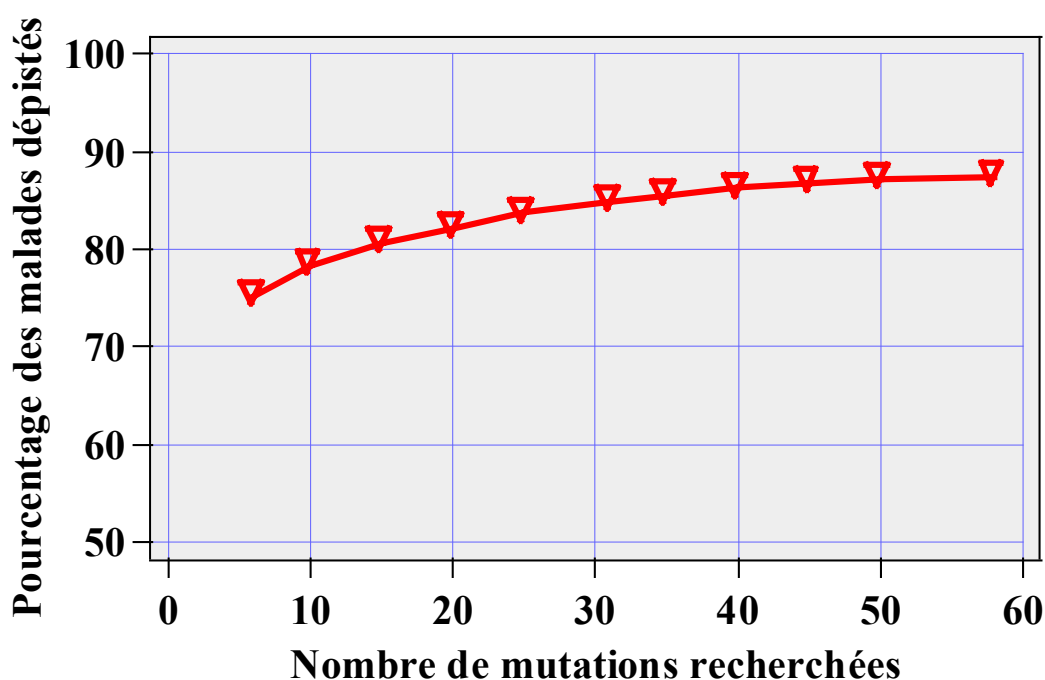


Figure 52: Ce graphe représente le pourcentage de malades dépistés en fonction du nombre de mutations recherchés. Il a été tracé en considérant les 58 mutations les plus fréquentes en France (Annexe 8). Ces données ont été recueillies par le Docteur E. Giraudon. L'allure de la courbe met en évidence le grand nombre de mutations (>60) qu'il nous faut détecter pour dépister 90% des personnes malades.

Ce graphe met en évidence la difficulté du diagnostic génétique de la mucoviscidose. En effet, pour dépister 90% des malades il faut être capable de tester plus de 65 mutations, ce qui consomme beaucoup de temps et d'argent avec les outils de diagnostic moléculaire actuels.

C.2 Transmission de la maladie :

La mucoviscidose est une maladie génétique héréditaire transmise sur le mode autosomique récessif, c'est-à-dire que pour avoir un enfant malade il faut que les deux parents soient porteurs d'une anomalie au niveau du gène CFTR. Ces parents sont dits porteurs sains car ils portent une anomalie mais ne sont pas malades. Par contre, il est possible qu'ils aient un enfant malade, porteur des anomalies de chacun de ses parents. La transmission de la maladie est décrite par la Figure 53 :

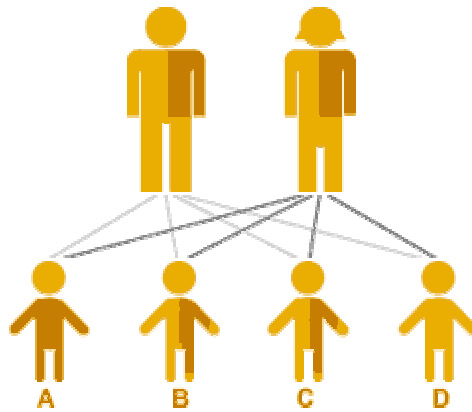


Figure 53: Mécanisme de transmission de la maladie. Deux parents porteurs de la mucoviscidose ont une probabilité d'avoir : 1 enfant malade sur 4 (enfant A), 2 enfants porteurs de la maladie sur 4 (enfants B et C) et 1 enfant sain sur 4 (enfant D).

Trois cas de figure se présentent :

- 1- Le père et la mère donnent, chacun, un chromosome sain. L'enfant est alors homozygote sain (A).
- 2- L'un des deux parents donne un chromosome porteur d'une anomalie dans le gène CFTR et le second un chromosome sain. L'enfant est alors porteur de la maladie. Il est hétérozygote c'est le cas des enfants (B) et (C).
- 3- Le père et la mère transmettent, chacun, un chromosome porteur d'une anomalie (différente ou identique) sur le gène CFTR. L'enfant est homozygote malade (D).

Pour un couple porteur d'un allèle pathologique gène de la mucoviscidose, la probabilité d'avoir un enfant non atteint de la mucoviscidose est alors de 1 sur 4, alors que la probabilité d'avoir un enfant porteur sain est de 1 sur 2 et celle d'avoir un enfant atteint est de 1 sur 4.

Conclusion :

L'enjeu de mes travaux de thèse est, comme nous l'avons déjà vu, la réalisation d'un système optique pour le diagnostic génétique dans le cas particulier de la mucoviscidose. De ce fait, j'ai manipulé des molécules d'ADN tout au long de mes expériences. Pour cela j'ai fait, dans ce Chapitre III, un rappel de la structure de cette molécule et de ses propriétés. Nous avons vu ainsi qu'une molécule d'ADN est un ensemble de deux chaînes enroulées en double hélice autour d'un même axe. Chaque chaîne est un mono brin d'ADN constitué d'une succession de bases greffées sur un squelette de sucre phosphaté. Les bases sont au nombre de quatre (A, C, G et T) et se situent à l'intérieur de la double hélice. Elles sont positionnées face à face et s'associent par paire (A/T et G/C) par l'intermédiaire de liaisons par des ponts d'hydrogène. Nous appelons oligonucléotide un enchaînement spécifique de nucléotides synthétisés in vitro.

Des changements nucléotidiques peuvent intervenir sur une séquence d'ADN. Ce sont les mutations. Nous nous sommes intéressés à deux types de mutations : une délétion de trois bases et une substitution. Lors des expériences d'hybridation avec des oligonucléotides, la présence de la délétion déstabilise fortement le double brin partiellement complémentaire alors que la substitution nous met en présence de l'un des mésappariements A/A, A/C, A/G, C/T, C/C, G/T, G/G et T/T. L'instabilité du double brin partiellement complémentaire dépend du mésappariement étudié et de sa position sur l'oligonucléotide. Ainsi, nous avons vu que les mésappariements mettant en cause une base G déstabilisent peu le double brin partiellement complémentaire et que la position de la substitution au centre de la séquence engendre l'instabilité optimale. Le paramètre décrivant la stabilité des double-brins d'ADN est la température de fusion. Trois méthodes de calcul de T_m existent. La première permet un calcul rapide et approximatif et est surtout utilisée dans la technique de la Polymerase Chain Reaction. La deuxième tient compte de l'effet de longueur des ADN, de leur composition en bases C/G, des concentrations en sel et en formamide de la solution et du pourcentage de mésappariement. Elle est applicable à des séquences de moins de 100 bases. La troisième est basée sur des calculs thermodynamiques qui tiennent compte de l'entropie (désordre) et de l'enthalpie (énergie de liaison) du système ainsi que de la stringence du milieu. Les simulations effectuées par ces trois méthodes, les multiples publications mettant en évidence l'effet de la composition des séquences sur l'efficacité de l'hybridation ainsi que nos résultats expérimentaux, nous ont conduits à choisir cette troisième formule pour calculer la

température de fusion des oligonucléotides utilisés. Ce calcul a été effectué par l'intermédiaire du programme Hyther mis à disposition sur Internet par John SantaLucia et sera présenté au chapitre IV.

Après ce rappel, je me suis intéressée à la maladie que nous cherchons à dépister : la mucoviscidose. C'est une maladie génétique très grave et difficile à diagnostiquer. Elle possède une incidence de 1 enfant sur 2000 à 3000 naissances chez la population européenne et se traduit souvent par des problèmes pulmonaires et digestifs. Ce mal peut aussi entraîner la stérilité des hommes et l'hypofertilité des femmes. La teneur en sel de la sueur ainsi que le diagnostic génétique par le test OLA/SCS restent pour le moment les méthodes de diagnostic les plus sûres. En 1989, le gène impliqué dans cette maladie a été découvert. Il est localisé sur le bras long du chromosome 7 et est responsable de la synthèse d'une glycoprotéine membranaire jouant le rôle d'un canal de chlorure. Jusqu'à nos jours, plus 1000 mutations ont été identifiées dans ce gène. En France, la délétion $\Delta F508$ concerne 67 à 70% des personnes atteintes, sept autres mutations ont une fréquence qui dépasse les 1% et les plus de 992 mutations restantes sont très rares. Ces chiffres ainsi que le graphe donné à la (Figure 53) montre que pour couvrir 90% de la population française, il faut pouvoir analyser, en parallèle, au moins 60 mutations ce qui équivaut au double du nombre de mutations dépistées actuellement par le test OLA/SCS. De là découle l'intérêt d'un nouveau système peu onéreux permettant une analyse en parallèle de plus d'une soixantaine de mutation.

Dans la dernière partie de mon manuscrit, je décrirai les expériences que j'ai réalisées en multicapteur et dont le but est d'exploiter l'instabilité introduite par une délétion de trois bases et une substitution afin de réaliser un diagnostic génétique de la mucoviscidose. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre de la recherche d'une technique peu onéreuse, rapide et fiable permettant de diagnostiquer la majorité (plus de 90%) des patients atteints de la mucoviscidose.

Chapitre IV :

Réalisation d'une puce à ADN.



A	<u>RAPPELS :</u>	113
B	<u>FAISABILITE ET SPECIFICITE DU MULTICAPTEUR :</u>	114
B.1	<u>CHOIX DES SONDAS ET DES CIBLES :</u>	114
B.2	<u>DISTRIBUTION DES SEQUENCES SUR LA LAME :</u>	116
B.3	<u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL :</u>	117
B.3.1	<u>Mise en route de l'expérience :</u>	118
B.3.1.1	<u>Enregistrement des courbes de réflectivité :</u>	119
B.3.1.2	<u>Choix de l'angle de travail :</u>	123
B.3.1.3	<u>Passivation de la surface :</u>	124
B.3.2	<u>Étude de la spécificité et de la sélectivité du capteur :</u>	124
B.3.2.1	<u>Passage en séquentiel :</u>	125
B.3.2.2	<u>Passage d'un mélange contenant plusieurs séquences :</u>	135
	<u>RECAPITULATIF :</u>	138
C	<u>OPTIMISATION DE LA DISCRIMINATION POUR UNE SUBSTITUTION :</u>	139
C.1	<u>CHOIX DES MUTATIONS ET CONCEPTION DES SONDAS :</u>	139
C.2	<u>PROTOCOLE EXPERIMENTAL ET ANALYSE DES RESULTATS :</u>	142
C.2.1	<u>Analyse des résultats en fonction de la longueur des oligonucléotides :</u>	151
C.2.2	<u>Analyse en fonction des T_m :</u>	156
C.2.3	<u>Modélisation :</u>	161
	<u>RECAPITULATIF :</u>	168
D	<u>ÉTUDE DE SIX MUTATIONS SUR L'EXON 10 :</u>	169
D.1	<u>CONCEPTION DES SONDAS :</u>	169
D.1.1	<u>Description de la stratégie :</u>	169
D.1.2	<u>Calcul des T_m :</u>	175
D.1.3	<u>Résultats théoriques :</u>	175
D.2	<u>PREMIERES EXPERIENCES :</u>	178
D.2.1	<u>Protocole expérimental :</u>	180
D.2.2	<u>Résultats expérimentaux :</u>	181
D.2.3	<u>Comparaison entre l'expérience et la théorie :</u>	182
	<u>RECAPITULATIF :</u>	185
	<u>CONCLUSION :</u>	186



Résumé :

Ce chapitre résume l'ensemble des expériences en imagerie des plasmons de surface menées au cours de la thèse. Les résultats traduisent la faisabilité d'un multicapteur paramétrique. Cette étude a abouti à une analyse de l'influence de la longueur des monobrans d'ADN utilisés sur la capacité de discrimination entre la réponse d'un duplex totalement complémentaire et celle d'un duplex partiellement complémentaire. Les résultats obtenus font ressortir l'importance de la composition en base des séquences et, notamment, celle de la température de fusion du double brin. L'étude de la réponse du multicapteur en fonction de ce dernier paramètre nous a permis de définir un ensemble de sondes ouvrant la voie à la construction d'une puce à ADN dédiée au diagnostic génétique, validée sur quelques mutations relatives à la mucoviscidose.

Les trois chapitres précédents illustrent le caractère pluridisciplinaire de mes travaux de thèse qui s'inscrivent dans le cadre des biotechnologies. Dans le premier chapitre, nous avons présenté les techniques de transduction permettant de transformer le signal résultant d'une interaction biologique en un signal mesurable. Nous nous sommes intéressés en particulier à l'imagerie par résonance des plasmons de surface, technique que nous avons exploitée pour effectuer nos mesures. Le deuxième chapitre a été consacré à la fonctionnalisation de la surface et au dépôt des sondes. Nous y avons décrit la chimie que nous avons développée dans le but d'ancrer des sondes d'ADN simple brin sur une surface d'or ainsi que la technique de dépôt des différentes sondes utilisées. Quant au troisième chapitre, il présente le matériel biologique utilisé ainsi que la mucoviscidose.

Dans ce dernier chapitre, j'aborde les résultats expérimentaux qui préparent le terrain à la mise en place d'une puce à ADN pour le diagnostic génétique de la mucoviscidose dans la population française. Le déroulement des expériences m'a poussé à le diviser en trois parties. La première montre la faisabilité d'un multicapteur spécifique et sélectif en utilisant des oligonucléotides de synthèse, composés de 20 bases environ. La deuxième présente l'influence de la longueur des oligonucléotides sur la spécificité du capteur ainsi que l'analyse de la réponse de notre système en fonction de la température de fusion du double brins d'ADN formé. La modélisation mise en place nous a permis de prédire théoriquement les résultats expérimentaux pour toutes les séquences étudiées. Nous avons ainsi élaboré une stratégie de choix des sondes optimisées pour la détection d'une substitution. Cette stratégie ainsi que son application aux six mutations les plus fréquentes de l'exon 10 font l'objet de la dernière partie.

A Rappels :

Il est important de rappeler que nous étudions des interactions ADN / ADN entre des oligonucléotides biotinylés fixés sur une surface d'or fonctionnalisée (les sondes) et des cibles libres en solution. L'or est couvert d'un empilement de trois mono-couches successives : MUA, PEI, ExtrAvidine. Des solutions composées de 7 μ M de sondes et de 1.5 M en bétaine sont préparées puis déposées sur la surface par l'intermédiaire d'un robot de dépôt de marque Qarray. La biotine des sondes interagit avec l'ExtrAvidine et permet ainsi d'accrocher ces oligonucléotides sur la surface. La technique de dépôt des sondes et le traitement de la surface sont décrits en détail dans le deuxième chapitre de ce manuscrit. Les séquences d'oligonucléotides étudiées sont relatives à l'exon 10 du gène CFTR dont les mutations ou les changements nucléotidiques sont impliqués dans le développement de la mucoviscidose, maladie décrite dans le troisième chapitre de cette thèse. Un schéma, illustrant la surface obtenue lors du dépôt des sondes, est donné à la Figure 54.

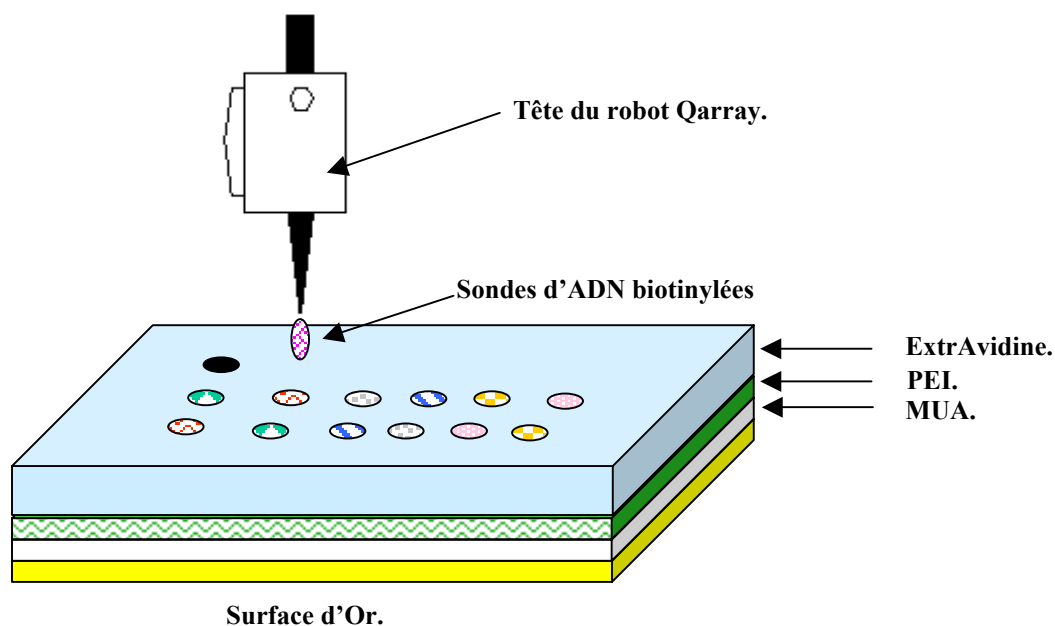


Figure 54: Schéma illustrant le dépôt de différentes sondes biotinylées sur une surface d'or couverte d'un empilement de trois mono couches (MUA-PEI-ExtrAvidine). Les cercles de même motif représentent une même séquence sonde.

Les hybridations cibles/sondes ont été suivies en parallèle et en temps réel par l'intermédiaire du dispositif d'imagerie par résonance des plasmons de surface développé dans notre laboratoire et présenté dans le premier chapitre (cf. p 45).

B Faisabilité et spécificité du multicapteur :

Dans cette partie nous démontrons la faisabilité d'un multicapteur capable de révéler la présence d'une cible spécifique en solution. La détection se fait en temps réel et en suivant simultanément les interactions se déroulant à des endroits différents de la surface.

B.1 Choix des sondes et des cibles :

Le but de notre application étant le diagnostic génétique, nous avons choisi d'étudier des mutations impliquées dans la maladie de la mucoviscidose. Pour cela nous avons sélectionné, la mutation la plus répandue nommée $\Delta F508$ qui correspond à une délétion de trois paires de bases entraînant l'absence d'un acide aminé (phénylalanine) en position 508 de la protéine CFTR. Parallèlement nous avons choisi deux polymorphismes nommés 1540 A/G (ou M470V) et 1716 G/A. Ces changements correspondent respectivement à une substitution d'un A en G pour la mutation 1540 entraînant la modification d'une méthionine en Valine en position 520 et d'un G en A en position 1716 qui n'entraîne pas de modification d'acides aminés. Ces deux modifications sont des polymorphismes car ils ne semblent pas directement impliquer dans le développement de la maladie.

Pour étudier une mutation, nous utilisons deux séquences : une séquence dite sauvage (S) correspondant à la séquence normale et une séquence dite mutée (M) correspondant à la séquence présentant le changement nucléotidique c'est à dire la mutation. Ainsi, pour les trois mutations qui nous intéressent, nous avons défini six séquences simple brin différentes. Les nucléotides mutés sont positionnés au centre des séquences. À cette série d'oligonucléotides nous avons ajouté trois autres sondes biotinylées jouant le rôle de contrôle négatif. En tout, nous recensons neuf sondes et neuf cibles. Pour cette étude nous avons choisi des oligonucléotides de 20 bases (sans compter la longueur du bras espaceur) car c'était la longueur standard utilisée dans notre laboratoire depuis plusieurs années.

Les sondes correspondent à une séquence du gène et possèdent à leur extrémité 5'un bras espaceur de 5 thymines terminé par une biotine. La biotine sert à les ancrer sur l'ExtraAvidine alors que le bras espaceur permet d'éloigner la séquence utile de la surface. Quant aux cibles, elles correspondent à des oligonucléotides synthétiques complémentaires des sondes et sont représentées en gras et suivie d'un *. Les correspondances entre les

numérotations adoptées et les mutations étudiées sont données au tableau 2. Dans ce tableau, les sondes sauvages et les cibles sauvages sont totalement complémentaires de même que les sondes mutées sont totalement complémentaires des cibles mutées. Ainsi, par exemple, les séquences 1 et 1* sont totalement complémentaires, de même pour les séquences 2 et 2*. La structure et les séquences des cibles et des sondes sont données dans le tableau 3.

Mutation	N° de la sonde sauvage	N° de la sonde mutée	N° de la cible sauvage	N° de la cible mutée
$\Delta F508$	1	2	1*	2*
1540 A/G (M470V)	3	4	3*	4*
1716 G/A	5	6	5*	6*

Tableau 2: Correspondance entre les numéros des séquences et les mutations étudiées.

Sondes Cibles	Extrémité. 5' 3'		Séquence.								Extrémité. 3' 5'
1		bio-(T) ₅ -G	AAA	ATA	TCA	TCT	TTG	GTG	TT		
1*			TTT	TAT	AGT	AGA	AAC	CAC	AA		
2		bio-(T) ₅ -G	AAA	ATA	TCA		TTG	GTG	TTT	CC	
2*			TTT	TAT	AGT		AAC	CAC	AAA	GG	
3		bio-(T) ₅ -T	AC	TTC	TAA	TGA	TGA	TTA	T		
3*			TG	AAG	ATT	ACT	ACT	AAT	A		
4		bio-(T) ₅ -T	AC	TTC	TAA	TGG	TGA	TTA	T		
4*			TG	AAG	ATT	ACC	ACT	AAT	A		
5		bio-(T) ₅ -C	AAC	TAG	AAG	AGG	TAA	GA			
5*		G	TTG	ATC	TTC	TCC	ATT	CT			
6		bio-(T) ₅ -C	AAC	TAG	AAG	AAG	TAA	GA			
6*		G	TTG	ATC	TTC	TTC	ATT	CT			
7		bio-(T) ₅ -A	CAC	TTC	GTG	CCT	TCG	GCA	GGG	AG	
7*			GTG	AAG	CAC	GGA	AGC	CGT	CCC	TC	
8		bio-(T) ₅ -A	ATA	TGA	ACC	CTT	CAC	ACT	A		
8*			TAT	ACT	TGG	GAA	GTG	TGA	T		
9		bio-(T) ₅ -C	TGG	AGC	CTT	CAG	AGG	GTA	A		
9*			ACC	TCG	GAA	GTC	TCC	CAT	T		
CP	3'		C	GGA	ACT	GCT	ATG	TCG			5'

Tableau 3: Séquences représentant la série des 9 oligonucléotides utilisés pour la faisabilité du multicapteur. La séquence de CP est employée pour empêcher les interactions non spécifiques entre les cibles et la surface. Les sondes sont modifiées en leur extrémité 5' par un espaceur formé de 5 Thymines (T) précédé par une biotine (bio) qui servira à les ancrer sur l'ExtrAvidine. Les rectangles indiquent la position des mutations.

Les séquences 7 à 9 représentent les contrôles négatifs qui permettront de valider la spécificité de la réponse du multicapteur. Les oligonucléotides 8 et 9 sont situés sur l'exon 10 alors que l'oligonucléotide 7 est une séquence de l'exon 17 du gène CFTR. Le CP est une cible non pertinente qui a été utilisée pour neutraliser les charges positives du PEI afin de diminuer le bruit de fond.

B.2 Distribution des séquences sur la lame :

Nous avons étudié la réponse du multicapteur lorsque les cibles 1* à 9* s'hybrident aux sondes 1 à 9 (Tableau 3). Dans ce but nous avons déposé les neuf sondes, sous la forme de plots, sur une lame d'or fonctionnalisée par l'intermédiaire de la multicouche MUA-PEI-ExtrAvidine. La technique de dépôt est décrite au paragraphe B.2.4 du chapitre II et la distribution spatiale des sondes est représentée dans la Figure 55.

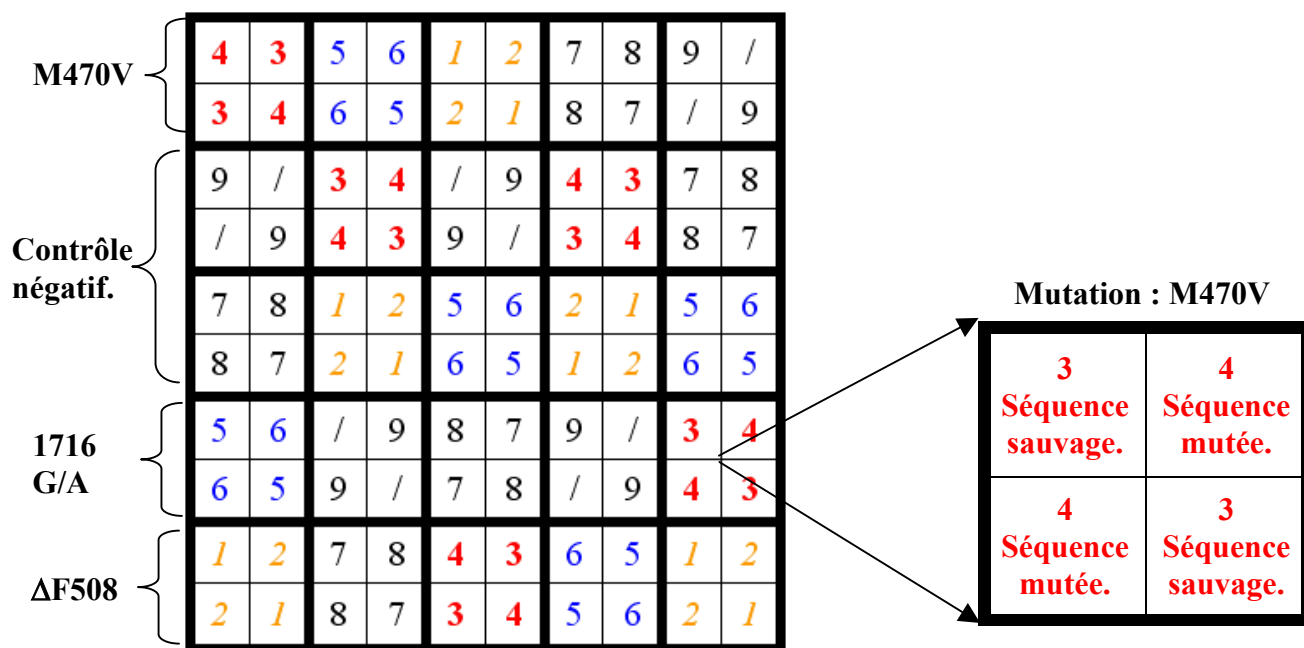


Figure 55 : Distribution spatiale des séquences sondes 1 à 9 dans une matrice carrée de 100 plots. Les sondes sauvages et mutées relatives à une même mutation sont disposées dans un carré formé de 4 plots. Une diagonale est occupée par les séquences sauvages et l'autre par les séquences mutées. Les plots des sondes 7 à 9 permettent de contrôler la réponse non spécifique du multicapteur tandis que les plots d'ExtrAvidine (/) permettent d'orienter la lame et de suivre l'évolution de la surface de base.

La grille conçue est une matrice de 10 x 10 plots, formée d'une mosaïque de motifs carrés. Dans chaque carré nous avons déposé les séquences sauvages et mutées relatives à une

même mutation. Les oligonucléotides de même séquence occupent la même diagonale. Cette structure nous permet de comparer, visuellement, l'augmentation de la réflectivité sur chacune des diagonales quand la surface est mise en contact avec les échantillons à analyser. Ainsi, nous obtenons rapidement une première analyse du produit étudié : la diagonale où la variation de réflectivité est maximale doit correspondre aux sondes totalement complémentaires aux cibles.

Chaque sonde est représentée 10 fois. Cette redondance nous permet d'évaluer la reproductibilité des résultats ainsi que leur dispersion. Des régions indiquées par des / sur la Figure 55, correspondent à des plots sans sondes. Elles nous permettent d'orienter la lame et de suivre simplement le comportement de la tri-couche MUA-PEI-ExtrAvidine (cf. Chapitre II).

B.3 Protocole expérimental:

Toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) dans un tampon PBS 1X (137 mM en NaCl pH. 7.4) et selon le protocole suivant :

Démarche expérimentale[†] :

- La lame est fixée sur la base d'un prisme et l'ensemble est monté sur le dispositif d'imagerie RPS décrit au premier chapitre.
- La surface est photographiée en air pour observer la qualité des plots.
- Les plots sont sélectionnés un à un et leur position est enregistrée avec l'assistance d'un programme LabView développé au laboratoire et décrit en détail dans la thèse d'Emmanuel Maillart [18].
- Le tampon PBS 137mM en NaCl pH 7.4 est injecté dans la cellule.
- Le miroir tournant fait varier l'angle de rasance externe (cf. Figure 10).
- Les courbes de réflectivité en fonction de l'angle de rasance externe sont tracées par le programme LabView.
- L'angle de rasance externe auquel il faut se positionner pour enregistrer les variations de réflectivité en fonction du temps est déterminé à partir des courbes tracées. C'est l'angle de travail.
- Le miroir est fixé à l'angle de travail. Désormais nous suivons en temps réel et par le biais du programme LabView, les variations de réflectivité au niveau des différents plots sélectionnés.
- La cible CP est injectée pour neutraliser les charges positives restantes sur la surface.
- Le tampon PBS est injecté pour rincer les molécules qui ne sont pas fixées.

[†] Démarche commune à toutes les expériences de ce chapitre.

Etude des interactions cibles/sondes[†] :

- Les cibles ou les solutions à analyser sont injectées dans la cuve.
- Le tampon PBS est injecté une dernière fois pour rincer la surface.
- Les cinétiques sont analysées et interprétées.

NB : Tous les produits biologiques sont préparés dans une solution PBS 1X de volume final égal à 250 µl et sont utilisés en circuit fermé.

Dans la suite de ce paragraphe, je décrirai en détail chacune des étapes mentionnées ci-dessus dans le cadre de l'étude de la faisabilité et de la spécificité du multicapteur.

B.3.1 Mise en route de l'expérience :

Après le dépôt des sondes sous forme de plots sur la surface d'or couverte par la multicouche MUA-PEI-ExtrAvidine, la lame fonctionnalisée est fixée sur la base d'un prisme d'indice 1.72 par l'intermédiaire d'une huile d'adaptation d'indice. L'ensemble est monté sur le dispositif d'imagerie RPS. La surface est alors éclairée par un faisceau incident polarisé transverse magnétique puis photographiée en air (Figure 56) avant l'injection de toute solution. Cette première image permet de s'assurer que la matrice de plots est bien positionnée au centre de la cuve et que ces derniers ont une forme régulière et ne présentent pas d'anomalies (absence de certains plots, recouvrement de plots voisins...) dont nous devons tenir compte lors de l'analyse des résultats. Le contraste de cette image nous permet de déterminer la dimension des plots et de pointer leur position avec l'assistance d'un programme LabView développé au laboratoire. La Figure 56 montre une matrice typique de 4 x 4 mm² formée par cent plots réguliers de 200 µm de diamètre, espacés de 400 µm de centre à centre.

[†] Démarche qui varie selon le but de l'expérience réalisée.

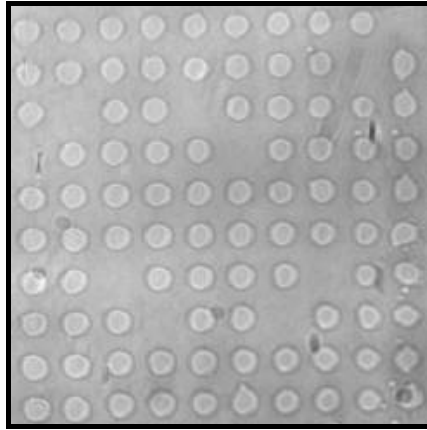


Figure 56: Image de la matrice de plots portant les sondes 1 à 9, prise par le système d'imagerie par résonance des plasmons de surface avant l'introduction de la solution tampon dans la cellule. La distribution des sondes est conforme à celle décrite au paragraphe précédent.

Après la sélection des plots, la cuve est remplie de PBS 1X (pH 7.4, 0.137 M en NaCl). Cette étape est critique car il arrive que la solution injectée ne remplisse pas entièrement la cuve. Nous nous retrouvons alors avec un volume d'air emprisonné sur la surface, ce qui gêne le déroulement de l'expérience et fausse les résultats des plots recouverts par la bulle. Dans ce cas, avant de continuer les démarches expérimentales il faut chasser la bulle d'air en vidant la cuve et la remplissant à nouveau. Si, malgré tous les efforts déployés nous n'arrivons pas à chasser la bulle d'air ni à minimiser son volume, il faut changer de lame et recommencer l'expérience.

B.3.1.1 Enregistrement des courbes de réflectivité :

Une fois la cuve bien remplie de PBS, nous faisons varier l'angle de rasance externe afin d'enregistrer l'ensemble des courbes de réflectivité de tous les plots. Cette étape est réalisée avec l'assistance d'un programme LabView présenté en détail dans la thèse Emmanuel Maillart [18]. En résumé, le programme enregistre les niveaux de gris de chaque pixel de la caméra et les transforme en réflectivité pour chacun des angles de rasance externe balayés. La démarche suivie comporte quatre étapes : dans la première, le programme enregistre les niveaux de gris quand la diode électroluminescente du montage optique est éteinte. Cette valeur, notée Niv_0 , caractérise la lumière parasite, correspond à une intensité réfléchie nulle et constitue notre première référence. Ensuite, il commande la rotation du moteur tournant dans un intervalle angulaire centré sur l'angle plasmon. Cet intervalle est défini par l'utilisateur et vaut 5 degrés dans notre cas. Pour chaque angle de rasance externe,

le programme enregistre à nouveau les niveaux de gris. Cette mesure est faite en polarisation transverse électrique (TE) (c'est la deuxième étape) et en polarisation transverse magnétique (TM) (c'est la troisième étape). Les valeurs des niveaux de gris obtenus en TE correspondent à une réflectivité théorique connue et indépendante de ce qui se trouve au-dessus de la couche d'or : c'est donc une deuxième référence.

Comme la réponse de notre caméra est linéaire en fonction de l'intensité et connaissant les réflectivités en TE, le programme calcule par une simple règle de trois la valeur de la réflectivité pour chaque angle d'incidence d'après la formule :

$$R_{TM}(t) = \frac{(Niv_{TM}(t) - Niv_0) \cdot R_{TE} \cdot T_{1,TE}^2}{(Niv_{TE} - Niv_0) \cdot T_{1,TM}^2} \quad \text{Eq. 14}$$

où R_{TM} est la réflectivité en TM à l'instant t , R_{TE} la réflectivité théorique en TE, T_1 la transmission de la face d'entrée du prisme, Niv_{TM} la valeur des niveaux de gris en polarisation TM, Niv_{TE} la valeur des niveaux de gris en polarisation TE, et Niv_0 la valeur des niveaux de gris quand la diode électroluminescente est éteinte. Ce calcul de la réflectivité pour chaque angle d'incidence externe constitue la quatrième étape.

Finalement, nous traçons l'ensemble des courbes de réflectivité en fonction de l'angle de rasance externe afin de vérifier leur forme et de déterminer l'angle de travail. La Figure 57 présente un exemple des courbes obtenues pour les différents plots de la matrice 10*10.

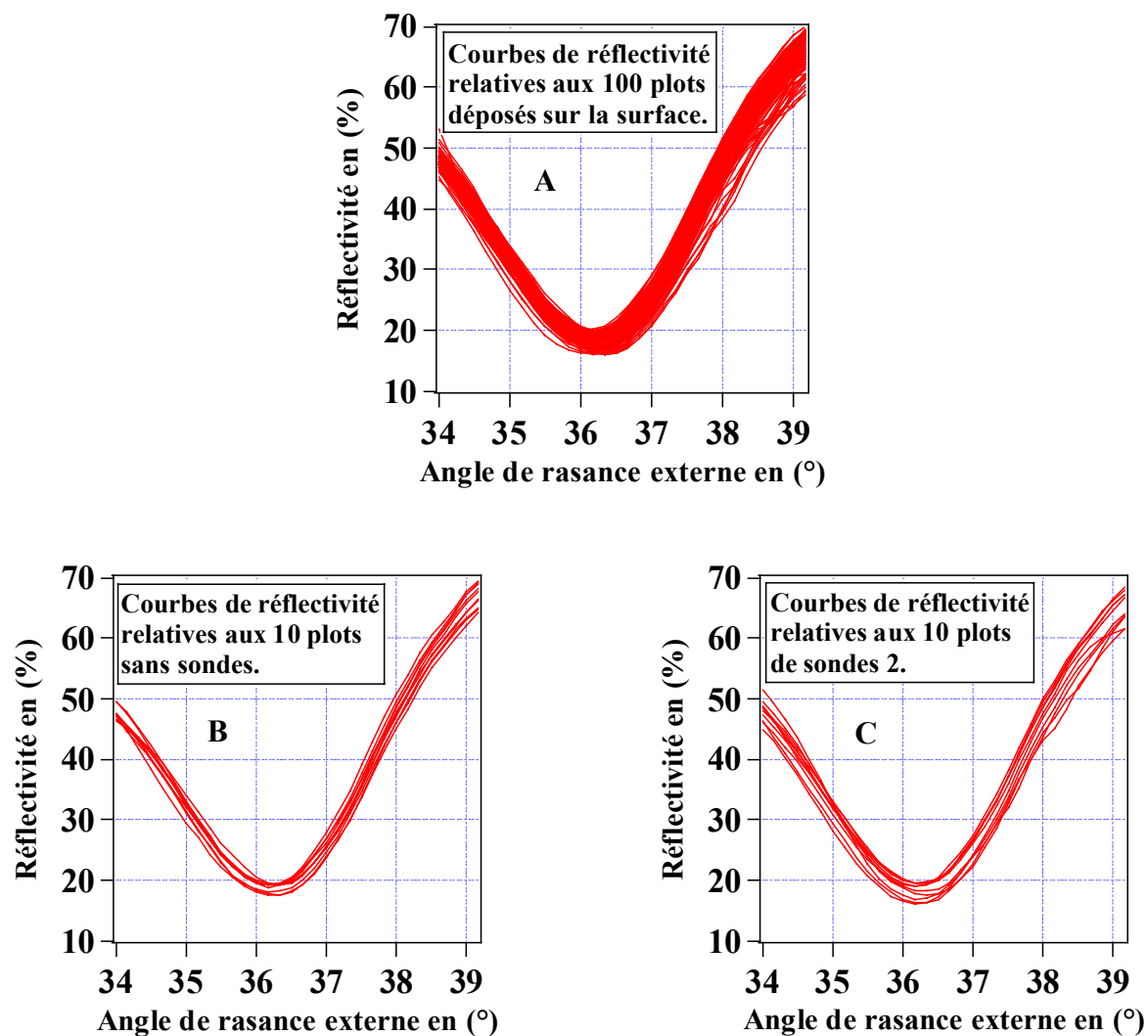


Figure 57: *A : Ensemble de 100 courbes de réflectivité relatives aux 100 plots différents, enregistrées par le programme LabView. B : Ensemble des courbes de réflectivité des 10 plots recouverts seulement de la multicouche MUA-PEI-ExtrAvidine. C : Ensemble des courbes de réflectivité des 10 plots de sonde 2 correspondant à la séquence mutée de la délétion $\Delta F508$. Ces courbes représentent la réflectivité enregistrée en fonction de l'angle d'incidence externe.*

Toutes les courbes de la Figure 57 montrent le pic d'absorption permettant d'observer le phénomène de la résonance des plasmons de surface. De plus elles ne présentent pas d'anomalie (absence de pic, interférences....) et possèdent un minimum de réflexion aux alentours de 20%. Cette valeur élevée est due à la largeur spectrale et à la divergence de la diode électroluminescente utilisée. L'étude représentant l'effet de ces deux paramètres sur la résonance des plasmons de surface est détaillée dans la thèse d'Emmanuel Maillart [18]. Malgré cela, l'allure des courbes de réflectivité nous permet de dire que notre surface est de

bonne qualité et nous pouvons poursuivre notre expérience. D'autre part, les cent courbes de la Figure 57 A possèdent un minimum de réflexion à des angles d'incidence voisins comme le montre les histogrammes de la Figure 58. Les courbes de réflectivité de plots d'ExtrAvidine sans sondes ne se démarquent pas des 90 autres courbes. De ce fait, le contraste entre la multicouche MUA-PEI-ExtrAvidine et les plots de sondes biotinylées est faible. C'est effectivement ce que nous constatons en prenant l'image de la surface exposée à la solution de PBS (Figure 59). Ce fait rend difficile la localisation des plots en PBS, raison de plus pour les sélectionner en air. Au cours de nos expériences, nous cherchons à suivre les hybridations ADN/ADN. Le nombre de cibles hybridées est au plus égal au nombre de sondes fixées sur la surface du plot. Le contraste que nous cherchons à observer est donc aussi faible que celui observé entre les plots d'ExtrAvidine et les plots de sondes d'où la difficulté des expériences.

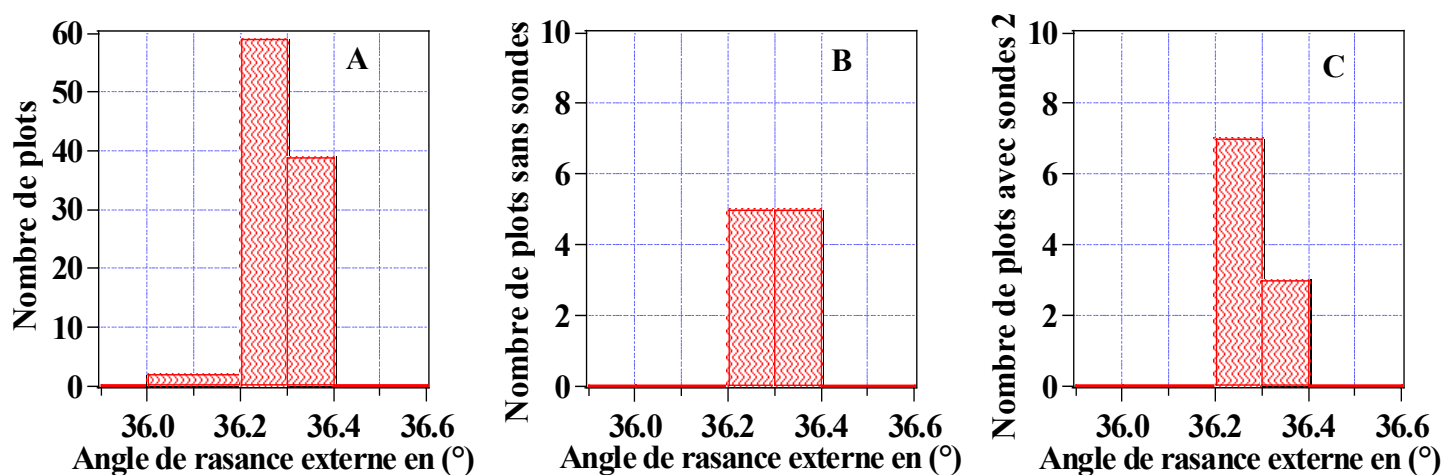


Figure 58: Histogrammes représentant la dispersion de l'angle plasmon qui est l'angle de rasance externe correspondant au minimum de réflectivité. **A** : Dispersions des angles plasmons des 100 plots étudiés. **B** : Dispersion des angles plasmons pour les 10 plots recouverts de la multicouche MUA-PEI-ExtrAvidine. **C** : Dispersion des angles plasmons pour les 10 plots de sonde 2 correspondant à la séquence mutée de la délétion $\Delta F508$.

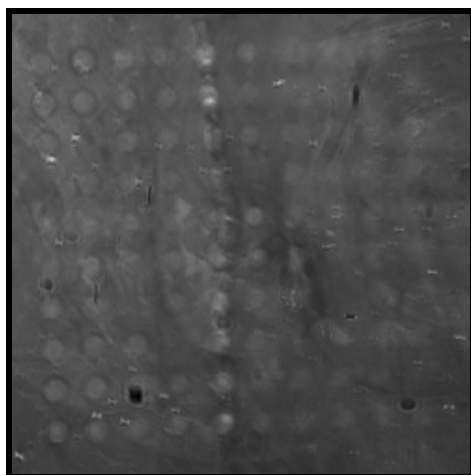


Figure 59: Image de la surface prise en PBS à l'angle de travail en imagerie par résonance de plasmon de surface. Notons le faible contraste entre la surface de base et les plots.

B.3.1.2 Choix de l'angle de travail :

Les courbes de réflectivité permettent aussi de déterminer, pour chacun des plots étudiés, l'angle d'incidence externe auquel il faut se positionner pour enregistrer des variations maximales de réflectivité en fonction du temps. Cet angle correspond au maximum de la dérivée des courbes de réflectivité. Vu l'allure des courbes, cet angle varie peu d'un plot à l'autre. Pour évaluer la dispersion des valeurs de l'angle de travail pour chacun des cent plots étudiés, nous les avons représentées sous la forme d'un histogramme (Figure 60).

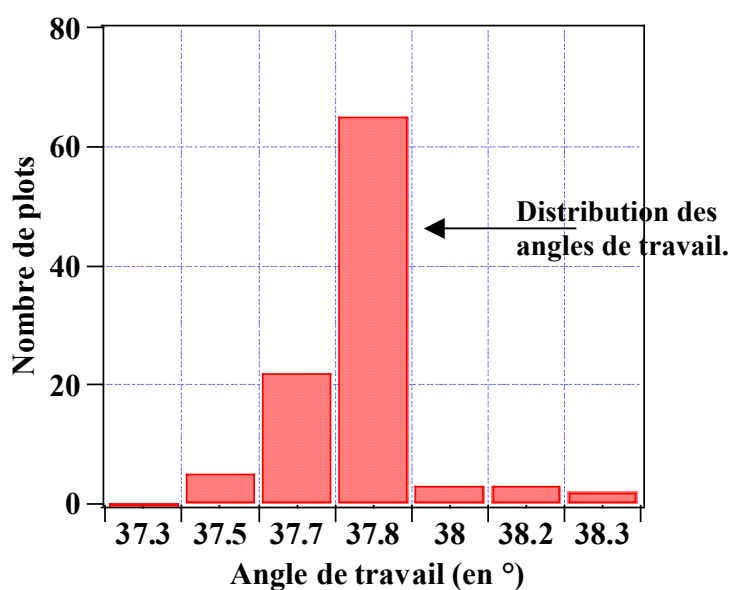


Figure 60: Valeurs de l'angle de travail pour les cent plots dont les courbes de réflectivité sont représentées à la figure 43 A.

La faible dispersion de l'angle de travail nous permet de nous positionner au même angle pour suivre les interactions se déroulant sur tous les plots. L'angle choisi est l'angle moyen calculé en effectuant la moyenne des angles de travail des 100 plots. Le calcul des réflectivités à angle fixe se fait selon le principe décrit au paragraphe précédent. Ainsi, après avoir fixé l'angle d'incidence, nous prenons une première référence en coupant le faisceau lumineux. Nous obtenons ainsi la valeur de Niv_0 . La deuxième référence (Niv_{TE}) correspond à l'image de la surface prise avec un faisceau lumineux polarisé en TE. La formule (Eq. 14) nous servira par la suite pour calculer les réflectivités.

