Caractéristiques Optiques et Dynamiques d'Interactions Biomoléculaires de Surface - Application aux biopuces à ADN

Jérôme Hottin

▶ **To cite this version:**

Jérôme Hottin. Caractéristiques Optiques et Dynamiques d'Interactions Biomoléculaires de Surface - Application aux biopuces à ADN. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2009. Français. NNT : . tel-00430804

HAL Id: tel-00430804
https://pastel.hal.science/tel-00430804

Submitted on 9 Nov 2009

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.

UNIVERSITE PARIS XI

UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

Ecole Doctorale Ondes et Matières

Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique – Graduate School

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES

DE L'UNIVERSITE PARIS-SUD XI ORSAY

par

Jérôme HOTTIN

Le 6 juillet 2009

CARACTERISATIONS OPTIQUES ET DYNAMIQUES D'INTERACTIONS BIOMOLECULAIRES DE SURFACE – APPLICATION AUX BIOPUCES A ADN

Devant le jury :

M. Bourguignon Bernard	Président du jury
M. Canva Michael	Directeur de thèse
M. Cloarec Jean-Pierre	Rapporteur
M. Maillart Emmanuel	
M. Mergny Jean-Louis	
Mme. Millot Marie-Claude	Rapporteur
M. Pissard Serge	Invité

Le hasard est un allié aussi fugitif que mortel.

Il te perd avec la même facilité qu'il te sauve.

Apprend à réduire cet imprévisible fauve

à la dimension d'un inoffensif chaton.

Inspiré de - La Horde du Contre Vent - (Alain Damasio)

Remerciements :

Je remercie en premier lieu les membres du jury Bernard Bourguignon, Emmanuel Maillart, Jean-Louis Mergny et Serge Pissard d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse ainsi que Marie-Claude Millot et Jean-Pierre Cloarec d'avoir en plus accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également Pierre Chavel, directeur du Laboratoire Charles Fabry de l'Intitut d'Optique – Graduate School, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse dans ses locaux.

Je remercie le directeur général de GenOptics, Philippe Kérourédan, pour avoir accepté de financer ma thèse et je remercie toute l'équipe pour m'avoir accueilli dans les locaux de l'entreprise, m'avoir soutenu et conseillé durant toute la durée de mes recherches.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Michael Canva, sans qui je n'aurais pas découvert ce sujet pluridisciplinaire qui ma motivé pendant les trois années et demi que j'ai passé au sein de son équipe « Matériaux, Composants et Systèmes pour la Biophotonique » (MaCSyBio).

J'associe à ces remerciements les autres membres du groupe, c'est-à-dire Gisèle Roger, maintenant à la retraite, pour avoir guidé mes premiers pas dans le domaine de la plasmonique, Alain Bellemain pour sa réactivité et ses compétences en programmation LabView qui m'ont été indispensables, Alain Aide pour ses conseils mécaniques. Je tiens à remercier Julien Moreau qui, par son regard neuf sur le projet et son dynamisme m'a ouvert de nouvelles portes dans des moments difficiles.

Bien sûr mes travaux n'auraient pas abouti sans la précieuse aide de Illaria Manelli, post-doctorante chimiste qui m'a enseigné la voie du Dextran, et de Jolanda Spadavecchia, post-doctorante chimiste et partenaire de « cardio-boxing » sans qui je n'aurais pu réaliser de biopuces permettant un vrai diagnostic génétique