B.3.1.3 Passivation de la surface :

Une solution contenant un oligonucléotide ne s'hybridant avec aucune des sondes déposées sur la lame (le CP du tableau 3) est introduite dans la cuve afin de neutraliser les sites actifs restants du poly(éthylène imine) (cf. Chapitre II paragraphe B.2.2). Cette démarche permet de réduire le bruit de fond dû aux interactions entre les cibles et la structure chimique de la surface. Au cours de cette étape, la variation de la réflectivité est plus élevée au niveau des plots sans sondes qu'au niveau des plots supportant les sondes 1 à 9. Ce qui indique que la solution injectée passive la surface sans interagir avec les sondes déposées. Elle remplit bien son rôle. Nous allons maintenant étudier les hybridations entre les cibles et les sondes qui nous intéressent.

Les oligonucléotides cibles sont directement dilués dans le tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) composé de 137 mM de NaCl et de 50 mM d'ions phosphate, puis injectés dans la cellule d'hybridation pendant 15 minutes à un débit de 70 μ l/min. La surface du capteur est ensuite suffisamment rincée avec la solution tampon PBS pour éliminer tous les oligonucléotides non fixés.

B.3.2 Étude de la spécificité et de la sélectivité du capteur:

Cette étude a été menée sous deux configurations distinctes. Dans la première, les différentes cibles sont successivement mises en contact avec le capteur, afin de vérifier la spécificité de la réponse des sondes (passage en séquentiel). Dans la deuxième, la surface fonctionnalisée est exposée à un mélange de cibles simulant les produits issus de patients (passage en simultané).

B.3.2.1 Passage en séquentiel :

Pour contrôler la réponse de chaque sonde, nous avons effectué plusieurs expériences durant lesquelles nous avons injecté les cibles l'une après l'autre dans la cuve. À chaque expérience, nous avons utilisé l'une des cibles sauvages ou mutées relatives à chacune des mutations étudiées. Toutes les cibles **1*** à **9***, présentées au tableau 3, ont été testées. La concentration en cibles des solutions utilisées a été fixée à 15.5 μ M. Dans les expériences rapportées dans cette thèse et qui ont pour but d'ouvrir le chemin vers la réalisation d'une puce à ADN basée sur l'imagerie par résonance des plasmons de surface, nous avons choisi de travailler à des concentrations élevées car nous cherchons à détecter une mutation ponctuelle en analysant les variations de réflectivité donc les prises de masse avant et après rinçage. L'étude de la cinétique et des constantes de temps fera l'objet de recherches futures. Des tests ont toutefois été menés pour déterminer la concentration limite permettant d'obtenir une réponse spécifique. Cette étude nous a permis de conclure que nous pouvons diminuer d'un facteur 100 nos concentrations en cible, sans perturber la sélectivité du capteur.

La surface ne réagit pas de façon uniforme au passage d'une cible dans la cuve. Seuls les plots où sont déposés les sondes totalement et partiellement complémentaires à la cible testée, affichent une augmentation de la réflectivité. Ce résultat est visualisé en premier lieu sur une image dite de différence obtenue en soustrayant l'image de la surface avant l'introduction des cibles (c'est à dire avant l'hybridation) de son image après hybridation. Pour augmenter le contraste, cette différence est multipliée par 25. La Figure 61 B illustre la réponse du multicapteur au passage de la cible **4***. Nous observons que cinq groupes de quatre plots se détachent de l'ensemble de la surface. L'emplacement de chacun de ces groupements correspond à la position d'un motif carré où ont été déposées les sondes 3 et 4 respectivement partiellement et totalement complémentaires par rapport à la cible **4*** (Figure 61 A).

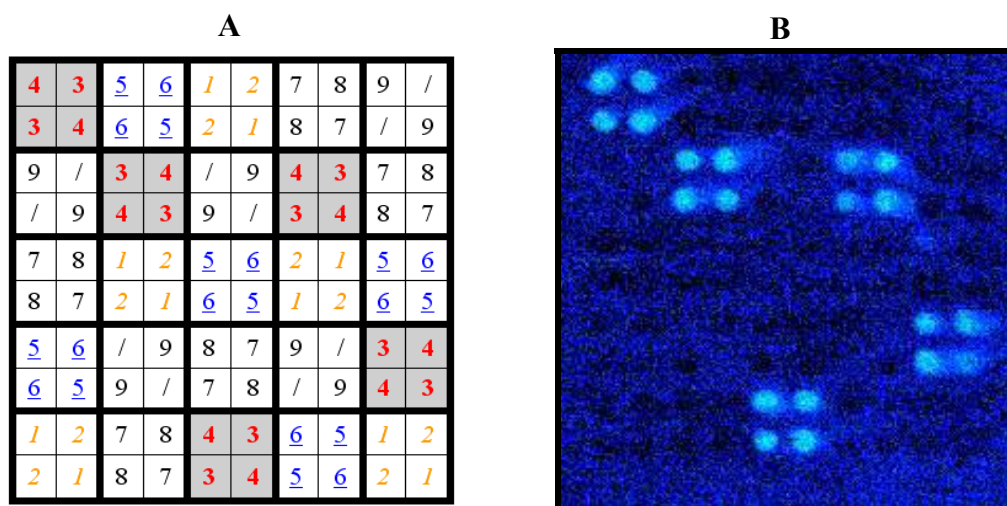


Figure 61: A : Tableau représentant la position des différentes sondes sur la surface. Les cases grisées correspondent aux positions des sondes totalement et partiellement complémentaires à la cible analysée. B : Différence entre l'image de la surface prise avant le passage de la cible 4* et son image après le passage de la même cible. Les cinq carrés lumineux montrent que seuls les plots de sondes totalement et partiellement complémentaires à la cible interagissent avec la solution injectée.

La luminosité est liée à la variation de la réflectivité. L'apparition de plots plus lumineux que d'autres indique que la variation de la réflectivité est plus importante au niveau de ces plots que pour le restant de la surface. Ils ont donc réagi avec la cible de façon spécifique. De plus, comme les plots qui interagissent supportent les sondes totalement ou partiellement complémentaires à la cible injectée, nous déduisons que l'hybridation cible/sonde se déroule uniquement sur les plots relatifs à une même mutation. La réponse du multicapteur est donc spécifique.

Dans le but du diagnostic génétique, nous avons comparé la réponse des sondes partiellement complémentaires à la cible à celle des sondes qui lui sont totalement complémentaires. Pour cela nous avons représenté sur un même graphique les cinétiques des sondes concernées. Un premier résultat est obtenu en comparant l'allure des cinétiques après la superposition des courbes. Cette étude montre que l'augmentation de la réflectivité est plus importante au niveau des sondes totalement complémentaires qu'au niveau des sondes partiellement complémentaires. Nous déduisons alors que la variation de la masse au niveau des plots totalement complémentaires est plus importante que celle observée au niveau des plots partiellement complémentaires. Donc le nombre de cibles hybridées aux sondes complémentaires est plus élevé que le nombre de cibles hybridées aux sondes partiellement complémentaires. L'efficacité de l'hybridation est donc plus importante pour le duplex

cible/sonde totalement complémentaire. Cette propriété est à la base de la sélectivité de notre multicapteur capteur.

Un exemple de courbes superposées est donné à la Figure 62 qui illustre les variations de réflectivité au niveau des plots où sont déposées les sondes : 2 (totalement complémentaires aux cibles), 1 (présentant une délétion par rapport aux cibles) et 3 (non relevantes) lorsque les cibles 2* traversent la cuve.

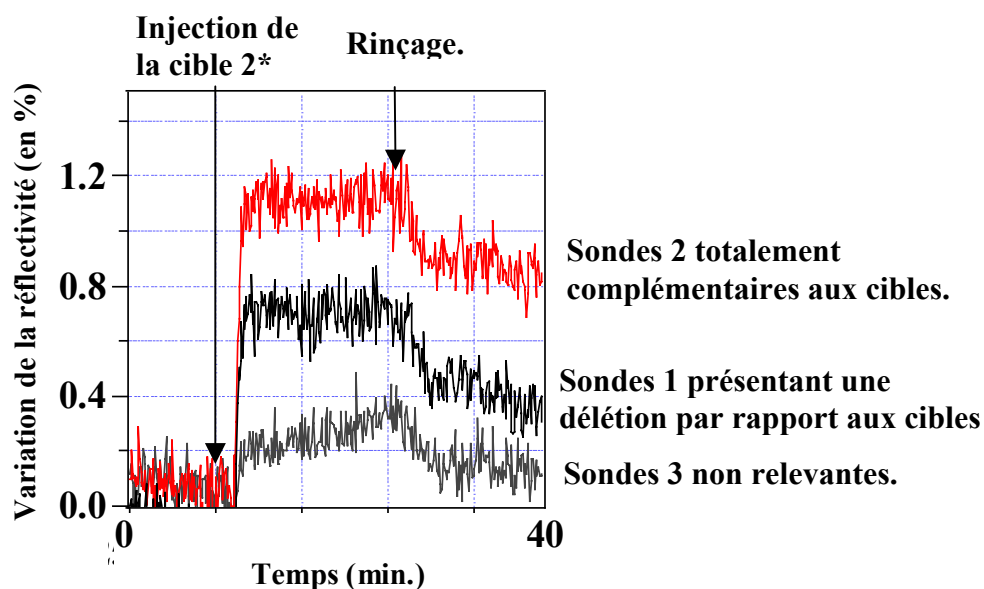


Figure 62: Comparaison entre la réponse des sondes 1, 2 et 3 lors du passage de la cible 2*. Les plots supportant les sondes totalement complémentaires aux cibles (sondes 2) affichent la variation de réflectivité la plus importante. De même, nous remarquons que les sondes sauvages (sondes 1) présentant une délétion par rapport aux cibles réagissent mieux que les sondes non relevantes (sondes 3).

La cinétique qui affiche la plus grande variation de réflectivité correspond aux plots de sondes 2 qui sont totalement complémentaire à la cible. Le plot des sondes 3 (sondes non relevantes) présente la variation de signal la plus faible alors que le plot des sondes 1 (sondes portant une mutation rapport à la cible 2*) possède une variation de réflectivité intermédiaire. Le fait que le maximum de variation de réflectivité soit observé aux endroits de la lame où se forment les doubles hélices parfaitement complémentaires, indique que le multicapteur est sélectif.

Après le passage d'une cible donnée, il reste sur la surface 80 plots capables de réagir. Pour tester leur réactivité, nous avons analysé leur réponse lorsque les cibles sont injectées, dans la cuve, l'une après l'autre. Nous observons alors que les plots réagissent par groupe de

vingt successivement. En représentant les variations de la réflectivité en fonction du temps, nous notons qu'elles révèlent bien l'ordre de passage des cibles. La Figure 63 illustre la réponse du multicateur lors du passage successif des cibles 5*, 2* et 4* respectivement. Les courbes correspondent à quatre plots représentant quatre sondes différentes (5, 2, 4 et 7). La deuxième courbe du bas illustre le comportement de la surface de base.

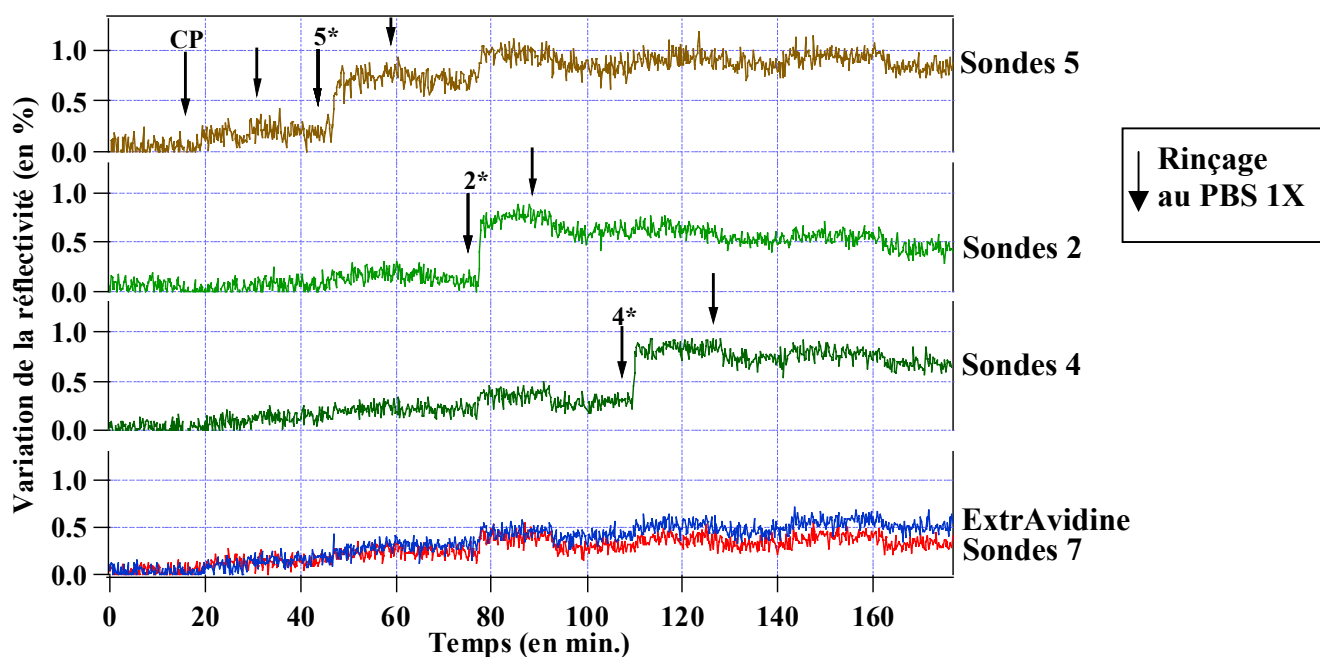


Figure 63: Réponse du multicateur à un envoi séquentiel des cibles 5*, 2*, 4*. Nous avons représenté sur cette figure la réponse de quatre sondes différentes (5, 2, 4, 7) ainsi que celle de la surface de base (MUA/PEI/ExtrAvidine). Pour la clarté de la figure, la cinétique du plot d'ExtrAvidine et celle du plot des sondes 7 ont été superposées à l'origine. Pour la même raison, toutes les cinétiques ont été ramenées au niveau 0 de façon artificielle. Les flèches annotées indiquent les instants où nous avons injecté les différentes cibles sur la surface tandis que les flèches sans annotation indiquent le début du rinçage au PBS 1X.

Comme la réflectivité n'augmente que lors du passage des cibles totalement ou partiellement complémentaires aux sondes, la réponse du multicateur est spécifique.

Les cibles 1*, 3*, 7*, 8*, et 9* ont été testées également. Les résultats obtenus sont conformes aux résultats exposés ci-dessus et confortent la spécificité du multicateur.

Pour mieux analyser l'ensemble des résultats recueillis, nous les avons quantifiés et groupés dans un tableau présenté au paragraphe ci-dessous.

B.3.2.1.1 Quantification des résultats :

Pour quantifier les résultats, nous avons mesuré les variations de la réflectivité après le rinçage de la cible. Cette quantité dR (Figure 64) est proportionnelle à l'augmentation de la masse due à l'hybridation cible/sonde.

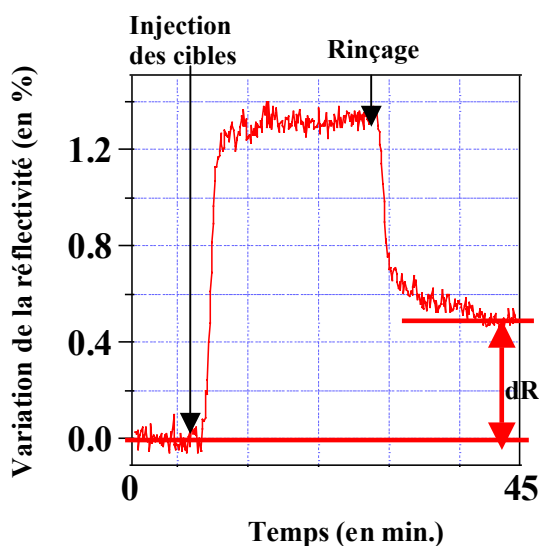


Figure 64: Quantification des résultats. Pour quantifier les résultats, nous avons mesuré la variation de la réflectivité dR après le rinçage de la cible. Cette valeur est proportionnelle au dépôt de masse résultant de l'hybridation cibles/sondes complémentaires.

Pour évaluer la dispersion des résultats obtenus et la sélectivité de la réponse du multicapteur, nous avons étudié, en premier lieu, la variation de réflectivité après rinçage de la cible 2* sur une lame où nous avons déposé cinquante plots de sonde 2 et cinquante plots de sonde 1. Les variations de réflectivité sur chaque groupe de 50 plots ont été reportées sur un histogramme et modélisées par une gaussienne (Figure 65).

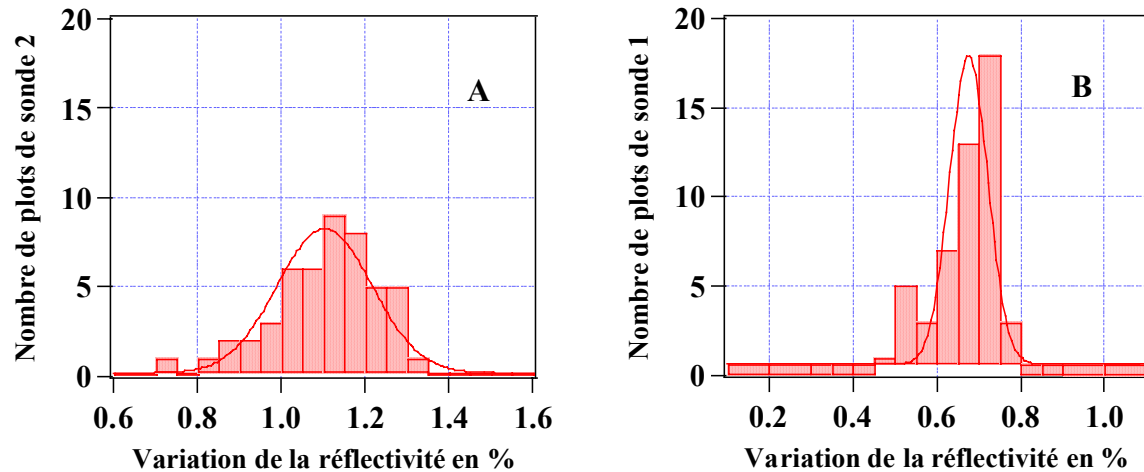


Figure 65: *A : Histogramme représentant la distribution de la variation de la réflectivité pour 50 plots de sondes 2 lors du passage de la cible 2*. Dans ce cas, les cibles et les sondes sont totalement complémentaires. Cette distribution a été modélisée par une gaussienne de largeur à mi-hauteur égale à 0.30 %. B : Histogramme représentant la distribution de la variation de la réflectivité pour 50 plots de sondes 1 lors du passage de la cible 2*. Dans ce cas les sondes et les cibles sont partiellement complémentaires c'est à dire qu'elles sont mutées l'une par rapport à l'autre. Cette distribution a été modélisée par une gaussienne de largeur à mi-hauteur égale à 0.10 %.*

Sur les graphes de la figure ci-dessus, la dispersion des variations de la réflectivité observée pour les duplex totalement complémentaires (cible 2*/ sonde 2) a été modélisée par une gaussienne présentant un maximum pour une variation de réflectivité égale à 1.10 % et de largeur à mi-hauteur égale à 0.30 %. Celle observée pour les duplex partiellement complémentaires (cible 2*/ sonde 1) a été modélisée par une gaussienne présentant un maximum pour une variation de réflectivité égale à 0.68 % et de largeur à mi-hauteur égale à 0.10 %. Nous remarquons que les résultats enregistrés au niveau des plots où se forment les duplex (cible 2*/ sonde 1) présentent une dispersion et une variation de réflectivité qui sont plus faibles que celles des résultats enregistrés au niveau des plots où se forment les duplex (cible 2*/ sonde 2). Pour bien visualiser la différence entre la réponse des deux types de sondes suite à l'injection de la cible 2* dans la cuve, nous avons tracé sur le même graphe les deux courbes gaussiennes obtenues plus haut (Figure 66). Notre barre d'erreur étant de $\pm 0.2\%$, quand la distance entre les deux pics est supérieure à 0.2%, nous pouvons séparer sans ambiguïté la réponse des sondes totalement complémentaires aux cibles de celle des sondes qui leur sont partiellement complémentaires.

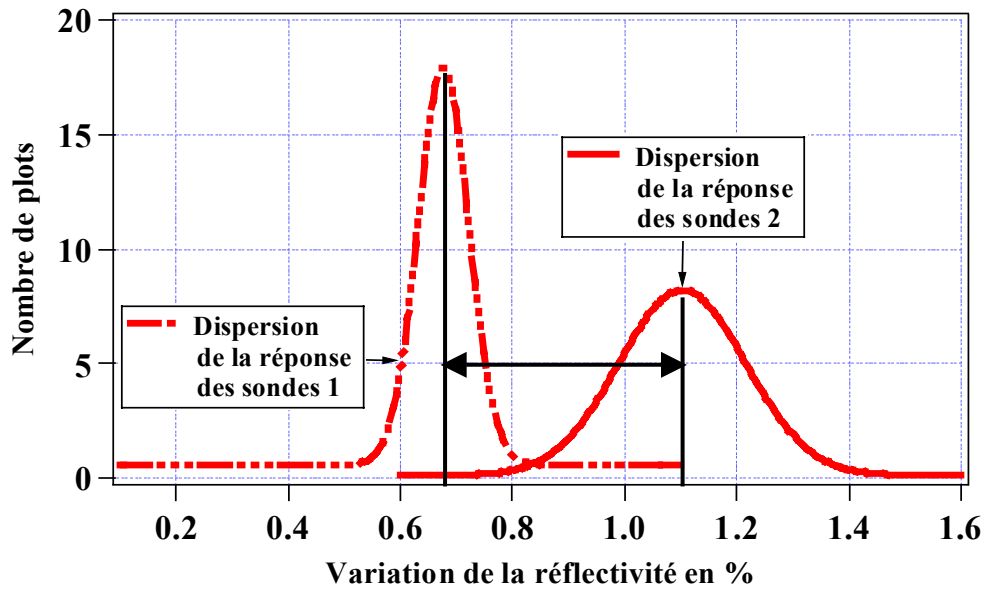


Figure 66: Représentation des gaussiennes que nous avons utilisé pour modéliser la réponse des sondes 1 et 2 après l'injection des cibles 2* dans la cuve. La distance entre les deux pics (0.48%) est supérieure à 0.2 %. Nous pouvons dire que les sondes 1 et 2 ont des réponses distinctes.

Le graphe ci-dessus montre que, pour les séquences sondes 1 et 2 qui représentent la délétion, les deux gaussiennes sont suffisamment séparées : la distance entre les deux maximums ($1.10\% - 0.68\% = 0.48\%$) est supérieure à 0.2%. La réponse optique du multicapteur, après le passage de la cible 2*, est non ambiguë. Nous pouvons alors conclure que notre système est sélectif pour cette séquence.

Nous nous sommes aussi intéressés à la dispersion observée au niveau des plots où sont déposées les sonde 3 et 4 représentant la substitution M470V, lors du passage des cibles 3*. Pour cela nous avons étudié la dispersion de la variation de réflectivité sur une surface portant cinquante plots de sondes 3 et cinquante plots de sonde 4. De même, les résultats obtenus ont été représentés sous forme d'histogrammes et modélisés par deux gaussiennes. La gaussienne représentant la réponse des plots de sondes 3 totalement complémentaires à la cible possède un maximum pour une variation de réflectivité égale à 1.17 % et une largeur à mi-hauteur égale à 0.30% (Figure 67 A). La gaussienne modélisant la réponse des plots de sonde 4 partiellement complémentaire à la cible présente, quant à elle, un maximum pour une variation de réflectivité égale à 1.02 % et une largeur à mi-hauteur de 0.30 % (Figure 67 B).

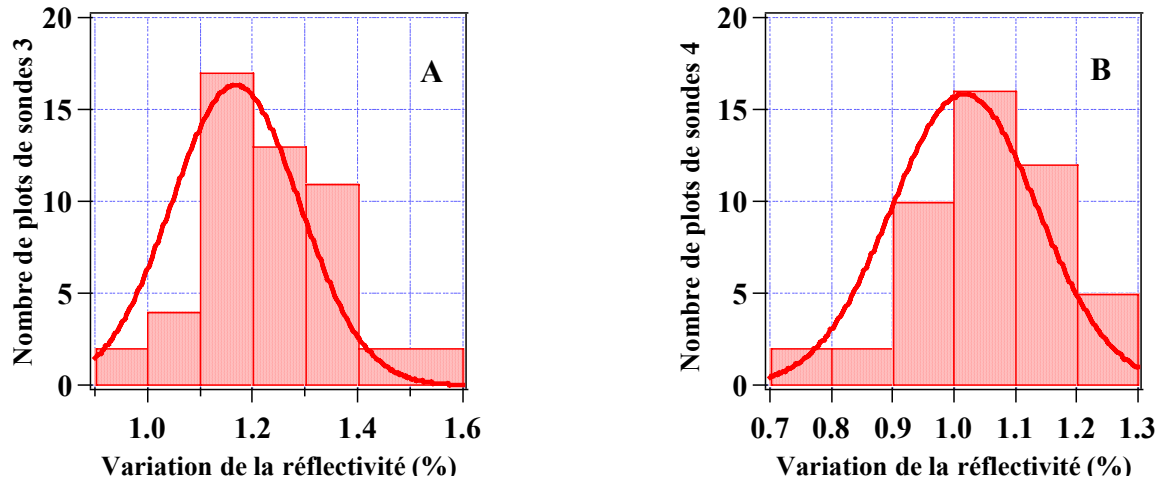


Figure 67: *A : Histogramme représentant la distribution de la variation de la réflectivité pour 50 plots de sondes 3 lors du passage de la cible 3*. Dans ce cas les cibles et les sondes sont totalement complémentaires. Cette distribution a été modélisée par une gaussienne de largeur à mi-hauteur égale à 0.30 %. B : Histogramme représentant la distribution de la variation de la réflectivité pour 50 plots de sondes 4 lors du passage de la cible 3*. Dans ce cas les sondes et les cibles sont partiellement. Cette distribution a été modélisée par une gaussienne de largeur à mi-hauteur égale à 0.30 %.*

Nous avons représenté ces deux courbes de modélisation qui ont la même largeur à mi-hauteur sur un même graphique (Figure 68) afin d'évaluer la sélectivité du multicapteur quand les séquences analysées diffèrent d'une seule base.

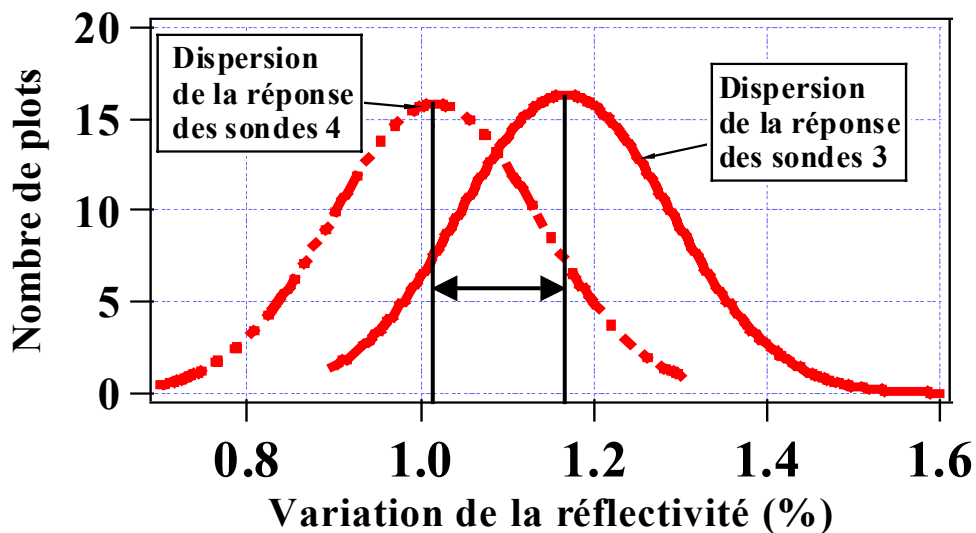


Figure 68: *Représentation des gaussiennes que nous avons utilisées pour modéliser la réponse des sondes 3 et 4 après l'injection des cibles 3* dans la cuve. La distance entre les deux pics de ces gaussiennes (0.15 %) est inférieure à $\pm 0.2\%$. Nous pouvons dire qu'il est difficile de séparer les réponses des sondes 3 et 4.*

La figure ci-dessus montre que, pour la substitution, les deux gaussiennes se chevauchent et que la distance entre les deux maximums (à 0.15%) est inférieure à 0.2%. Les réponses des sondes 3 et 4 après leur hybridation aux cibles **3*** ne sont pas identiques mais il est difficile de les différencier sans ambiguïté à cause de la dispersion des résultats. En d'autres termes, la réponse optique de notre multicapteur, après le passage de la cible **3***, est à la limite de la sélectivité.

Vous retrouverez les résultats concernant la sélectivité du système optique dans les paragraphes suivant.

D'autre part nous pouvons aussi conclure de cette étude que pour les cibles qui font une vingtaine de bases et qui ont une masse molaire voisine de 6000 Daltons, nous observons, après rinçage, une augmentation maximale de la réflectivité (dR) de 1.10% avec un écart type de 0.15% autour de cette valeur (Figure 65A).

Une telle dispersion des résultats est souvent citée dans la littérature [174] et, d'après Peterson et al. [175], elle est essentiellement due à une fluctuation de la densité de sondes d'un plot à l'autre. Il est difficile, dans l'état actuel de nos connaissances, de déterminer à quels paramètres sont dues ces inhomogénéités.

Quelle que soit la variation de la réflectivité enregistrée à la suite des hybridations ADN/ADN, notre barre d'erreur sera estimée à ± 0.2 % pour tenir compte de la dispersion des résultats au cours d'une même expérience et des fluctuations observées d'une expérience à l'autre.

Les quantités dR ont été mesurées pour chacun des plots. Puis nous avons calculé la variation de réflectivité moyenne pour les 10 plots représentant une même séquence sonde. Les valeurs ainsi obtenues ont ensuite été normalisées en prenant comme référence, la réponse moyennée sur les 10 plots de sonde 7. Les sondes 7 ont été choisies comme référence car elles correspondent à l'unique séquence localisée sur l'exon 17 du gène CFTR, exon sur lequel nous ne recherchons aucune mutation. Elle représente l'unique séquence non relevante pour toutes nos applications futures notamment pour l'étude de produits issus de patients. La formule de normalisation est : $\frac{dR_{sonde}-dR_7}{dR_{max}-dR_7}$ (Eq. 15) où dR_{sonde} est la variation de réflectivité moyenne pour un type de sondes donné, dR₇ la variation de réflectivité moyenne pour les sondes 7, dR_{max} la variation de réflectivité moyenne maximale observée après le passage de

chaque cible. Les valeurs ainsi obtenues sont comprises entre 0 et 1. Le rapport maximal “1” doit correspondre aux plots où se forment des duplex parfaitement complémentaires, le rapport minimal proche de “0” est lié à une absence d’hybridation tandis que les rapports intermédiaires doivent correspondre aux plots où se forment des duplex partiellement complémentaires avec une mutation au centre. Plus la valeur intermédiaire est faible, plus il sera facile de déterminer la séquence présente en solution et plus le diagnostic clinique sera fiable.

	Délétion de 3 bases (ΔF508)		Substitution A→G (1540A/G)		Substitution G→A (1716G/A)							
Cibles, Sondes	1	2	3	4	5	6	7	8	9			
1*	1	0.7	$ \alpha \leq 0.2$				0	$ \alpha \leq 0.2$				
2*	0.7	1										
3*			1	0.85								
4*			0.85	1								
5*					1	0.85						
6*					0.85	1						

Tableau 4: Normalisation de la réponse du capteur. Ce tableau illustre la réponse du multicapteur lors du passage des cibles 1* à 6*. Il montre qu’une cible interagit de façon préférentielle avec la sonde qui lui est complémentaire. La réponse de la sonde mutée est plus faible tandis que celle de toutes les sondes restantes est noyée dans le bruit. Dans le cas de la délétion, les réponses des sondes totalement et partiellement complémentaires aux cibles sont distinctes, alors que dans le cas de la substitution il est difficile de conclure. La symétrie de ce tableau est valable dans la limite de l’erreur estimée à 0.2.

Dans ce tableau, α est la variation moyenne de la réflectivité normalisée d’après la formule (Eq.8) et l’erreur estimée vaut ± 0.2 . Nous remarquons que la valeur 1 est localisée sur la diagonale correspondant à la sonde totalement complémentaire de la cible. La sonde mutée affiche la valeur légèrement inférieure et puis le reste de la surface présente une variation de la réflectivité normalisée très faible (aux alentours de 0.2). Une cible n’est donc reconnue que par sa sonde complémentaire et sa sonde mutée. Le capteur ainsi formé est spécifique.

A l'intérieur du couple (sonde sauvage, sonde mutée) la variation de réflectivité en valeur normalisée est toujours maximale pour les sondes totalement complémentaires aux cibles. Ce fait nous permet de connaître l'espèce présente dans la solution ce qui prouve que le capteur est spécifique. Dans le cas de la délétion qui est une mutation à effet déstabilisant très important, la discrimination est facilement observable (1 et 0.7). En effet il s'agit de comparer une hybridation entre 20 bases complémentaires pour les duplex (1*, 1) et (2*, 2) et 13 bases complémentaires pour les duplex (1*, 2) et (2*, 1). Dans le cas des substitutions, le déséquilibre des réponses est peu prononcé (1 et 0.85). Cette faible différence, a été démontrée par Feriotto et al. pour des cibles de plus de 17 bases s'hybridant avec des sondes de 20 bases avec une mutation au centre [176]. Il faut noter que les valeurs normalisées représentées dans le tableau pour la réponse du couple (sonde sauvage, sonde mutée) sont symétriques dans la marge d'erreur définie. En effet cette symétrie n'est pas tout à fait vraie. Une étude plus approfondie de l'hybridation entre les cibles et leur sondes complémentaires et mutées est présenté dans la deuxième partie de ce chapitre.

B.3.2.2 Passage d'un mélange contenant plusieurs séquences :

La deuxième étape consiste à étudier la réponse de la surface suite au passage d'un mélange de cibles. Nous avons ainsi testé plusieurs mélanges pour simuler soit des patients homozygotes, soit des patients hétérozygotes. Quand le mélange simulait un patient homozygote, la concentration de chacune des cibles présentes dans le mélange était de 15.5 μM comme précédemment. Par contre, quand il simulait un patient hétérozygote, la concentration des cibles sauvages et mutées était de 7.5 μM , les autres composantes du mélange étant toujours à 15.5 μM .

Nous avons ainsi étudié le cas :

- d'un mélange homozygote sauvage pour les trois mutations (mélange 1*, 3*, 5*),
- d'un mélange homozygote muté pour la délétion ΔF508 et sauvage pour les deux autres substitutions (mélange 2*, 3*, 5*),
- d'un mélange hétérozygote pour la délétion ΔF508 et homozygote sauvage pour les deux autres substitutions (mélange 1*, 2*, 3*, 5*),
- d'un mélange homozygote muté pour la substitution 1540A/G et sauvage pour les autres mutations (mélange 1*, 4*, 5*)
- ainsi que le cas d'un mélange hétérozygote pour la substitution 1540 A/G et homozygote sauvage pour les deux autres mutations (mélange 1*, 3*, 4*, 5*).

Dans une première approche, nous visualisons la différence d'image observée après le passage du mélange testé. Les sondes qui doivent réagir sont les sondes 1 à 6, correspondant aux séquences sauvages et mutées par rapport aux cibles présentes en solution. Nous devons donc observer, sur la différence d'image, 60 plots lumineux dont la position coïncide avec la position des sondes 1 à 6. La surface de base ainsi que les plots des sondes 7 à 9 ne sont pas supposés réagir et doivent donc afficher une variation de réflectivité correspondant au bruit de fond. La Figure 69 illustre ce phénomène et montre que l'utilisation d'un mélange n'affecte pas la spécificité du multicapteur.

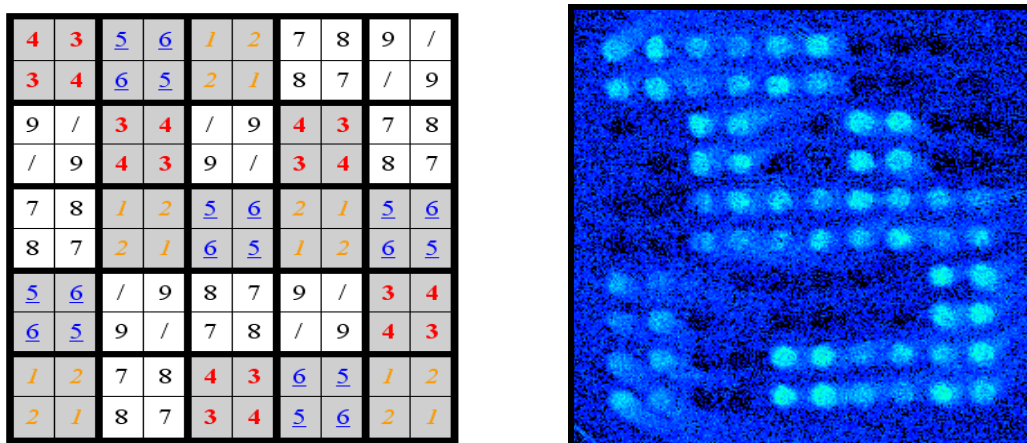


Figure 69: Cette figure met en parallèle la distribution des sondes avec l'image différence obtenue en soustrayant la photo de la surface après le rinçage des cibles de son image avant leur injection. Le mélange (2*, 3*, 5*) injecté simule un patient homozygote muté pour la délétion $\Delta F508$. Les plots de sondes 1 à 6, sur fond gris dans la grille, réagissent avec les cibles et la réflectivité augmente au niveau de chacun d'eux. Ce que nous visualisons sur l'image différence où nous pouvons aussi comparer visuellement les diagonales d'un même carré de quatre plots. Les plots de sondes 7 à 9 ainsi que la surface de base ne réagissent pas avec le mélange. La réflectivité au niveau de ces plots traduit le bruit de fond.

Sur la figure ci-dessus, les sondes 7 à 9 jouant le rôle de contrôle négatif ainsi que la surface de base, ne réagissent pas aux différentes composantes du mélange. Les plots les plus lumineux correspondent aux positions des plots de sondes 1 à 6 complémentaires aux cibles présentes dans le mélange injecté sur la surface.

Les résultats obtenus pour les différents mélanges ont été normalisés de la même manière que précédemment. Ils ont été représentés à la Figure 70.

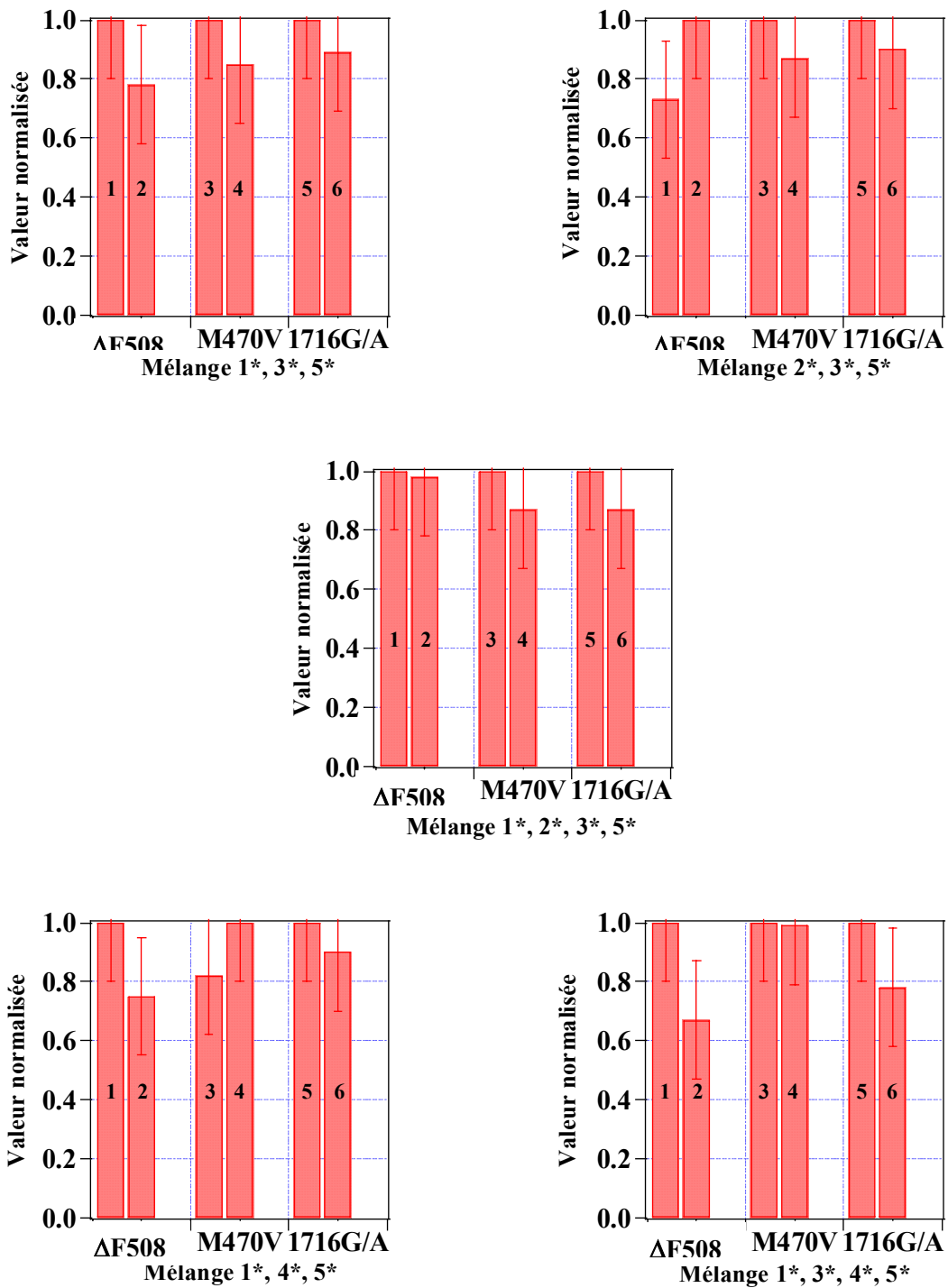


Figure 70 Réponse normalisée du multicapteur obtenue après le passage dans la cuve des différents mélanges testés. La réponse des sondes 1 à 5 dépend des cibles injectées. Elle permet de reconnaître la composition du mélange et atteste de la spécificité du multicapteur.

En considérant chaque couple de sonde (1b, 2b), (3b, 4b), (5b, 6b) comme une balance, nous remarquons que cette balance est déséquilibrée quand une seule des séquences complémentaires circule dans la cuve. Ce déséquilibre est très net quand il s'agit d'une

délétion. Cependant, pour une mutation ponctuelle, le déséquilibre de la balance est faible et il reste dans la limite de l'erreur (± 0.2). Il sera optimisé dans la partie suivante.

Récapitulatif :

Dans cette partie, nous avons réalisé un capteur multiparamétrique capable de suivre en parallèle et en temps réel une centaine d'hybridation ADN/ADN. Les séquences analysées sont relatives à trois mutations différentes mises en cause dans la maladie de la mucoviscidose. Il s'agit de la délétion de trois bases $\Delta F508$ et de deux substitutions. Les cibles ont été analysées de deux façons différentes.

En premier lieu, elles ont été injectées dans la cuve l'une après l'autre. Ce passage séquentiel nous a permis de valider la spécificité de notre surface. En effet, quand des cibles sont injectées, elles interagissent avec les sondes qui leur sont totalement ou partiellement complémentaires. La réponse des autres sondes ne dépasse pas la valeur du bruit. De plus les signaux mesurés au niveau des plots de sondes totalement complémentaires sont supérieurs aux signaux mesurés au niveau des plots de sondes partiellement complémentaires. Ce phénomène traduit la spécificité du multicapteur.

En deuxième lieu, les cibles ont été envoyées sur la surface en mélange afin d'analyser la réponse du système lors de l'utilisation des solutions d'ADN simulant différents patients. Ces tests nous ont montré que le passage d'un mélange n'affectait pas la spécificité du multicapteur. La quantification de nos résultats nous a permis de détecter sans ambiguïté la délétion $\Delta F508$. En effet, nous sommes capables de dire si le mélange testé correspond à la simulation d'un patient homozygote sauvage ou homozygote muté ou même hétérozygote pour cette mutation. Pour la substitution, la discrimination est plus difficile car les sondes totalement et partiellement complémentaires aux cibles présentes dans le mélange, ont des réponses très voisines que notre barre d'erreur ne permet pas de séparer clairement. Les résultats pour ce type de mutation sont ambigus. Or, les mutations de la mucoviscidose sont en majorité des substitutions. Nous avons alors cherché à améliorer la sélectivité du multicapteur pour une substitution, afin d'être à même d'établir un diagnostic génétique non ambigu. Les travaux de Giordani Feriotto sur l'effet de la longueur des cibles sur la réponse d'un capteur Biacore [176] nous ont poussés à étudier l'hybridation pour différentes longueurs de sondes et de cibles.

C Optimisation de la discrimination pour une substitution :

Dans cette partie, nous cherchons à améliorer la sélectivité de notre multicapteur en faisant varier la longueur des cibles et des sondes. Les résultats obtenus ont d'abord été analysés en fonction de la longueur des oligonucléotides étudiés. Cependant cette étude s'est révélée insuffisante pour expliquer le comportement de toutes les séquences. C'est pourquoi, après avoir défini la température de fusion d'un double brin d'ADN, nous avons représenté les signaux mesurés en fonction de ce dernier paramètre qui caractérise la stabilité des duplex. Ainsi, nous avons pu modéliser la variation de la réflectivité du multicapteur en fonction de la température de fusion et comprendre pourquoi toutes les cibles ne réagissent pas de la même façon.

C.1 Choix des mutations et conception des sondes :

Pour cette étude, nous nous sommes limités à deux types de mutation : la délétion $\Delta F508$ et la substitution M470V (1540 A/G). Nous avons gardé la délétion car c'est une mutation facile à détecter. Le choix de la substitution a été motivé par la difficulté que nous avons à détecter les mésappariements. Chaque mutation a été représentée par sa séquence sauvage et sa séquence mutée.

Comme dans la partie précédente, les sondes représentent une séquence spécifique du gène et sont biotinylées en leur extrémité 5'. De plus, elles ont été conçues de façon à garder la mutation au centre de la séquence et à une distance constante par rapport à la surface. Pour ce faire, la longueur du bras espaceur poly T a été ajustée entre 5 et 20 bases. Ainsi, sans tenir compte du bras espaceur, les longueurs des sondes choisies se répartissent comme suit : 8, 9, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 29 et 39 bases. Les sondes de 10 bases n'ont pas été commandées car elles sont identiques aux sondes de 11 bases. Cette identité est due au choix de l'espaceur poly T et au fait que la séquence de 11 bases possède aussi une thymine (T) à son extrémité 5'. La Figure 71 illustre la conception d'une sonde de 9 bases.

Nous recensons donc quatre groupes différents de sondes : les deux groupes de sondes sauvages et mutées représentant la délétion ainsi que les deux groupes de sondes sauvages et

mutées représentant la substitution. Chacun de ces groupes contient 10 séquences de longueurs différentes. En tout, nous avons défini 40 sondes distinctes auxquelles nous avons ajouté une sonde non pertinente située sur l'exon 17 : c'est la sonde 7 utilisée dans le paragraphe précédent.

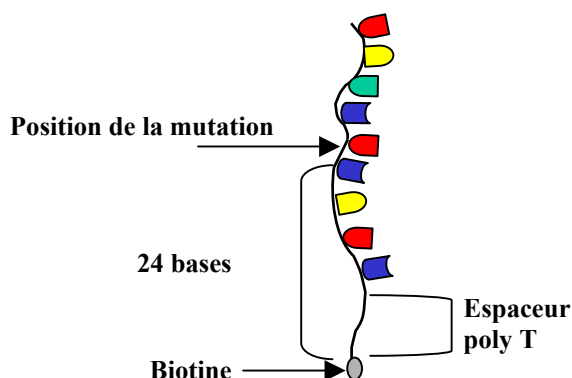


Figure 71: Conception d'une sonde de 9 bases. La longueur de l'espaceur poly T est de 20 bases. La mutation se trouve à 24 bases de la biotine.

Les cibles correspondent à la séquence complémentaire des sondes définies et forment aussi quatre groupes différents : les deux groupes de cibles sauvages (1*) et mutées (2*) relatifs à la délétion ainsi que les deux groupes de cibles sauvages (3*) et mutées (4*) relatifs à la substitution. Chacun de ces groupes contient 11 séquences de longueur différente (8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19, 29 et 39 bases). Ainsi, nous avons au total un lot de 44 cibles. La liste de ces oligonucléotides est donnée dans l'Annexe 10.

La distribution des sondes se fait dans le même esprit que précédemment : la matrice est formée de carrés élémentaires. A chaque carré nous avons attribué une longueur et une

38	28
28	38

mutation donnée. Par exemple, dans le carré nous avons déposé les sondes sauvages et mutées relatives à la substitution M470V. La longueur de ces oligonucléotides est de 11 bases (sans l'espaceur) et est donnée par le chiffre des unités (dans ce cas précis, c'est 8). La séquence déposée est indiquée par le chiffre des dizaines. Dans l'exemple le chiffre 2 désigne la sonde sauvage tandis que le chiffre 3 désigne la sonde mutée. La sonde sauvage de 11 bases (28) occupe l'une des diagonales tandis que la sonde mutée de 11 bases (38) occupe la deuxième. Les correspondances entre les longueurs et les chiffres des unités ainsi que les correspondances entre le chiffre des dizaines et la séquence sonde sont

données par la Figure 72 B. Des plots sans sondes représentés par le signe / permettent de contrôler la surface de base. Des plots de sondes 7 (cf. tableau 3), indiqués comme Non Relevant (NR), permettent d'évaluer les interactions non spécifiques et les sauts d'indices induits par la différence d'indice entre les solutions utilisées. La disposition en carré est motivée par la possibilité d'une analyse qualitative "à l'œil" en temps réel de la réponse du multicapteur. La répartition des 41 sondes sur la surface est illustrée à la Figure 72 A.

A

NR	NR	38	28	05	15	31	21	01	11	37	27	04	14
NR	NR	28	38	15	05	21	31	11	01	27	37	14	04
27	37	08	18	25	35	12	02	30	40	07	17	23	33
37	27	18	08	35	25	02	12	40	30	17	07	33	23
07	17	39	29	/	NR	32	22	10	20	36	26	03	13
17	07	29	39	/	NR	22	32	20	10	26	36	13	03
28	38	19	09	27	37	13	03	29	39	06	16	22	32
38	28	09	19	37	27	03	13	39	29	16	06	32	22
08	18	/	/	07	17	33	23	09	19	/	/	02	12
18	08	28	38	17	07	23	33	19	09	/	/	12	02
30	40	10	20	26	36	14	04	28	38	05	15	21	31
40	30	20	10	36	26	04	14	38	28	15	05	31	21
/	/	34	24	06	16	34	24	08	18	35	25	01	11
18	08	24	34	16	06	24	34	18	08	25	35	11	01

B

Avec :

X1 ↔ 39 Bases,

X2 ↔ 29 Bases,

X3 ↔ 19 Bases,

X4 ↔ 17 Bases,

X5 ↔ 15 Bases.

X6 ↔ 13 Bases

X7 ↔ 12 Bases

X8 ↔ 11 Bases

X9 ↔ 9 Bases

(X+1)0 ↔ 8 Bases

Et X=0, 1, 2, 3, tel que

0 ↔ séquence 1 biot ΔF508N.

1 ↔ séquence 2 biot ΔF508M.

2 ↔ séquence 3 biot 470 M.

3 ↔ séquence 4 biot 470 V.

NR ↔ Non Relevant.(sondes 7 tableau 3)

Figure 72: Distribution des 41 sondes sur la surface d'or couverte de MUA-PEI-ExtraAvidine. A chaque motif carré nous attribuons une longueur déterminée par le chiffre des unités et une mutation déterminée par le chiffre des dizaines.

Toutes les sondes de même longueur ont été déposées quatre fois sur la surface, c'est-à-dire sur quatre plots différents, à l'exception des sondes de 12 bases auxquelles nous avons consacré sept plots et des sondes de 11 bases auxquelles nous avons attribué six plots. De même, nous avons disposé six plots de sondes non relevantes.

Les 41 sondes ont ainsi été réparties dans une matrice de 196 plots, de 200 µm de diamètre chacun et distants de 300 µm de centre à centre. La matrice est inscrite dans un carré de 4x4 mm² comme dans la partie précédente. Une image de ces plots prise en air sur le montage d'imagerie par résonance des plasmons de surface est donnée par la Figure 73.

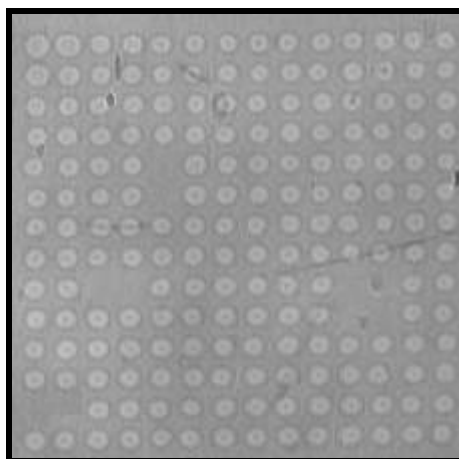


Figure 73: Photo de la matrice 196 plots en air, enregistrée par le montage d'imagerie par résonance des plasmons de surface. La distribution des séquences est conforme à celle présentée à la Figure 72.

C.2 Protocole expérimental et analyse des résultats :

Les expériences suivent le même déroulement décrit dans la partie précédente (paragraphe B.3.1). Nous couplons d'abord la lame au prisme, ensuite, nous photographions la surface en air. A cette étape, nous sélectionnons les plots et enregistrons leur position. Puis, nous injectons le tampon PBS 1X dans la cuve et enregistrons les courbes de réflectivité pour chacun des 196 plots. Nous déterminons ainsi l'angle de travail auquel nous fixons le miroir tournant. C'est à cet angle que nous suivrons les cinétiques d'interactions cibles/sondes. La solution de CP est injectée alors dans la cuve pour neutraliser les charges positives restantes du PEI.

Comme précédemment, les expériences d'hybridation sont menées à température ambiante ($23.7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) avec un tampon PBS 1X (soit 137 mM en NaCl, pH 7.4), contenant les cibles à $15.5 \mu\text{M}$.

Différentes longueurs des cibles **1***, **2***, **3*** et **4*** de (Annexe 10) ont été testées. Les cinétiques obtenues sont résumées dans les quatre tableaux suivants où les lignes horizontales représentent les différentes longueurs de cibles et les colonnes les différentes longueurs de sondes. Dans chaque case, les variations de la réflectivité sont représentées en fonction du temps pour tous les plots de sondes complémentaires (courbes rouges) et tous les plots de sondes mutées (courbes noires) par rapport aux cibles présentes dans la solution analysée. Chaque colonne résume une expérience.

L'ensemble de ces tableaux illustre la grande quantité de résultats obtenus et permet de donner une première idée sur le comportement des oligonucléotides cibles et sondes en fonction de leur longueur. Dans les tableaux 5 et 8, les cinétiques sont représentées en pleine échelle afin de mettre en évidence la différence du comportement des sondes complémentaires et mutées. C'est pourquoi tous les graphes de ces deux tableaux ne sont pas à la même échelle. Par contre, dans les graphes des tableaux 6 et 7, toutes les cinétiques sont à la même échelle (2.2 % en ordonnée et 50 minutes en abscisse) et nous pouvons comparer les graphes entre eux. Le temps de passage des cibles dans la cuve, en d'autres termes la durée des interactions cibles/sondes, correspond toujours à 15 minutes. La variation de réflectivité maximale observée est de 2.2%. Elle correspond aux cibles de 39 bases.

Tableau 5 : Hybridation de la cible **1*** de différentes longueurs avec les sondes 1 biot $\Delta F508S$ et 2 biot $\Delta F508M$. (1 colonne= 1 expérience)
(pleine échelle)

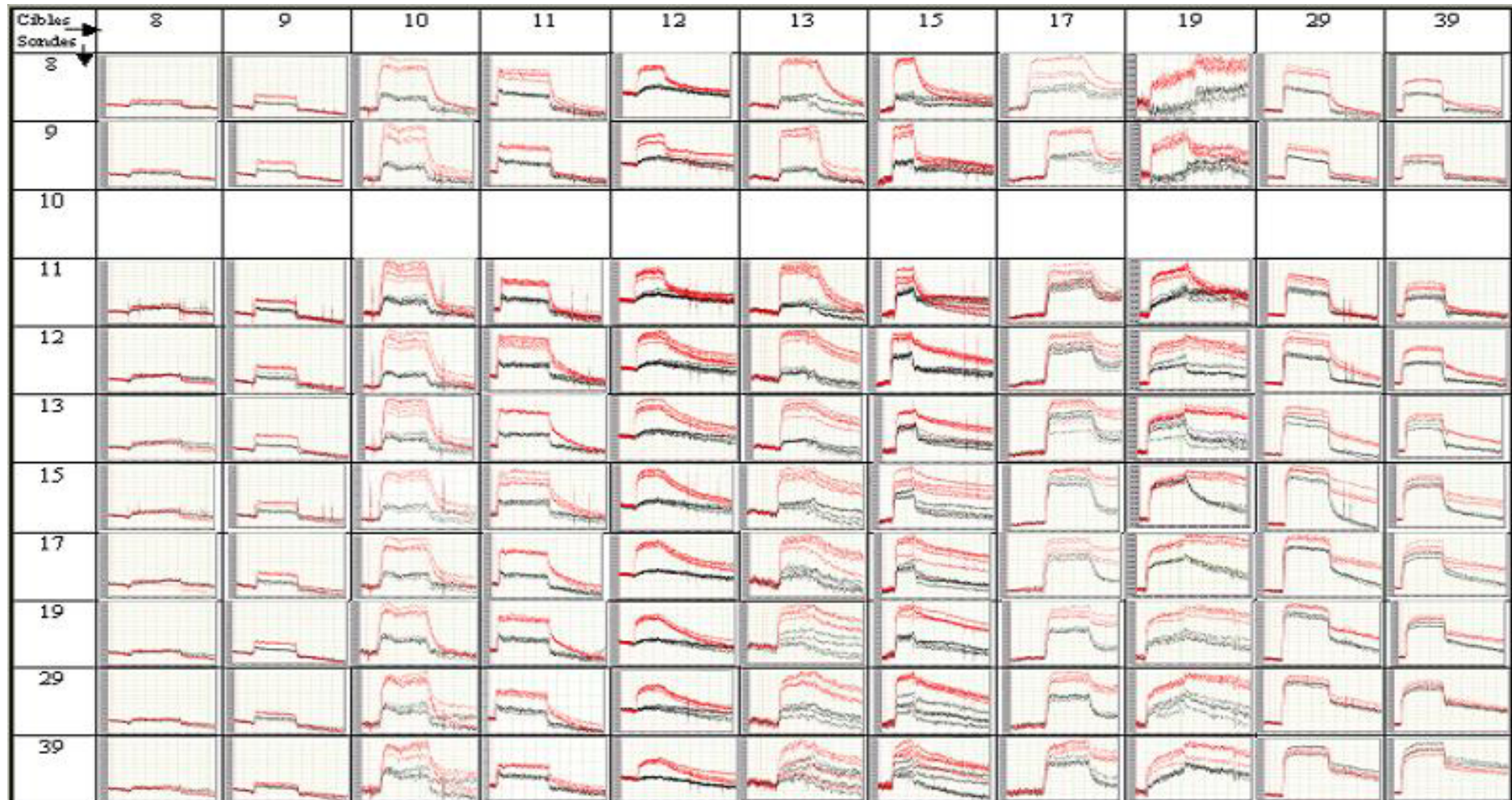


Tableau 6: Hybridation de la cible 2* de différentes longueurs avec les sondes 1 biot $\Delta F508S$ et 2 biot $\Delta F508M$. (1 colonne= 1 expérience)
(même échelle)

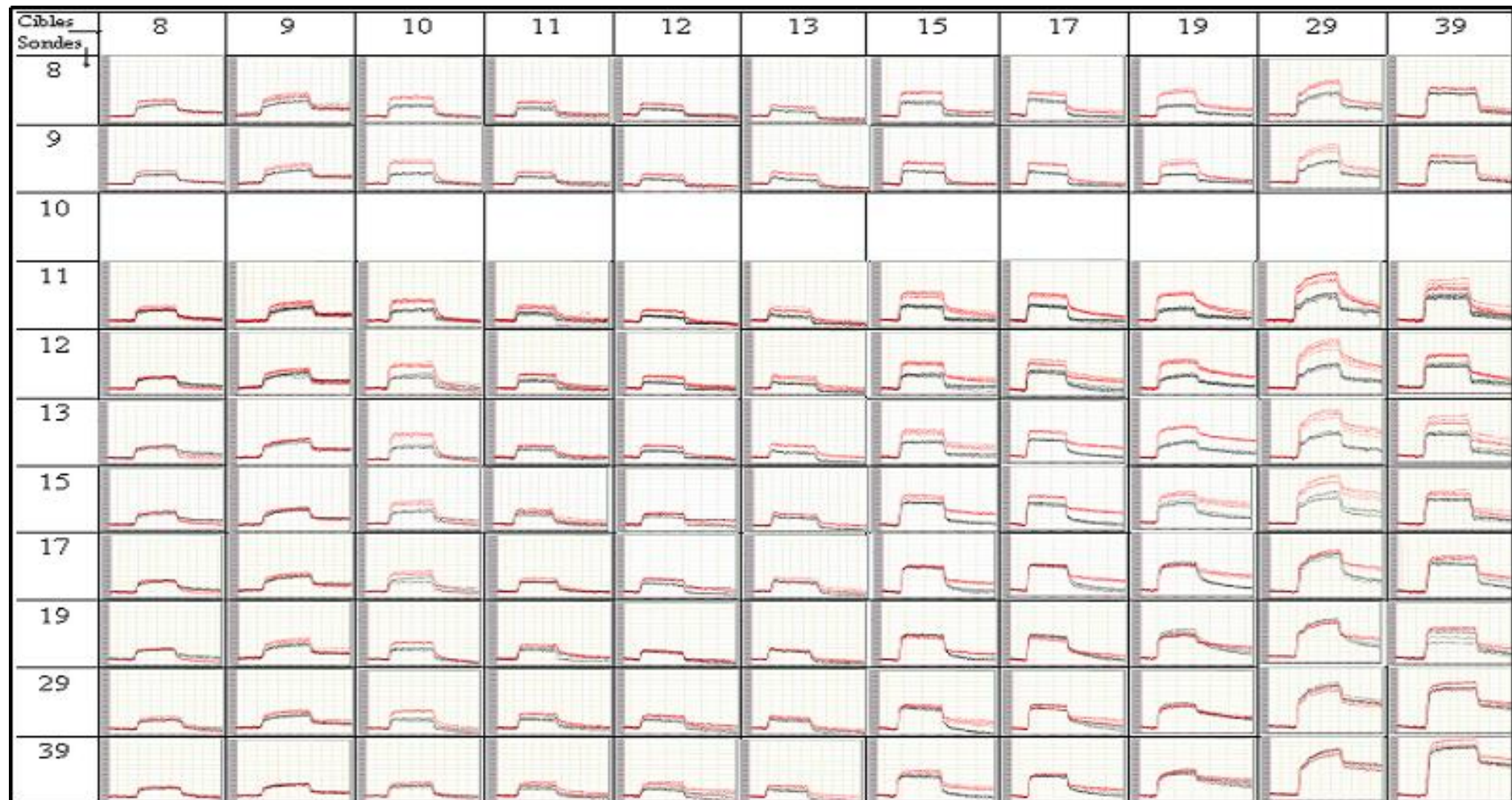


Tableau 7: Hybridation de la cible 3* de différentes longueurs avec les sondes 3 biot 470M et 4 biot 470V . (1 colonne= 1 expérience)
(même échelle)

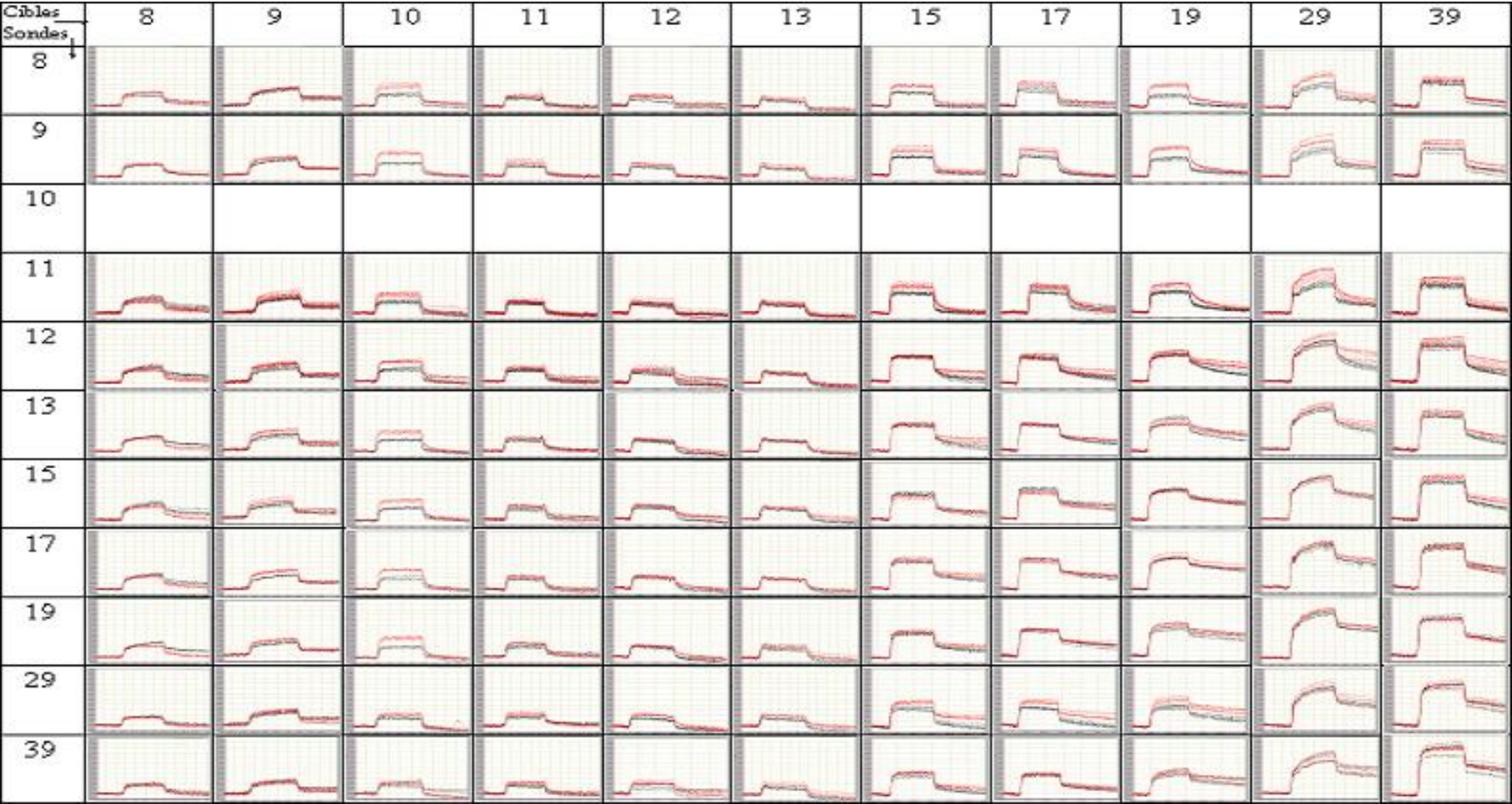
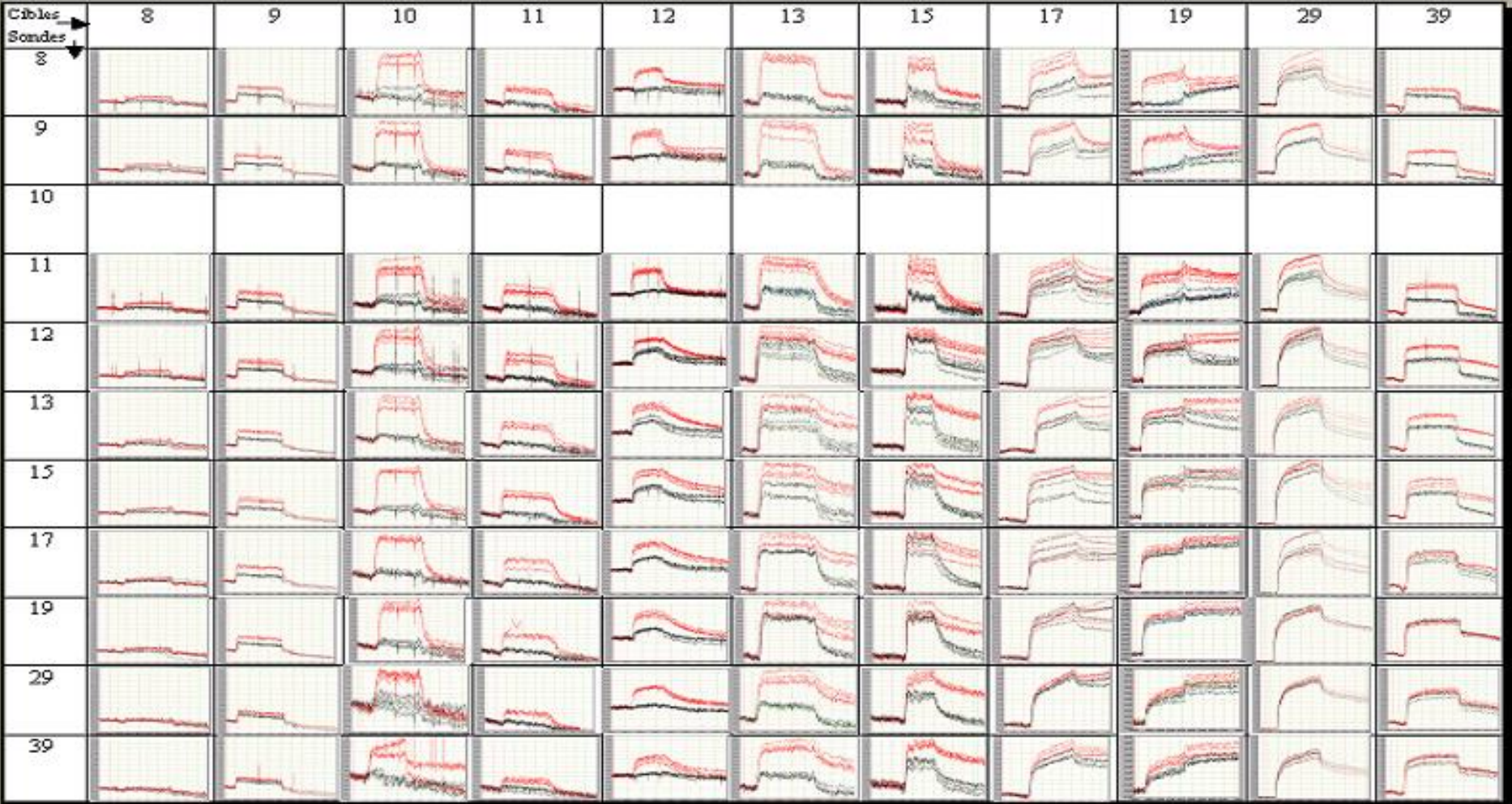


Tableau 8: Hybridation de la cible 4* de différentes longueurs avec les sondes 3 biot 470M et 4 biot 470V . (1 colonne= 1 expérience)
(pleine échelle)



Deux constantes sont observées dans tous les tableaux :

- la faiblesse du signal pour les cibles et les sondes de courte longueur (8 bases)
- et la difficulté que nous avons à différencier les courbes rouges des courbes noires dans les régions où les sondes et les cibles sont longues (29 et 39 bases).

Un exemple de ces cinétiques est donné dans la figure ci-dessous pour les double-brins de 8 et de 29 bases représentant la délétion $\Delta F508$.

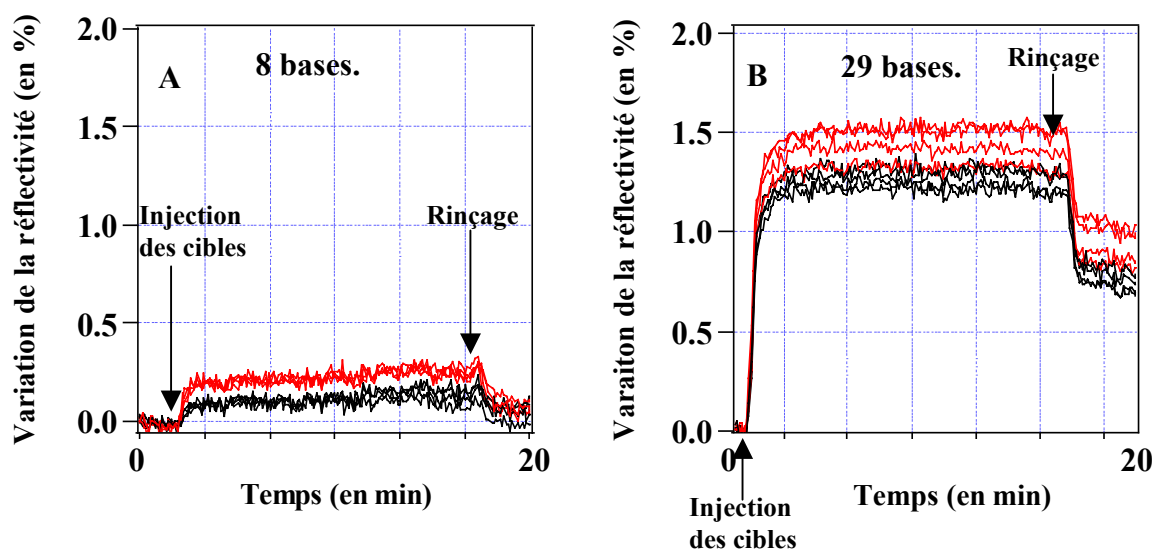


Figure 74: Exemple de cinétiques obtenues lors du passage des cibles relatives à la séquence sauvage de la délétion $\Delta F508$ pour des longueurs identiques de sondes et de cibles. Le graphe A illustre la réponse des sondes de courte longueur (8 bases) et le graphe B illustre la réponse de celles de grande longueur (29 bases). Sur chacun des graphes le groupe de courbes en rouge, correspond au cas de duplex parfaitement complémentaires, le groupe de courbes en noire aux duplex partiellement complémentaires. Pour les grandes longueurs, nous avons estimé que la séparation des deux groupes de courbes n'est pas suffisante pour une bonne discrimination.

Pour la délétion (cibles 1* et 2*), les cinétiques obtenues pour des longueurs de sondes et de cibles comprises entre 10 et 19 bases montrent que la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes totalement complémentaires aux cibles est supérieure à celle observée au niveau des plots de sondes partiellement complémentaires aux cibles. Cette différence de réponse est constatée avant le rinçage des cibles pour les double-brins de longueur comprise entre 10 et 12 bases ou après leur rinçage pour les double-brins de longueur comprise entre 13 et 19 bases. La figure ci-dessous illustre les variations de

réflectivité sur les plots où sont localisées les sondes sauvages et mutées de la délétion $\Delta F508$ lors du passage des cibles sauvages 1*. Dans un même graphe, les cinétiques représentées correspondent à l'hybridation des cibles et des sondes de même longueur (11 bases pour le graphe A et 13 pour le graphe B) tandis que le nombre de courbes (4 courbes en rouge et 4 courbes en noire) correspond au nombre de plots associé à chaque longueur.

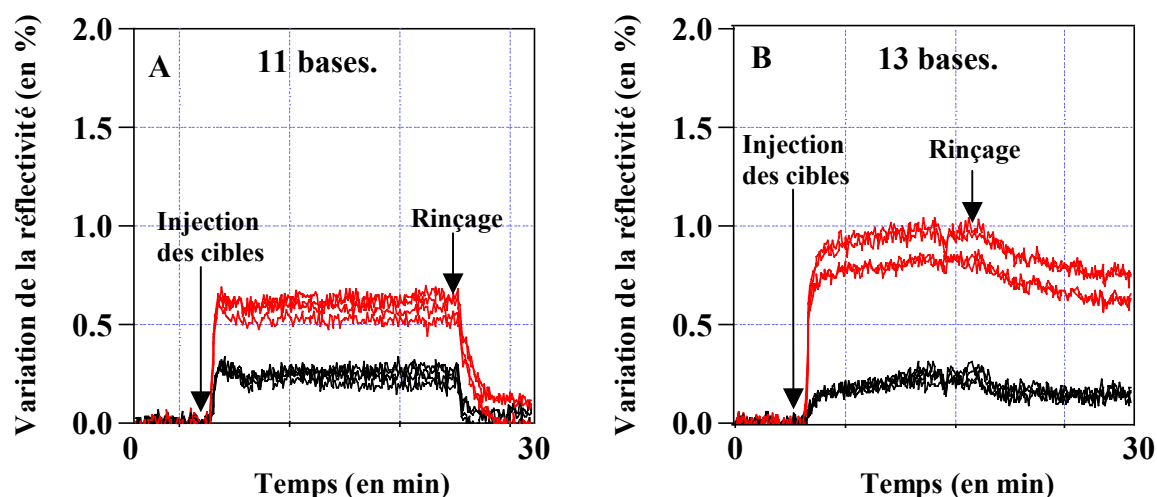


Figure 75: Exemple de cinétiques obtenues lors du passage de la cible sauvage 1* de 11 bases (graphe A) et de 13 bases (graphe B) relatives à la délétion $\Delta F508$. Sur chacun des deux graphes les cibles et les sondes ont une même longueur. Sur chaque graphe nous avons représenté 8 courbes correspondant chacune, à un plot différent. Celles qui affichent les plus grandes variations de réflectivité correspondent aux plots de sondes totalement complémentaires. Les courbes restantes illustrent les plots de sondes mutées. Sur le graphe A, la discrimination se fait avant rinçage alors que sur le graphe B elle peut se faire avant ou après rinçage.

En ce qui concerne la substitution M470V (tableaux 7 et 8) nous remarquons une réponse asymétrique du capteur. En effet pour les cibles 4*, la discrimination est nette pour des longueurs comprises entre 10 et 15 bases. C'est ce que nous pouvons constater sur la Figure 76 où nous avons représenté les cinétiques des sondes sauvages et mutées de la mutation M470V. Ces oligonucléotides possèdent une longueur de 11 bases (graphe A) et de 15 bases (graphe B). Sur chacun de ces graphiques, les sondes sont hybridées à des cibles de même longueur. La réponse des sondes totalement complémentaires aux cibles analysées est toujours supérieure à celle des sondes qui leur sont partiellement complémentaires. Ceci se traduit sur le graphe par deux ensembles de courbes séparés. Plus cette séparation est grande, plus la sélectivité du multicapteur est bonne.

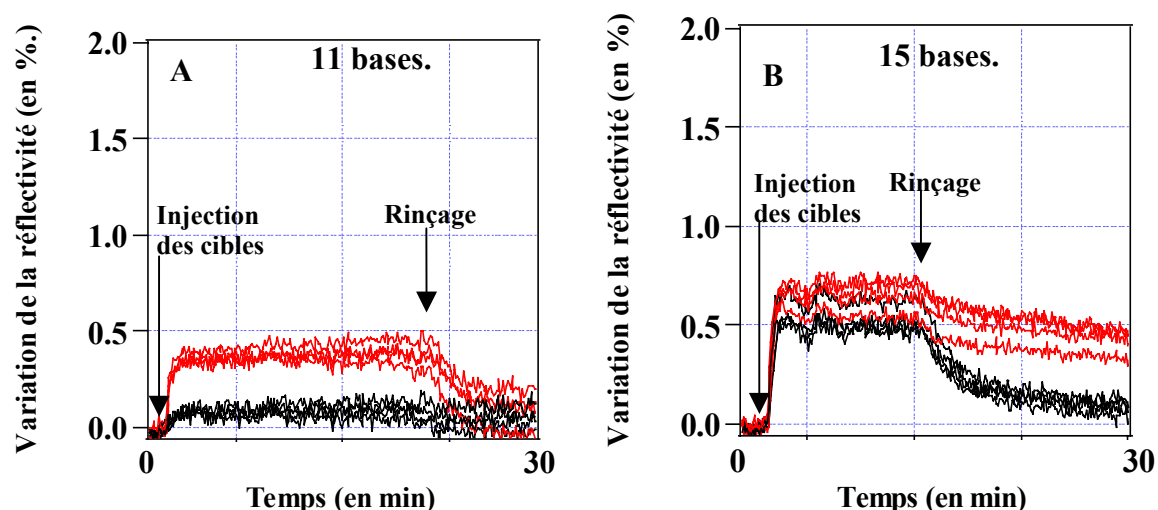


Figure 76: Exemple de cinétiques d'hybridation entre des cibles et des sondes de même longueur, obtenues lors du passage de la cible 4* 11 bases (A) et 15 bases (B). Ces graphes montrent que, pour une substitution, la réponse du capteur est spécifique et non ambiguë si nous utilisons des sondes de longueur comprise entre 10 et 15 bases.

Pour des longueurs supérieures, il est toutefois difficile de trancher. Les résultats obtenus pour une sonde de 19 bases, lors du passage des cibles 4* de différentes longueurs, reproduisent les résultats obtenus par *Feriotto et al.* dans son article paru dans *Human Mutation* [176] dans lequel il montre qu'en utilisant la résonance des plasmons de surface, les longueurs de cible permettant la détection d'une substitution sont comprises entre 9 et 17 bases. Pour les cibles 3* (Tableau 7) qui diffèrent d'une seule base des cibles 4*, aucune longueur de sondes et de cibles ne donne des résultats satisfaisants. Ainsi, les cibles 3* et 4* n'ont pas un comportement symétrique. Cette dissymétrie, mise en évidence après maintes répétitions de l'expérience, indique que les doubles brins partiellement complémentaires résultant de l'hybridation des cibles 3* aux sondes 4 biot 470V (Annexe 10) sont plus stables que les doubles brins partiellement complémentaires résultant de l'hybridation des cibles 4* aux sondes 3 biot 470M (Annexe 10). Cette différence de stabilité a été attribuée à la présence d'un mésappariement différent dans chacun des deux cas. En effet, dans le premier cas (sondes 4 biot 470V / cibles 3*) nous sommes en présence du mésappariement T/G alors que dans le deuxième cas (sondes 3 biot 470M/cibles 4*) nous sommes en présence du mésappariement A/C (Figure 77).

Sondes 4Biot470V	5'bio-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT AATG	G	TGAT 3'
Cibles 3*	3'	TTAC	T ACTA 5'
Sondes 3Biot470M	5'bio-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT AATG	A	TGAT 3'
Cibles 4*	3'	TTAC	C ACTA 5'

Figure 77: Séquences des doubles brins de 9 bases résultant des hybridations entre les sondes 4biot470V et les cibles 3* et entre les sondes 3Biot470M et les cibles 4*. Cette figure met en évidence la présence du mésappariement G/T dans le premier cas et A/C dans le deuxième.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons examiné l'importance de la stabilité de la liaison entre deux bases non complémentaires ainsi que de la température de fusion du double brin dans l'étude de l'hybridation ADN/ADN. Ces paramètres déterminent la stabilité du duplex formé et par suite la prise de masse sur la surface et l'intensité du signal observé. Les résultats, exposés plus loin dans ce manuscrit, montrent que la longueur des oligonucléotides utilisés pour l'étude de la spécificité du multicapteur (des oligonucléotides de 20 bases) n'était pas optimisée et que nous pouvons donc améliorer la sélectivité de la réponse de notre appareil par un choix plus judicieux des sondes.

L'étude de toutes ces cinétiques a d'abord été effectuée en fonction de la longueur des sondes et des cibles. Nous avons constaté que ce paramètre n'était pas suffisant pour expliquer la différence de comportement des groupes de cibles 3* et 4*. Nous avons voulu alors représenter ces résultats en fonction de la température de fusion calculée théoriquement dans certaines conditions de salinité et de température. Cette présentation nous a permis d'établir une loi reliant la variation de réflectivité à la température de fusion des double-brins formés. Nous avons pu ainsi prévoir la réponse de notre système lorsque la surface est exposée à une solution quelconque et concevoir des sondes plus adaptées permettant de dévoiler sans ambiguïté la présence ou l'absence de la mutation recherchée.

C.2.1 Analyse des résultats en fonction de la longueur des oligonucléotides :

En première approche, nous avons mesuré les augmentations de la réflectivité avant (dR_{av}) et après (dR_{ap}) le rinçage des cibles pour chacun des 196 plots (Figure 78). Comme une même séquence sonde est déposée sur plusieurs plots, nous avons calculé la moyenne des différentes valeurs de dR_{av} (respectivement de dR_{ap}) obtenues pour chacun des plots de même séquence sonde. Dans la suite de ce manuscrit, nous désignons par les termes dR_{av} et dR_{ap} les valeurs moyennes calculées.

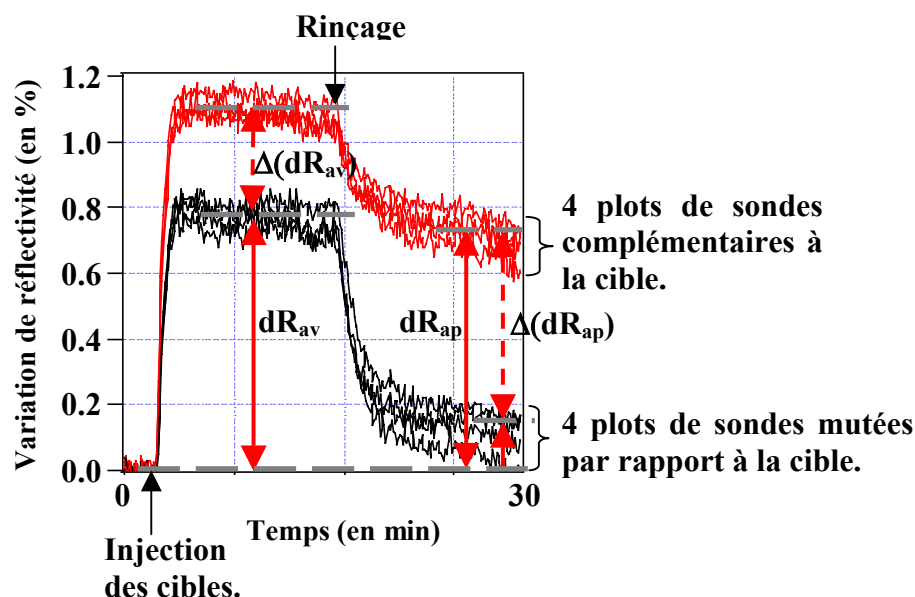


Figure 78: L'étude des résultats a été réalisée avant et après le rinçage des cibles. De ce fait, nous avons mesuré, pour tous les plots, les variations de réflectivité dR_{av} (avant rinçage) et dR_{ap} (après rinçage). Pour les plots de sondes complémentaires et mutées par rapport aux cibles analysées nous avons aussi calculé $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$ après avoir calculé la moyenne des variations de réflectivité pour tous les plots des séquences sauvages et mutées respectivement avant et après rinçage.

Pour la paire de sondes complémentaires et mutées par rapport à la cible étudiée nous avons, en plus, évalué les écarts $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$. Ces valeurs traduisent la différence entre la variation de réflectivité moyenne des sondes complémentaires aux cibles et la variation de réflectivité moyenne des sondes mutées. Elles nous permettent donc d'évaluer la discrimination du multicapteur. Les valeurs moyennes des dR_{av} et dR_{ap} ont été tracées en fonction de la longueur des sondes et des cibles. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence la différence de comportement des oligonucléotides en fonction de leur longueur.

Pour les cibles et les sondes de longueur inférieure à 13 bases nous observons, lors du passage des cibles, une augmentation du signal non explicable par un simple saut d'indice. Cette prise de masse disparaît avec le rinçage et la variation de réflectivité s'annule (Figure 79 zone 1). Ce phénomène s'explique par l'hypothèse suivante : pendant leur passage, les cibles s'hybrident avec les sondes qui leur sont complémentaires, la réflectivité augmente. Lors du rinçage, la stringence du tampon PBS 1X suffit à déstabiliser le duplex et à le déshybrider en deux mono brins de courte longueur. Après rinçage, on observe une perte de masse qui se traduit par une diminution de la réflectivité.

Cas des doubles brins totalement complémentaires.

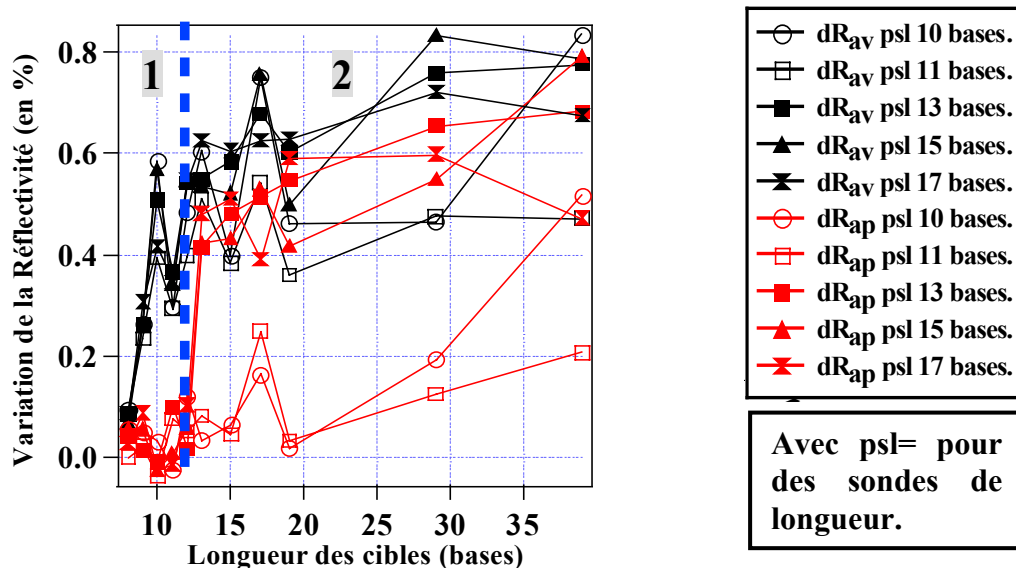


Figure 79: Les courbes tracées illustrent la variation de la réflectivité pour des sondes 470V de 10, 11, 13 et 15 et 17 bases suite à leur hybridation avec les cibles complémentaire 4* de différentes longueurs. La mutation concernée est la substitution M470V. Chaque point sur la figure représente la valeur moyenne des dR_{av} en noir (resp. dR_{ap} en rouge) calculée pour tous les plots d'une même séquence. Les points appartenant à la même verticale correspondent à une même expérience. Ainsi 11 expériences différentes sont représentées sur ce graphique. La distance temporelle entre chacune des expériences ainsi que les fluctuations des conditions expérimentales peuvent expliquer le bruit observé. La zone 1 traduit le comportement des duplex de longueur comprise entre 8 et 13 bases alors que la zone 2 traduit le comportement de duplex compris entre 15 et 39 bases.

Pour les oligonucléotides de longueur supérieure à 13 bases, le signal d'hybridation atteint son maximum et diminue faiblement après rinçage signifiant que le complexe hybridé est stable dans le tampon PBS 1X (Figure 79 zone 2).

Un deuxième résultat est aussi visible sur ces courbes représentant la variation de la réflectivité en fonction de la longueur des cibles : les signaux mesurés (dR_{av} et dR_{ap}) augmentent pour atteindre une saturation à partir d'une longueur de cible de 19 bases. Sachant que la résonance des plasmons de surface est sensible à la masse déposée, la saturation du signal pour les cibles de plus de 19 bases signifie un plus faible taux d'hybridation pour les grandes longueurs. Pour visualiser le phénomène au niveau moléculaire et vérifier notre hypothèse, nous avons divisé le signal mesuré par la longueur des cibles utilisées (Figure 80). Nous retrouvons alors l'interprétation, au niveau moléculaire, des phénomènes décrits plus haut.

Variation de la réflectivité pour les plots de sondes 4 lors de l'injection des cibles 4*.
 —○— sondes 10 bases —□— sondes 11 bases —■— sondes 13 bases —▲— sondes 15 bases
 —✱— sondes 17 bases

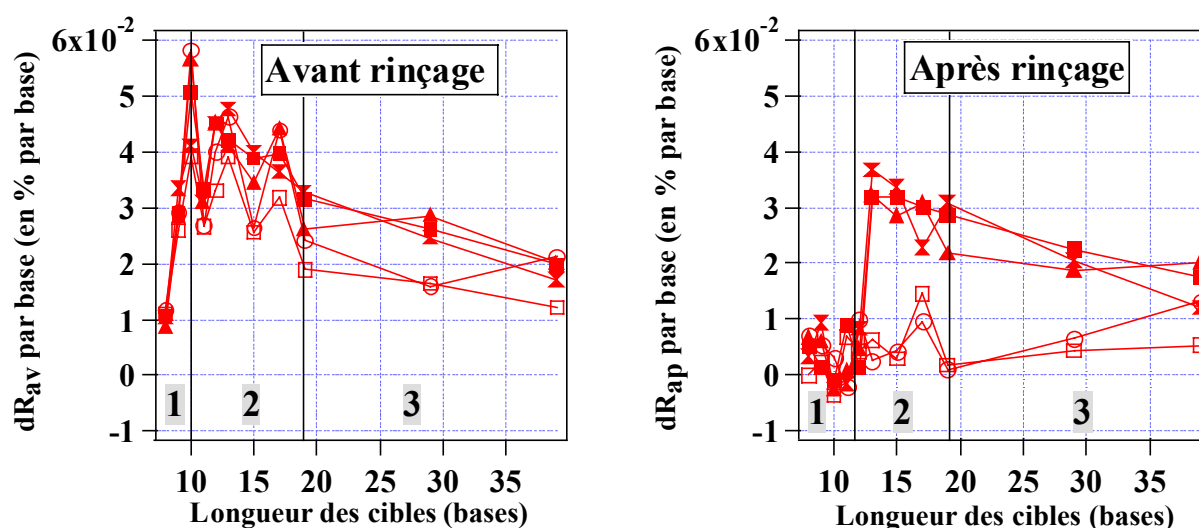


Figure 80 : Variation de la réflectivité par base avant (gauche) et après rinçage (droite) de la cible 4*. Ces deux graphes illustrent la réponse du multicapteur au niveau moléculaire. Sur chacun nous pouvons distinguer trois zones : la zone 1 correspondant aux faibles longueurs (8 à 10 sur le graphe droit et 8 à 12 sur le graphe gauche) montre un signal croissant avant rinçage et nulle après rinçage. La zone 2 correspond à des oligonucléotides de longueur intermédiaire (10 à 19 sur le graphe de droite 13 à 19 le graphe de gauche) et montre un nombre constant de molécules hybridées avant et après rinçage. C'est la zone de saturation. Finalement, la zone 3 correspond aux cibles de longueur supérieure à 19 bases et ce, avant et après rinçage. Dans cette zone le nombre de molécules hybridées diminue.

En effet, avant rinçage (Figure 80 gauche), le nombre de séquences hybridées augmente pour des cibles et des sondes allant de 8 à 10 bases puis sature pour les cibles dont la longueur est comprise entre 11 et 19 bases. Nous déduisons que l'augmentation de la réflectivité observée pour des longueurs d'oligonucléotides comprises entre 8 et 10 bases est due aussi bien au nombre croissant de molécules déposées sur la surface du plot qu'à l'augmentation de leur taille. En revanche, pour les oligonucléotides compris entre 10 et 19 bases l'augmentation de la réflectivité est uniquement due à l'augmentation de leur taille et donc de leur masse.

Au-delà de 19 bases, le nombre de molécules hybridées diminue mais leur masse augmente. Ces deux effets se compensent ce qui explique pourquoi l'augmentation de la réflectivité reste constante. Les repliements ainsi que les structures secondaires des oligonucléotides de plus de 19 bases pourraient expliquer la diminution du taux d'hybridation.

Après rinçage (Figure 80 droite), les courbes peuvent encore être divisées en trois parties. La première correspond aux oligonucléotides compris entre 8 et 13 bases. Pour ces longueurs les double-brins formés avant rinçage ne résistent pas à la stringence du tampon PBS 1X et le signal observé avant rinçage disparaît. La deuxième concerne les oligonucléotides allant de 13 à 19 bases. Pour ces longueurs, le nombre de molécules hybridées et par la suite le taux d'hybridation reste constant. L'augmentation des dR_{ap} pour ces longueurs d'oligonucléotides peut donc être expliquée par l'augmentation de leur masse molaire (la masse molaire d'un oligonucléotide de 19 bases est supérieure à celle d'un oligonucléotide de 13 bases). La dernière partie de ces courbes regroupe les cibles de plus de 19 bases. Pour ces longueurs, le signal d'hybridation diminue et nous retrouvons le même comportement que celui de la Figure 80 gauche. Ce phénomène est attendu car, comme précédemment, les problèmes de repliement et de structures secondaires pourraient apparaître et empêcher les sondes et les cibles de s'hybrider.

Pour conclure cette étude, les écarts $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$, ont été représentés en fonction des longueurs des sondes et des cibles (Figure 81). En tenant compte de la barre d'erreur ($\pm 0.2\%$), la distinction entre la réponse d'une sonde complémentaire et celle d'une sonde mutée est possible quand $\Delta(dR_{av})$ ou $\Delta(dR_{ap})$ dépasse 0.2%. Les cartes représentant $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$ en fonction des longueurs des sondes et des cibles montrent que cette distinction est possible avant le rinçage pour des couples de cibles et de sondes de courte longueur (jusqu'à 13 bases) et après rinçage pour des couples de cibles et de sondes de longueur comprises entre 13 et 17 bases. Pour les couples de cibles et de sondes de plus de 19 bases, la discrimination devient de plus en plus difficile. Cette constatation est valable pour la délétion et pour la séquence **4*** de la substitution. Pour la séquence **3***, il est difficile de trouver une longueur permettant une discrimination non ambiguë.

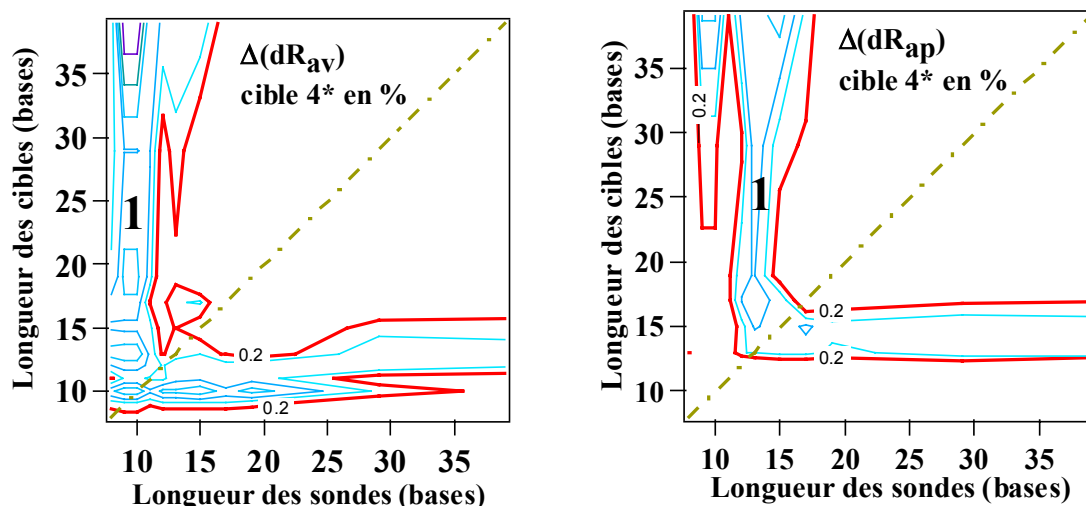


Figure 81: Courbes de niveau représentant les écarts $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$ en fonction des longueurs des sondes et des cibles. Ces cartes représentent possibilité de distinguer la réponse des sondes totalement et partiellement complémentaires aux cibles 4* relatives à la substitution M470V. Les lignes de niveau bleues (zone1) indiquent les longueurs de sondes et de cibles permettant une bonne discrimination (écarts > 0.2%). Les lignes rouges montrent la limite de discrimination. Elles illustrent la possibilité d'étudier les interactions avant ou après rinçage. En comparant les deux graphes nous observons, après rinçage, un décalage de la zone 1 vers les sondes et les cibles comprises entre 13 et 15 bases.

Ce choix de représentation, bien qu'il soit riche en information, ne nous permet pas cependant de comprendre pourquoi, à longueur égale, les cibles 3* et 4* ne réagissent pas de la même façon. Il est donc important d'évaluer l'effet de la composition de la séquence sur les interactions cibles/sondes. Pour cela, nous allons représenter les variations de réflectivité en fonction de la température de fusion des double-brins de différentes longueurs. Ce paramètre a été décrit en détail au paragraphe A.3 du troisième chapitre (page 86).

C.2.2 Analyse en fonction des T_m

En introduisant les séquences des cibles et des sondes, leur concentration (15.5 μ M) ainsi que la salinité du tampon d'hybridation (0.16 M en NaCl), le programme Hyther calcule tous les paramètres thermodynamiques des hybridations résultantes : enthalpie, entropie, énergie libre et température de fusion. Ce programme présente aussi la possibilité d'introduire, dans le calcul des T_m en solution, des corrections qui permettent de tenir compte du fait que les sondes sont attachées à la surface. Ces corrections montrent une dépendance linéaire entre les T_m en solution et les T_m en surface. La connaissance des T_m en solution

permet de prédire la stabilité du duplex à la surface d'une puce à ADN. Son calcul est donc suffisant pour comprendre les hybridations cibles/sondes se déroulant à la surface de la puce.

Les températures de fusion, pour les duplex résultants de l'hybridation de deux mono brins de longueur égale en solution, sont données dans le Tableau 9. Nous nous intéressons aux T_m des doubles hélices formées entre une cible donnée et les sondes qui lui sont complémentaires et mutées.

		Tm en fonction de la longueur (en°C)										
Longueur duplex. →		8	9	10	11	12	13	15	17	19	29	39
Couple cible (c)/sonde (s), ↓		bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.	bases.
c1*s1		22.1	30.6	34.2	41.1	42.2	46	50.5	54.4	56.3	64.3	68.1
c1*s2		-60.2	-39.1	-17.6	4.4	11.4	16.1	22	27.3	31.7	46.4	54.7
c2*s1		-23.5	-9.1	-1.1	11.4	14.6	20.6	27.2	33.1	36.6	47.7	58.8
c2*s2		26	33.1	35.2	40.7	42.9	46.7	50.2	52.8	55.4	63.1	68.8
c3*s3		22.3	27.4	30.1	34.1	38.6	39.7	44.7	49.1	54.1	66.1	73.8
c3*s4		-0.9	8.9	14.7	21.4	28.4	30.7	37.6	43.7	50	64.4	71.6
c4*s3		-25	-8.9	0.7	10.4	20.3	23.4	32.1	39.7	47	63.5	71
c4*s4		28.7	33.1	35.2	38.7	42.7	43.5	48	52	56.7	67.8	73.8

Tableau 9: Valeurs des T_m obtenues pour différentes longueurs des quatre couples cibles (c)/sondes (s) possibles. Les couples c_j*s_j représentent les duplex totalement complémentaires alors que les couples c_j*s_k représentent les duplex mutés. La température de fusion augmente avec la longueur des duplex. Les valeurs négatives sur le tableau correspondent aux duplex cibles/sondes mutées.

Pour une meilleure visualisation de ces résultats, nous avons représenté les T_m des double-brins partiellement complémentaires en fonction des T_m des double-brins totalement complémentaires formés pour chacune des 44 cibles utilisées.

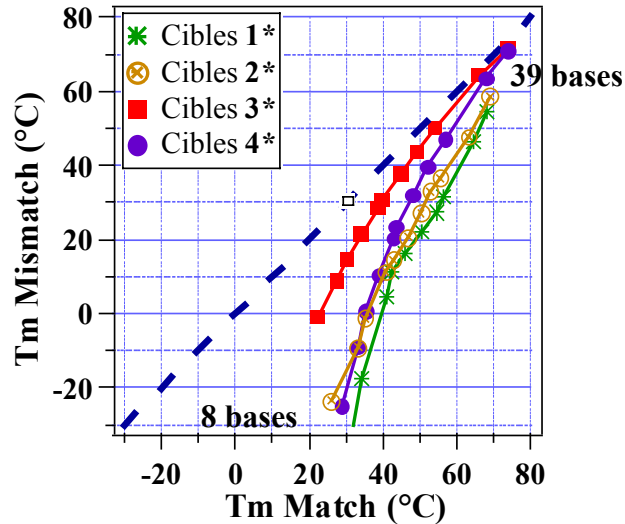


Figure 82: Représentation des T_m des double-brins partiellement complémentaires en fonction des T_m des double-brins complémentaires pour les 44 cibles utilisées: (*: cibles 1*, cercle vide: cibles 2*, carré plein: cibles 3*, cercle plein: cibles 4*). Les points de la diagonale représentent le cas où la discrimination n'est pas possible car les double-brins partiellement et totalement complémentaires possèdent la même température de fusion, et donc, la même efficacité d'hybridation.

Le graphe ci-dessus est partagé en trois zones :

- 1- La zone au-dessus de la diagonale est le lieu des points correspondant à des double-brins partiellement complémentaires ayant une température de fusion supérieure à celles des double-brins totalement complémentaires. Ils sont donc plus stables. Ce qui n'est pas possible. Il est donc normal qu'elle soit vide.
- 2- Les points de la diagonale correspondent quant à eux, à des duplex partiellement complémentaires et totalement complémentaires d'égale stabilité. Dans ce cas, il est difficile de les distinguer.
- 3- La zone située en dessous de la diagonale est le lieu des points où la stabilité des duplex totalement complémentaires est supérieure à celle des duplex totalement complémentaires. Toutes les valeurs de T_m données dans le Tableau 9 se situent dans cette zone.

Nous remarquons aussi que la température de fusion augmente avec la longueur et qu'elle s'approche de la diagonale. Les duplex totalement et partiellement complémentaires de grande longueur possèdent donc des stabilités voisines. Ce fait explique pourquoi il est difficile de discriminer pour de telles longueurs.

Dans notre étude nous nous intéressons à la partie du graphique située au-dessous de la diagonale. Pour cela nous tracerons plus loin le graphique représentant les écarts de T_m (ΔT_m) en fonction de la température de fusion du duplex parfaitement complémentaire (T_m Match)

Les valeurs moyennes des dR_{av} et dR_{ap} des double-brins correspondant aux cibles et aux sondes de même longueur (la diagonale des tableaux des pages 144 à 147) ont été représentées en fonction de leur température de fusion. Nous obtenons les graphes de la Figure 83 qui montrent l'existence d'une T_m seuil, en l'occurrence une dizaine de degrés avant le rinçage et une trentaine de degré après rinçage, à partir de laquelle la réponse du capteur croît linéairement. L'existence de ce seuil est en quelque sorte prévisible, étant donné que l'observation d'un signal dépend de deux paramètres qui sont :

- 1) La limite de détection de notre appareil qui est de 10 pg/mm^2 , ce qui correspond à une variation minimale de réflectivité de 0.05 %. Si la masse des cibles hybridées ne dépasse pas cette limite, l'interaction cible/sonde reste inaperçue.
- 2) La formation du double brin. En effet, la variation de la réflectivité est due à l'hybridation entre les cibles et les sondes. Si cette interaction n'a pas lieu, nous n'observerons pas de prise de masse sur la surface et donc pas de signal.

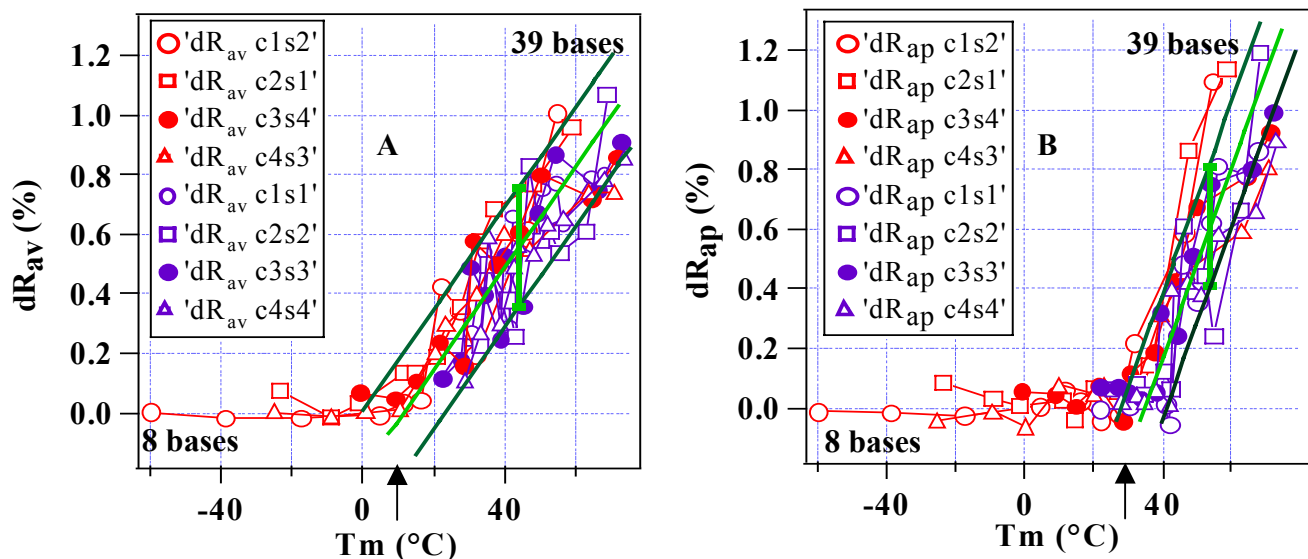


Figure 83: Variation de la réflectivité avant et après rinçage en fonction des T_m pour les différentes cibles (c) et sondes (s) de même longueur. Les motifs bleus correspondent aux doubles hélices complémentaires alors que les motifs rouges correspondent aux doubles hélices avec une mutation au centre. Les motifs identiques illustrent le passage d'une même cible sur la surface. Les différents points d'une même courbe représentent les différentes longueurs de cibles testées et par suite les différentes expériences réalisées. La variation de la réflectivité augmente linéairement à partir d'une T_m seuil indiquée par une flèche sur les graphes. En comparant les deux graphes nous remarquons une augmentation de la température de fusion seuil ainsi que de la pente des courbes.

Les courbes représentées sur un même graphique se superposent avec un bruit de $\pm 0.2 \%$ qui correspond à l'écart entre les deux droites délimitant la dispersion des résultats (Figure 83). Cette grande dispersion peut être expliquée par le fait que chaque point des courbes tracées correspond à une expérience différente.

Après rinçage, la perte de signal pour les oligonucléotides dont la longueur est comprise entre 8 et 13 bases, se traduit par une augmentation du seuil à partir duquel la variation de réflectivité mesurée dépasse 0.05% . Les droites de modélisation des deux graphes de la Figure 83 traduisent deux allures différentes de la variation de la réflectivité avant et après rinçage. En effet, après rinçage, toute liaison instable est éliminée définitivement d'où l'augmentation de la température de fusion seuil.

La résonance des plasmons de surface étant sensible à la masse déposée sur la surface les résultats ci dessus dépendent aussi de la masse des cibles utilisées. Pour s'en affranchir, et puisque la masse des oligonucléotides est proportionnelle à leur longueur, nous avons divisé les variations de réflectivité avant et après rinçage par la longueur des cibles correspondantes. Les graphes résultants (Figure 84) montrent un signal nul qui augmente linéairement à partir

d'un seuil, sature puis diminue. La diminution du signal pour les T_m élevées ($> 45^\circ\text{C}$) est due à la longueur des oligonucléotides (19 à 39) pouvant entraîner le repliement des molécules et donc un encombrement stérique empêchant l'efficacité d'hybridation.

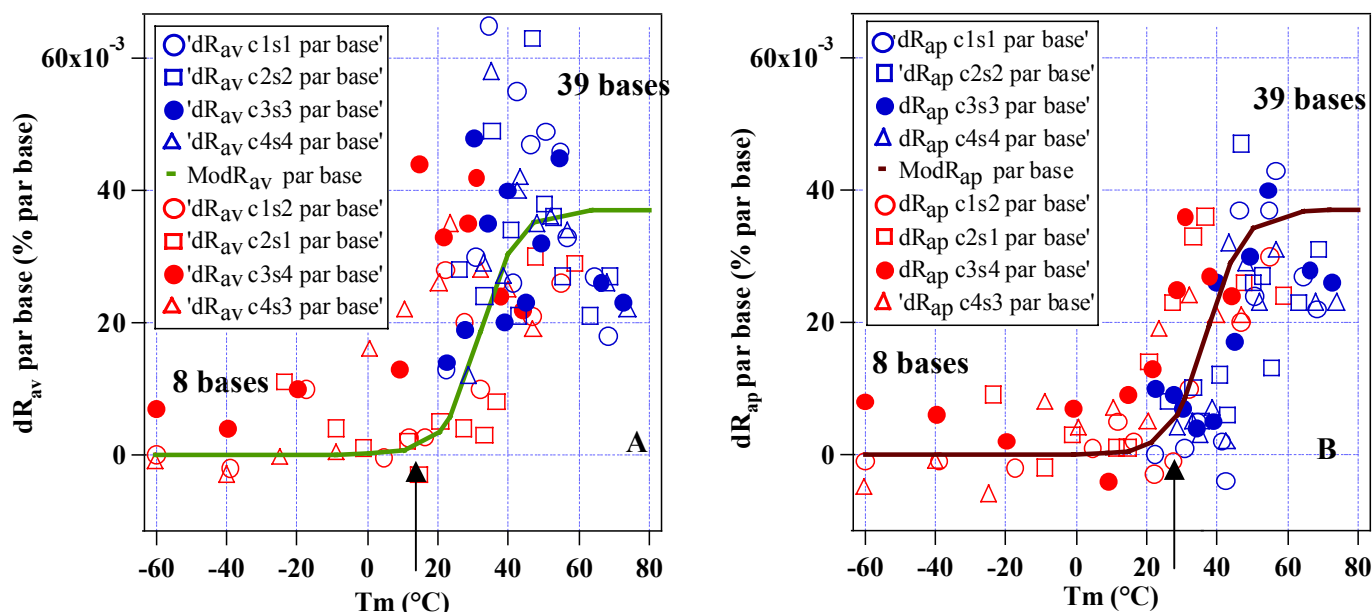


Figure 84: Variation de la réflectivité par base, A : avant rinçage et B : après rinçage, en fonction de la Température de fusion. Comme précédemment les motifs bleus correspondent aux doubles hélices complémentaires alors que les motifs rouges correspondent aux doubles hélices avec une mutation au centre, un même motif illustre le passage d'une même cible et les différents points représentent les différentes longueurs de cibles testées et par suite les différentes expériences réalisées. Sur les deux graphes, nous retrouvons le seuil de détection relevé précédemment. De plus, pour des longueurs d'oligonucléotides supérieures à 19 bases le signal diminue, phénomène pouvant être attribué à la présence de structures secondaires. Les fonctions de modélisation ($ModR_{av}$, $ModR_{ap}$) donnent l'allure de la variation de réflectivité par base avant et après rinçage elles sont expliquées au paragraphe suivant.

C.2.3 Modélisation :

Nous avons cherché une fonction mathématique pouvant modéliser le comportement de la réponse du capteur. Dans ce but, nous avons choisi une fonction de fermi qui rend compte de la probabilité d'avoir une particule dans un niveau d'énergie donné en fonction de la température. Elle peut donc nous servir pour modéliser la probabilité d'observer une hybridation en fonction de la température de fusion. La fonction de modélisation, empiriquement déterminée, s'écrit $f(T_m) = \frac{C}{1 + \exp\left(A^* \frac{T_m - T_{HC}}{T_{HC}}\right)}$ avec $C = 0.037\%$ par

base, $A = -60$ avant rinçage et après rinçage, T_m la température de fusion, T_{HC} la température à

laquelle notre signal diminue de moitié elle est égale à 32°C avant et à 38°C après rinçage. Toutes les températures sont données en degré Kelvin pour les transformer en degré Celsius il suffit de retrancher 273.15 à la valeur calculée. Ces courbes sont représentées sur les graphes de la Figure 84. Elles sont nommées ModR_{av} quand nous analysons les résultats avant rinçage (Figure 84 A) et ModR_{ap} quand nous analysons les résultats après rinçage (Figure 84 B).

En divisant $f(T_m)$ par C nous obtenons une fonction normalisée, traduisant le nombre de molécules fixées par unité de surface. Les courbes résultantes sont représentées sur la Figure 85. Elles illustrent la réponse théorique du multicapteur avant rinçage (Mod1) et après rinçage (Mod2) en fonction de la température de fusion.

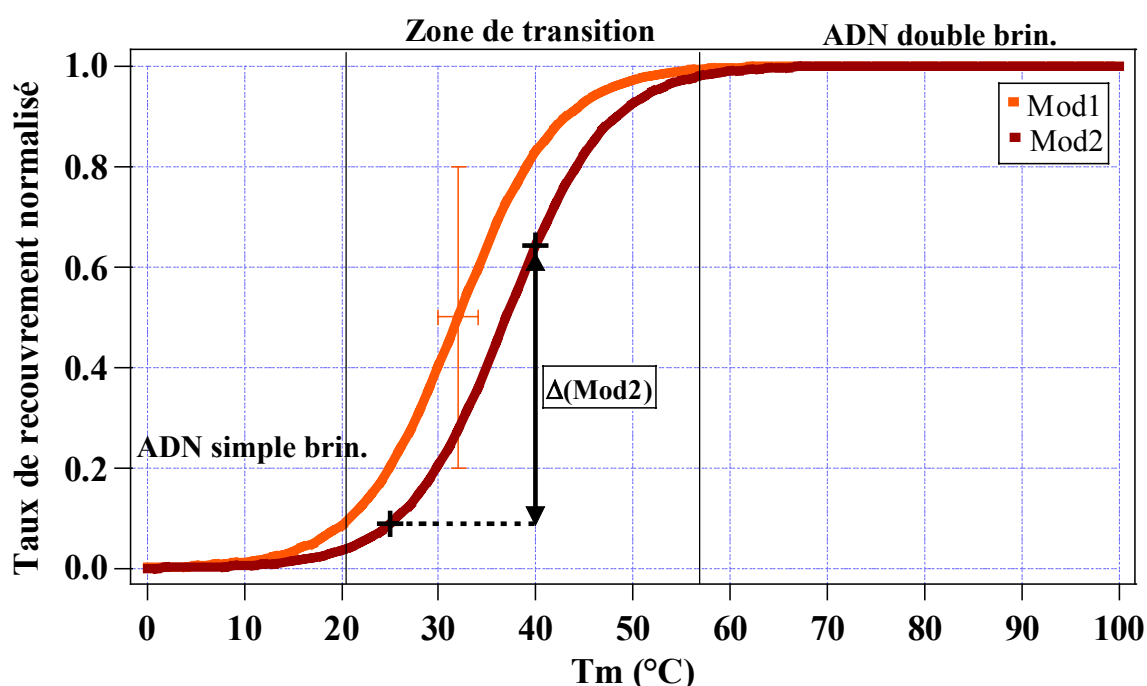


Figure 85: Représentation des fonctions de modélisation normalisée par la constante C avant et après rinçage (respectivement courbe Mod1 et Mod2). Elles traduisent le nombre de molécules hybridées par unité de surface. Pour que notre système soit capable de discriminer entre la réponse d'un duplex totalement complémentaire et celle d'un duplex partiellement complémentaire il faut que les températures de fusion de ces doubles brins permettent d'optimiser la valeur de $\Delta(\text{Mod2})$ ou de $\Delta(\text{Mod1})$ (non représentée sur la figure). Ceci est possible si elles se situent de part et d'autre de la zone de transition ou dans cette zone.

Remarque : Les calculs de la température de fusion effectués par l'intermédiaire du programme Hyther (Figure 86) pour différentes concentrations de cibles, montrent que pour de faibles concentrations la température de fusion des doubles brins est constantes. Cette remarque est importante car elle nous permet de garder la notion de température de fusion lors du rinçage, période durant laquelle la concentration de cibles diminue.

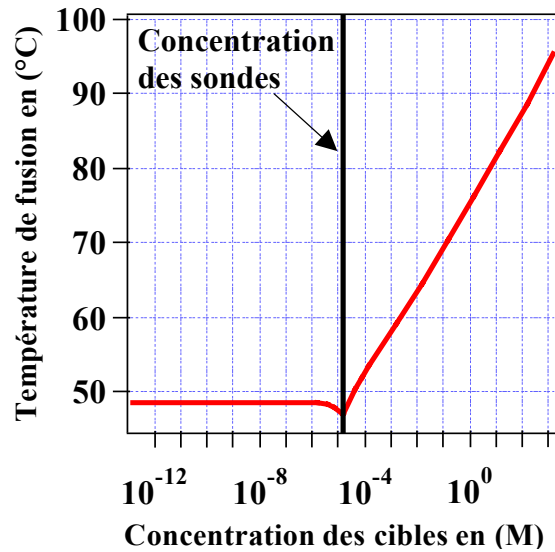


Figure 86 : Représentation de la température de fusion en fonction de la concentration des cibles (échelle logarithmique). Ces valeurs ont été calculées par le programme Hyther pour une concentration en sondes égale à 1.5×10^{-6} M et une solution tampon à 0.137 M en sel.

Connaissant la température de fusion d'une double hélice d'ADN, nous pouvons prédire, par l'intermédiaire des courbes de la Figure 85, le taux de recouvrement de la surface. Cette valeur est proportionnelle à la variation de la réflectivité observée expérimentalement (dR_{av} , et dR_{ap}). Pour que la sélectivité de notre multicauteur soit optimale il faut que :

- 1- la température de fusion du duplex totalement complémentaire corresponde à un taux de recouvrement maximal (au voisinage de 1 sur la Figure 85) donc, à une variation de réflectivité dR_{av} (resp. dR_{ap}) maximale
- 2- et que la température de fusion du duplex partiellement complémentaire corresponde à un taux de recouvrement minimal (au voisinage de 0 sur la Figure 85) donc une variation de réflectivité dR_{av} (resp. dR_{ap}) minimale.

Il faut donc, bien choisir les températures de fusion des doubles brins totalement et partiellement complémentaires de façon à optimiser les valeurs de $\Delta(\text{Mod1})$ (resp. $\Delta(\text{Mod2})$) Figure 85). Dans ce but, nous avons recherché les couples (T_m , ΔT_m) qui maximisent les grandeurs $\Delta(\text{Mod1})$ (rep. $\Delta(\text{Mod2})$). Ainsi, nous avons calculé les grandeurs $\Delta(\text{Mod1}) = \text{Mod1}(T_m) - \text{Mod1}(T_m - \Delta T_m)$ où ΔT_m est une variation de la température de fusion (resp. $\Delta(\text{Mod2}) = \text{ModR}_{ap}(T_m) - \text{ModR}_{ap}(T_m - \Delta T_m)$) puis tracer les valeurs obtenues en fonction des deux paramètres T_m et ΔT_m . Nous avons alors obtenu des courbes de niveaux représentées sur les graphes de la Figure 87. Elles nous ont permis d'évaluer les écarts entre la

réponse des sondes complémentaires et celle des sondes partiellement complémentaires aux cibles.

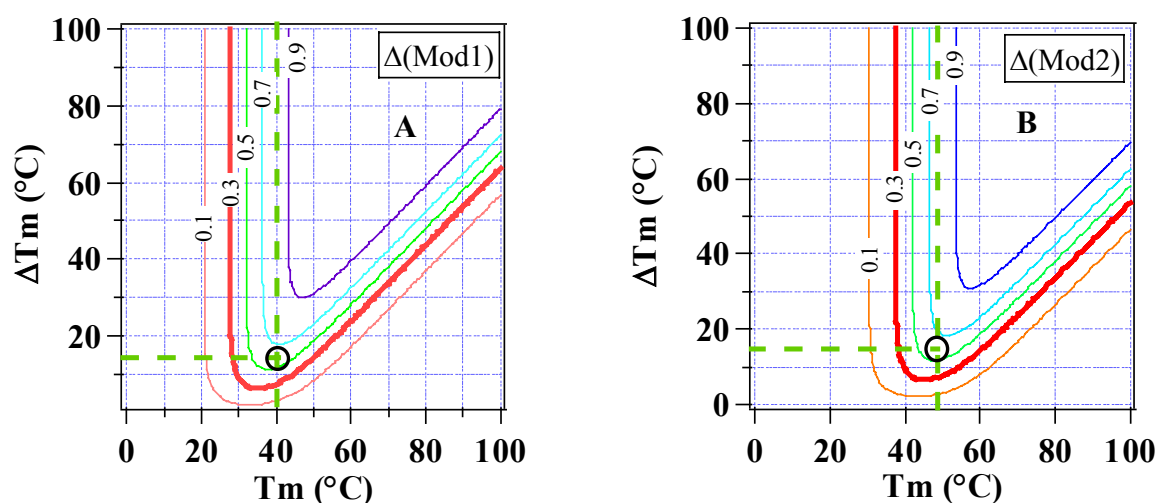


Figure 87: Courbes de niveaux représentant $\Delta(\text{Mod1})$ et $\Delta(\text{Mod2})$ permettant de prédire la réponse du capteur en fonction des T_m et des variations des T_m (ΔT_m). Ces courbes permettent, en multipliant par 0.037 % puis par le nombre de bases des oligonucléotides, de remonter aux écarts $\Delta(dR_{av})$ et $\Delta(dR_{ap})$ attendus dans certaines conditions de T_m et de ΔT_m . Les lignes vertes indiquent les températures de fusion qui induisent une importante variation de réflectivité au niveau des sondes totalement complémentaires aux cibles et une faible variation de réflectivité au niveau des sondes mutées et ce pour une faible variation de T_m (autour de 15°C).

Pour éviter toute ambiguïté dans la réponse du multicapteur il faut que $\Delta(dR_{av})$ ou $\Delta(dR_{ap}) > 0.2\%$, valeur correspondant à la barre d'erreur estimée. Cette condition signifie que la réponse de notre multicapteur est spécifique quand les valeurs de $\Delta(\text{Mod1})$ ou $\Delta(\text{Mod2})$ sont supérieures à 0.3 (courbe rouge épaisse sur la Figure 87). Si nous choisissons d'étudier les interactions avant rinçage un double brin totalement complémentaire, possédant de 40°C, semble être un bon compromis. Par contre, si nous choisissons d'effectuer nos analyses après rinçage, un double brin totalement complémentaire possédant une température de fusion de 45°C, est mieux adapté. En effet, pour ces valeurs, une mutation causant une diminution de T_m d'une quinzaine de degrés entraînerait une perte de la moitié du signal au niveau des double-brins partiellement complémentaires. Cela signifie que la variation de la réflectivité au niveau des plots où les double-brins partiellement complémentaires se forment serait égale à la moitié de la variation de la réflectivité au niveau des plots supportant les double-brins complémentaires.

Pour vérifier théoriquement les résultats expérimentaux que nous avons obtenus avec l'ensemble de nos oligonucléotides, nous avons calculé les ΔT_m pour les duplex formés avec les différentes longueurs de cibles. Les résultats obtenus sont donnés au tableau 10.

ΔT_m en fonction de la longueur (en °C). Cible (c)	8 bases.	9 bases.	10 bases.	11 bases.	12 bases.	13 bases.	15 bases.	17 bases.	19 bases.	29 bases.	39 bases.
Cible1*	82.3	69.7	51.8	36.7	30.8	29.9	28.5	27.1	24.6	17.9	13.4
Cible2*	49.5	42.2	36.3	29.3	28.3	26.1	23	19.7	18.8	15.4	10
Cible3*	23.2	18.5	15.4	12.7	10.2	9	7.1	5.4	4.1	1.7	2.2
Cible4*	53.7	42	34.5	28.3	22.4	20.1	15.9	12.3	9.7	4.3	2.8

Tableau 10: $\Delta T_m = T_m(cj*sj) - T_m(cj*sk)$ pour les duplex formés avec les cibles et des sondes de même longueur. $cj*sj$ désigne le double-brin complémentaire et $cj*sk$ le double-brin partiellement complémentaire. Nous remarquons que les ΔT_m les plus élevés correspondent aux duplex les plus courts.

Ces résultats ont été visualisés à la Figure 88.

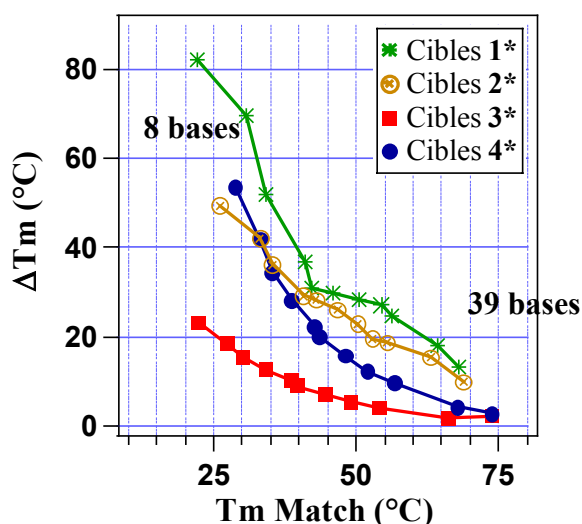


Figure 88 : Représentation des ΔT_m en fonction des T_m des duplex complémentaires pour les 44 cibles utilisées : (* : cibles 1*, cercle vide : cibles 2*, carré plein : cibles 3*, cercle plein : cibles 4*). Comme nous pouvons le prévoir, ΔT_m diminue quand la longueur et la température de fusion augmentent. La courbe relative aux différentes longueurs des cibles 3* se situe au-dessous de toutes les autres courbes. Nous pouvons donc nous attendre à des difficultés à distinguer la réponse des sondes totalement complémentaires de celle des sondes partiellement complémentaires aux cibles.

Comme nous pouvons le prévoir, ce graphe montre que les ΔT_m diminuent quand les longueurs des double-brins et leur T_m augmentent, ce qui explique la difficulté de discrimination pour les longueurs dépassant les 19 bases. De plus, la courbe en rouge représentant la trajectoire des cibles 3* est en dessous de toutes les autres courbes. Les duplex mutés et complémentaires formés lors du passage de ces cibles sur la surface possèdent des stabilités voisines et il faut donc s'attendre à avoir des difficultés pour les discriminer.

Pour comprendre les résultats expérimentaux que nous avons obtenus, nous avons superposé le réseau de courbes tracé sur graphe précédent sur les courbes de niveau représentant $\Delta(\text{Mod1})$ et $\Delta(\text{Mod2})$. Le résultat est illustré à la Figure 89.

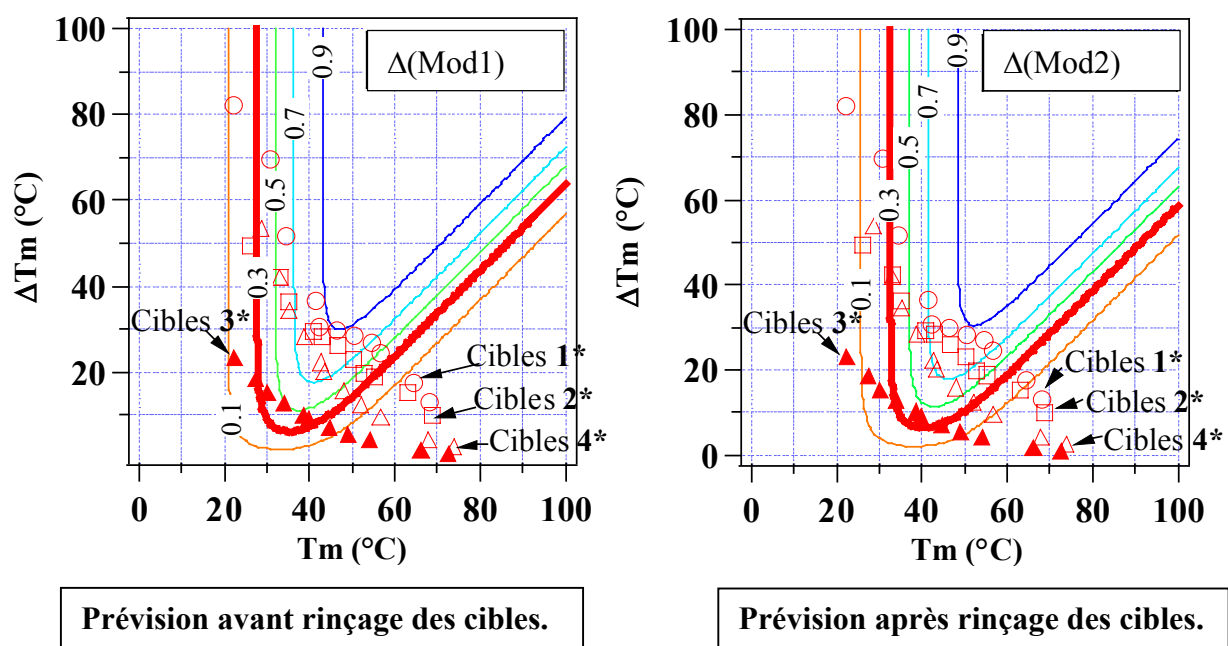


Figure 89: Sur ces graphiques nous avons superposé les courbes tracées sur la figure précédente et les courbes de niveau représentant $\Delta(\text{Mod1})$ et $\Delta(\text{Mod2})$. Le but de cette superposition est de comprendre les résultats expérimentaux. Nous remarquons que la courbe relative aux cibles 3* se situe dans la région où les écarts théoriques sont les plus faibles. Il est donc normal d'avoir du mal à différencier la réponse de la séquence totalement complémentaire de celle de la séquence mutée. Pour ces cibles, il est donc difficile d'observer une bonne discrimination.

Nous remarquons que pour les délétions, les points correspondant aux longueurs comprises entre 9 et 19 bases se situent dans la région de la carte qui permet la meilleure discrimination. Les longueurs 8, 29 et 39 bases ne permettent pas la discrimination et c'est effectivement ce que nous obtenons expérimentalement.

Pour la substitution nous remarquons que les points relatifs aux cibles 4* se divisent en deux catégories : ceux correspondant aux longueurs 8 à 15 bases qui permettent la discrimination et ceux correspondant aux longueurs de 17 à 39 bases qui ne permettent pas la discrimination. Ces résultats prédits correspondent bien aux résultats expérimentaux obtenus (Tableau 8 page 147). En ce qui concerne la séquence 3* (triangles pleins sur la Figure 89) nous constatons que les points représentant les écarts des températures de fusion entre duplex mutés et complémentaires tombent dans la région où la discrimination est très difficile, voire même impossible. Ce fait indique bien, que dans un mélange donné, il est plus difficile de détecter la présence de la séquence 3* que celle de la séquence 4*. Les résultats expérimentaux obtenus sont ainsi bien expliqués.

A partir des courbes de niveaux, nous pouvons donc prédire la réponse du capteur pour une longueur d'oligonucléotide donnée correspondant à un couple (T_m , ΔT_m) précis. Par suite, pour avoir une bonne distinction entre la réponse d'une séquence complémentaire et celle d'une séquence mutée, il est important de choisir une longueur pour laquelle le couple (T_m , ΔT_m) est associé à un écart normalisé de réflectivité par base ($\Delta(\text{Mod1})$ ou $\Delta(\text{Mod2})$) supérieur à 0.3. Il est aussi intéressant de choisir des oligonucléotides dont la longueur permet l'obtention d'une température de fusion correspondant à une variation de réflectivité maximale. Il nous faut donc une température de fusion voisine de 40°C pour le duplex parfaitement complémentaire, si l'étude est effectuée avant rinçage, et 45°C si l'étude est effectuée après rinçage. Dans ces cas, pour un ΔT_m de 15°C, le signal enregistré au niveau des plots où se forment les duplex partiellement complémentaires est égal à la moitié du signal enregistré sur les plots où se forment les duplex totalement complémentaires.

Récapitulatif :

Dans cette partie, nous avons étudié l'effet de la longueur des oligonucléotides sur la spécificité du multicapteur. Les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'étudier les hybridations ADN/ADN avant ou après rinçage des cibles et que, pour une même longueur, les différentes séquences n'ont pas le même comportement. Nous avons donc cherché une autre façon d'analyser nos données expérimentales. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés au paramètre qui caractérise la stabilité d'un double brin d'ADN : sa température de fusion (T_m). Nous avons calculé les températures de fusion des double-brins totalement et partiellement complémentaires résultants de l'hybridation entre cibles et sondes d'égale longueur par l'intermédiaire du programme Hyther disponible sur Internet. Nous avons aussi tracé les variations de réflectivité mesurées avant et après rinçage en fonction de ces T_m . Les graphiques obtenus présentent une dépendance linéaire. Cependant, comme la résonance des plasmons de surface est sensible à la masse déposée, nous avons voulu nous affranchir de ce dernier paramètre en divisant les variations de réflectivité par la longueur des cibles correspondantes. Les courbes obtenues ont été modélisées par des fonctions de Fermi. Cette modélisation nous a permis de prédire les variations de réflectivité que nous devons observer suite à l'injection dans la cuve d'une cible possédant une longueur bien définie. De plus, en traçant les courbes de niveau représentant les écarts de réflectivité en fonction des ΔT_m et des T_m , nous avons pu comprendre pourquoi toutes les cibles testées ne répondent pas de la même manière. Ainsi, nous avons modélisé la réponse optique de notre système en fonction de la température de fusion des oligonucléotides, paramètre qui caractérise leur stabilité.

Cet outil mathématique ouvre la voie à la conception de sondes adéquates qui ne s'hybrident pas avec les cibles recherchées et ainsi permettent de détecter leur présence. Ces sondes conviennent à la fabrication d'une puce à ADN. La stratégie de choix des sondes ainsi que son application aux mutations les plus fréquentes de l'exon 10 de la mucoviscidose font l'objet du chapitre suivant.

D Étude de six mutations sur l'exon 10 :

Après avoir modélisé la variation de la réflectivité en fonction de la température de fusion, nous pouvons désormais prévoir le comportement des sondes fixées sur la surface de la puce quand elles sont exposées à une séquence cible donnée. De ce fait nous sommes désormais capables de mettre au point des sondes permettant une meilleure discrimination des cibles. Cette absence d'hybridation se traduit par un signal de faible amplitude. Le contraste entre la réponse de la sonde complémentaire et celle de la sonde artificielle conçue sera tel que nous pourrons, facilement et sans aucune ambiguïté, identifier la cible mise en contact avec la surface.

Dans les paragraphes qui vont suivre, je décrirai la stratégie développée pour choisir des sondes adaptées à la détection d'une mutation ponctuelle entraînant une faible déstabilisation de la double hélice d'ADN. Ces sondes seront distribuées sur la surface selon un motif qui facilite l'analyse visuelle des résultats. Pour finir, la technique élaborée a été appliquée à la détection de six mutations situées sur l'exon 10 du gène CFTR et les résultats expérimentaux ont été comparés aux résultats théoriques prévus.

D.1 Conception des sondes :

D.1.1 Description de la stratégie :

Forts des résultats exposés dans les paragraphes précédents, nous proposons une méthode pour générer une sonde artificielle qui nous permet de détecter sans ambiguïté la présence d'une cible donnée dans la solution analysée. Cette sonde nous servira de témoin. Le duplex qu'elle formera avec la cible aura une stabilité si faible qu'il ne résistera pas à la stringence du tampon PBS 1X. Sur la lame, le plot relatif à cette nouvelle sonde n'affichera aucune augmentation significative de la réflectivité. Ce fait se traduit, sur la différence d'images, par un plot confondu avec le bruit de fond. La différence entre la réponse des plots de sondes complémentaires à la cible et celle des plots de sondes artificielles est maximale. Elle nous permet de détecter sans ambiguïté la cible injectée.

Pour concevoir les sondes, nous avons appliqué notre stratégie avant rinçage. Ce choix met en valeur la capacité des plasmons de surface à suivre dans le temps, l'évolution des

cinétiques. Dans ce cas, nous n'avons pas besoin de rincer pour déterminer quelles sondes ont réagi et nous accédons à l'information en un temps très court (5 minutes). La condition ainsi définie, nous impose, comme nous l'avons déjà vu, le choix d'une longueur correspondant à une T_m (duplex complémentaire) au voisinage de 40°C.

Le plan ci-dessous illustre les étapes que nous avons suivies pour choisir les sondes :

- 1) Définir la longueur de la séquence double brin totalement complémentaire correspondant à une température de fusion (T_{m0}) au voisinage de 40°C.
- 2) Calculer la température de fusion du duplex partiellement complémentaire (T_{m1}).
- 3) Calculer $\Delta T_m = T_{m0} - T_{m1}$.
- 4) Si $\Delta T_m > 15^\circ\text{C}$ les sondes sauvages et mutées, correspondant aux séquences retrouvées dans le génome humain, sont suffisantes. En effet, dans ce cas, le couple (T_{m0} , ΔT_m) vérifie la condition $\Delta(\text{Mod1}) > 0.3$.
- 5) Si $\Delta T_m < 15^\circ\text{C}$ la condition $\Delta(\text{Mod2}) > 0.3$ n'est pas vérifiée et nous avons procédé à l'étape suivante.
- 6) Introduire, sur la séquence mutée par rapport à la cible, une substitution artificielle, deux bases en avant ou en arrière de la mutation retrouvée dans le génome humain. Cette opération aura pour effet d'augmenter l'instabilité du double brin formé et donc d'augmenter la valeur de ΔT_m . Elle se déroule comme suit :
 - Écrire la séquence de la sonde mutée par rapport à la cible.
 - Remplacer la base située deux bases à gauche de la mutation positionnée au centre de la séquence sonde par chacune des trois autres bases successivement. Ainsi, si la base concernée est l'adénine (A) elle sera remplacée successivement par les bases C, T, et G.
 - Pour chacune des trois séquences sondes obtenues, calculer la température de fusion (T_{m2}) du double-brin cible/sonde artificielle.
 - Calculer les trois $\Delta T_{m1} = T_{m2} - T_{m0}$ résultants.
 - Choisir la sonde correspondant à $(\Delta T_{m1})_{\text{maximal}}$.
 - Positionner le point (T_{m0} , $(\Delta T_{m1})_{\text{maximal}}$) sur le graphe représentant $\Delta(\text{Mod1})$ en fonction de T_m et ΔT_m .
 - Si $\Delta(\text{Mod2}) > 0.7$ choisir la séquence sonde correspondante comme sonde artificielle. Dans le cas contraire, recommencer la même démarche en introduisant la substitution artificielle deux bases à droite de la mutation usuelle positionnée au centre de la séquence sonde.

NB :

- ☞ Le calcul de la T_m a été effectué avec le programme Hyther dans les mêmes conditions que précédemment.
- ☞ Pour que le signal soit détectable, il est important de choisir une cible d'une dizaine de bases au minimum.

- ☞ Pour le moment, la position de la mutation artificielle est choisie de façon empirique.
- ☞ Cette démarche est appliquée pour chacune des cibles sauvages et mutées relative à une même mutation.
- ☞ La conception de deux sondes artificielles (sondes sauvages +1 mutation artificielle, sondes mutées +1 mutation artificielle) est systématique dès que la réponse du multicapteur à l'une des cibles sauvages ou mutées est ambiguë.

La conception des sondes artificielles est donc basée sur le choix des températures de fusion du duplex cible/sonde totalement complémentaire et cibles/sondes artificielles. Pratiquement, la conception des nouvelles sondes consiste donc à introduire à chacune des séquences sondes sauvages et mutées une deuxième mutation ponctuelle qui augmente l'instabilité du double-brin formé. L'écart ΔT_m entre la température de fusion du double-brin totalement complémentaire et celle du double-brin présentant la mutation analysée est ainsi augmenté (Figure 90).

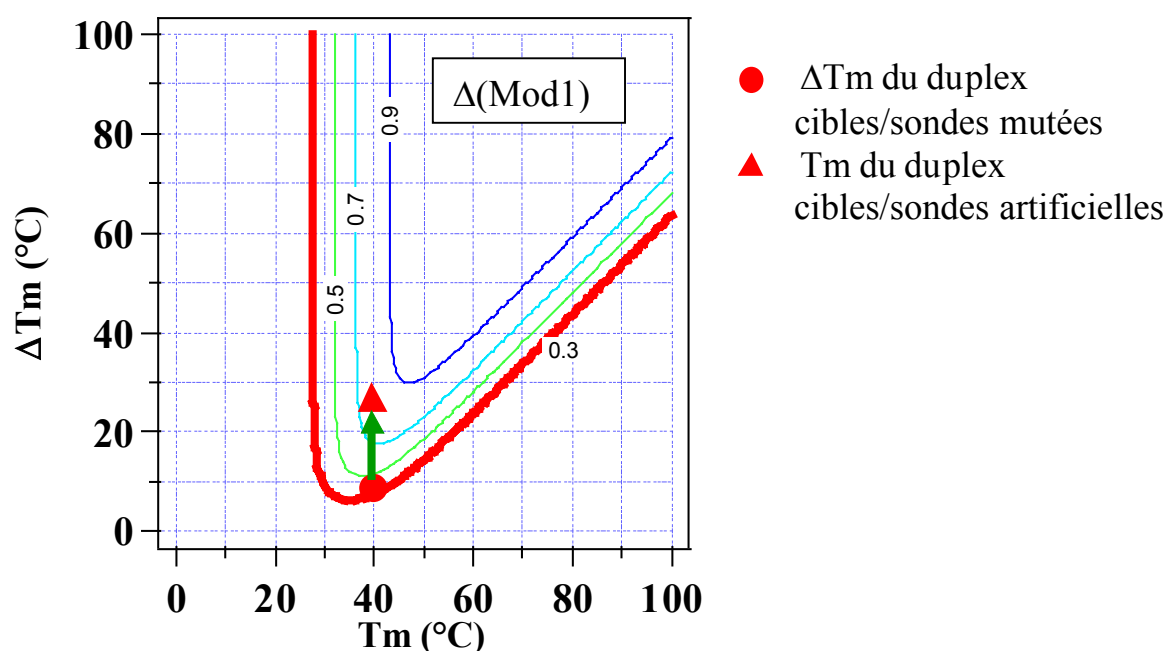


Figure 90: Effet de la mutation artificielle sur la température de fusion. Le point circulaire représente l'écart ΔT_m entre les duplex complémentaires et mutés avant l'introduction de la mutation. Le point triangulaire représente l'écart ΔT_m entre les duplex complémentaires et mutés après l'introduction de la mutation artificielle. Les courbes de niveaux représentent les $\Delta(\text{Mod1})$ et sont proportionnelles aux écarts de réflectivités observées. Plus les valeurs de ces écarts sont élevées, plus la spécificité de notre multicapteur est bonne.

La figure ci-dessus montre l'effet de l'ajout d'une mutation artificielle sur la réponse de notre multicapteur. Elle présente les valeurs des $\Delta(\text{Mod1})$ en fonction des T_m et des ΔT_m ainsi que les points illustrant la température de fusion des duplex complémentaires (T_m) et mutés ($T_m + \Delta T_m$). Le cercle prédit les écarts des variations de réflectivité observés entre les duplex totalement et partiellement complémentaires avant l'application de notre stratégie de choix de sonde alors que le triangle illustre les écarts prévus en utilisant les sondes artificielles. Cet exemple met en évidence l'amélioration de la sélectivité du multicapteur suite à l'introduction d'une mutation artificielle. En effet, sans l'utilisation de la sonde artificielle, il nous est impossible de distinguer la réponse des plots de sondes complémentaires de celle des plots de sondes mutées.

La figure suivante illustre un exemple de sondes conçues pour la mutation M470V :

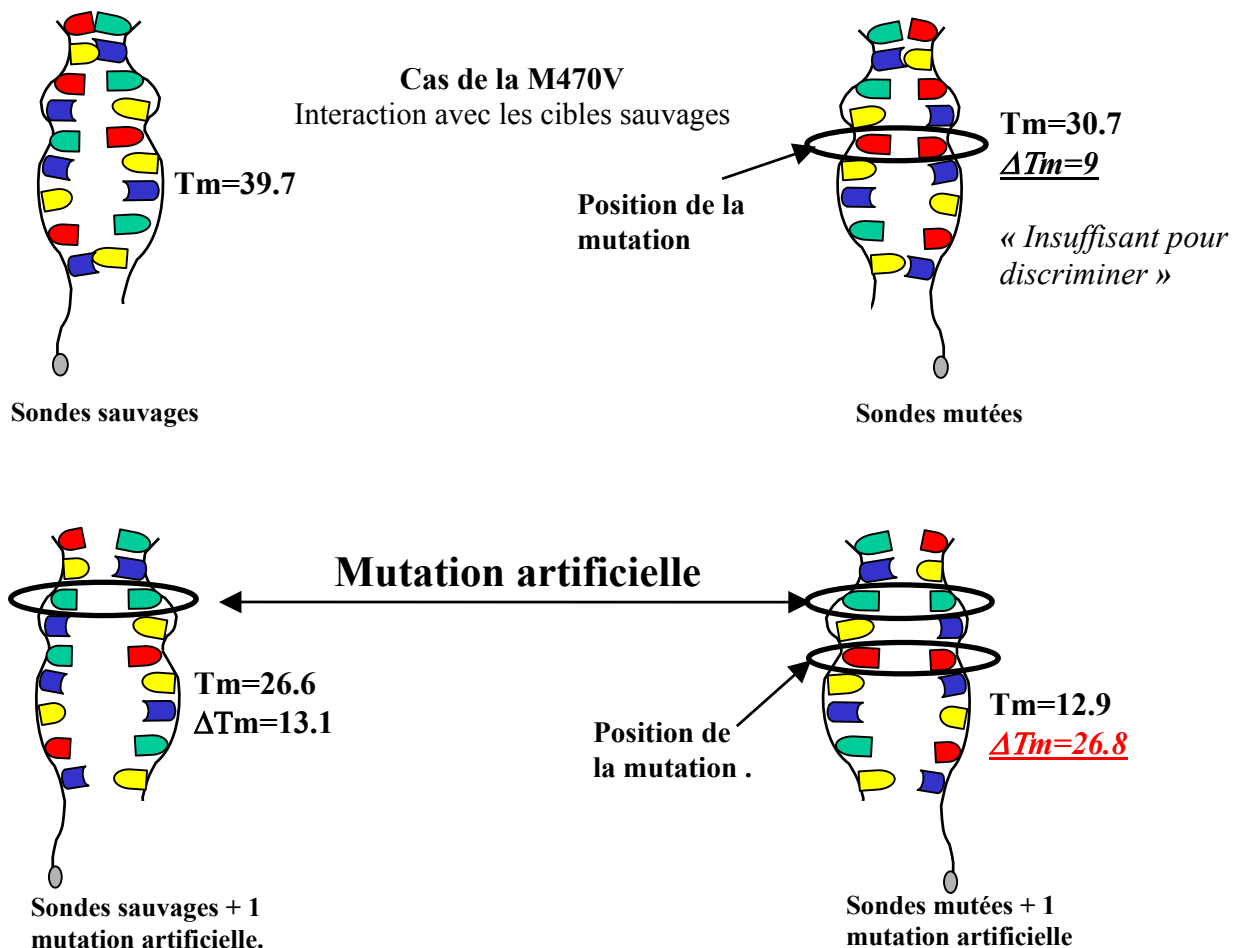


Figure 91: Illustration de la conception des sondes artificielles pour la mutation M470V. La présence de la mutation artificielle sur les sondes mutées entraîne une diminution drastique de la température de fusion. Par conséquent, l'efficacité d'hybridation (cible/sonde mutée+1 substitution artificielle) diminue et la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes artificielles doublement mutées par rapport aux cibles est faible.

Pour mieux analyser “à l’œil” les résultats, nous avons choisi de disposer les sondes dans un motif de base carré. La diagonale du carré est formée de la sonde sauvage ou mutée et de la sonde artificielle qui lui est doublement mutée. Si l’une des cibles sauvage ou mutée traverse la cuve, la réponse de ce motif est un triangle. Le sens du triangle nous permettra de déterminer la séquence mise en contact avec la surface (Figure 92).

Motif de dépôt sur la lame.

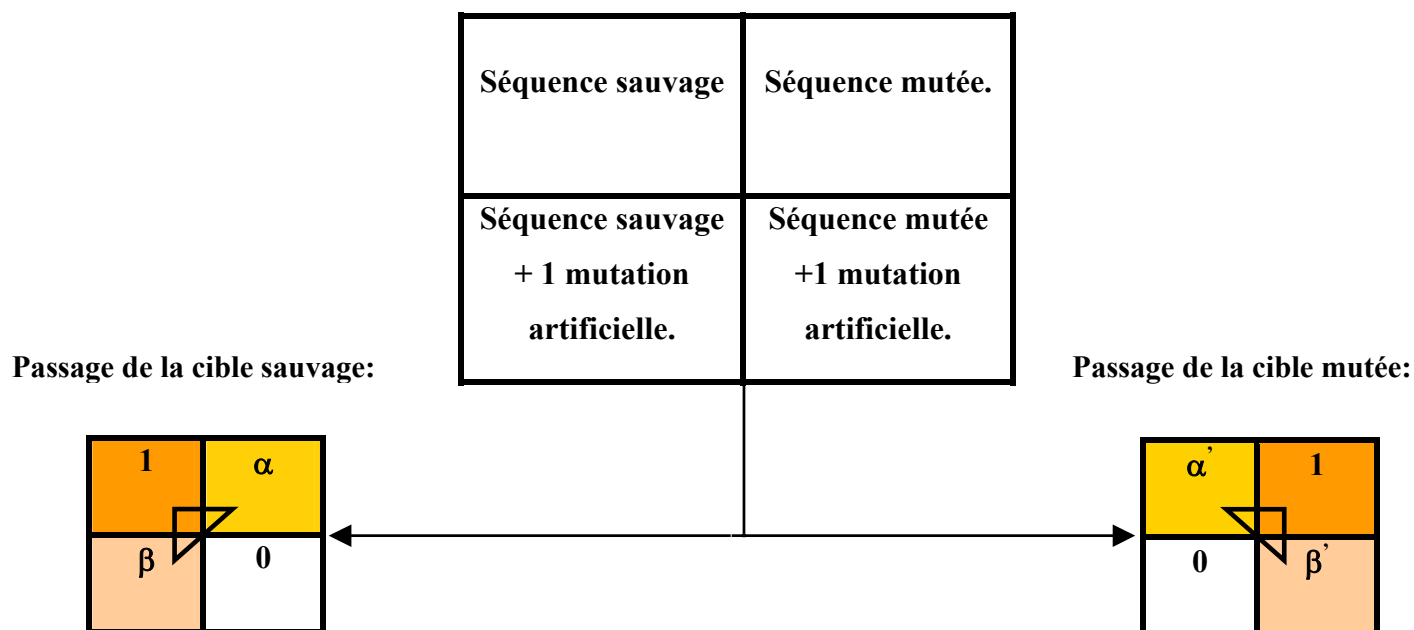


Figure 92: Motif de disposition des sondes sur la lame pour une meilleure discrimination rapide et visuelle. α et β sont compris entre 0.2 et 0.4%. Le sens du triangle nous permettra de déterminer rapidement la séquence cible qui est injectée sur la surface.

Dans le but du diagnostic génétique et comme chacun possède deux versions d’un même gène, nous avons aussi analysé le cas où nous injectons sur la surface des mélanges différents de cibles simulant des patients homozygotes (sauvages ou mutés) ou hétérozygotes. Cette démarche a pour but de visualiser la nouvelle réponse optique qui nous permettra de déterminer le génotype du patient testé et de la comparer à la réponse que nous avons observé au cours des premières expériences en multicapteur (cf. partie B de ce chapitre). Dans les deux cas, nous comparons la réponse d’un ensemble de quatre plots disposés selon un motif carré et portant des sondes correspondant à une mutation donnée. Dans nos premières expériences, une mutation était représentée par deux sondes : les sondes sauvages et mutées. Désormais, une mutation est représentée par 4 sondes différentes : (les sondes sauvages et

mutées plus deux sondes artificielles.). La réponse du multicapteur obtenue dans chacun de ces cas après l'injection d'un mélange, est présentée au tableau ci-dessous :

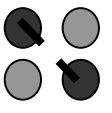
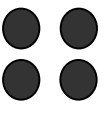
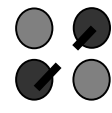
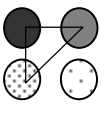
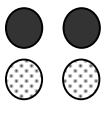
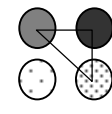
Génotype	Homozygote sauvage. SS	Hétérozygote SM	Homozygote muté. MM
Premières expériences			
Expériences actuelles			

Tableau 11: Illustration de l'effet de la stratégie de choix des sondes sur la discrimination attendue entre les trois types possibles de génotypes pour une mutation donnée. Cette dernière est représentée par de 4 plots dont nous analysons les réponses suite à l'injection d'un mélange de séquences cibles sauvages et/ou mutées. Au cours des "Premières expériences", nous avons cherché à détecter la présence éventuelle d'une plus forte diagonale (SS ou MM suivant les cas) ou d'une réponse équilibrée sur les 4 plots (cas SM). Dans nos "Expériences actuelles", notre analyse consiste à visualiser l'absence de signal dans un des coins (cas SS ou MM suivant la position), ou une réponse équilibrée sur les deux lignes (cas SM).

Ainsi, durant nos "premières expériences" nous avons basé notre diagnostic sur la recherche d'une diagonale affichant la variation de réflectivité la plus élevée (cas SS et cas MM) ou d'une variation de réflectivité identique sur tous les plots (cas SM). Dans nos expériences actuelles, nous recherchons des structures triangulaires (cas SS et MM) ou une réponse symétrique sur chacune des diagonales (cas SM).

Nous avons voulu tester expérimentalement notre modèle dans le cadre de la mucoviscidose. Pour cela, nous avons choisi les mutations les plus fréquentes de l'exon 10 qui sont au nombre de six (deux délétions et quatre substitutions).

Comme pour les études précédentes, les sondes sont biotinylées à leur extrémité 5'. La mutation retrouvée chez les patients est toujours localisée au centre de la séquence et à une distance de 24 bases à partir de la surface. Cette dernière contrainte a pu être respectée grâce au bras espaceur poly-T. En effet, toutes les séquences n'ayant pas le même nombre de bases, la longueur de l'espaceur a été modifiée afin de respecter la position de la mutation par

rapport à la chimie de surface. Ainsi, une sonde de 15 bases aura un bras espaceur de 17 T et une sonde 11 bases aura un bras espaceur de 19 T. En plus des sondes sauvages et mutées, et pour mettre en application la théorie de conception des sondes décrite plus haut, nous avons introduit au voisinage de la mutation habituelle et quand cela était nécessaire, une mutation artificielle dans le but d'améliorer la spécificité du multicapteur.

En premier lieu, nous avons choisi des cibles de même longueur que les sondes. De plus grandes longueurs engendreraient une augmentation de signal plus importante sans entraîner de perte de spécificité. Leur utilisation est envisageable dans de futures expériences.

La liste des sondes et des cibles commandées est donnée dans l'Annexe 11.

D.1.2 Calcul des T_m :

Les 6 mutations que nous avons choisies sont les mutations les plus fréquentes de l'exon 10 du gène CFTR. Nous avons appliqué la stratégie présentée ci-dessus pour la conception des sondes. Les températures de fusion ont été calculées par le programme Hyther pour une solution à 15.5 μ M en oligonucléotides simples brins et à 0.16 M en NaCl. En reportant les résultats sur les graphes représentant la variation de réflectivité normalisée par base en fonction des températures de fusion nous pouvons prédire les dR_{av} expérimentaux en multipliant par le nombre de base et par la constante $C=0.037\%$ par base. Les valeurs obtenues sont présentées au paragraphe suivant et sont données avec une marge d'erreur de 0.2% pour tenir compte du bruit ainsi que de la dispersion des résultats. Nous avons ainsi établi une liste de vingt sondes et douze cibles (Annexe 11) à commander, afin de pouvoir vérifier notre modélisation.

D.1.3 Résultats théoriques :

Étude théorique de la mutation M470V :

Nous connaissons déjà cette mutation qui a fait partie des deux études précédentes. Nous rappelons que c'est un polymorphisme qui se traduit, au niveau de la protéine, par le remplacement d'un acide aminé méthionine (M) par un autre acide aminé valine (V). Au niveau de la séquence d'ADN, cette modification se traduit, par une substitution d'une base A par une base G.

Le tableau suivant résume la réponse du multicapteur après injection dans la cuve des cibles sauvages, c'est -à -dire des cibles parfaitement complémentaires aux sondes ne portant pas la mutation.

	T _m	ΔT_m	Longueur	dR _{av} théorique en %
M470V Sonde sauvage (M470VS)	39.7	0	13 bases.	0.46
M470V Sonde mutée (M470VM)	30.7	9	13 bases.	0.30
M470V Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (M470VSM)	26.6	13.1	13 bases.	0.21
M470V Sonde mutée +1 mutation artificielle (M470VMM)	<u>12.9</u>	<u>26.8</u>	13 bases.	<u>0.09</u>

Tableau 12: Réponse du multicapteur en terme de T_m, ΔT_m et dR_{av} suite à l'injection des cibles sauvages relatives au polymorphisme M470V. La sonde artificielle doublement mutée par rapport à la cible sauvage, présente un écart de ΔT_m maximal et une variation de réflectivité minimale.

Représentées sur un histogramme, les variations de la réflectivité avant rinçage (dR_{av}) ont l'allure suivante :

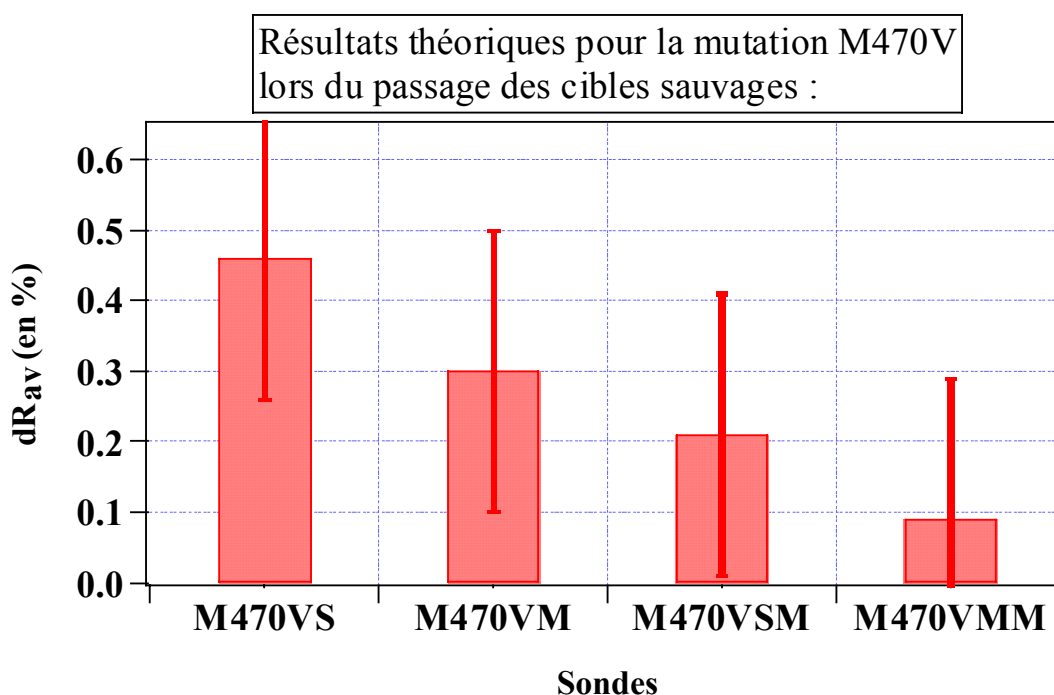


Figure 93 : Allure de la réponse théorique du multicapteur en dR_{av}. Les résultats expérimentaux attendus varient dans une marge de $\pm 0.2\%$ correspondant à notre barre d'erreur. Le recouvrement de réponse des sondes M470VS et M470VM illustre le problème que nous avons cherché à résoudre en appliquant notre nouvelle stratégie de choix des sondes. Les cibles sauvages correspondent aux cibles 3* 13 bases utilisées dans les expériences précédentes.

Les sondes artificielles, doublement mutées par rapport à la cible sauvage et possédant un ΔT_m maximal (26.8°C) affichent une variation de réflectivité minimale. Dans la matrice déposée, les plots qui leur correspondent ne doivent pas réagir avec les cibles.

La cible sauvage de cette mutation n'est autre que la cible (3* 13 bases) qui a été difficile à détecter au cours des expériences analysant l'effet de la longueur. L'ajout d'un plot où nous avons fixé des sondes doublement mutées par rapport à cette cible devrait donc suffire pour résoudre ce problème.

La cible mutée (séquence 4* 13 bases) possède une signature différente. En effet nous savons déjà, d'après l'étude portant sur l'effet de la longueur, que l'efficacité d'hybridation entre cette cible et la séquence normale est faible. Et donc qu'il est relativement facile de la mettre en évidence. Les calculs du tableau 12 ont confirmé ce fait et prédit que seuls deux plots sur quatre auront une dR_{av} supérieure au bruit quand la séquence 4* 13 bases sera mise en contact avec la surface.

	T_m	ΔT_m	Longueur.	dR_{av} théorique en %
M470V Sonde sauvage (M470VS)	23.4	20.1	13 bases.	0.12
M470V Sonde mutée (M470VM)	43.5	0	13 bases.	0.46
M470V Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (M470VSM)	<u>1.3</u>	<u>42.2</u>	13 bases.	<u>0.05</u>
M470V Sonde mutée +1 mutation artificielle (M470VMM)	31	12.5	13 bases.	0.25

Tableau 13: Réponse du multicapteur aux cibles mutées relatives à la mutation M470V en terme de T_m , ΔT_m et dR_{av} .

Les variations de réflectivité avant rinçage, données dans le tableau ci-dessus ont été représentées sous forme d'un histogramme (Figure 94).

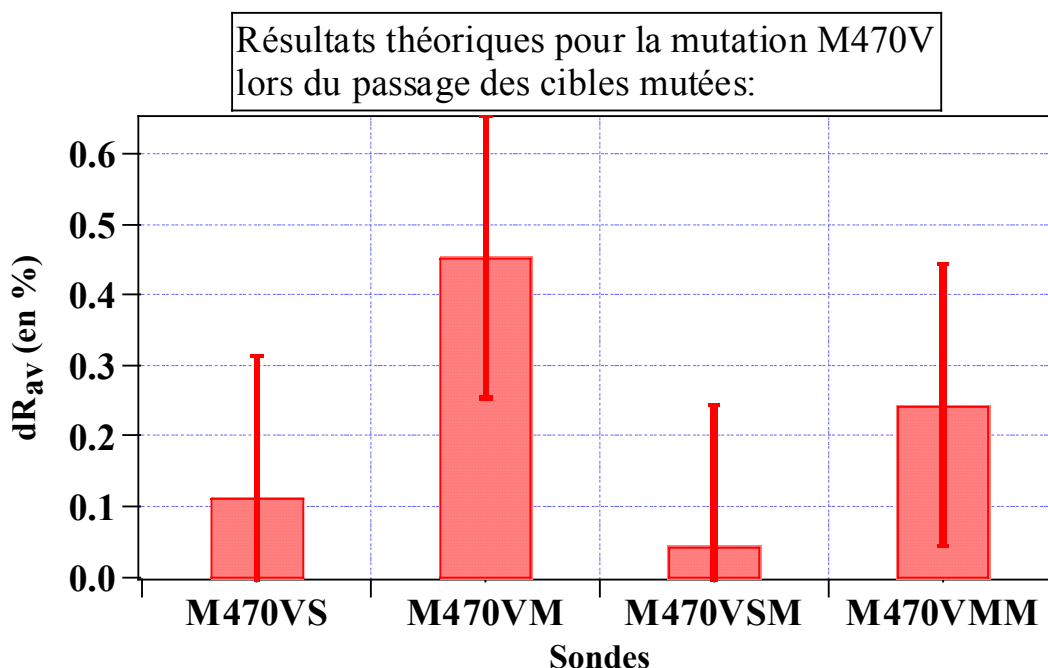


Figure 94: Histogramme représentant la variation de la réflectivité suite au passage des cibles mutées : séquence 4* 13 bases. Comme précédemment, la barre d'erreur correspond à la marge dans laquelle les résultats expérimentaux sont supposés varier.

La variation de réflectivité minimale correspond toujours aux plots de sonde où l'écart des T_m est maximal. L'étude théorique de la réponse des cinq autres mutations est donnée dans l'Annexe 12.

D.2 Premières expériences :

Les oligonucléotides commandés ont été déposés sur la surface d'or fonctionnalisée au MUA-PEI-ExtraAvidine selon un plan de matrice de 14*14 plots. La technique de dépôt est la même que celle adoptée dans les expériences précédentes. A savoir : le robot de dépôt Qarray place sur la surface d'or traitée chimiquement des gouttes de quelque nanolitres d'une solution d'oligonucléotides biotinylés. Ces sondes, diluées à une concentration de 7 μ M dans un tampon PBS 1X, 1.5 M en bétaine, sont réparties selon un motif défini par l'expérimentateur. Dans notre application, nous avons opté pour la distribution illustrée à la Figure 95 où les quatre sondes relatives à une même substitution sont réparties selon le modèle décrit à la page 173. Pour les délétions, nous avons conservé le même principe que dans les expériences précédentes à savoir : les sondes normales et mutées relatives à une même délétion occupent chacune les deux plots de la diagonale d'un carré élémentaire (2x2).

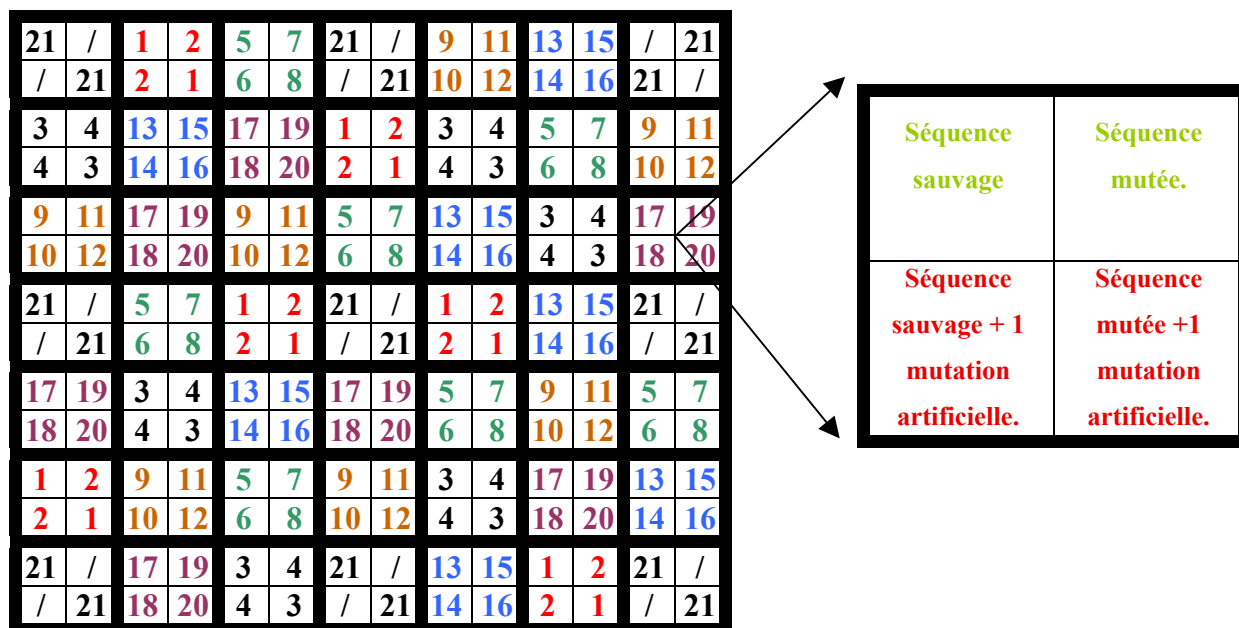


Figure 95: Distribution des séquences sur la surface. Pour les substitutions, nous retrouvons les motifs carrés présentés plus haut tandis que pour les délétions nous avons conservé le motif de bases utilisés lors des expériences précédentes, à savoir chacune des séquences sauvages et mutées relatives à une même délétion, occupe deux plots correspondant à l'une des diagonales d'un carré élémentaire de dimension (2*2).

Avec les correspondances suivantes :

ΔF508 :

Séquence sauvage↔1.

Séquence mutée↔2.

M470V :

Séquence sauvage↔5.

Séquence sauvage+1 mutation artificielle↔6.

Séquence mutée↔7.

Séquence mutée+1 mutation artificielle↔8 .

1716 G/A :

Séquence sauvage↔9.

Séquence sauvage+1 mutation artificielle↔10.

Séquence mutée↔11.

Séquence mutée+1 mutation artificielle↔12.

ΔI507 :

Séquence sauvage↔3

Séquence mutée↔4

Q493X :

Séquence sauvage↔13.

Séquence sauvage+1 mutation artificielle↔14.

Séquence mutée↔15.

Séquence mutée+1 mutation artificielle↔16.

V520F :

Séquence sauvage↔17.

Séquence sauvage+1 mutation artificielle↔18.

Séquence mutée↔19.

Séquence mutée+1 mutation artificielle↔20.

Les sondes 21 correspondent à une séquence non relevante de longueur égale à 13 bases et positionnée sur l'exon 17 du gène CFTR. Elles servent de contrôle des interactions non spécifiques. Les plots annotés par un / correspondent à des plots sans sondes permettant de suivre le comportement de la surface MUA-PEI-ExtrAvidine.

Chaque mutation a été représentée six fois alors que les sondes non relevantes ont été déposées sur 18 plots différents. La photo en air de la surface montre des plots de 200 μm de diamètres et séparés de 300 μm de centre à centre. L'ensemble est toujours inscrit dans une matrice de 4x4 mm^2 .

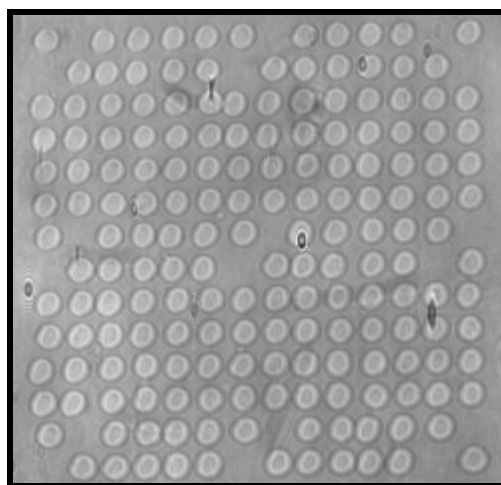


Figure 96: Photo des plots prise en air sur le dispositif d'imagerie par résonance des plasmons de surface. Nous comptons 196 plots de 200 μm de diamètre et distants de 300 μm de centre à centre. L'ensemble est inscrit dans un carré de 4 mm^2 .

D.2.1 Protocole expérimental :

Le déroulement des expériences suit le protocole décrit au paragraphe B.3 page 117. En effet, la surface est couplée au prisme d'indice 1.72 et mise en contact avec la cuve sur le dispositif d'imagerie par résonance des plasmons de surface. Elle est photographiée en air puis exposée au tampon PBS 1X. Les variations de la réflectivité sont tracées en fonction de l'angle d'incidence externe par le programme de calcul de réflectivité et ce pour chacun des plots. L'angle de travail est ainsi fixé et une solution de CP (cf. Tableau 3) est injectée afin de neutraliser les charges positives du PEI. Les cibles traversent ensuite la cuve l'une après l'autre ou en mélange. Le passage des cibles est accompagné par une augmentation de la réflectivité au niveau des plots concernés. Nous retrouvons alors les motifs triangulaires ou à deux plots que nous avons prédits.

D.2.2 Résultats expérimentaux :

Les premières expériences menées ont abouti à des résultats encourageants. En effet, les cibles sauvages ont été injectées séquentiellement dans la cuve du multicapteur dans l'ordre suivant M470V, Q493X, V520F, 1716 G/A puis $\Delta F508$. Les images différences obtenues sont présentées ci-dessous :

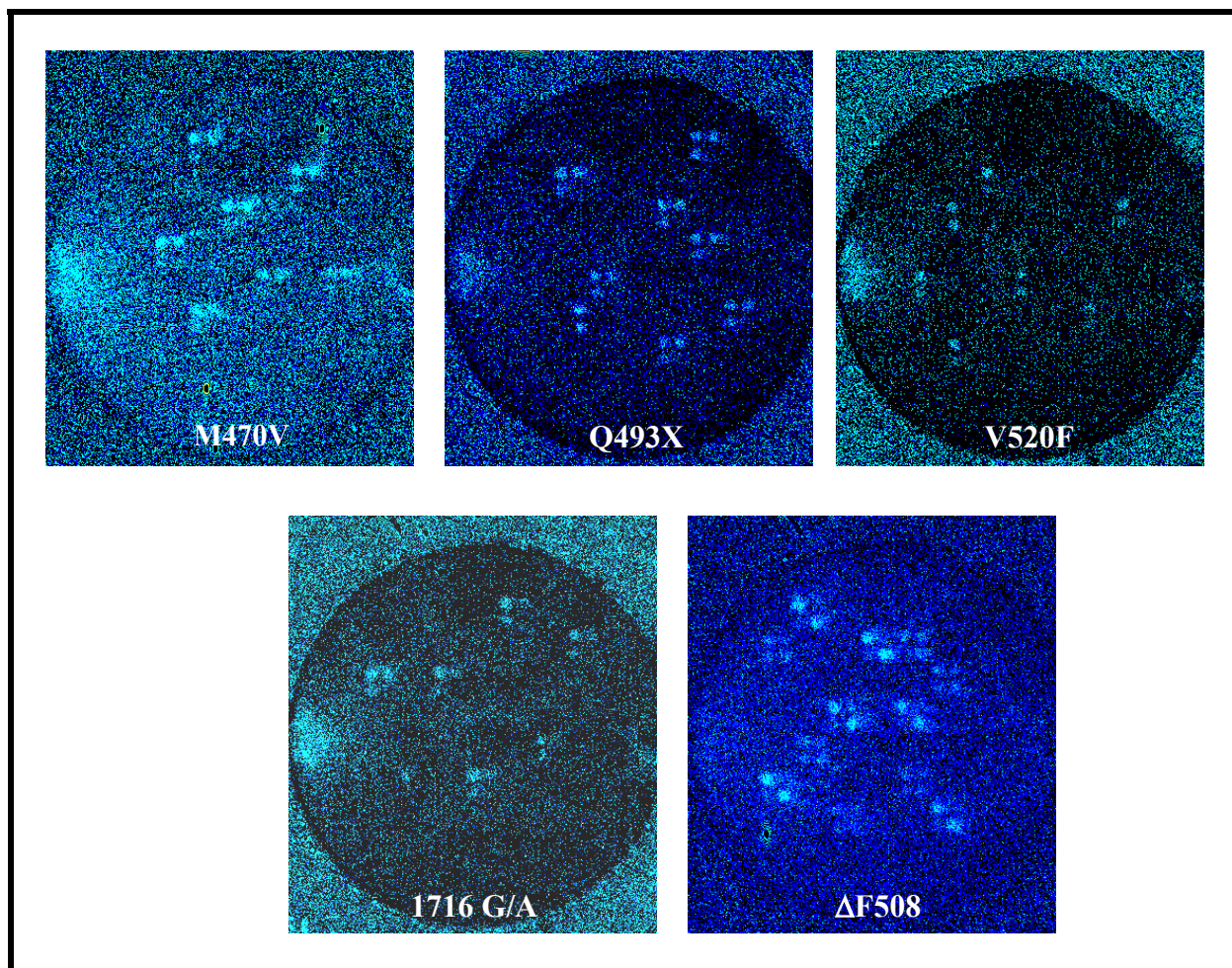


Figure 97: Différence d'image lors du passage des cibles sauvages liées successivement aux mutations M470V, Q493X, V520F, 1716 G/A et $\Delta F508$. Les structures attendues (en triangle ou en deux plots) apparaissent.

Sur ces figures, nous retrouvons la structure triangulaire prédite pour trois substitutions. En ce qui concerne la mutation V520F, seuls deux plots sont plus lumineux que le fond car pour la cible sauvage l'écart de T_m entre le duplex parfaitement complémentaire et le duplex muté est suffisant pour observer une discrimination. Ce phénomène est prédit par la théorie. Toutefois, il a été nécessaire de concevoir 4 sondes différentes, car la réponse à la cible mutée est moins discriminante.

D.2.3 Comparaison entre l'expérience et la théorie :

Nous avons aussi mesuré les variations de réflectivité avant rinçage, puis nous les avons reportées sur les histogrammes montrés plus haut. Ci-dessous, nous montrons un exemple de comparaison entre les résultats théoriques (TH) et expérimentaux (EXP) le reste étant disponible en Annexe 13. L'exemple donné illustre le passage des cibles sauvages et mutées relatives à la mutation M470V.

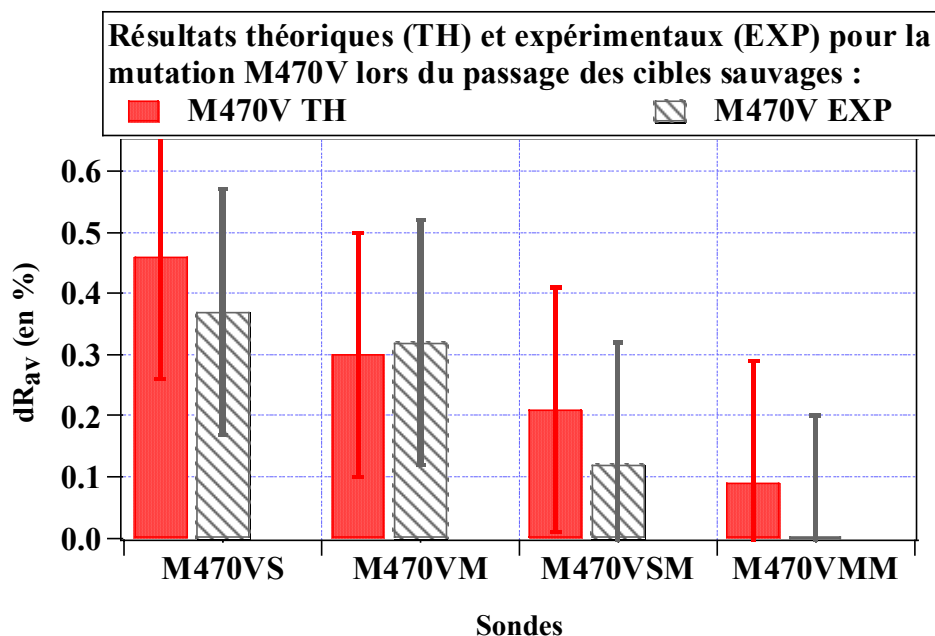


Figure 98: Comparaison des résultats théoriques (TH) et expérimentaux (EXP) lors du passage de la cible sauvage (3* 13 bases) relative à la mutation M470V. Les réponses prévues sont conformes aux résultats expérimentaux obtenus et montre que nous avons amélioré la spécificité du multicapteur en ajoutant une sonde artificielle doublement mutée par rapport à la cible injectée.

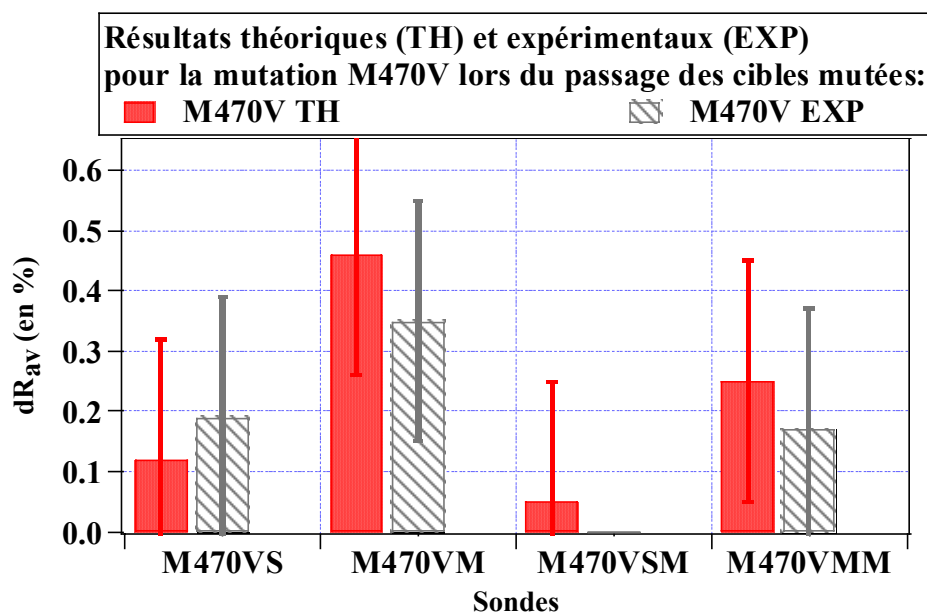


Figure 99: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible mutée (4* 13 bases) relative à la mutation M470V. Les résultats théoriques et expérimentaux sont en accord.

De ces deux figures présentées ci-dessus nous déduisons que la réponse théorique prévue correspond à la réponse expérimentale obtenue. Nous sommes capables désormais de détecter sans ambiguïté une substitution et ce en choisissant les sondes suivant la démarche décrite au paragraphe D.1 de ce chapitre IV. Nous avons ainsi amélioré la sélectivité de notre système optique.

Nous avons aussi étudié la variation de la réflectivité suite à l'injection dans la cuve d'un mélange de cibles sauvages et d'un mélange de cibles mutées. La réponse du multicapteur est illustrée à la Figure 100 où elle est comparée aux résultats obtenus avant l'optimisation des sondes.

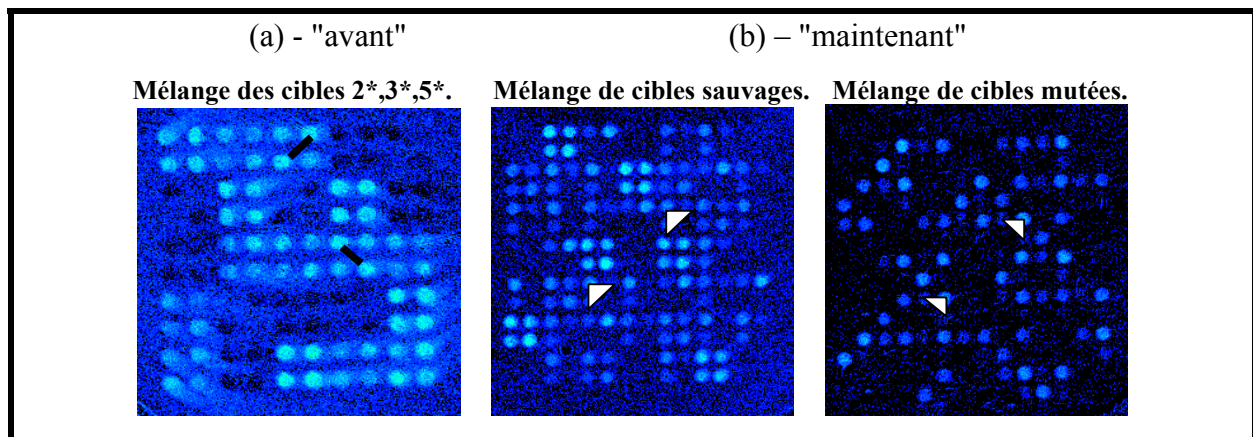


Figure 100: Résultats expérimentaux correspondant à l'envoi en mélange de différentes cibles représentant les séquences associées aux mutations *M470V*, *Q493X*, *V520F*, *1716 G/A* et $\Delta F508$ l'exon 10. Notons que, l'image obtenue "avant" (a) est constituée de carrés avec des diagonales plus ou moins marquées, alors que sur les photographies obtenues "maintenant" (b) les carrés où les diagonales étaient difficilement distinguables ont été remplacés par les motifs plus discriminants présentés précédemment. Le sens des triangles dépend de la composition du mélange testé.

Cette figure permet de comparer visuellement, sur une différence d'image, la réponse du multicapteur avant et après l'application de la stratégie de choix des sondes : la structure en diagonale (Figure 100 a) est remplacée par une structure triangulaire dont l'orientation dépend des cibles injectées (Figure 100 b). Ces formes montrent que notre technique de conception des sondes améliore la spécificité du multicapteur et peut être adaptée à la conception d'une puce à ADN dédiée à la mucoviscidose. Le test de l'hybridation entre les sondes ainsi conçues et les produits issus de patient est la dernière étape vers ce but. Elle constitue une partie des travaux futurs de notre équipe.

Récapitulatif :

Dans ce chapitre, nous avons utilisé les modélisations présentées au paragraphe C.2.3 de la page 161 pour développer une stratégie nous permettant de concevoir des sondes capables de révéler la présence d'une cible spécifique dans une solution. Nous avons aussi appliqué cette technique à la détection des mutations les plus fréquentes de l'exon 10 de la mucoviscidose. Les modélisations effectuées nous ont aussi permis de prédire la variation de réflectivité au niveau de chaque plot. Les expériences réalisées en utilisant les sondes conçues ont montré une concordance entre théorie et expérience. Cette étude nous a confirmé que la spécificité de notre appareil a été améliorée par un choix judicieux de sondes. Les premiers tests sur des produits obtenus sur de l'ADN de patients se sont révélés très encourageants et ont ainsi ouvert la voie vers la réalisation de la puce à ADN dédiée à la mucoviscidose.

Conclusion :

Dans ce dernier chapitre, j'ai résumé l'essentiel des travaux de recherche menés en multicapteur au cours de mes années de thèse. Ils sont axés sur l'étude de centaines d'interactions ADN/ADN par l'intermédiaire d'un système optique basé sur le principe de l'imagerie par résonance des plasmons de surface. Ainsi, j'ai montré la possibilité de réaliser un tel appareil avec une capacité d'identifier, de façon sélective, une cible circulant à la surface du capteur. Toutefois, quelques difficultés résidaient dans la détection d'une substitution, c'est pourquoi je me suis intéressée à l'étude de l'influence de la longueur des fragments d'ADN sur l'efficacité de l'hybridation cible/sonde et par suite sur la spécificité de la réponse du système optique. Cette étude, suscitée par l'article de Feriotto et al. [176], a mis en évidence la sensibilité des plasmons de surface aux interactions se déroulant avant rinçage et a débouché sur une explication, en terme de température de fusion (T_m), des phénomènes observés. La représentation des variations de réflectivité en fonction des températures de fusion nous a permis de déterminer une fonction permettant d'extrapoler un modèle théorique capable de prédire les variations de réflectivité de chaque sonde déposée vis à vis des cibles en solution. Nous avons pu ainsi maîtriser la réponse du multicapteur et par suite concevoir des sondes artificielles permettant la détection de la mutation recherchée. Cette étude théorique a été mise en application pour l'étude de six mutations (deux délétions et quatre substitutions). Les expériences réalisées montrent des résultats qui sont en bon accord avec ceux calculés par la théorie ce qui permet de valider notre modèle. Il est maintenant envisageable de concevoir une puce à ADN détectant des mutations ponctuelles sans l'utilisation de cibles marquées.

Conclusion et Perspectives

À la fin du vingtième siècle, et suite à la découverte de la molécule d'ADN et au lancement du projet de décryptage du génome humain, de nouvelles technologies, telles les biopuces, ont vu le jour. Par leur caractère pluridisciplinaire, elles suscitent une collaboration entre chercheurs venus de divers horizons et ont pour but l'étude des interactions bio moléculaires. C'est dans ce cadre que se situe ma thèse à la charnière entre la physique, la chimie et la biologie. En effet, au cours de ces quatre années mon but était de mettre en oeuvre un capteur optique multiparamétrique capable de mener, en temps réel, en parallèle et sans aucun marquage, une analyse de plus d'une centaine d'interactions ADN/ADN. Il s'agit donc d'établir une relation entre les signaux optiques mesurés et les réactions biologiques de surface afin de concevoir une biopuce adaptée au diagnostic génétique.

Plusieurs techniques de détection sont actuellement disponibles sur le marché, la plus répandue est la détection par fluorescence. En cette décennie, une autre méthode basée sur la résonance des plasmons de surface s'est développée en parallèle. Ce phénomène optique, décrit dans la première partie de la thèse, se produit à l'interface d'un métal et d'un diélectrique et est extrêmement sensible aux variations d'indice au voisinage de la surface métallique. Il se traduit par un pic d'absorption au niveau de la courbe représentant la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence. Une variation d'indice est associée à un décalage du pic et par suite à une variation de la réflectivité à angle fixe. Le métal le plus utilisé est l'or à cause de sa stabilité et de sa résistance aux traitements chimiques. Nous avons mis à contribution cette technique, mise au point par l'un des chercheurs du laboratoire, pour imager via un prisme, une couche mince de 50 nm d'or sur une caméra CCD reliée à un ordinateur. Cette configuration nous a permis de suivre localement et en temps réel l'évolution de la réflectivité en fonction du temps sur quelques centaines de plots (jusqu'à 200).

Dans une deuxième étape, nous nous sommes intéressés au traitement chimique de la surface afin de la rendre apte à fixer les molécules biologiques. Cette étape est critique. La surface idéale recherchée devait être inerte aux produits utilisés, robuste, reproductible et régénérable. Parmi les diverses méthodes testées, nous avons opté pour l'utilisation du complexe ExtrAvidine-biotine connu pour la grande affinité entre chacun de ses constituants.

La biotine a été greffée à l'extrémité 5' des molécules d'ADN tandis que l'ExtrAvidine a été fixée de façon électrostatique sur le polyéthylène imine (PEI), un polymère chargé positivement. Cette bicouche est à son tour fixée sur l'or par l'intermédiaire de l'acide mercapto-undécanoïque. Ce composé bifonctionnel présente une extrémité thiol ayant une grande affinité avec l'or et une terminaison COO^- qui fixe le PEI par liaison électrostatique. Les oligonucléotides biotinylés ont été déposés sur la surface par l'intermédiaire d'un robot à des concentrations de $7\ \mu\text{M}$ et dans un tampon PBS 1X avec 1.5 M de bétaine, produit qui retarde l'évaporation et nous permet ainsi d'obtenir des plots circulaires de bonne qualité.

Notre système a été appliqué à l'étude de mutations impliquées dans la mucoviscidose, maladie génétique récessive et létale qui a une incidence de 1/3000 en Europe. Nous avons vu qu'elle affecte gravement le système respiratoire et le tube digestif et qu'elle se manifeste aussi par une sueur de teneur élevée en sel. Au niveau génétique, cette maladie est liée à plus de 1000 mutations affectant le gène CFTR dont la plus connue et la plus répandue (67 à 70% des cas en Europe) est la délétion ΔF508 . C'est une délétion de trois bases qui se traduit par l'absence d'un acide aminé, la phénylalanine au niveau de la protéine codée. Nous nous sommes aussi intéressés au diagnostic de cette maladie. Le test le plus courant consiste à mesurer la concentration en sel de la sueur. Trois mesures supérieures à 60 mmole/l révèlent la maladie. De nos jours, les tests génétiques se développent de plus en plus. Ils permettent actuellement de détecter 31 mutations spécifiques dans le gène CFTR et de couvrir plus de 80% des malades en France. L'incidence de la majorité des mutations de la mucoviscidose est faible et varie d'une population à l'autre. Ce fait montre l'importance du développement d'une puce à ADN capable de révéler le plus grand nombre possible de mutations et donc d'assurer un recouvrement plus important des individus malades. C'est le but de mes travaux de thèse.

Nous utilisons pour cela l'imagerie par résonance des plasmons de surface. Nos premiers résultats ont été publiés dans la revue *Sensors and Actuators B*. Ils montrent que la réponse de notre système nous permet de distinguer la formation d'un duplex totalement complémentaire de celle d'un duplex partiellement complémentaire. Cette distinction est nette quand il s'agit d'une délétion. Le cas d'une substitution est plus subtil et nous a poussé à entamer une étude plus avancée portant sur l'influence de la longueur des oligonucléotides. Cette étude a fait ressortir deux points importants :

- 1) La capacité de la résonance des plasmons de surface à étudier des interactions même lors du passage des cibles sur la surface, ce qui est un avantage majeur sur la fluorescence.
- 2) L'importance de la composition en base des séquences ainsi que de la température de fusion.

La représentation des résultats en fonction de la température de fusion calculée par la méthode thermodynamique nous a permis d'établir une relation entre la réponse **optique du capteur et la température de fusion des duplex parfaitement ou partiellement complémentaires**. Nous avons ainsi pu modéliser la variation de réflectivité en fonction de la température de fusion calculée dans certaines conditions de concentration et de salinité par l'intermédiaire du programme Hyther mis à disposition sur Internet. Cette modélisation nous a permis d'expliquer la différence de comportement des diverses cibles utilisées et de prédire la réponse du capteur à toute hybridation entre cibles et sondes quelconques. Ainsi, nous avons pu concevoir des sondes capables de révéler par une absence d'hybridation les cibles recherchées. La stratégie de choix de sonde, basée sur le calcul des températures de fusion, a été appliquée aux six mutations les plus fréquentes de l'exon 10 du gène CFTR. Les résultats expérimentaux sont en bon accord avec les résultats prévus.

Cette étude a ouvert la voie à l'utilisation des produits provenant de patients. Les premiers tests sur des patients réels ont été réalisés et ont montré des résultats très encourageants.

Annexes

Annexe 1 : Glossaire :

Ce glossaire a été rédigé en se basant sur les définitions données par *Wikipédia, l'encyclopédie gratuite et libre* [177] ainsi que par *Le grand dictionnaire terminologique* [178] et *le glossaire : biotechnologie et bioinformatique* [179] disponibles en ligne sur Internet.

ADN (ou Acide DésoxyriboNucléique) : Macromolécule qui porte l'information génétique de tout être vivant. L'ADN est composé de deux longues chaînes de nucléotides orientées en sens inverse et qui forment une double hélice, jointe par des liaisons hydrogène entre les bases complémentaires (Adénine et Thymine ou Cytosine et Guanine).

ADN Recombinant : Molécule d'ADN composée de séquences nucléotidiques qui ont été ajoutées ou juxtaposées par manipulation in vitro.

Allèles : Un **allèle** est une version possible d'une séquence nucléotidique particulière d'un être vivant. Chez un individu, chaque gène est représenté sous la forme de deux allèles, situés au même endroit sur les chromosomes homologues. Les deux allèles sont soit identiques dans leur composition nucléotidique – l'individu est alors **homozygote** pour cet allèle – soit différents dans leur composition – l'individu est alors **hétérozygote** pour cet allèle.

ARN (ou acide ribonuléique) : C'est une macromolécule biologique formée de ribonucléotides permettant de transférer et de traiter l'information dans la cellule. L'ARN est une séquence d'acide nucléique linéaire, simple brin (=monocaténaire). On distingue différents types d'ARN dont les ARN messagers, les ARN de transfert, les ARN ribosomaux, les ARN nucléaires et les ARN cytoplasmiques.

ARN messager (ARNm) : C'est une forme particulière d'ARN qui permet la synthèse de protéine lors de la phase dite de traduction.

Chromosome : Éléments du noyau, visibles au moment de la division cellulaire, composés de l'ADN d'un être vivant. Ils sont le support de l'hérédité.
Le nombre des chromosomes chez l'être humain est de 46 (22 paires de chromosomes homologues et une paire de chromosomes sexuels).

Codon : Unité du code génétique formée par un triplet de **nucléotides** adjacents contenus dans l'ARN messager et codant pour un acide aminé.

Exon : Fragment d'un gène qui persiste dans l'ARN messager mature.

Glandes muqueuses : Glandes sécrétant le mucus.

Glandes sudoripares : Glandes sécrétant la sueur.

Gène : séquence d'ADN du génome d'un organisme vivant codant pour une protéine.

Génotype : Ensemble des variations génétiques (allèles) d'un organisme.

Glycoprotéine : Protéine portant des sucres et située généralement à la surface d'une cellule ou de l'enveloppe d'un virus.

Homozygote : séquence nucléique particulière qui est identique sur les deux chromosomes faisant partie d'une même paire.

Hétérozygote : séquence nucléique particulière qui présente des variations nucléotidiques sur les deux chromosomes faisant partie d'une même paire.

Intron : Fragment non codant d'un gène situé entre deux **exons**

Longueur d'onde : c'est la distance séparant deux crêtes successives d'une onde périodique. On la dénote communément par la lettre grecque λ (*lambda*). Mathématiquement, on peut la définir ainsi : si l'onde peut être représentée par une fonction périodique f qui prend comme argument la distance x , alors la longueur d'onde est la plus petite valeur positive de λ tel que pour tout x , on a :

$$f(x + \lambda) = f(x) .$$

Mésappariement (Mismatch en anglais) : non-appariement entre deux bases non complémentaires positionnées en vis à vis au sein d'un ADN double brin.

Non relevante : Une cible dite non relevante est une cible qui ne devrait pas interagir avec les sondes déposées sur la surface.

Une sonde dite non relevante est une sonde qui n'interagit pas avec les cibles injectées dans la cuve.

Permittivité : c'est une constante de proportionnalité qui relie l'intensité du champ électrique au déplacement électrique. Elle détermine les propriétés diélectriques du milieu étudié.

Point isoélectrique (pI) : pH auquel la molécule, dans une solution, ne se déplacera plus dans un champ électrique parce qu'elle n'a plus une charge électrique nette. Lorsque le pH de la solution est supérieur au pI de la molécule, celle-ci est chargée négativement et inversement

Polymerase Chain Reaction (PCR) : Technique d'amplification *in vitro* de séquences d'ADN. Cette technique permet amplifier une séquence spécifique d'ADN plus d'un milliard de fois et permet donc d'obtenir à partir d'un échantillon d'ADN d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie.

Polarisation transverse magnétique (TM) ou p ou // : La polarisation caractérise l'orientation du champ magnétique (ou électrique) de l'onde lumineuse. On dit qu'une polarisation est transverse magnétique quand le vecteur champ magnétique est perpendiculaire au plan d'incidence défini par la direction du faisceau incident et la normale à la surface.

Polarisation transverse électrique (TE) ou s ou $\perp$: On dit qu'une polarisation est transverse électrique quand le vecteur champ électrique est perpendiculaire au plan d'incidence.

Pompe Péristaltique : Pompe dans laquelle le fluide est acheminé par compression dans des tuyaux souples où il circule.

Substitution : Remplacement d'une base par une autre base différente dans une chaîne d'ADN.

Annexe 2 : Passage de l'angle d'incidence interne à l'angle de rasance externe :

Le but de cette annexe est d'établir la relation entre l'angle de rasance externe (θ) et l'angle d'incidence interne φ .

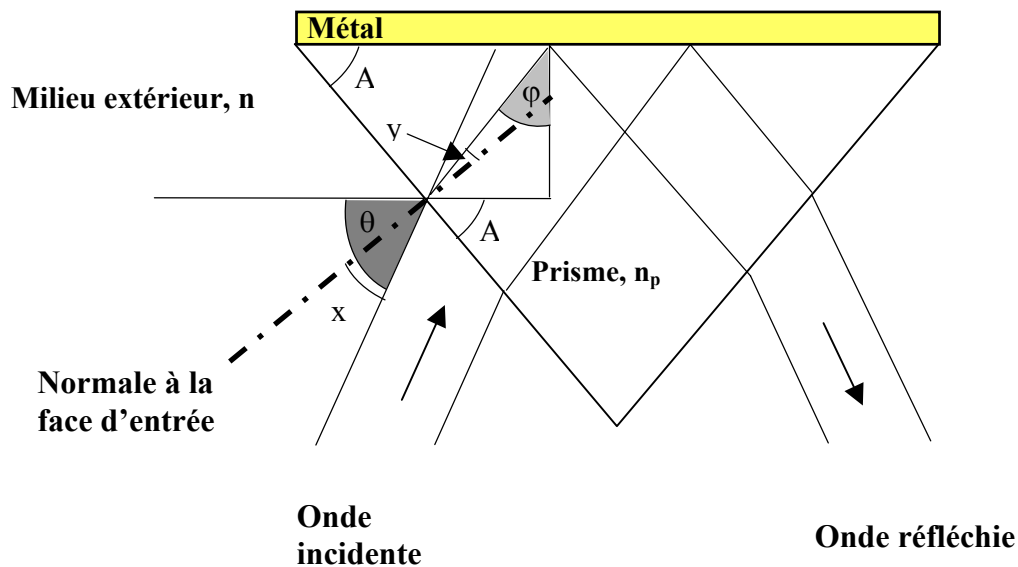


Figure 101: Trajet d'une onde lumineuse qui traverse la face d'entrée d'un prisme d'indice n_p , se réfléchit sur sa surface de base et sort par sa face de sortie. Notons n l'indice du milieu extérieur, x l'angle d'incidence externe, θ l'angle de rasance externe, y l'angle de réfraction, φ l'angle d'incidence interne et A l'angle au sommet du prisme.

Une onde incidente traverse un milieu extérieur d'indice n , se réfracte sur la face d'entrée d'un prisme d'indice n_p , se réfléchit sur sa surface de base et sort par sa face de sortie.

La relation de Descartes reliant l'angle d'incidence externe (x) et l'angle de réfraction (y) s'écrit :

$n \sin (x) = n_p \sin (y)$ où n et n_p sont les indices respectifs du milieu extérieur et du prisme.

D'autre part la relation entre l'angle de rasance externe et l'angle de réfraction est donnée par la relation :

$$\theta = \frac{\pi}{2} - A + x \text{ avec } A \text{ l'angle au sommet du prisme.}$$

La relation entre l'angle d'incidence interne et l'angle de réfraction s'écrit :

$$\varphi = A - y \text{ avec } A \text{ l'angle au sommet du prisme.}$$

Dans nos expériences nous travaillons avec un prisme d'angle au sommet $A = \frac{\pi}{3}$ et un milieu extérieur d'indice $n = 1$.

$$\Rightarrow \theta = \frac{\pi}{6} + x \text{ et } \varphi = \frac{\pi}{3} - y$$

La relation de Descartes devient alors :

$$\sin\left(\theta - \frac{\pi}{6}\right) = n_p \sin\left(\frac{\pi}{3} - \varphi\right)$$

A partir de cette relation nous constatons que θ augmente quand φ diminue.

Annexe 3 : Calculs de la sensibilité de la résonance des plasmons de surface :

Dans cette annexe nous calculons la sensibilité de la résonance des plasmons de surface par rapport à la variation de l'indice du milieu diélectrique et de son épaisseur. Les calculs sont tirés de la référence [61]. Leur but est d'estimer les variations minimales d'indice et d'épaisseur que nous pouvons détecter.

La composante longitudinale du vecteur d'onde incident $(K_{in})_x$ est proportionnelle à $\sin(\theta)$ avec θ l'angle d'incidence du faisceau lumineux. De ce fait, maximiser² la dérivée de R par rapport à θ revient à maximiser la dérivée de R par rapport à $(K_{in})_x$. Ensuite, connaissant notre bruit de mesure nous pouvons remonter aux valeurs minimales de variation d'indice et d'épaisseur que nous sommes capables de détecter.

Commençons d'abord par réécrire le vecteur d'onde des plasmons de surface à l'interface de deux milieux infinis :

$$K_{sp} = k_r + jk_i = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}} \quad (\text{Eq. 16})$$

L'introduction du prisme de couplage perturbe le vecteur d'onde K_{sp} qui s'écrit désormais :

$$K_{sp} = (k_r + \Delta k_{rp}) + j(k_i + k_{ip}) \quad (\text{Eq. 17})$$

Avec Δk_{rp} la perturbation introduite par le prisme et k_{ip} les pertes radiatives dues au couplage avec le prisme. L'onde incidente excitant les plasmons de surface possède un vecteur d'onde de composante longitudinale $(K_{in})_x = n_p k_0 \sin(\theta)$. Au voisinage de la résonance des plasmons de surface la réflectivité s'écrit :

² Nous cherchons à maximiser la variation de réflectivité par rapport à l'angle d'incidence pour que la plus faible variation des propriétés optiques du milieu diélectrique engendre une variation de réflectivité maximale.

$$R=1-\frac{4k_i k_{ip}}{((K_{in})_x-k^m)^2+(k_i+k_{ip})^2} \quad (\text{Eq. 18})$$

Avec $k^m=k_r+\Delta k_{rp}$. Il faut maintenant maximiser la dérivée de R par rapport à $(K_{in})_x$ pour cela il faut trouver les valeurs de $((K_{in})_x-k^m)$ qui annulent la dérivée seconde $\frac{d^2R}{d^2((K_{in})_x)}$. Les

calculs donnent
$$\left(\frac{dR}{d((K_{in})_x)}\right)_{Max} = 3\frac{\sqrt{3}}{2} \frac{k_i k_{ip}}{(k_i+k_{ip})^3} \quad (\text{Eq. 19})$$

Pour $(K_{in})_x-k^m=\pm(k_i+k_{ip})/3^{1/2}$.

$\left(\frac{dR}{d((K_{in})_x)}\right)_{Max}$ possède une valeur optimale pour $k_{ip}=k_i/2$ c'est à dire quand les pertes dans le prisme valent la moitié des pertes intrinsèques. Cette valeur vaut $\left(\frac{dR}{d((K_{in})_x)}\right)_{Max} = \frac{2\sqrt{3}}{9k_i}$. (Eq. 20)

Variation minimale d'indice :

Maintenant évaluons la variation d'indice minimale détectable. Pour cela introduisons le bruit de mesure N. Il correspond à la valeur expérimentale du bruit de mesure. Dans notre cas $N=5*10^{-4}$. D'autre part exprimons $(K_{in})_x$ et k_i en fonction des paramètres physiques n_p , ϵ_r et ϵ_i . ϵ_r et ϵ_i étant respectivement la partie réelle et imaginaire de la constante diélectrique dans le métal : $\epsilon_m=\epsilon_r+j\epsilon_i$. En tenant compte que pour un métal $-\epsilon_r \gg \epsilon_i$ et que $-\epsilon_r \gg \epsilon_d$ nous pouvons faire l'approximation suivante :

$$K_{sp}=k_0 n_d \left(1 - \frac{\epsilon_d}{2\epsilon_r} - \frac{\epsilon_d}{2\epsilon_r} + j \frac{\epsilon_i \epsilon_d}{2\epsilon_r^2}\right) \quad (\text{Eq. 21})$$

Avec $k_0=\frac{\omega}{c}$. Des équations (Eq.16) et (Eq.21) nous déduisons que $k_i=\frac{n_d^3 k_0 \epsilon_i}{2\epsilon_r^2}$. En remplaçant k_i par sa valeur dans l'équation (Eq.20) et en remarquant que la variation de réflectivité minimale est N et que $d(K_{in})_x$ et dk^m causent une même variation de R nous obtenons la formule suivante :

$$\lim(dk^m) = \frac{9N}{4\sqrt{3}} \frac{n_d^3 k_0 \varepsilon_i}{\varepsilon_r^2}. \quad (\text{Eq. 22})$$

Pour retrouver la variation minimale de l'indice que nous pouvons détecter, il faut remarquer que $\frac{dk^m}{dn_d} \cong k_0$ par suite la variation minimale de l'indice pouvant être détectée a pour expression : $\lim(dn_d) = \frac{1.3Nn_d^3 \varepsilon_i}{\varepsilon_r^2}$ (Eq. 23)

Pour un milieu diélectrique d'indice 1.334, un $\varepsilon_m = -13.59 + j 0.95$ et une fluctuation du signal (N) de $5 \cdot 10^{-4}$ nous sommes donc capables d'observer une variation d'indice $dn_0 = 8 \cdot 10^{-6}$.

Variation minimale d'épaisseur :

L'adsorption de molécules sur la surface métallique crée une couche de séparation entre le métal et le diélectrique. Pour déterminer l'épaisseur (a) minimale détectable par la résonance des plasmons de surface il faut il exprimer k^m en fonction de (a) puis calculer :

$$\lim(a) = \frac{\lim(dk^m)}{\frac{dk^m}{da}} \quad (\text{Eq. 24})$$

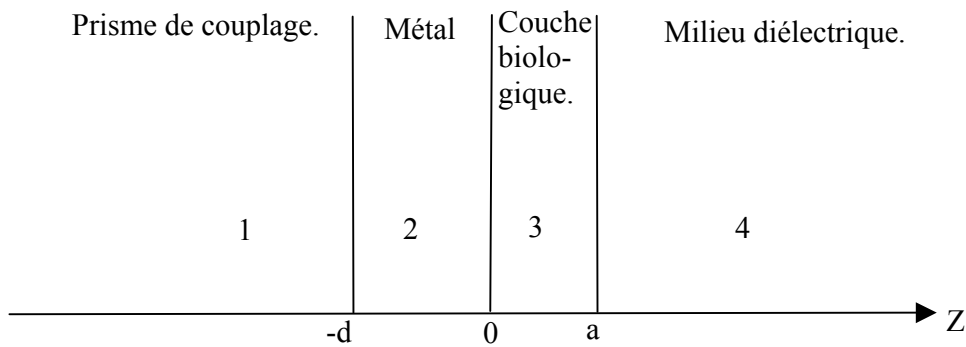


Figure 102: Distribution des épaisseurs selon l'axe vertical

Pour cela nous écrivons les expressions des champs électrique et magnétique dans chacun des trois milieux : métal, couche biologique et diélectrique. Les équations de Maxwell, les conditions aux limites pour $z=0$ et $z=d$ ainsi que la petite dimension de la couche biologique permettent d'écrire :

$$\frac{k_{z2}\varepsilon_4}{k_{z4}\varepsilon_2} = j a k_{z3} \left(\frac{k_{z2}\varepsilon_3}{k_{z3}\varepsilon_2} \frac{k_{z3}\varepsilon_4}{k_{z4}\varepsilon_3} \right) = p \quad (\text{Eq. 25})$$

En constatant que $k_z^2 + k_x^2 = \varepsilon k_0^2$ l'équation (Eq.25) nous donne une relation entre k^m et p et entre p et a . La limite de (a) s'écrit alors : $\lim a = \frac{\ln(dk^m)}{\frac{dk^m}{dp} \frac{dp}{da}}$. Les calculs de $\frac{dk^m}{dp}$ et $\frac{dp}{da}$

permettent finalement d'obtenir :

$$\lim a = 0.1 \frac{\varepsilon_i}{|\varepsilon_r|^{\frac{3}{2}}} \frac{n_d}{n_f - n_d} \lambda N \quad (\text{Eq. 26})$$

Avec n_f l'indice du milieu biologique. Dans nos conditions d'expérience où $\lambda = 660$ nm, $\varepsilon_r = -13.59$, $\varepsilon_i = 0.95$, $n_d = 1.334$, $n_f = 1.41$ et $N = 5 \cdot 10^{-4}$ l'épaisseur minimale observée est de 0.01 nm.

Ainsi le système utilisé nous permet de détecter une variation d'indice Δn de l'ordre de $8 \cdot 10^{-6}$ et une variation d'épaisseur Δe de l'ordre de 0.01 nm

Annexe 4 : Protocoles d'utilisation des polymères PACl et PMACl :

Produits chimiques utilisés :

Durant ces premières expériences nous avons utilisé les produits chimiques suivants : la cystéamine, les polymères PACl et PMACl synthétisés au laboratoires [94], de l'EDC (1,3-(diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide), de la NHS (N-hydroxysuccinimide), de l'ExtrAvidine, de l'éthanolamine ainsi que des oligonucléotides biotinylés et non biotinylés. Comme solvant nous avons utilisé l'éthanol, le dichloroéthane, l'eau, le tampon PBS à pH 7.4 et 8.5.

Fonctionnalisation de la surface :

Nettoyage des lames :

- Pré rayer les lames de microscope de dimension 75 x 25 cm en 4 petites lamelles (trois de 25*20 mm et une de 25*15 mm).
- Les nettoyer avec un jet d'air comprimé sur la partie verre afin de supprimer les débris générés.
- Les rincer à l'eau pure, et les sécher à l'air comprimé en salle blanche.
- Les rincer successivement à l'EtOH et à l'eau (18.2 MΩ). Cette opération est effectuée à deux reprises.
- Les sécher à l'air comprimé.

Dépôt et activation des polymères :

- Diluer la cystéamine dans de l'éthanol à une concentration de 0.05 mole/l.
- Plonger lame d'or dans la solution de cystéamine ainsi préparée et laisser interagir toute la nuit.
- Rincer abondamment à l'éthanol pour éliminer les résidus de cystéamine qui n'ont pas réagi.
- Diluer les polymères à 5% dans du dichloroéthane
- Filtrer la solution obtenue et y plonger la lame d'or couverte de cystéamine.
- Laisser incubé pendant 6h sous agitation.

- Rincer abondamment la surface au dichlorométhane, puis à l'éthanol puis à l'eau.
- Plonger la lame dans un tampon phosphate 0.1 mole/l de pH.=8.5 pendant 48h à 45°C afin d'hydrolyser les fonctions chlorures d'Acyle.
- Rincer à l'eau. Les surfaces ainsi obtenues sont hydrophiles et peuvent être conserver plusieurs semaines.
- Exposer les surfaces couvertes de polymère hydrolysé à une solution de N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0.05 mole/l et de 1,3-(diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide (EDC) à 0.2 mole/l en solution dans l'eau.
- Laisser incubé pendant 30 minutes. Cette étape a pour rôle d'activer les groupements carboxyliques du polymère hydrolysé en ester de N-hydroxysuccinimide (NHS).

À la fin de l'activation, la surface est capable de fixer des molécules aminées. Pour cela nous avons essayé de fixer les molécules d'ADN en utilisant deux voies différentes.

Fixation des molécules d'ADN (Voie 1) :

Cette partie de la fonctionnalisation s'est déroulée sur le montage mono capteur décrit au premier chapitre de cette thèse. Il s'agit de fixer des molécules d'ADN aminées sur le polymère activé en suivant les étapes ci-dessous :

- Injecter de l'eau dans la cuve.
- Diluer les oligonucléotides aminés dans un tampon phosphate (0.15 M en NaCl de pH 7.4) à une concentration de 14 μ M.
- Faire circuler la solution d'oligonucléotides préparée au dessus de la surface pendant 25 minutes.
- Rincer à l'eau pendant 25 minutes

Comme le taux de fixation des molécules aminées était très faible (moins de 10 fmoles/mm²), nous avons varié la concentration des oligonucléotides entre 14 et 70 μ M pour favoriser le greffage des NH₂ et la concentration saline du tampon entre 0.15 et 0.3 M pour diminuer les interactions électrostatiques entre la surface et les oligonucléotides chargés négativement.

Ces tests n'ont pas permis d'améliorer la fixation des oligonucléotides aminés.

Fixation des molécules d'ADN (Voie 2) :

Comme précédemment le déroulement des interactions est suivi en temps réel sur le montage mono capteur décrit au premier chapitre de la thèse. Cette voie consiste à fixer des molécules d'ExtrAvidine sur la surface de polymère activé. Des molécules d'ADN biotinylées sont ensuite fixées sur cette dernière couche par l'intermédiaire de la liaison ExtrAvidine/biotine. Les étapes suivies sont :

- Injecter de l'eau dans la cuve.
- Préparer une solution d'ExtrAvidine à 0.2 g/l diluée dans un tampon PBS 0.137 M pH 7.4.
- Injecter cette solution dans la cuve pendant 30 minutes.
- Rincer avec la solution PBS 0.137 M pH. 7.4.
- Injecter de l'eau pendant une dizaine de minutes.
- Préparer une solution d'éthanolamine (0.5 M pH=7.8)
- Injecter la solution préparée et la laisser circuler pendant 20 minutes. Cette étape a pour but de désactiver les esters de NHS n'ayant pas réagi et d'empêcher les interactions non spécifiques entre le polymère et les oligonucléotides.
- Rincer à l'eau pendant une dizaine de minutes.
- Rincer avec la solution PBS 0.137 M pH. 7.4 pendant une dizaine de minutes
- Préparer une solution d'oligonucléotides biotinylés à 14 μ M dilués dans un tampon PBS 0.137 M.
- Faire circuler cette solution au-dessus de la surface pendant 15 minutes pour fixer les oligonucléotides biotinylés.
- Rincer avec la solution PBS 0.137 M pH. 7.4 pendant une dizaine de minutes.
- Préparer, dans un tampon PBS 0.137 M, une solution d'oligonucléotides non biotinylés et non complémentaires aux séquences fixées. Cette solution possède une concentration de 15 μ M.
- Faire circuler la solution préparée au-dessus de la surface pendant 15 minutes pour vérifier l'absence des interactions non spécifiques.
- Rincer avec la solution PBS 0.137 M pH. 7.4 pendant une dizaine de minutes.

Cette étape a révélé la présence de réactions non spécifiques. Pour rechercher la source de ces interactions nous avons désactivé le polymère à l'éthanolamine juste après son activation. Ensuite nous avons injecté la solution contenant des cibles non biotinylées préparée ci-dessus. Après rinçage au PBS, nous observons une variation de réflectivité, ce qui signifie qu'il y a eu fixation des cibles non biotinylées sur la surface. Cette démarche suggère donc que la désactivation à l'éthanolamine était responsable des interactions non spécifiques. Pour résoudre ce problème nous avons suivi la démarche suivante :

- Après la fixation de l'ExtraAvidine injecter, dans la cuve, pendant 25 minutes, une solution tampon PBS pH 8.5 pour désactiver les groupements ester de NHS qui n'ont pas réagi.
- Rincer avec une solution tampon PBS 0.137 M pH 7.4 pendant une dizaine de minute.
- Préparer une solution d'oligonucléotides biotinylés à 14 μ M dilués dans un tampon PBS 0.137 M pH 7.4.
- Faire circuler cette solution au-dessus de la surface pour fixer les oligonucléotides biotinylés.
- Rincer avec la solution PBS 0.137 M pH. 7.4.

À ce stade, le taux de fixation des molécules biotinylées était faible (moins de 10 fmoles/mm²) et l'expérience a été abandonnée.

Ainsi dans cette annexe j'ai présenté les protocoles expérimentaux basés sur l'utilisation de polymères interagissant de façon covalente avec des radicaux aminés. Ces expériences ont abouti à des résultats non satisfaisants et ont été abandonnées.

Annexe 5 : Protocole expérimental pour la fonctionnalisation des lames d'or :

Produits chimiques utilisés :

La construction de la surface nécessite trois produits commerciaux : l'acide 11-mercaptoundécanoïque ou MUA, le poly(éthylène imine) ou PEI, et l'ExtrAvidine. Ils sont tous achetés chez Sigma Aldrich. En plus, trois solvants nous sont nécessaires : l'Ethanol absolu, l'eau ultra pure ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) et le PBS 1X (0.137 mM en NaCl, pH 7.4).

Fonctionnalisation de la surface :

Nettoyage des lames :

- Pré rayer les lames de microscope de dimension $75 \times 25 \text{ cm}$ en 4 petites lamelles (trois de $25 \times 20 \text{ mm}$ et une de $25 \times 15 \text{ mm}$).
- Les nettoyer avec un jet d'air comprimé sur la partie verre afin de supprimer les débris générés.
- Les rincer à l'eau pure, et les sécher à l'air comprimé en salle blanche.
- Les rincer successivement à l'EtOH et à l'eau ($18.2 \text{ M}\Omega$). Cette opération est effectuée à deux reprises.
- Les sécher à la centrifugeuse à 1650 tours par minute pendant 5 minutes.

Dépôt du MUA :

- Peser 55,3 mg de MUA.
- Les dissoudre dans 250 ml d'EtOH absolu en utilisant une éprouvette graduée en verre. La concentration de la solution ainsi préparée est égale à 0.22 g/l .
- Homogénéiser la solution en agitant manuellement l'éprouvette.
- La filtrer avec des filtres de porosité égale à $0.45 \text{ }\mu\text{m}$.

- Déposer les lames sèches dans un portoir horizontal l'une au-dessus de l'autre.
- Les plonger dans le bain de MUA pendant 17h et les agiter horizontalement à 50 tours par minute afin de conserver l'homogénéité de la solution tout au long de la fixation du MUA.

Dépôt du PEI :

- Peser 625,3 mg de PEI.
- Les dissoudre dans 250 ml d'eau 18.2 MΩ.cm dans une fiole jaugée en verre. La solution finale est à 2.5 g/l.
- Agiter la solution dans le but de l'homogénéiser.
- Diluer 50 ml de PBS 10X dans 450 ml d'eau 18.2 MΩ.cm pour obtenir du PBS 1X.
- Rincer les lames trois fois successives à l'EtOH absolu puis trois fois successives à l'eau à 18.2 MΩ.cm.
- Rincer le bûcher et le portoir ayant servi la nuit une fois à l'EtOH et trois fois à l'eau.
- Filtrer la solution de PEI avec les filtres de porosité égale à 0.45 µm.
- Rincer le bûcher une fois au PEI filtré afin d'éliminer toute trace d'eau.
- Mettre les lames dans le portoir et les plonger dans le bain de PEI pendant 50 minutes tout en les agitant horizontalement à 50 tour par minute.
- Rincer les lames trois fois à l'eau 18.2 MΩ.cm.
- Les sécher par centrifugation à 1300 tours par minute.
- Diluer la solution mère d'ExtraAvidine (1 g/l dans le tampon PBS 1X) dans le tampon PBS 1X déjà préparé pour obtenir une solution à 0.2 g/l. (NB : la

solution mère est aliquotée par cent micro litres. Chaque aliquot est utilisé à deux reprises au maximum.)

Fixation de l'ExtrAvidine :

- Déposer 40 µl de la solution d'ExtrAvidine 0.2 g/l sur chacune des quatre petites lamelles à l'aide d'une pipette de 200 µl.
- A l'aide d'une lame couvre objet, étaler la goutte d'ExtrAvidine sur la surface et laisser interagir pendant une demi-heure.
- Tourner la lame côté or vers le sol dans un bêcher contenant une solution de PBS 1X. La lame couvre objet glisse et tombe au fond du bêcher.
- Agiter la lame dans la solution de PBS 1X pour la rincer.
- Rincer la lame dans l'eau ultra pure (18.2 MΩ.cm) pour éviter toute trace de sel lors du séchage.
- Mettre les lames rincées à l'eau dans un tube falcon et les centrifuger à 900 tours par minute. Les lames sont enfin prêtes au dépôt (elles se conservent au frais pour une semaine au moins).

Dépôt des oligonucléotides biotinylés :

Technique de dépôts :

- Hydrater les lames fonctionnalisées au-dessus d'un bain-marie pendant un quart d'heure avant le dépôt.
- Diluer les oligonucléotides biotinylés dans une solution de PBS 1X avec de la bétaine (1.5 M), pour retarder l'évaporation (le volume total de la solution est de 50 µl).
- Les préparer par 50 µl dans des tubes à PCR.
- Répartir 10 à 20 µl de chaque produit dans une plaque de 384 puits. Le reste de l'aliquot est congelé à -20 et servira une à deux fois encore.

- L'aiguille plonge dans le puits puis dépose le produit sur la lame. L'opération est répétée jusqu'à ce que tous les plots d'une même espèce soient mis sur la surface à trois reprises chacun. Ensuite l'aiguille subit deux lavages. Elle est d'abord nettoyée à l'alcool et ensuite rincée à l'eau. Un coup d'air comprimé termine l'opération. L'aiguille sèche est prête à déposer les plots d'une seconde espèce.
- A la fin du dépôt couvrir la plaque d'un papier adhésif et la mettre au congélateur (-20°C). Elle servira pour un deuxième dépôt.
- Hydrater les lames au-dessus d'un bain-marie pendant 5 minutes pour favoriser la fixation de la biotine.
- Conserver les surfaces ainsi fonctionnalisées à 4°C dans des tubes en plastique. La durée de conservation minimale testée est de trois mois.

NB :

- Le robot de dépôt QArray de GENETIX, dont la photo est représentée à la Figure 33, est utilisé pour les répartir sur la surface suivant la matrice désirée. Dans le cadre de notre application, la partie du robot servant au dépôt des plots (la tête) est une aiguille pleine et pointue.
- Le dépôt se fait en atmosphère humide afin de laisser le temps au complexe ExtrAvidine-biotine de se former. L'aiguille dépose trois fois le même produit au même endroit de la lame avec une profondeur d'impression de -150 μm . Nous obtenons alors des plots de quelque nanolitres ayant un diamètre de 200 μm .

Annexe 6 : Quelques chiffres clés :

Cette annexe nous permet d'évaluer l'impact de la mucoviscidose dans la société française. Les chiffres sont tirés de la référence [162].

- ☛ 1 malade sur 2500 naissances environ.
- ☛ 1 malade naît chaque jour.
- ☛ Environ 5 à 6000 malades en France.
- ☛ 1 personne sur 25 est porteuse du gène, soit environ 2 500 000 individus.
- ☛ 10 % des malades ont des antécédents familiaux.
- ☛ Âge moyen du diagnostic : 7 mois.

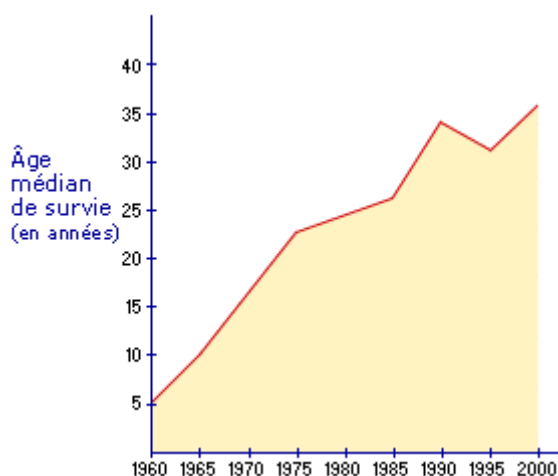


Figure 103: Evolution de l'espérance de vie d'un malade atteint de la mucoviscidose.

Annexe 7 : Paramètres thermodynamiques des dix plus proche voisin :

L'application de la méthode du plus proche voisin aux acides nucléiques a commencé avec Tinoco en 1962 [180] et Zimm en 1964 [181]. Cette méthode consiste à calculer l'entropie, l'enthalpie et l'énergie libre des ADN double brins en sommant l'entropie, l'enthalpie et l'énergie libre de chaque proche voisin de ces constituants.

Nous distinguons dix couples de proches voisins : AA/TT, AT/TA, TA/AT, CA/GT, GT/CA, CT/GA, GA/CT, CG/GC, GC/CG, GG/CC. Le sens de lecture des couples étant 5'3'/3'5'. Les paramètres thermodynamiques de chacun de ces couples, dans une solution à 1M en NaCl, sont tabulés. Trois tableaux sont disponibles et sont donnés ci-dessous. Le plus récent étant celui de John SantaLucia publié en 1998.

Séquence	$-\Delta S^\circ$ (cal/K.mol)	$-\Delta H^\circ$ (Kcal/mol)	$-\Delta G_{37^\circ}$ (Kcal/mol)
AA/TT	24	9.1	1.66
AT/TA	23.9	8.6	1.19
TA/AT	16.9	6.0	0.76
CA/GT	12.9	5.8	1.8
GT/CA	17.3	6.5	1.13
CT/GA	20.8	7.8	1.35
GA/CT	13.5	5.6	1.41
CG/GC	27.8	11.9	3.28
GC/CG	26.7	11.1	2.82
GG/CC	26.6	11.0	2.75
Initiation	10.8		

Tableau 14 : Valeur des différents paramètres thermodynamiques des dix couples de plus proches tel que fournis par K.J. Breslauer et al. en 1986 [182].

Séquence	$-\Delta S^\circ$ (cal/K.mol)	$-\Delta H^\circ$ (Kcal/mol)	$-\Delta G_{37^\circ}$ (Kcal/mol)
AA/TT	21.9 ± 1.3	8.0 ± 0.3	1.2 ± 0.1
AT/TA	15.2 ± 1.3	5.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
TA/AT	18.4 ± 1.3	6.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
CA/GT	21.0 ± 1.3	8.2 ± 0.3	1.7 ± 0.1
GT/CA	25.5 ± 1.3	9.4 ± 0.3	1.5 ± 0.1
CT/GA	16.4 ± 1.3	6.6 ± 0.3	1.5 ± 0.1
GA/CT	23.5 ± 1.3	8.8 ± 0.3	1.5 ± 0.1
CG/GC	29.0 ± 1.3	11.8 ± 0.3	2.8 ± 0.1
GC/CG	26.4 ± 1.3	10.5 ± 0.3	2.3 ± 0.1
GG/CC	28.4 ± 1.3	10.9 ± 0.3	2.1 ± 0.1
Initiation	9 ± 1.3	-0.6 ± 0.3	-3.4 ± 0.1

Tableau 15 : Valeur des différents paramètres des dix plus proches voisins tel que fournis par Sugimoto en 1996 [183]

Séquence	$-\Delta S^\circ$ (cal/K.mol)	$-\Delta H^\circ$ (Kcal/mol)	$-\Delta G_{37^\circ}$ (Kcal/mol)
AA/TT	22.2 ± 0.8	7.9 ± 0.2	1.00 ± 0.01
AT/TA	20.4 ± 2.4	7.2 ± 0.7	0.88 ± 0.04
TA/AT	21.3 ± 2.4	7.2 ± 0.9	0.58 ± 0.06
CA/GT	22.7 ± 2.0	8.5 ± 0.6	1.45 ± 0.06
GT/CA	22.4 ± 2.0	8.4 ± 0.5	1.44 ± 0.04
CT/GA	21.0 ± 2.0	7.8 ± 0.6	1.28 ± 0.03
GA/CT	22.2 ± 1.7	8.2 ± 0.6	1.30 ± 0.03
CG/GC	27.2 ± 2.6	10.6 ± 0.6	2.17 ± 0.05
GC/CG	24.4 ± 2.0	9.8 ± 0.4	2.24 ± 0.03
GG/CC	19.9 ± 1.8	8.0 ± 0.9	1.84 ± 0.04
Initiation GC	2.8 ± 0.2	-0.1 ± 1.1	-0.98 ± 0.05
Initiation AT	-4.1 ± 0.2	-2.3 ± 1.3	-1.03 ± 0.05
Correction pour la symétrie	1.4	0	-0.4

Tableau 16 : Valeur des différents paramètres des dix plus proches voisins tel que fournis par John SantaLucia en 1997 [155]

Toutes les valeurs de ΔG° ont été calculées à 37°C.

Annexe 8 : Mucoviscidose, Distribution des 58 mutations les plus fréquentes en France :

Ce tableau a été établi par Docteur E. Giraudon de l'hôpital Henri Mondor en 2003 :

Mutation	Nucleotide Localisation	Nucleotide Change	Mutation Type	Frequency (%)
DF508	10	deletion of 3bp between 1652 and 1655	deletion of Phe at codon 508	67
G542X	11	G>T at 1756	Gly>stop at codon 542	2.8
N1303K	21	C>G at 4041	Asn>Lys at codon 1303	2.1
1717-1G>A	intron 10	G>A at 1717-1	mRNA splicing mutation	1.3
G551D	11	G>A at 1784	Gly>Asp at codon 551	1
2789+5G>A	intron 14b	G>A at 2789+5	mRNA splicing mutation	1
R553X	11	C>T at 1789	Arg>stop at codon 553	0.9
W1282X	20	G>A at 3978	Trp>stop at codon 1282	0.9
ΔI507	10	deletion of 3bp between 1648 and 1653	deletion of Ile at codon 507	0.7
1078delT	7	deletion of T at 1078	frameshift	0.65
2183AA>G	13	A>G at 2183 and deletion of A at 2184	frameshift	0.65
R1162X	19	C>T at 3616	Arg>stop at codon 1162	0.45
711+1G>T	intron 5	G>T at 711+1	mRNA splicing mutation	0.45
Y1092X	17b	C>A at 3408	Tyr>stop at codon 1092	0.4
3849+10kbC>T	intron 19	C>T at 3849+10kb	mRNA splicing mutation	0.4
G85E	3	G>A at 386	Gly>Glu at codon 85	a
394delTT	3	deletion of TT at 394-395	frameshift	a
L206W	6a	T>G at 749	Leu>Trp at codon 206	a
R334W	7	C>T at 1132	Arg>Trp at codon 334	a
R347P	7	G>C at 1172	Arg>Pro at codon 347	a
R347H	7	G>A at 1172	Arg>His at codon 347	a

W846X	14a	G>A at 2669	Trp>stop at codon 846	a
R1066C	17b	C>T at 3328	Arg>Cys at codon 1066	a
3659delC	19	deletion of C at 3659	frameshift	a
621+1G>T	intron 4	G>T at 621+1	mRNA splicing mutation	a
3272-26A>G	intron 17a	A>G at 3272-26	mRNA splicing mutation	a
4005+1G>A	intron 20	G>A at 4005+1	mRNA splicing mutation	a
E60X	3	G>T at 310	Glu>stop at codon 60	b
R117H	4	G>A at 482	Arg>His at codon 117	b
Y122X	4	T>A at 498	Tyr>stop at codon 122	b
I148T	4	T>C at 575	Ile>Thr at codon 148	b
G178R	5	G>A at 664	Gly>Arg at codon 178	b
A455E	9	C>A at 1496	Ala>Glu at codon 455	b
Q493X	10	C>T at 1609	Gln>stop at codon 493	b
L558S	11	T>C at 1805	Leu>Ser at codon 558	b
E585X	12	G>T at 1885	Glu>stop at codon 585	b
2184insA	13	insertion of A at 2184	frameshift	b
K710X	13	A>T at 2260	Lys>stop at codon 710	b
D1152H	18	G>C at 3586	Asp>His at codon 1152	b
S1251N	20	G>A at 3884	Ser>Asn at codon 1251	b
3905insT	20	insertion of T at 3905	frameshift	b
1811+1.6kbA>G	intron 11	A>G at 1811+1.6kb	mRNA splicing mutation	b
1677delTA	10	deletion of TA at 1677-1678	frameshift	c
R1158X	19	C>T at 3604	Arg>stop at codon 1158	c
G1244E	20	G>A at 3863	Gly>Glu at codon 1244	c
4016insT	21	insertion of T at 4016	frameshift	c
3120+1G>A	intron 16	G>A at 3120+1	mRNA splicing mutation	c
Q1313X	21	C>T at 4069	Gln>stop at codon 1313	d
1898+1G>A	intron 12	G>A at 1898+1	mRNA splicing mutation	d
2184delA	13	deletion of A at 2184	frameshift	e
R792X	13	C>T at 2506	Arg>stop at codon 792	e
L227R	6a	T>G at 812	Leu>Arg at codon 227	f
1609delCA	10	deletion of CA at 1609-1610	frameshift	f

S549R	11	T>G at 1779	Ser>Arg at codon 549	f
L1065P	17b	T>C at 3326	Leu>Pro at codon 1065	f
2143delT	13	deletion of T at 2143	frameshift	g
G673X	13	G>T at 2149	Gly>stop at codon 673	g
G576X	12	G>T at 1858	Gly>stop at codon 576	h

Avec les correspondances suivantes : a: 0,39-0,20 ; b: 0,19-0,10 ; c: 0,09-0,08 ; d: 0,06 ; e: 0,05 ; f: 0,04 ; g: 0,02 ; h: 0,01.

Les cases correspondant aux mutations dont l'incidence est supérieure à 0.4 possèdent un fond gris.

Annexe 9 : Position des mutations étudiées sur l'exon 10 du gène CFTR :

Nous exposons, ci-dessous, la position des différentes séquences utilisées lors de notre première série d'expériences. Elles sont localisées sur l'exon 10 du gène CFTR.

CFTR: Exon 10 - Mutations et polymorphismes étudiés - N: oligonucléotides cibles utilisés

1473 548,3		TC	CTG	AGC	GTG	ATT	TGA	TAA	TGA	CCT	AAT	AAT	GAT	GGG	TTT	TAT	TTC	CAG Glu	1524 564
1525 465	ATC Thr	TCA Ser	CTT Leu	CTA Leu	ATG Met	ATG Met	ATT Ile	ATG Met	GGA Gly	GAA Glu	CGT Leu	GAG Glu	CCT Pro	TCA Ser	GAG Glu	GGT Gly	AAA Lys	ATT Ile	1578 482
	3* =	GT	GAA	GAT	TAC	TAC	TAA	TAC		9* =	AC	CTC	GGA	AGT	CTC	CCA	TT		
	4* =	GT	GAA	GAT	TAC	CAC	TAA	TAC											
1579 483	AAG Lys	CAC His	AGT Ser	GGA Gly	AGA Arg	ATT Ile	TCA Ser	TTC Phe	TGT Cys	TCT Ser	CAG Gln	TTT Phe	TCC Ser	TGG Trp	ATT Ile	ATG Met	CCT Pro	GGC Gly	1632 500
1633 501	ACC Thr	ATT Ile	AAA Lys	GAA Glu	AAT Asn	ATC Ile	ATC Ile	TTT Phe	GGT Gly	GTT Val	TCC Ser	TAT Tyr	GAT Asp	GAA Glu	TAT Tyr	AGA Arg	TAC Tyr	AGA Arg	1686 518
			1* =	AA	TTA	TAG	TAG	AAA	CCA	CAA									
			2* =	TT	TTA	TAG	TAA	CCA	CAA	AGG									
			2 =	TT	TTA	TAG	TAA	CCA	CAA	AGG									
1687 519	AGC Ser	GTC Val	ATC Ile	AAA Lys	GCA Ala	TGC Cys	CAA Gln	CTA Leu	GAA Glu	GAG Glu	GTA Arg	AGA Arg	AAC	TAT Tyr	GTG Val	AAA Lys	ACT	TTT Phe	1740 536
						5* =	TTT	GAT	CTT	CTC	CAT	TCT							
						6* =	GTT	GAT	CTT	CTT	CAT	TCT							
1741 537	TTA	TGC	ATA	TGA	ACC	CTT	CAC	ACT	ACC	CAA	AT...							...	1ppp
		8* =	TAT	ACT	TGG	GAA	GTG	TGA	T									...	zzz

7* = CTG CCG TCC GAA GGC ACG AAG TG

Figure 104: Sur cette partie de l'exon 10, nous avons surligné les différentes séquences que nous avons étudiées lors de nos premières expériences. Les différentes cibles sont données en dessous de la séquence de l'exon alors que les sondes sont regroupées dans le tableau suivant.

Mutation	Sondes	Extrémité 5'	Séquence.								Extrémité 3'
$\Delta F508$	1	bio-(T) ₅ -G	AAA	ATA	TCA	TCT	TTG	GTG	TT		
	2	bio-(T) ₅ -G	AAA	ATA	TCA		TTG	GTG	TTT	CC	
M470V	3	bio-(T) ₅ -T	AC	TTC	TAA	TG A	TGA	TTA	T		
	4	bio-(T) ₅ -T	AC	TTC	TAA	TG G	TGA	TTA	T		
1716 G/A	5	bio-(T) ₅ -C	AAC	TAG	AAG	A G G	TAA	GA			
	6	bio-(T) ₅ -C	AAC	TAG	AAG	A A G	TAA	GA			
	8	bio-(T) ₅ -A	ATA	TGA	ACC	CTT	CAC	ACT	A		
	9	bio-(T) ₅ -C	TGG	AGC	CTT	CAG	AGG	GTA	A		

Figure 105: Tableau des différentes sondes utilisées. La biotine sert à les fixer sur l'ExtraAvidine tandis que le bras espaceur formé de 5 bases T sert à les éloigner de la surface.

Annexe 10 : Liste des oligonucléotides pour étudier l'effet de la longueur :

Dans cette annexe, nous fournissons les listes de tous les oligonucléotides que nous avons utilisés pour étudier l'effet de la longueur sur la stabilité du double brin résultant de l'hybridation entre les cibles et les sondes.

Liste des sondes :

Nomenclature	Notation	Séquence.
1 biot ΔF508S 39 bases	1	5' bio- TTT TTC CAT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC CTA TGA TG 3'
1 biot ΔF508S 29 bases	2	5' bio- TTT TTT TTT TAA AGA AAA TAT CAT CTT TGG TGT TTC CTA 3'
1 biot ΔF508S 19 bases	3	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT AAA TAT CAT CTT TGG TGT T 3'
1 biot ΔF508S 17 bases	4	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TAA TAT CAT CTT TGG TGT 3'
1 biot ΔF508S 15 bases	5	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTA TAT CAT CTT TGG TG 3'
1 biot ΔF508S 13 bases	6	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAT CAT CTT TGG T 3'
1 biot ΔF508S 12 bases	7	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAT CAT CTT TGG 3'
1 biot ΔF508S 11 bases	8	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT T TAT CAT CTT TG 3'
1 biot ΔF508S 9 bases	9	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CAT CTT TG 3'
1 biot ΔF508S 8 bases	10	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CAT CTT T 3'
2 biot ΔF508M 39 bases	11	5' bio- TTT TTA CCA TTA AAG AAA ATA TCA TTG GTG TTT CCT ATG ATG AA 3'
2 biot ΔF508M 29 bases	12	5' bio- TTT TTT TTT TTA AAG AAA ATA TCA TTG GTG TTT CCT ATG 3'
2 biot ΔF508M 19 bases	13	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT AAA ATA TCA TTG GTG TTT C 3'

2 biot ΔF508M 17 bases	14	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TAA ATA TCA TTG GTG TTT 3'
2 biot ΔF508M 15 bases	15	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATA TCA TTG GTG TT 3'
2 biot ΔF508M 13 bases	16	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT ATA TCA TTG GTG T 3'
2 biot ΔF508M 12 bases	17	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT ATA TCA TTG GTG 3'
2 biot ΔF508M 11 bases	18	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA TCA TTG GTG 3'
2 biot ΔF508M 9 bases	19	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA TCA TTG GT 3'
2 biot ΔF508M 8 bases	20	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA TCA TTG G 3'
3 biot 470M 39 bases	21	5' bio- TTT TTC CAG ATC TCA CTT CTA ATG ATG ATT ATG GGA GAA CGT GA 3'
3 biot 470M 29 bases	22	5' bio- TTT TTT TTT TTC TCA CTT CTA ATG ATG ATT ATG GGA GAA 3'
3 biot 470M 19 bases	23	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT CTT CTA ATG ATG ATT ATG G 3'
3 biot 470M 17 bases	24	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG ATG ATT ATG 3'
3 biot 470M 15 bases	25	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG ATG ATT AT 3'
3 biot 470M 13 bases	26	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG ATG ATT A 3'
3 biot 470M 12 bases	27	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG ATG ATT 3'
3 biot 470M 11 bases	28	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG ATG ATT 3'
3 biot 470M 9 bases	29	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG ATG AT 3'
3 biot 470M 8 bases	30	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG ATG A 3'

4 biot 470V 39 bases	31	5' bio- TTT TTC CAG ATC TCA CTT CTA ATG GTG ATT ATG GGA GAA CGT GA 3'
4 biot 470V 29 bases	32	5' bio- TTT TTT TTT TTC TCA CTT CTA ATG GTG ATT ATG GGA GAA 3'
4 biot 470V 19 bases	33	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT CTT CTA ATG GTG ATT ATG G 3'
4 biot 470V 17 bases	34	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG GTG ATT ATG 3'
4 biot 470V 15 bases	35	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG GTG ATT AT 3'
4 biot 470V 13 bases	36	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG GTG ATT A 3'
4 biot 470V 12 bases	37	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTA ATG GTG ATT 3'
4 biot 470V 11 bases	38	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG GTG ATT 3'
4 biot 470V 9 bases	39	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG GTG AT 3'
4 biot 470V 8 bases	40	5' bio- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA ATG GTG A 3'

Liste des cibles :

Nomenclature	Nombre de bases	Séquence
1*	39	5' C ATC ATA GGA AAC ACC AAA GAT GAT ATT TTC TTT AAT GG 3'
1*	29	5' TAG GAA ACA CCA AAG ATG ATA TTT TCT TT 3'
1*	19	5' AAC ACC AAA GAT GAT ATT T 3'
1*	17	5' AC ACC AAA GAT GAT ATT 3'
1*	15	5' C ACC AAA GAT GAT AT 3'
1*	13	5' ACC AAA GAT GAT A 3'
1*	12	5' CC AAA GAT GAT A 3'
1*	11	5' CC AAA GAT GAT 3'
1*	10	5' C AAA GAT GAT 3'
1*	9	5' C AAA GAT GA 3'

1*	8	5' AAA GAT GA 3'
2*	39	5' TTC ATC ATA GGA AAC ACC AAT GAT ATT TTC TTT AAT GGT 3'
2*	29	5' CAT AGG AAA CAC C AA TGA TAT TTT CTT TA 3'
2*	19	5' GA AAC ACC AAT GAT ATT TT 3'
2*	17	5' A AAC ACC AAT GAT ATT T 3'
2*	15	5' AAC ACC AAT GAT ATT 3'
2*	13	5' AC ACC AAT GAT AT 3'
2*	12	5' C ACC AAT GAT AT 3'
2*	11	5' C ACC AAT GAT A 3'
2*	10	5' ACC AAT GAT A 3'
2*	9	5' ACC AAT GAT 3'
2*	8	5' CC AAT GAT 3'
3*	39	5' TCA CGT TCT CCC ATA ATC ATC ATT AGA AGT GAG ATC TGG 3'
3*	29	5' TTC TCC CAT AAT CAT CAT CAT TAG AAG TGA GA 3'
3*	19	5' C CAT AAT CAT CAT CAT TAG AAG 3'
3*	17	5' CAT AAT CAT CAT CAT TAG AA 3'
3*	15	5' AT AAT CAT CAT CAT TAG A 3'
3*	13	5' T AAT CAT CAT CAT TAG 3'
3*	12	5' AAT CAT CAT CAT TAG 3'
3*	11	5' AAT CAT CAT CAT TA 3'
3*	10	5' AT CAT CAT CAT TA 3'
3*	9	5' AT CAT CAT CAT T 3'
3*	8	5' T CAT CAT CAT T 3'
4*	39	5' TCA CGT TCT CCC ATA ATC ACC ATT AGA AGT GAG ATC TGG 3'
4*	29	5' TTC TCC CAT AAT CAC CAT CAT TAG AAG TGA GA 3'
4*	19	5' C CAT AAT CAC CAT CAT TAG AAG 3'
4*	17	5' CAT AAT CAC CAT CAT TAG AA 3'
4*	15	5' AT AAT CAC CAT CAT TAG A 3'
4*	13	5' T AAT CAC CAT CAT TAG 3'
4*	12	5' AAT CAC CAT CAT TAG 3'

4*	11	5' AAT CA C CAT TA 3'
4*	10	5' AT CA C CAT TA 3'
4*	9	5' AT CA C CAT T 3'
4*	8	5' T CA C CAT T 3'

Annexe 11 : Liste des oligonucléotides pour tester l'effet de la Tm.

Nous donnons ci-dessous, les listes de sondes et de cibles que nous avons conçu pour tester l'effet de la mutation artificielle sur la réponse du multicapteur. Nous cherchons ainsi à valider la technique de choix des sondes que nous avons décrit au chapitre IV de cette thèse.

Liste des sondes biotinyllées choisies sur l'exon 10.

Q493X Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGGTCT C AGTTTT 3'
Q493X Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGGTCT T AGTTTT 3'
Q493X Sondes sauvages + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGGTCT CA ATTTT 3'
Q493X Sondes mutées + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGGTCT TA ATTTT 3'
V520F Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGAAGC G TCATC 3'
V520F Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGAAGC T TCATC 3'
V520F Sondes sauvages + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGAAGC GA AATC 3'
V520F Sondes mutées + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGAAGC TA AATC 3'
1716 G>A Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AGAAGA G GTAAGA 3'
1716 G>A Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AGAAGA A GTAAGA 3'
1716 G>A Sondes sauvages + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AGAAT AG GTAAGA 3'
1716 G>A Sondes mutées + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AGAAT A AGTAAGA 3'
M470V Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTAATG A TGATTA 3'
M470V Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTAATG G TGATTA 3'
M470V Sondes sauvages + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTAA AG ATGATTA 3'
M470V Sondes mutées + 1 mutation artificielle	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CTAA AGG TGATTA 3'
ΔF508 Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TT ATA TCA TCT TTG GTG 3'
ΔF508 Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TT AAT ATC ATT GGT GTT 3'
ΔI507 Sondes sauvages	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TT GAAAAT ATCATC TTT 3'
ΔI507 Sondes mutées	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TT GAAAAT ATC TTTGGT 3'
Non relevant (21)	5' Biot TTT TTT TTT TTT TTT TTT CACTTCGTGCCTT 3'

Liste des cibles correspondantes.

M470V Cibles sauvages (T)	5' T AAT CAT T CAT TAG 3'
M470V Cibles mutées (C)	5' T AAT CAC C CAT TAG 3'
Q493X Cibles sauvages (G)	5'-AAAAC TG AGAACA-3'
Q493X Cibles mutées (A)	5'-AAAAC A AGAACA-3'
V520F Cibles sauvages (C)	5'-GATGAC CG CTTC-3'
V520F Cibles mutées (A)	5'-GATGA A GCTTC 3'
1716 G/A Cibles sauvages (C)	5'-TCTTAC CT CTTCT-3'
1716 G/A Cibles mutées (T)	5'-TCTTAC T CTTCT-3'
ΔF508 Cibles sauvages	5'-CAC CAA AGA TGA TAT-3'
ΔF508 Cibles mutées	5'-AAC ACC AAT GAT ATT-3'
ΔI507 Cibles sauvages	5'-AAAGAT GAT ATTTTC -3'
ΔI507 Cibles mutées	5'-ACCAA A GAT ATTTTC -3'

Annexe 12 : Etude théorique des 6 mutations de l'Exon 10

Les séquences nucléotidiques analysées ci-dessous sont données dans l'Annexe 11.

Etude théorique de la mutation 1716 G/A:

C'est une deuxième substitution, affectant l'exon 10 du gène. Elle se traduit, au niveau du gène CFTR, par le remplacement d'une base G par une base A.

Le calcul des T_m , ΔT_m et dR_{av} lors du passage des cibles 1716 G/A sauvages sont donnés par le tableau suivant.

	T_m	ΔT_m	Longueur.	dR_{av} théorique en %
1716 G/A Sondes sauvages (1716 G/AS)	47.8	0	13 bases.	0.46
1716 G/A Sonde mutée (1716 G/AM)	29.6	18.2	13 bases.	0.18
1716 G/A Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (1716 G/ASM)	31.9	15.9	13 bases.	0.21
1716 G/A Sonde mutée +1 mutation artificielle (1716 G/AMM)	6.8	41	13 bases.	0.02

Tableau 17: Valeurs calculées pour le passage des cibles sauvages de la mutation 1716 G/A.

Valeurs illustrées par l'histogramme de la Figure 106 qui met en évidence la structure triangulaire de la réponse du multicapteur.

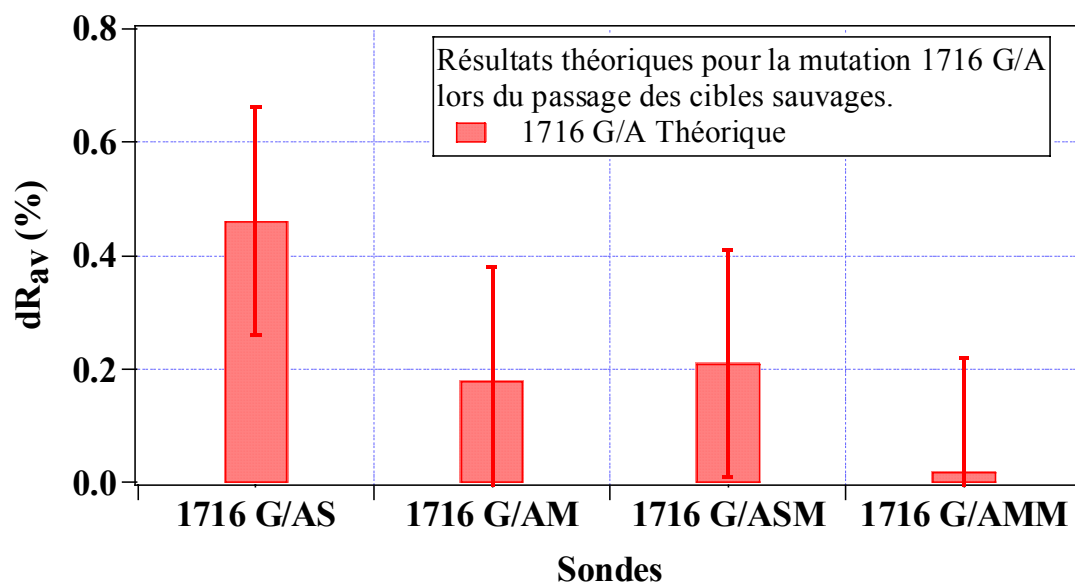


Figure 106: Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation 1716 G/A lors du passage des cibles sauvages.

Le passage des cibles 1716 G/A mutées entraîne la formation de duplex dont les caractéristiques sont données dans le tableau et l'histogramme ci dessous :

	Tm	ΔTm	Longueur.	dR _{av} théorique en %
1716 G/A Sondes sauvages (1716 G/AS)	35.1	9.6	13 bases.	0.32
1716 G/A Sonde mutée (1716 G/AM)	44.7	0	13 bases.	0.46
1716 G/A Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (1716 G/ASM)	14.5	30.2	13 bases.	0.05
1716 G/A Sonde mutée +1 mutation artificielle (1716 G/AMM)	28.6	16.1	13 bases.	0.23

Tableau 18: Valeurs calculées pour le passage des cibles mutées de la mutation 1716 G/A

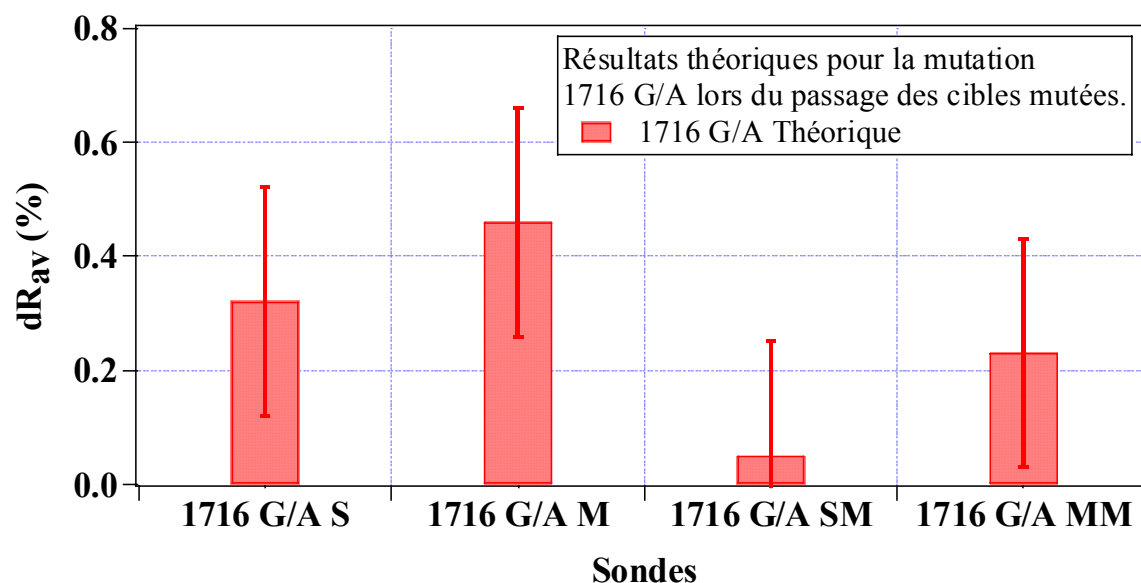


Figure 107 : Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation 1716 G/A lors du passage des cibles mutées.

La circulation des cibles sauvages ou mutées de la mutation 1716 G/A, au-dessus de la surface sera donc détectée par l'apparition de triangles au niveau des sondes relatives à cette mutation.

Etude théorique de la mutation Q493X :

Cette troisième mutation est aussi une substitution dans laquelle une base C est remplacée par une base T.

Les valeurs des T_m , ΔT_m et dR_{av} induites par le passage des cibles Q493X sauvages sont groupées dans le tableau suivant.

	T_m	ΔT_m	Longueur.	dR_{av} théorique en %
Q493X Sonde sauvage (Q493XS)	47.7	0	13 bases.	0.46
Q493X Sonde mutée (Q493XM)	35.3	12.4	13 bases.	0.32
Q493X Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (Q493XSM)	31.4	16.3	13 bases.	0.23
Q493X Sonde mutée +1 mutation artificielle. (Q493XMM)	11.6	36.1	13 bases.	0.02

Tableau 19 : Valeur théorique prévue lors du passage de la cible sauvage de la mutation Q493X.

D'où l'histogramme :

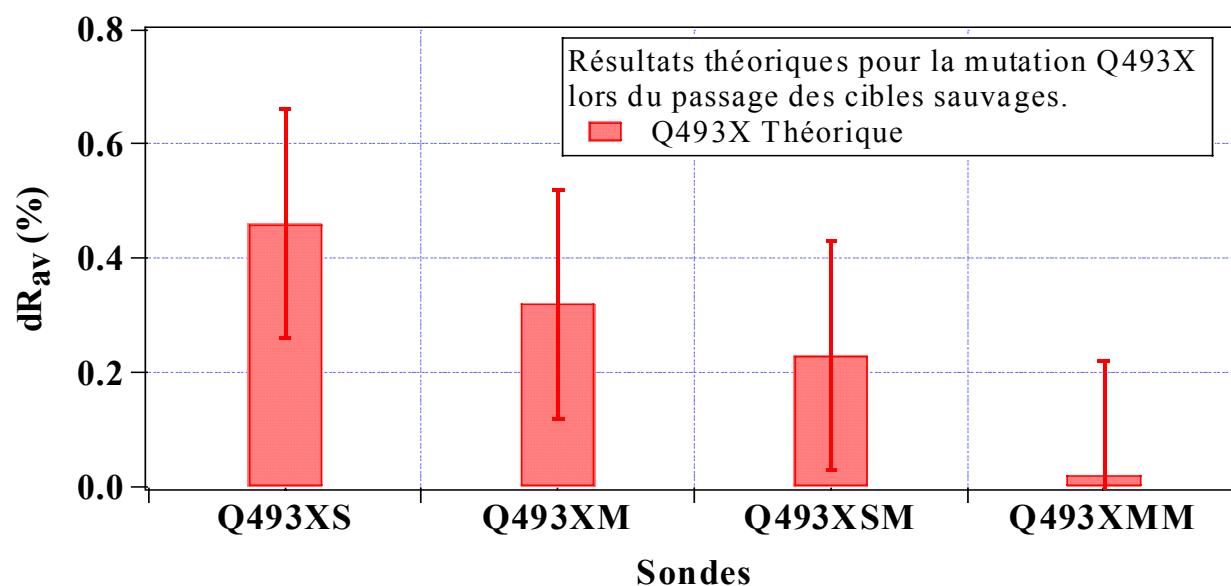


Figure 108: Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation Q493X lors du passage des cibles sauvages.

Les valeurs des T_m , ΔT_m et dR_{av} induites par le passage des cibles Q493X mutées sont groupées dans le tableau suivant.

	T_m	ΔT_m	Longueur.	dR_{av} théorique en %
Q493X Sonde sauvage (Q493XS)	28.2	15.5	13 bases.	0.18
Q493X Sonde mutée (Q493XM)	43.7	0	13 bases.	0.46
Q493X Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (Q493XSM)	-3.9	47.6	13 bases.	0.05
Q493X Sonde mutée +1 mutation artificielle. (Q493XMM)	26.2	17.5	13 bases.	0.18

Tableau 20: Valeurs calculées pour le passage des cibles mutées de la mutation Q493X.

D'où l'histogramme :

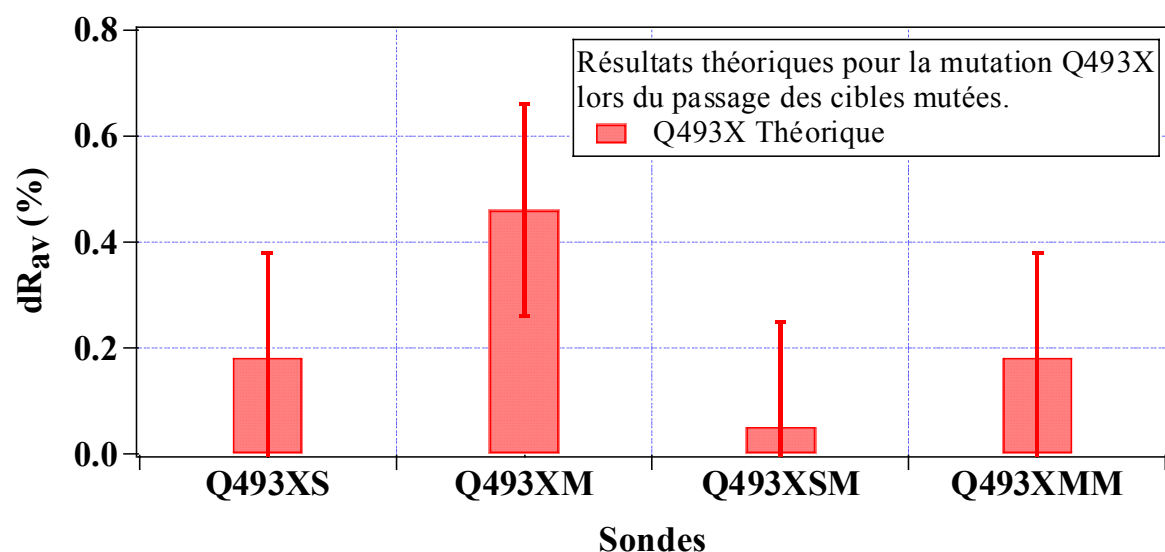


Figure 109 : Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation Q493X lors du passage des cibles mutées.

Pour cette mutation nous obtenons la structure triangulaire attendue.

Etude théorique de la mutation V520F :

C'est la quatrième substitution étudiée. Elle est caractérisée par le remplacement d'une base G par une base T.

Le tableau 17 illustre les grandeurs calculées lors du passage des cibles V520F

	Tm	ΔTm	Longueur.	dR _{av} théorique en %
V520F Sonde sauvage (V520FS)	48.6	0	11 bases.	0.39
V520F Sonde mutée (V520FM)	29.7	18.9	11 bases.	0.18
V520F Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (V520FSM)	32.9	15.7	11 bases.	0.23
V520F Sonde mutée +1 mutation artificielle (V520FMM)	3.8	44.8	11 bases.	0.02

Tableau 21 : Valeur théorique prévue lors du passage de la cible sauvage de la mutation V520F.

L'illustration des dR_{av} sous forme d'histogramme est donnée à la figure suivante :

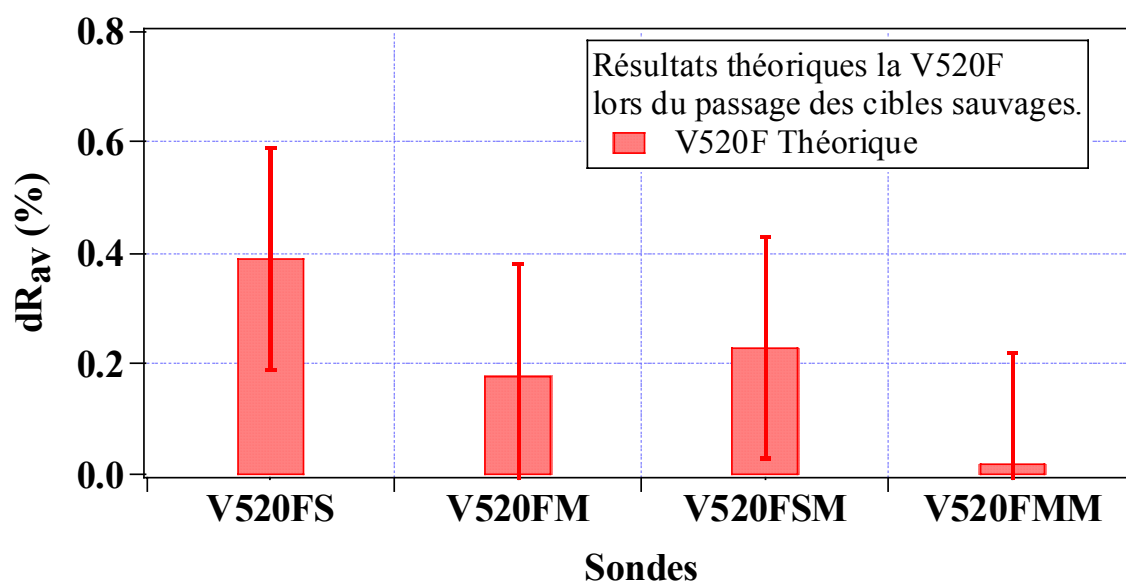


Figure 110 : Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation V520F lors du passage des cibles sauvages.

La signature de la cible mutée est illustrée par le tableau de valeur :

	Tm	ΔTm	Longueur.	dR_{av} théorique en %
V520F Sonde sauvage (V520FS)	33.4	10.3	11 bases.	0.21
V520F Sonde mutée (V520FM)	43.7	0	11 bases.	0.39
V520F Sonde sauvage + 1 mutation artificielle (V520FSM)	10.1	33.6	11 bases.	0.04
V520F Sonde mutée +1 mutation artificielle (V520FMM)	26.2	17.5	11 bases.	0.16

Tableau 22: Valeur théorique prévue lors du passage des cibles mutées de la mutation V520F.

L'histogramme correspondant est décrit par la Figure 111:

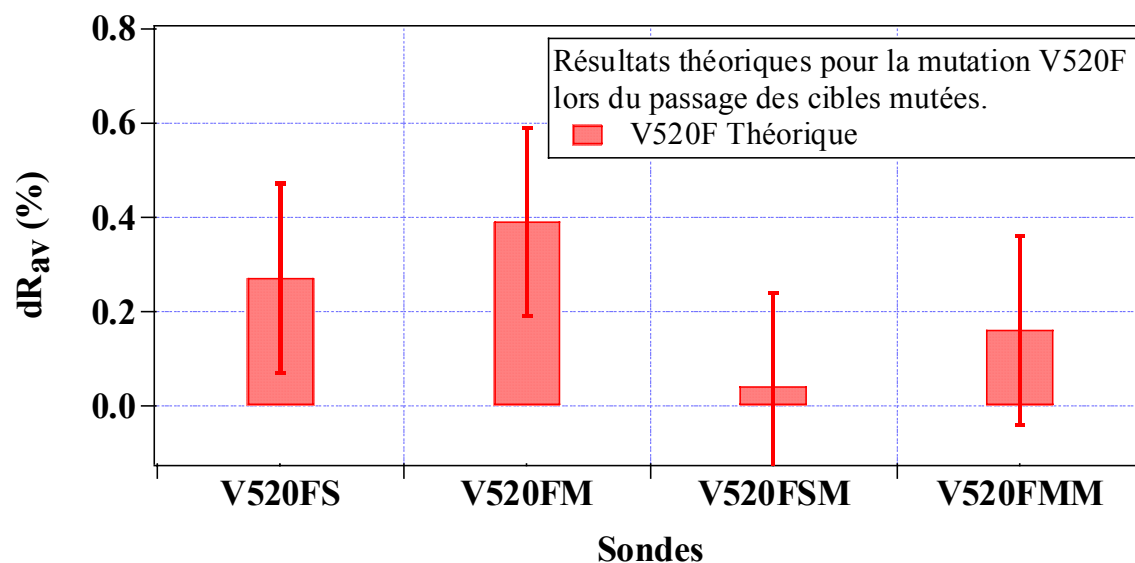


Figure 111 : Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives à la mutation V520F lors du passage des cibles mutées.

Etude théorique des délétions $\Delta I507$ et $\Delta F508$:

Comme nous l'avons déjà vu la délétion $\Delta F508$ est la plus fréquente des mutations responsables de la mucoviscidose dans la population européenne (67 à 70% des cas d'après le Dr E. Girodon, Service de Génétique, Hôpital Henri Mondor cf. Annexe 8). Elle correspond à la délétion de trois nucléotides qui entraîne la délétion du codon phénylalanine à la position 508 de la protéine.

La délétion $\Delta I507$ correspond à la délétion de trois nucléotides qui se traduit par l'absence de l'acide aminée isoleucine en position 507 de la protéine. Son incidence est 100 fois plus faible que celle de la $\Delta F508$ (toujours d'après le Dr E. Giraudon cf. Annexe 8).

Au niveau du gène ces deux mutations se chevauchent et se positionnent entre les nucléotides numéros 1648 à 1653 pour la $\Delta I507$ et 1652 et 1655 pour la $\Delta F508$. De ce fait, les séquences sauvages relatives à ces deux mutations se croisent et les cibles correspondantes ont une très grande affinité avec les deux sondes. Nous devons donc nous attendre à des hybridations croisées. C'est à dire que la présence de l'une des espèces à la surface pourrait réagir avec les plots relatifs aux deux mutations.

Le tableau ainsi que l'histogramme ci dessous illustrent la réponse des sondes aux cibles normales de la $\Delta I507$.

	Tm	ΔTm	Longueur.	dR_{av} théorique en %
$\Delta I507$ Sonde sauvage (DI507S)	44.9	0	15 bases.	0.53
$\Delta I507$ Sonde mutée (DI507M)	26.6	18.3	15 bases.	0.24
$\Delta F508$ Sonde sauvage (DF508S)	33.3	11.6	15 bases.	0.34
$\Delta F508$ Sonde mutée (DF508M)	14.1	30.8	15 bases.	0.05

Tableau 23: Réponse des deux délétions lors du passage des cibles sauvages liées à la $\Delta I507$.

Les variations de la réflectivité illustrées dans ce tableau, sont représentées dans l'histogramme ci-dessous :

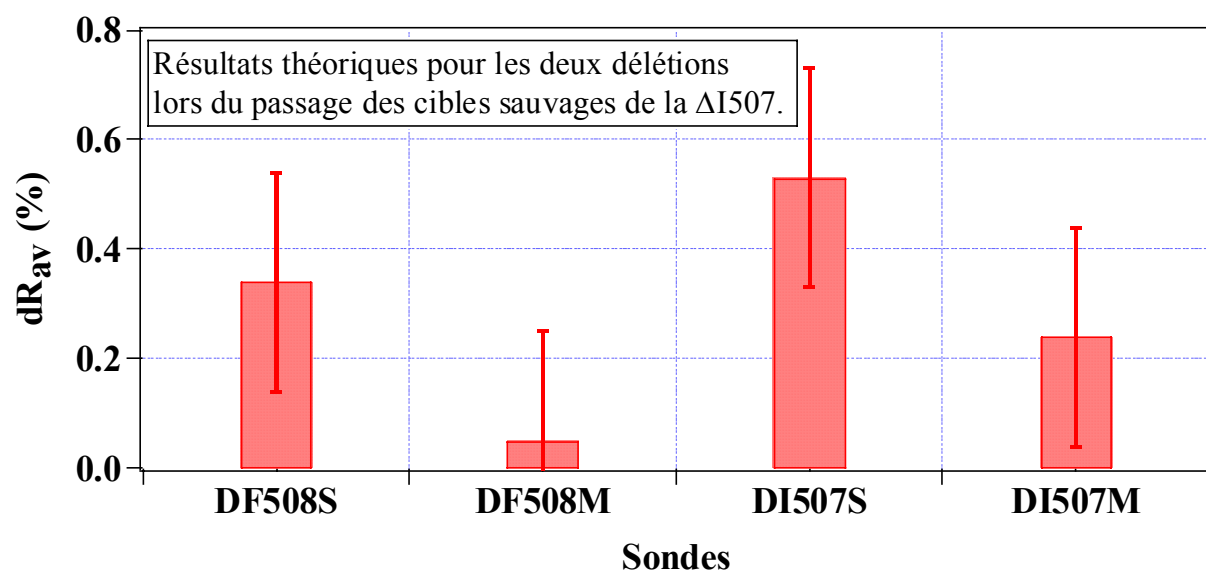


Figure 112: Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives aux délétions $\Delta F508$ et $\Delta I507$ lors du passage des cibles sauvages $\Delta I507$.

Le passage des cibles $\Delta I507$ mutées donne :

	Tm	ΔTm	Longueur.	dR_{av} théorique en %
$\Delta I507$ Sonde sauvage ($\Delta F507S$)	27	21.2	15 bases.	0.21
$\Delta I507$ Sonde mutée ($\Delta F507M$)	48.2	0	15 bases.	0.53
$\Delta F508$ Sonde sauvage ($\Delta F507S$)	34.4	13.8	15 bases.	0.37
$\Delta F508$ Sonde mutée ($\Delta F507M$)	26.5	21.70	15 bases.	0.16

Tableau 24: Valeurs théoriques prévues lors du passage des cibles mutées liées à la délétion $\Delta I507$.

L'histogramme correspondant étant :

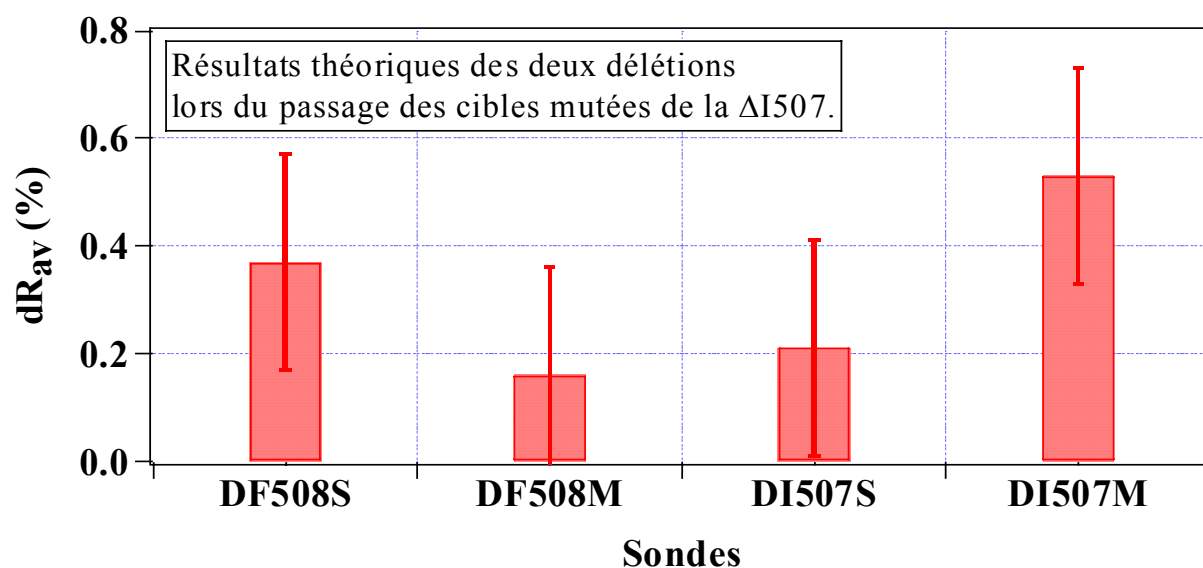


Figure 113: Histogramme illustrant la variation de la réflectivité au niveau des plots de sondes relatives aux délétions $\Delta F508$ et $\Delta I507$ lors du passage des cibles mutées $\Delta I507$.

Pour les délétions nous n'avons pas eu besoin d'avoir recours aux sondes artificielles pour une bonne discrimination. Malgré leur position voisine, les écarts de T_m sont tels, que nous pensons pouvoir observer des réponses différentes vis à vis de chacune des cibles utilisées. De plus, des longueurs de 15 bases sont un très bon compromis entre l'intensité du signal et la sélectivité du capteur.

Annexe 13 : Résultats théoriques et expérimentaux

Pour valider la théorie qui doit nous permettre d'améliorer la discrimination de notre multicapteur, nous avons commandé des séquences nucléotidiques synthétiques correspondant aux sondes et aux cibles données dans l'Annexe 11. Les résultats théoriques et expérimentaux sont présentés dans les histogrammes ci-dessous.

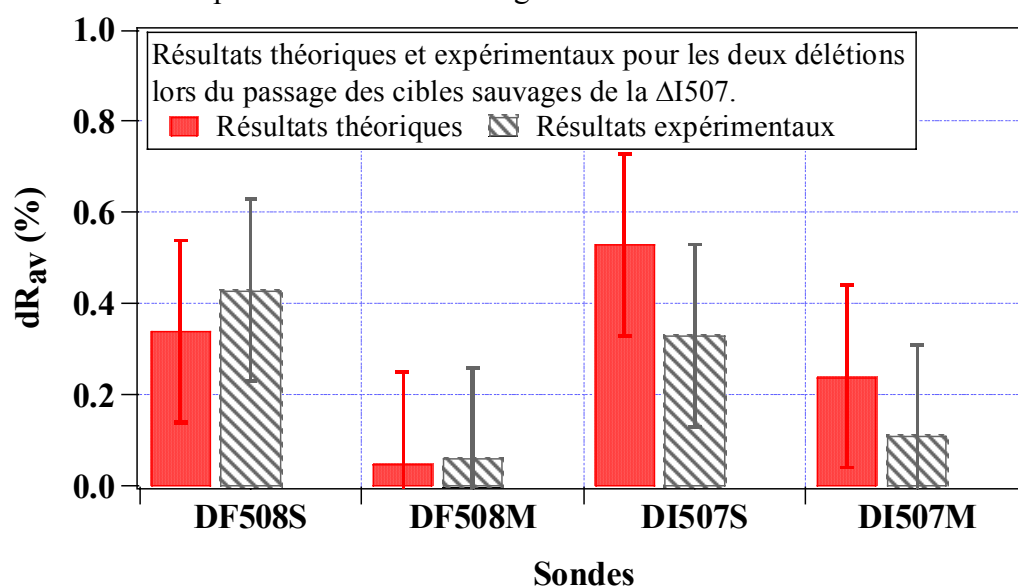


Figure 114 : Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible sauvage relative à la délétion $\Delta I507$ (DI507). L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré traduit les résultats expérimentaux.

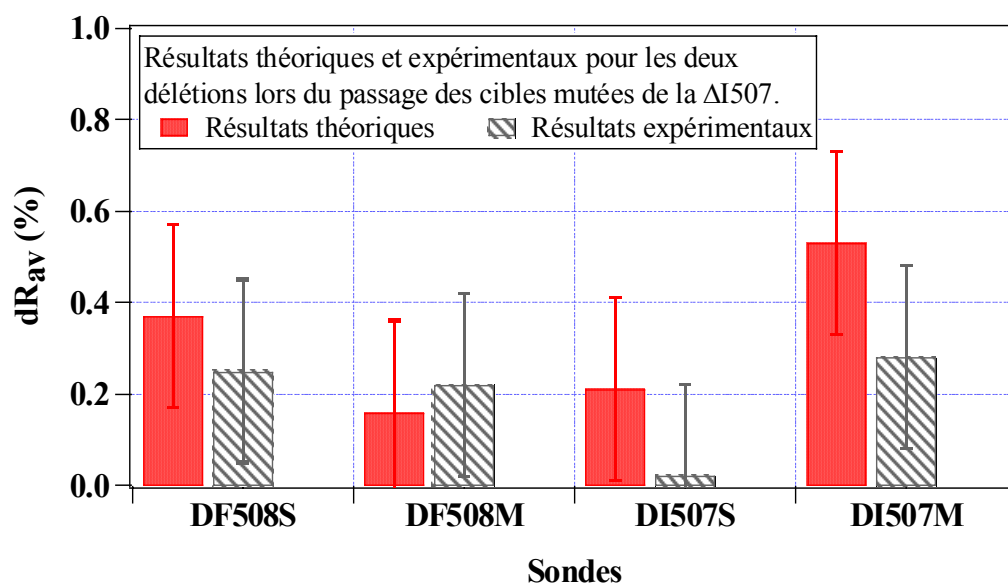


Figure 115 : Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage des cibles mutées relatives à la délétion $\Delta I507$ (DI507). L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré traduit les résultats expérimentaux.

Comparaison entre les résultats théoriques et expérimentaux obtenus dans l'étude de la mutation V520F :

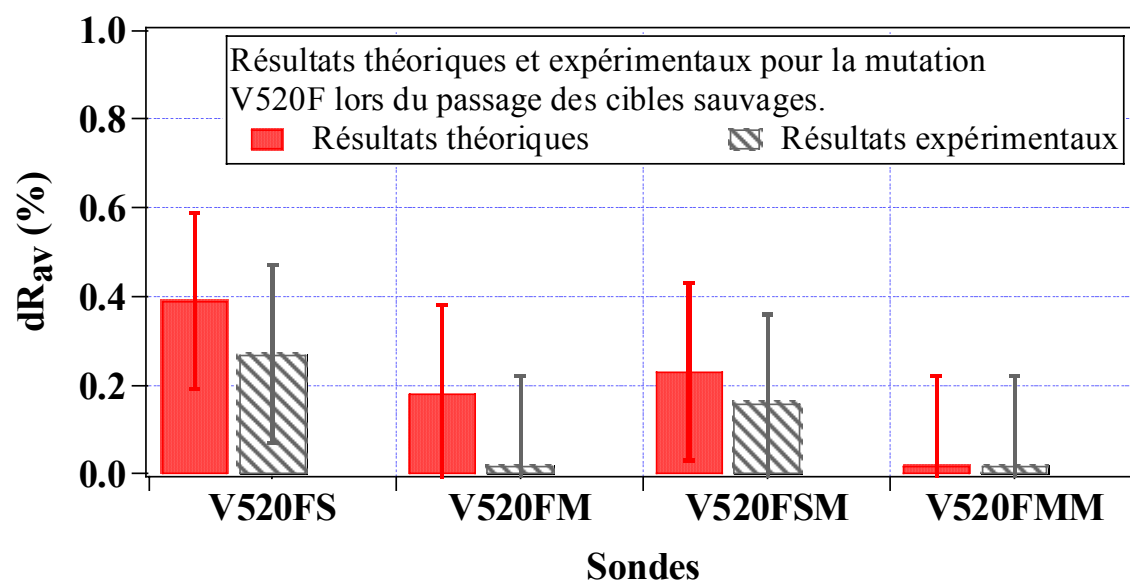


Figure 116: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible sauvage relative à la substitution V520F. L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré représente les résultats expérimentaux.

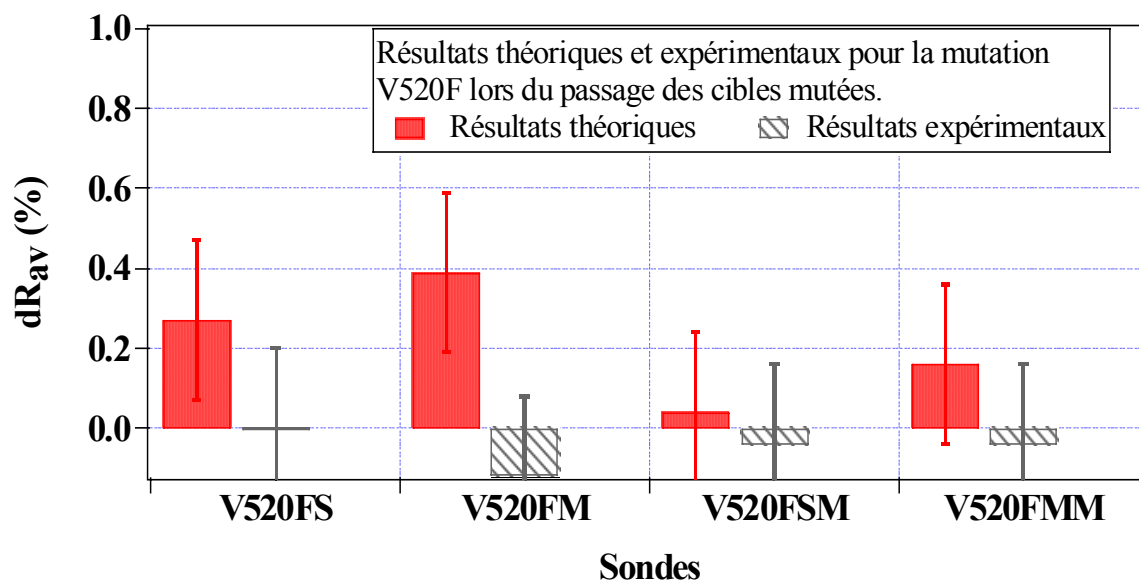


Figure 117: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible mutée relative à la substitution V520F. L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré représente les résultats expérimentaux.

Comparaison entre les résultats théoriques et expérimentaux obtenus dans l'étude de la mutation 1716 G/A :

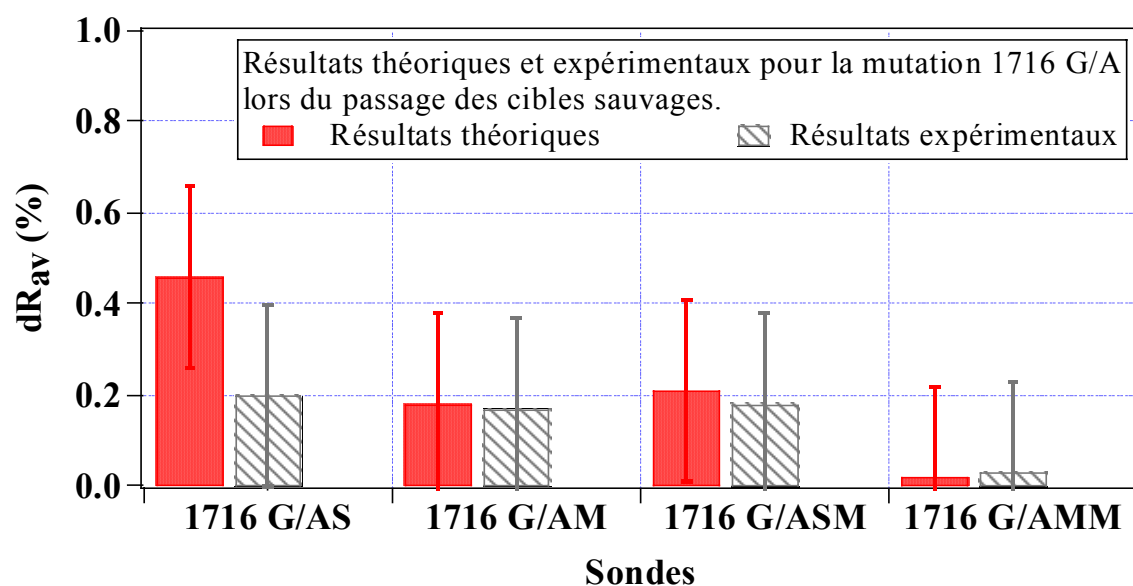


Figure 118: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible sauvage relative à la substitution 1716 G>A. L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré représente les résultats expérimentaux.

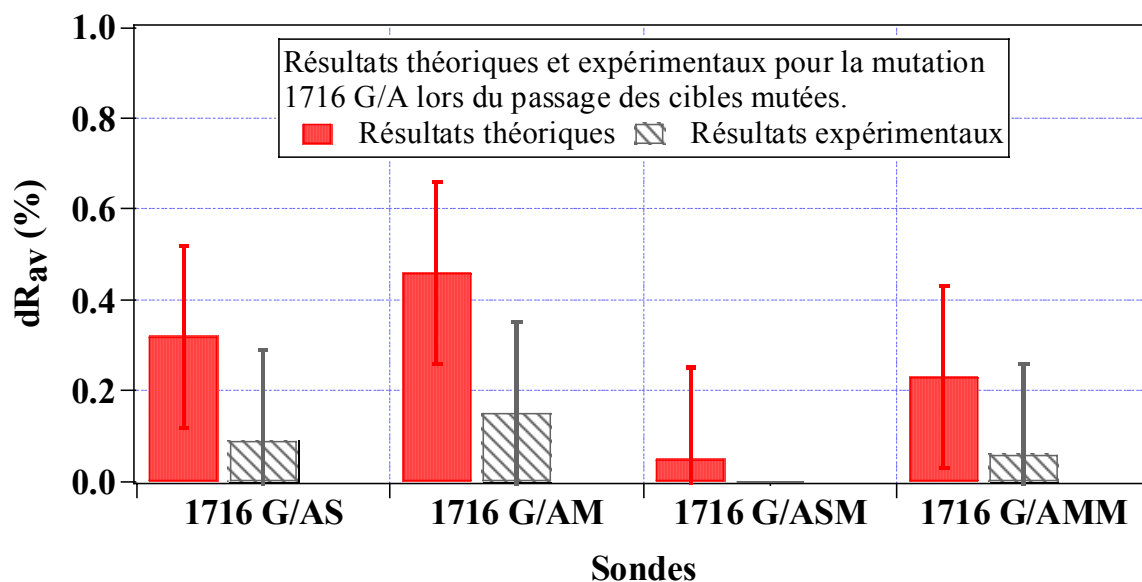


Figure 119: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible mutée relative à la substitution 1716 G>A. L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré représente les résultats expérimentaux.

Comparaison entre les résultats théoriques et expérimentaux obtenus dans l'étude de la mutation Q493X :

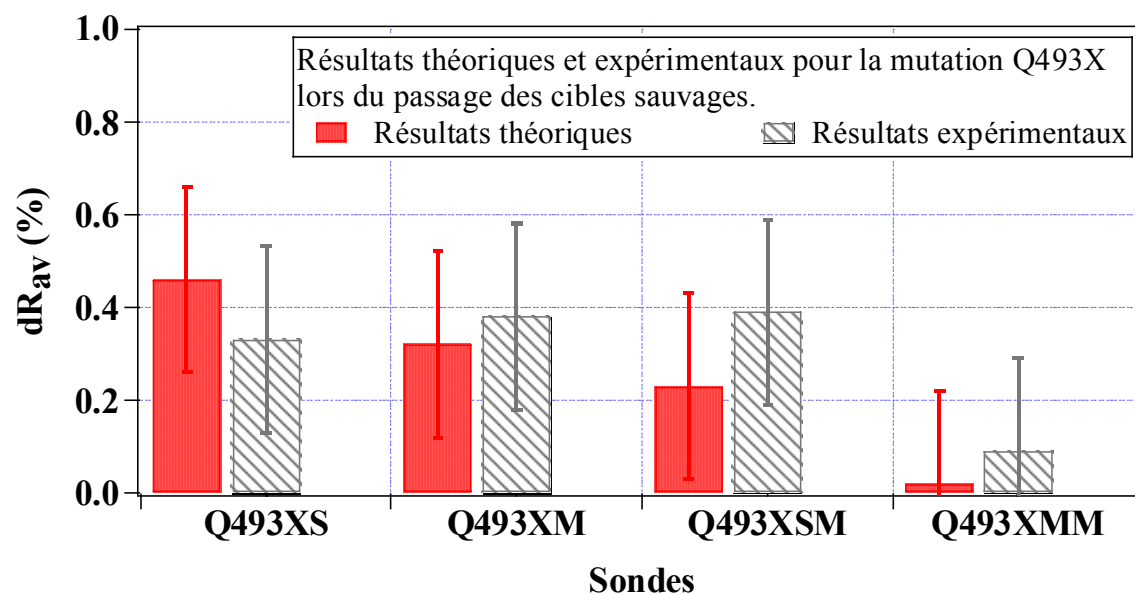


Figure 120 : Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible sauvage relative à la mutation Q493X. L'histogramme plein correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme hachuré représente les résultats expérimentaux.

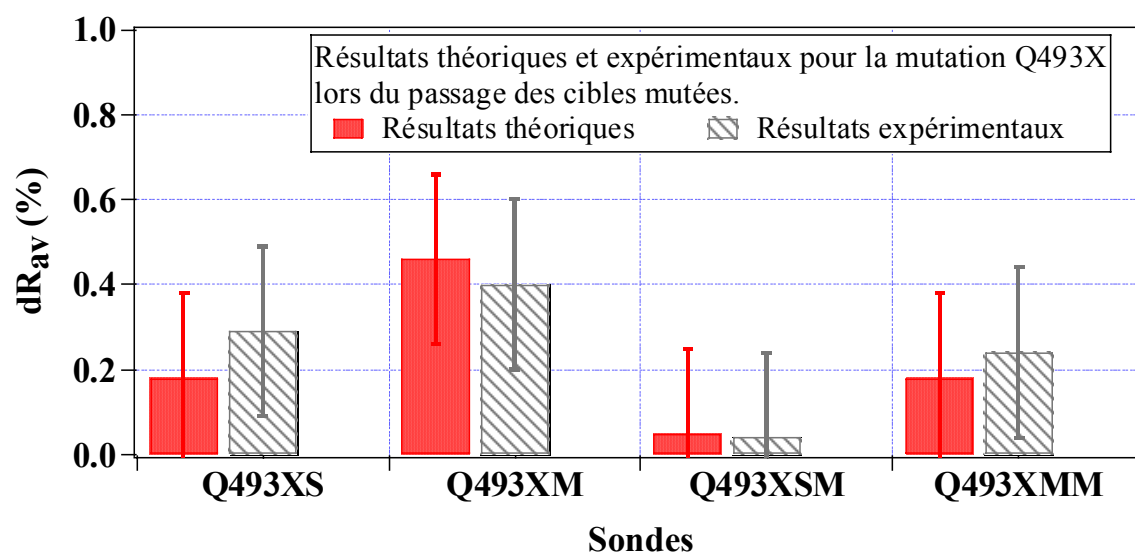


Figure 121: Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux lors du passage de la cible mutée relative à la mutation Q493X. L'histogramme rouge correspond aux valeurs théoriques alors que l'histogramme bleu représente les résultats expérimentaux.

Dans cette annexe, nous avons représenté une comparaison entre les résultats théoriques et expérimentaux pour 4 des mutations étudiées les autres résultats sont exposés dans le corps du manuscrit. Cette étude montre que l'expérience conforte la théorie.

Bibliographie :

- 1 G. Mendel, **Experiments in Plant Hybridization** (1865). Read at the meetings of February 8th, and March 8th, 1865 et disponible en version informatique sur le site <http://www.mendelweb.org/Mendel.html>, consulté le 14 Septembre 2004.
- 2 N. Paweletz, W. Flemming, **Pioneer of mitosis research**, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2001, 2, 1, 72-5.
- 3 Profiles in science, National Library of medicine, Consulté le 14 Septembre 2004, <http://profiles.nlm.nih.gov/CC/Views/Exhibit/narrative/discovery.html>
- 4 J.D. Watson, et F.H.C. Crick, **Molecular structure of Nucleic Acids.**, *Nature*, 1953, 171, 737-738.
- 5 J.G. Gall, M.L. Pardue, **Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations**, *PNAS*, 1969, 63, 2, 378-383.
- 6 Institut Pasteur, consulté le 14 Septembre 2004
<http://www.pasteur.fr/recherche/unites/biophyadn/e-Ffish.html>
- 7 S. N. Cohen, A. C. Y. Chang, H. W. Boyer, and R. B. Helling, **Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro**, *PNAS*, 1973, 70, 11, 3240-3244.
- 8 M. Grunstein, D. S. Hogness, **Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene.**, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1975, USA 72: 3961-3965.
- 9 E. M. Southern, **DNA Microarrays. History and Overview**, *Methods in Molecular Biology*, 2001, 170, 181-199.
- 10 H. A. Behrensdoerf, M. Pignot, N. Windhab, A. Kappel, **Rapid parallel mutation scanning of gene fragments using protein-DNA chip format**, *Nucleic acid research*, 2002, 30, 14, e64.
- 11 J. Petrik, **Microarray technology: the future of blood testing**, *Blackwell Science*, 2001, 80, 1-11.
- 12 G. Y. J. Chen, M. Uttamchandani, R. Y. P. Lue, M. L. Lesaichere, S. Q. Lao, **Array-based technologies and their applications in proteomics**, *Current topics in medicinal chemistry*, 2003, 3, 705-724.
- 13 M. May, G. Heebner, **Drug discovery and biotechnology trends- Bioinformatics: Feeling the forward momentum**, *Science*, 2003, 26 Sept., Special advertising section, page Web: http://www.sciencemag.org/feature/e-market/benchtop/ddbt_92603.shl., consulté le 14 Septembre 2004.

14 Société Affymetrix, consulté le 14 Septembre 2004, www.affymetrix.com.

15 Société Agilent, consulté le 24 Novembre 2004,
<http://www.chem.agilent.com/Scripts/PCol.asp?lPage=494>

16 Société Nanogen, consulté le 14 Septembre 2004, www.nanogen.com.

17 F. Yu, D. Yao, W. Knoll, **Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy studies of interaction between an antibody and its surface-coupled antigen**, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 2610-2617.

18 E. Maillart, **Développement d'un système optique d'imagerie en résonance des plasmons de surface :Application à l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel**, thèse de physique spécialité :optique, Université Paris XI, 30 juin 2004, 285 pages.

19 J. R. Stetter, W. R. Penrose, S. Yao, **Sensors, chemical sensors, electrochemical sensors and ECS**, *Journal of electrochemical society*, 2003, 150, 2, S11-S16.

20 M. Mascini, I. Palchetti, G. Marrazza, **DNA electrochemical biosensors**, *J. Anal. Chem (Special issue paper)*, 2001, 369, 15-22.

21 J.E. Pearson, A. Gill, P. Vadgama, **Analytical aspect of biosensors**, *Ann. Clin. Biochem.*, 2000, 37, 119-145.

22 J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, S. R. Manalis, **Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge**, *PNAS*, 2002, 99, 22, 14142-14146.

23 S. Kiyoo, Y. Hayami, Y. Makoto, S. Kyoichiro, **Method and device for compensating temprature-dependent characteristic change in ion-sensitive FET transducer**, *United State Patent 4385274*, 1983.

24 M. Pravada, **Sensors for neurochemistry**, thèse en:Sciences Pharmaceutiques, [Vrije Universiteit Brussel](http://www.vrijeuniversiteitbrussel.be) (Belgique), 1998, 174 pages.

25 S. Brahim, A. M. Wilson, D. Narinesingh, E. Iwuoha, A. Guiseppi-Elie, **Chemical and biological sensors based on electrochemical detection using conducting electroactive polymers.**, *Microchim. Acta.*, 2003, 143, 123-137.

26 K.M. Millan, A. Saraulo, and S.R. Mikkelsen, **Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode**, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2943-2948.

27 K. R. Rogers, **Principles of affinity-based biosensors**, *Molecular biotechnology*, 2000, 14, 109-130.

28 J. Tamayo, A. D. L. Humphires, A. R. Malloy, M. J. Miles, **Chemical sensors and biosensors in liquid environment based on microcantilevers with the quality factor amplified**, *Ultramicroscopy*, 2001, 86, 167-173.

-
- 29 R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner†, H. P. Lang, M. K. Baller, U. Certa, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, and C. Gerber, **Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array**, *PNAS*, 2002, 99, 15, 9783-9788.
- 30 **Biosensors: a brief tutorial No. 6: Optical Biosensors- a Bright Future?**, consulté le 14 Septembre 2004 <http://www.fraserclan.com/biosens6.htm>.
- 31 B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, **Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing**, *Sensors and Actuators*, 1983, 4, 299–304.
- 32 **Société Biacore**, consulté le 14 Septembre 2004, www.biacore.com
- 33 T. Sakai, K. Shinahara, A. Torimaru, H. Tanaka, Y. Shoyama, K. Matsumoto, **Sensitive detection of Glycyrrhizin and evaluation of the affinity constants by a Surface Plasmon-based Immunosensor**, *Analytical Science*, 2004, 20, 279.
- 34 E. Mariotti, M. Minunni, M. Mascini, **Surface plasmon resonance biosensors for genetically modified organism detection**, *Analytica chimica acta*, 2002, 453, 165-172.
- 35 C. Williams, T. A. Addona, **The integration of SPR biosensor with mass spectrometry: possible applications for proteome applications**, *Trends in Biotechnology*, 2000, 18, 2, 45-48
- 36 R. W. Wood, **On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum**, *Phil.Magm.*, 1902, 4, 396.
- 37 U. Fano, **The theory of anomalous diffraction of Quasi-Stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves)**, *J.Opt.Soc.Am.*, 1941, 31, 213.
- 38 A. Otto, **Excitation of nonradiative surface plasma waves by the method of frustrated total reflection**, *Z.Physik*, 1968, 216, 398.
- 39 E. Kretschmann, H. Raether, **Radiative decay of non radiative Surface plasmons Excited by light**, *Z. Naturforsch*, 1968, 23 a, 2135-2136.
- 40 V. E. Kochergin, A. A. Beloglazov, M. V. Valeiko, P. I. Nikitin, **Phase properties of a surface-plasmon resonance from the view point of sensor applications**, *Quantum electronics*, 1998, 28, 444-448.
- 41 S. Boussaad, J. Pean, N. J. Tao, **High-Resolution multiwavelength surface plasmon resonance spectroscopy for probing conformational and electronic changes in Redox Proteins**, *Anal.Chem.*, 2000, 72, 222-226.
- 42 B. Lamprecht, J. R. Krenn, G. Schider, H. Ditlbacher, M. Salermo, N. Felidj, A. Leitner, F. R. Aussenegg, J. C. Weeber, **Surface plasmon propagation in microscale metal stripes**, *Applied physics letters*, 2001, 79, 1, 51-53.

-
- 43 K. Kurihara, K. Suzuki, **Theoretical understanding of absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretschmann's theory**, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 696-701.
- 44 **Surface plasmon resonance (SPR) optical sensors, current technology and applications**, *Sensors and Actuators B*, 1999, 54, Special Issue.
- 45 W. P. Chen, J. M. Chen, **Use of surface plasma waves for determination of the thickness of metallic films**, *J. Opt. Soc. Am.*, 1981, 71, 2, 189-191.
- 46 A. G. Frutos, M. C. Corn, **SPR of ultrathin organic films**, *Analytical Chemistry News and Features*, July 1, 1998, 449 A-455 A.
- 47 E. Kai, S. Sawata, K. Ikebukuro, T. Iida, T. Honda, I. Karube, **Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance**, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 796-800.
- 48 H. C. M. Yau, S. Y. Wu, H. P. Ho, M. Yang, **Surface plasmon resonance measurement of pyridoxal kinase-pyridoxamine binding on self-assembled monolayer**, *Sensors and Actuators B*, 85, 2002, 227-231.
- 49 B. Hock, M. Seifert, K. Kramer, **Engineering receptors and antibodies for biosensors**, *Biosensors and bioelectronics*, 2002, 17, 239-249.
- 50 D. Hao, M. Ohme-Takagi, K. Yamasaki, **A modified chip for surface plasmon resonance enables a rapid determination of sequence specificity of DNA-binding proteins**, *FEBS letters*, 2003, 536, 151-156.
- 51 R. L. Rich, D. G. Myszka, **Spying on HIV with SPR**, *Trends in microbiology*, 2003, 11, 3, 124-133.
- 52 E. M. Yeatman, E. A. Ash, **Surface plasmon scanning microscopy**, *Scanning microscopy technologies and applications*, 1988, 897, 100-107.
- 53 B. Rothenhausler, W. Knoll, **Surface plasmon microscopy**, *Nature*, 1988, 332, 615-617
- 54 C. E. Jordan, A. G. Frutos, A. J. Thiel, R. Corn, **Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA hybridisation adsorption and streptavidin/DNA multilayer formation at chemically modified gold surface.**, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4939-4947.
- 55 G. Kovacs, **Optical excitation of surface plasmon-polaritons in layered media**, In *Electromagnetic Surface Modes*, John Wiley & Sons, Boardman, New York, 1982, 143-200.
- 56 J. Homola, S. S. Yee, D. M. Myszka, **Surface Plasmon Resonance Biosensors**, In *Optical biosensors: Present and Future*, Elsevier, 2002, p.207-251.
- 57 P. Guédon, *Étude de systèmes optiques pour l'analyse directe, en temps réel et en parallèle, d'interactions biomoléculaires.*, thèse de physique spécialité :optique, Université Paris VI, 11 mai 2000, 193 pages.

-
- 58 A. G. Notcovich, V. Zhuk, S. G. Lipson, **Surface plasmon resonance phase imaging**, *Applied Physics Letters*, 2000, 76, 13, 1665-1667.
- 59 M. J. O'Brien, V. H. Pérez-Luna, S. R. J. Brueck, G. P. López, **A Surface Plasmon resonance array based on spectroscopic imaging**, *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, 16, 97-108.
- 60 B. P. Nelson, A. G. Frutos, J. M. Brockman, M. Corn, **Near-Infrared Surface Plasmon Resonance Measurements of ultrathin films. 1. Angle shift and SPR Imaging experiments**, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3928-3934.
- 61 E.M. Yeatman, **Resolution and sensitivity in surface plasmon microscopy and sensing**, *Biosensors and Bioelectronics*, 1996, 11, 635-649.
- 62 B. Rothenhausler, W. Knoll, **Surface plasmon microscopy**, *Nature*, 1988, 332, 615-617.
- 63 T. Zhang, H. Morgan, A.S.G. Curtis, M. Riehle, **Measuring particle-substrate distance with surface plasmon resonance microscopy**, *J. Opt. A*, 2001, 333-337
- 64 T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guédon, A. Roget, Y. Lévy, **Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips**, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2003, 32, 687-696.
- 65 N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M.C. Millot, S. Pissard, R. Narwa et M. Goossens, **100 Channels Parallel Detection of DNA Interactions by SPR Imaging of Polymer-Functionalized Surfaces**, *Sensors and Actuators B*, 2003, 94/3, 313-323.
- 66 **IBIS**, consulté le 14 Septembre 2004, <http://www.ibis-spr.nl/products/spr/index.htm>
- 67 **GWC Technologies, Inco**, **Spectroscopic tools for biosensing and thin film analysis**, consulté le 14 Septembre 2004, <http://www.gwcinstruments.com/>
- 68 B.P. Nelson, T.E. Grimsrud, M.R. Liles, R.M. Goodman, R.M. Corn, **Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays**, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 1-7.
- 69 **HTS biosystem**, consulté le 14 Septembre 2004, <http://www.htsbiosystems.com/>
- 70 **Genoptics**, consulté le 14 Septembre 2004, <http://www.genoptics-sprIn.com/>
- 71 P. Guédon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbre, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy, **Characterization and optimisation of a real time, parallel, label free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging**, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 6003-6009.
- 72 S. P.A. Fodor, J. L. Read, M. C. Pirrung, L. Stryer, A. T. Lu, D. Solas, **Light-Directed, Spatially addressable parallel chemical synthesis**, *Science*, 1991, 251, 767-773.
- 73 R.J. Lipshutz, S.P.A. Fodor, T.R. Gingeras, D.J. Lockhart, **High density synthetic oligonucleotide arrays**, *Nature Genetics supplement*, 1999, 21, 20-24.

74 J. Wang, **Survey and summary from DNA biosensors to gene chip**, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, 16, 3011-3016.

75 K. Takahashii, K. Seio, M. Sekine, O. Hino, M. Esashi, **A photochemical/chemical direct method of synthesizing high-performance deoxyribonucleic acid chips for rapid and parallel gene analysis**, *Sensors & Actuators B*, 2002, 83, 67-76.

76 G.E. Poirier, E.D. Pylant, **The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au (111).**, *Science*, 1996, 272, 1145-1148.

77 L. M. Demers, C. A. Mirkin, R. C. Mucic, R. A. Reynolds, R. L. Letsinger, R. Elghanian, G. Viswanadham, **A fluorescent-based method for determining the surface coverage and hybridisation efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles**, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5535-5541.

78 D. Pessevic, R. Lawall, M. Veith, M. Liley, Y. Okahata, W. Knoll, **Oligonucleotide hybridisation observed by surface plasmon optical techniques**, *Applied Surface Science*, 1995, 90, 425-436.

79 K. A. Peterlinz, R. M. Georgiadis, T. M. Herne, M. J. Tarlov, **Observation of hybridization and dehybridization of Thiol-Tethered DNA using two-color surface plasmon Resonance spectroscopy**, *J. Am. Soc.*, 1997, 119, 3401-3402.

80 T. M. Herne, M. J. Tarlov, **Characterization of DNA probes immobilizes on gold surfaces.**, *J. Am. Soc.*, 1997, 119, 8916-8920.

81 S. Cosnier, **Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerised films. A Review.**, *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, 14, 443-456.

82 M. Gerard, A. Chaubey, B.D. Malhotra, **Application of conducting polymers to biosensors (Review)**, *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, 17, 345-359.

83 T. Livache, B. Fouque, A. Roget, J. Marchand, G. Bidan, R. Téoule, G. Mathis, **Polypyrrole DNA chip on a silicon Device: Example of Hepatitis C virus genotyping**, *Analytical Biochemistry*, 1998, 255, 188-194.

84 T. Livache, H. Bazin, P. Caillat, A. Roget, **Electroconducting polymers for the construction of DNA or peptide arrays on silicon chips.**, *Biosensors & Bioelectronics*, 1998, 13, 629-634.

85 F. Garnier, H. Korri-Yousoufi, P. Srivastava, B. Mandrand, T; Delair, **Toward intelligent polymers: DNA sensors based on oligonucleotide-functionalized polypyrroles.**, *Synthetic Metals*, 1999, 100, 89-94.

86 S. Brahim, D. Narinesingh, A. Guiseppi-Elie, **Polypyrrole-hydrogel composites for the construction of clinically important biosensors.**, *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, 17, 53-59.

-
- 87 P. Dutta, S.K. Mandal, **Electronic conduction processes in DNA-doped polypyrrole nanocomposite films**, *Nanotechnology*, 2004, 15, 250-253.
- 88 J. Spinke, M. Liley, F.-J. Schmitt, H.-J. Guder, L. Angermaier, W. Knoll, **Molecular recognition at self-assembled monolayers: Optimization of surface functionalization**, *J. Chem. Phys.*, 1993, 99, 9, 7012-7019.
- 89 M. B. González-García, C. Fernández-Sánchez, A. Costa-García, **Colloidal gold as an electrochemical label of streptavidin-biotin interaction**, *Biosensors & bioelectronics.*, 2000, 15, 315-321.
- 90 S. Busse, V. Scheumann, B. Menges, S. Mittler, **Sensitivity studies for specific binding reactions using the biotin/streptavidin system by evanescent optical methods.**, *Biosensors & Bioelectronics*, 2002, 17, 704-710.
- 91 E. Mariotti, M. Minunni, M. Mascini, **Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection.**, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 453, 165-172.
- 92 E. A. Smith, M. J. Wanat, Y. Cheng, S. V. P. Barreira, A. G. Frutos, R. M. Corn, **Formation, Spectroscopic characterization, and application of sulfhydryl-terminated alkanethiol monolayers for the chemical attachment of DNA onto gold surfaces.**, *Langmuir*, 2001, 17, 2502-2507.
- 93 B. T. Houseman, E. S. Gawalt, M. Mrksch, **Maleimide-functionalized self-assembled monolayers for the preparation of peptide and carbohydrate biochips.**, *Langmuir special issue entitled The biomolecular interface*, 2002, A-J.
- 94 M. C. Millot, F. Martin, C. Mangin, Y. Lévy, B. Sébille, **Use of polymethacryloyl chloride to immobilize proteins onto gold surfaces. Detection by surface plasmon resonance.**, *Materials Science & Engineering C*, 1999, 7, 3-10.
- 95 Z. GUO, R. A. Guilfoyle, A. J. Thiel, R. Wang, L. M. Smith, **Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports**, *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 24, 5456-5465.
- 96 P. T. Hammond, **Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly**, *Current Opinion in colloid & Interface Science*, 2000, 4, 430-442.
- 97 B. L. Frey, C. E. Jordan, S. Kornguth, R. M. Corn, **Control of the specific adsorption of proteins onto gold surfaces with poly (L-lysine) monolayers.**, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 4452-4457.
- 98 M. Gotoh, M. Hasebe, T. Ohira, Y. Hasegawa, Y. Shinohara, H. Sota, J. Nakao, M. Tosu, **Rapid method for detection of point mutations using mismatch binding protein (MutS) and an optical biosensor.**, *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 1997, 14, 47-50.
- 99 G. Marrazza, I. Chinella, M. Mascini, **Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection**, *Biosensors & Bioelectronics*, 1999, 14, 43-51.

-
- 100 P. Y. Tsoi, J. Yang, Y.-T. Sun, S-F Sui, M. Yang, **Surface plasmon resonance study of DNA polymerases binding to template/primer DNA duplexes immobilized on supported lipid monolayers**, *Langmuir*, 2000, 16, 6590-6596.
- 101 A. Dupont-Filliard, A. Roget, T. Livache, M. Billon, **Reversible oligonucleotide immobilization based on biotinylated polypyrrole film**, *Analytical Chimica Acta*, 2001, 449, 45-50.
- 102 D. K. Kambhampati, T. A. M. Jakob, J. W. Robertson, M. Cai, J. E. Pemberton, W. Knoll, **Novel silicon dioxide sol-gel films for potential sensor applications :A surface plasmon resonance study**, *Langmuir*, 2001, 17, 1169-1175.
- 103 L. S. Jung, J. S. Schumaker-Parry, C. T. Campbell, S. S. Yee, M. H. Gelb, **Quantification of tight binding to surface-immobilized phospholipid vesicles using surface plasmon resonance: binding constant of phospholipase A₂**, *J. Am. Chem.,Soc.*, 2000, 122, 4177-4184.
- 104 C. Boozer, Q. Yu, S. Chen, C-Y. Lee, J. Homola, S.S. Yee, S. Jiang, **Surface fuctionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self assembly.**, *Sensors and Actuators B*, 2003, 90, 22-30.
- 105 L. A. Chrisey, G. U. Lee, C. E. O’Ferrall, **Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayers films.**, *Nucleic Acids Research*, 1996, 24, 15, 3031-3039.
- 106 T. Strother, R. J. Hamers, L. M. Smith, **Covalent attachment of oligodeoxyribonucleotides to amine-modified Si (001) surfaces.**, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, 18, 3535-3541.
- 107 A. G. Frutos, L. M. Smith, R. M. Corn, **Enzymatic ligation reactions of DNA “Words” on surfaces for DNA computing.**, *Journal of the American Chemical Society*, 1998, 120, 40, 10277-10282.
- 108 J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, **A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA interactions with surface plasmon resonance imaging.**, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 8044-8051.
- 109 A. G. Frutos, J. M. Brockman, R. M. Corn, **Reversible protection and reactive patterning of amine-and hydroxyl-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for the fabrication of biopolymer arrays.**, *Langmuir*, 2000, 16, 2192-2197.
- 110 S. E. Baker, T. L. Lasseter, L. M. Smith, R. J. Hamers, **Covalently-linked adducts of single-walled nanotubes with biomolecules: synthesis, hybridization, and biologically-directed surface assembly.**, *Mat. Res. Soc., Proc.*, 2003, 737, F4.6.1-F4.6.6.
- 111 H. J. Lee, T. T. Goodrich, and R. M. Corn, **SPR Imaging Measurements of 1-D and 2-D DNA Microarrays Created from Microfluidic Channels on Gold Thin Films**, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 5525-5531

-
- 112 E. Huang, F. Zhou, and L. Deng, **Studies of Surface Coverage and Orientation of DNA Molecules Immobilized onto Preformed Alkanethiol Self-Assembled Monolayers**, *Langmuir*, 2000, 16, 3272-3280
- 113 M. Jansson, J. Dixelius, M. Uhlen, B.O. Nilsson, **Binding affinities of insulin-like growth factor-I (IGF-I) fusion proteins to IGF binding protein 1 and IGF-I receptor are not correlated with mitogenic activity.**, *FEBS Letters*, 1997, 416, 259-264.
- 114 F. Zhang, M. Fath, R. Marks, R. J. Linhardt, **A highly stable covalent conjugated heparin biochip for heparin-protein interaction studies.**, *Analytical Biochemistry*, 2002, 304, 271-273.
- 115 J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, D. A. Mann, R. M. Owen, L. L. Kiessling, **Selective immobilization of multivalent ligands for surface plasmon resonance and fluorescence microscopy**, *Analytical Biochemistry*, 2002, 305, 149-155.
- 116 P.-K. Cheung, C.-C. Fong, K.-T. Ng, W.-C. Lam, Y.-C. Leung, C.-W. Tsang, M. Yang, M.-S. Wong, **Interaction between pyridoxal kinase and pyridoxal-5-phosphate-dependent enzymes**, *J. Biochem.*, 2003, 134, 731-738.
- 117 C.-C. Fong, M.-S. Wong, W.-F. Fong, M. Yang, **Effect of hydrogel matrix on binding kinetics of protein-protein interactions on sensor surface**, *Analitica Chimica Acta*, 2002, 456, 201- 208.
- 118 **SPR pages, Sensor Chips-CM5**, consulté le 14 Septembre 2004
<http://home.hccnet.nl/ja.marquart/Sensorchips/CM5/CM5.htm>
- 119 C. V. Nguyen, L. Delzeit, A. M. Cassell, J. Li, J. Han, M. Leyyappan, **Preparation of nucleic acid functionalized carbon nanotube arrays.**, *Nano Letters*, 2002, 2, 10, 1079-1081.
- 120 A. J. Thiel, A. G. Frutos, C. E. Jordan, R. M. Corn, L. M. Smith, **In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces.**, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4948-4956.
- 121 Q. Liu, A.G. Frutos, A. J. Thiel, R. M. Corn, L. M. Smith, **DNA Computing on surfaces: Encoding information at single base level**, *Journal of computational biology*, 1998, 5, 2, 269-278.
- 122 R. Advincula, E. Aust, W. Meyer, W. Knoll, **In Situ investigation of polymer self-assembly solution adsorption by surface plasmon spectroscopy.**, *Langmuir*, 1996, 12, 3536-3540.
- 123 Y. Lvov, G. Decher, G. Sukhorukov, **Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and Poly(allylamine).**, *Macromolecules*, 1993, 26, 5396-5399.
- 124 Y. Lvov, K. Ariga, T. Kunitake, **Layer-by-layer assembly of protein/polyion ultrathin films.**, *Chemistry Letters*, 1994, 2323-2326.

-
- 125 G. B. Sukhorukov, H. Möhwald, G. Decher, Y. M. Lvov, **Assembly of polyelectrolyte multilayer films by consecutively alternating adsorption of polynucleotides and polycations.**, *Thin solid films*, 1996, 220-223.
- 126 G. B. Sukhorukov, M. M. Montrel, A. I. Petrov, L. I. Shabarchina, B. I. Sukhorukov, **Multilayer films containing immobilized nucleic acids. Their structure and possibilities in biosensor applications.**, *Biosensors and bioelectronics*, 1996, 11, 9, 913-922.
- 127 Y. Lvov, K. Ariga, I. Ichinose, T. Kunitake, **Molecular film assembly via layer-by-layer adsorption of oppositely charged macromolecules (linear polymer, protein and clay) and concanavalin A glycogen.**, *Thin solid films*, 1996, 284-285, 797-801.
- 128 C. E. Jordan, R. M. Corn, **Surface plasmon resonance imaging measurements for electrostatic biopolymer adsorption onto chemically modified gold surfaces.**, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 1449-1456.
- 129 F. Caruso, K. Niikura, D. N. Furlong, Y. Okahata, **Assembly of alternating polyelectrolyte and protein multilayer films for immunosensing.**, *Langmuir*, 1997, 13, 3427-3433.
- 130 R. Pei, X. Cui, X. Yang, E. Wang, **Assembly of alternating polycation and DNA films by electrostatic layer by layer adsorption.**, *Biomacromolecules*, 2001, 2, 463-468.
- 131 C.E. Jordon, B.L. Frey, S. Kornguth, R. M. Corn, **Characterization of poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation Fourier transform infrared spectroscopy and surface plasmon resonance measurements.**, *Langmuir*, 1994, 10, 3642-3648.
- 132 D. Watson, F. H. C. Crick, **Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid.**, *Nature*, 1953, 171, 964-967.
- 133 G. B. Kauffman., **DNA structure: Happy birthday!**, *Chem. Educator.*, 2003, 8, 219-230.
- 134 J.P. Fitch, **Nucleic acid as the blueprint** In *An engineering introduction to biotechnology*, SPIE PRESS, Bellingham, Washington, 2002, 31-42.
- 135 R. Tavernier, C. Lizeaux, **Unicité génétique des individus et polymorphismes des espèces.**, In *Sciences de la vie et de la Terre.*, Bordas, Paris, Juillet 1994, 7-89.
- 136 E. Chargaff, **How genetics got a chemical education.**, *Ann. New York Acad. Sci.*, 1979, 325, 345-360.
- 137 **DNA molecular structure**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www-biol.paisley.ac.uk/courses/stfunmac/glossary/DNAmol.html>
- 138 E. Chargaff, E. Vischer, R. Doniger, C. Green, F. Misani, **The composition of desoxypentose nucleic acids of thymus and spleen.**, *J. Biol. Chem.*, 1949, 177, 405-416.

139 **Oligonucleotide Properties Calculator**, consulté le 24 Janvier 2004,

<http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>.

140 R. B. Wallace, J. Shaffer, R. F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura, **Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ χ 174 DNA: the effect of single base pair mismatch.**, *Nucleic Acids Research*, 1979, 6, 11, 3543-3557.

141 S. Ikuta, K. Takagi, R. B. Wallace, K. Itakura, **Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs.**, *Nucleic Acids Research*, 1987, 15, 2, 797-811.

142 M. Gotoh, Y. Hasegawa, Y. Shinohara, M. Shimizu, M. Tosu, **A new approach to determine the effect of mismatches on kinetic parameters in DNA hybridisation using an optical biosensor.**, *DNA Research*, 1995, 2, 285-293.

143 S. Howorka, S. Cheley, H. Bayley, **Sequence-specific detection of individual DNA strands using engineered nanopores.**, *Nature biotechnology*, 2001, 19, 636-639.

144 S. Bommarito, N. Peyret, J. SantaLucia, Jr., **Thermodynamic parameters for DNA sequences with dangling ends.**, *Nucleic Acids Research*, 2000, 28, 9, 1929-1934.

145 J.C. Kaplan, M. Delpech, **L'hybridation moléculaire** In : *Biologie moléculaire et médecine*, Flammarion et C^{ie}, France, 1990

146 R.B. Wallace, J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, K. Itakura., **Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch**, *Nucleic Acids Research*, 1979, 6, 3543.

147 **Sigma-Genosys Oligos**, consulté le 24 Janvier 2004,

http://www.sigma-genosys.com/oligo_meltingtemp.asp.

148 L. A. Marky, K. J. Breslauer, **Calculating thermodynamic data for transitions of any molecularity from equilibrium melting curves.**, *Biopolymers*, 1987, 26, 1601-1620.

149 H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr, **Thermodynamics of internal C • T mismatches in DNA.**, *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 11, 2694-2701.

150 T. Xia, J. SantaLucia, Jr., M. E. Burkard, R. Kierzek, S. J. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, D. H. Turner, **Thermodynamic parameters for an expanded nearest-neighbor model for formation of RNA duplexes with Watson – Crick base pairs.**, *Biochemistry*, 1998, 38, 14719-14735.

151 J. SantaLucia, Jr, **A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics.**, *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.*, 1998, 95, 1460-1465.

152 **TP du cours de biochimie avancé (KBB 031)** de l'université de technologie de Chalmers et l'université de Göteborg, cite consulté le 31 Janvier 2004.

http://www.molbiotech.chalmers.se/programs/kbb031_biokemi_fk/labbm/DNAmelting.pdf.

153 N. Le Novère, **Melting, computing the melting temperature of nucleic acid duplex**, *Bioinformatics Applications note*, 2001, 17, 12, 1226-1227.

154 **Oligonucleotide Properties Calculator**, consulté le 24 Janvier 2004, <http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html>.

155 H. T. Allawi, J. SantaLucia, Jr., **Thermodynamics and NMR of internal G • T mismatches in DNA.**, *Biochemistry*, 1997, 36, 10581-10594.

156 Programme de calcul des températures de fusion, consulté le 22 Mars 2004, <http://ozone2.chem.wayne.edu/Hyther/hyther1main.html>

157 A. V. Fotin, A. L. Drobyshv, D. Y. Proudnikov, A. N. Perov, A. D. Mirzabekov, **Parallel thermodynamic analysis of duplexes on oligodeoxyribonucleotide microchips.**, *Nucleic Acids Research*, 1998, 26, 6, 1515-1521.

158 **Association vaincre la mucoviscidose, Transmission de la mucoviscidose**, consulté le 09 Septembre 2004 <http://www.vaincrelamuco.org/pop/parents>.

159 **Association Québécoise de la Fibrose Kystique**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www.aqfk.qc.ca/maladie.html>.

160 M. Roussey, **La mucoviscidose**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www.med.univ-rennes1.fr/etud/pediatric/mucoviscidose.htm>.

161 **Encyclopédie médicale –Mucoviscidose – Doctissimo**, consulté le 09 Septembre 2004, http://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedia/sa_999_cidose.htm

162 **SOS mucoviscidose**, consulté le 09 Septembre 2004 <http://www.sosmucoviscidose.asso.fr/maladie/chiffrescles.htm>

163 **Ordre des infirmières et infirmiers du Québec**, consulté le 13 Novembre 2003, http://www.infirmiere.net/nouveau_infvir/contenu/probleme_sante/enfants/.

164 **Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology**, consulté le 09 Septembre 2003, <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/IntroItems/CisticFibFr.html>

165 **La Mucoviscidose**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www.splf.org/gp-splf/dossier-documents/mucoviscidose.html>.

166 F.A. Eggerding, D.M. Iovannisci, E. Brinson, P. Grossman, E.S Winn-Deen, **Fluorescence-based oligonucleotide ligation assay for analysis of cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations**, *Human Mutation*, 1995, 5, 3, 153-165.

167 **Société ABBOTT**, consulté le 09 Septembre 2004, http://www.abbottdiagnostics.com/Reagents_Tests/

168 **CMGS-Oligo Ligation Assay**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/ola98.htm>

-
- 169 **La mucoviscidose : Traitement et diagnostic**, consulté le 09 Septembre 2004, <http://www.ac-versailles.fr/pedagogi/svt/docpeda/banques/electro/ph%E9notypes/html/muco.htm>
- 170 M. Goossens, P. Fanen, B. Costes, N. Ghanem, **Le gène de la mucoviscidose son produit la protéine CFTR et ses mutations**, *Bull. Acad. Natle. Méd.*, 1993, 177, n°3, 371-381, séance du 9 mars 1993.
- 171 B. Marc, L. Jérôme, **La mucoviscidose** in *Biologie moléculaire en biologie clinique III. Applications en génétique.*, Elsevier, Octobre 1999, 15-31.
- 172 J. L. Bobadilla, M. Macek Jr., J. P. Fine, P. M. Farell, **Cystic Fibrosis: A worldwide analysis of CFTR Mutations- Correlation with incident data and application to screening**, *Human mutation*, 2002, 19, 575-606.
- 173 E. Flori, B. Doray, **Mucoviscidose**, *Module 02 de la conception à la naissance-item 31*, Faculté de Médecine de Strasbourg, Mars 2004.
- 174 V. Dugas , G. Depret , Y. Chevalier , X. Nesme, É. Souteyrand, **Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption?**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, in press.
- 175 W.A. Peterson, R.J.Heaton, R.M. Georgiadis, **The effect of surface probe density on DNA hybridisation**, *Nucleic acid research*, 2001, 29, 5163-5168.
- 176 G. Feriotto, A. Ferlini, A. Ravani, E. Calzolari, C. Mischiati, N. Bianchi, R. Gambari, **Biosensor technology for real-time detection of the cystic fibrosis W1282X in CFTR**, *Human mutation*, 2001, 18, 70-81.
- 177 Wikipédia, l'encyclopédie gratuite et libre, consulté le 10 décembre 2004, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Accueil>.
- 178 Le grand dictionnaire terminologique, consulté le 10 décembre 2004, http://www.granddictionnaire.com/btml/fra/r_motclef/index1024_1.asp.
- 179 Glossaire: biotechnologie et bioinformatique, consulté le 10 décembre 2004, <http://www.infobiogen.fr/glossaire/glossaire.php>.
- 180 H. DeVoe, I. Jr. Tinoco, **The stability of helical polynucleotides: base contributions**, *J. Mol. Biol.*, 1962, 4; 500-517.
- 181 D.M. Crothers, B.H. Zimm, **Theory of the melting transition of synthetic polynucleotides: Evaluation of the stacking free energy**, *J. Mol. Biol.*, 1964, 9; 1, 1-9.
- 182 K.J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, and L.A. Markey, **Predicting DNA duplex stability from the base sequence**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 3746-3750.

183 N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama, K. Honda, **Improved thermodynamic parameters and Helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes**, *Nucleic Acid Research*, 1996, 24, 22, 4501-4505.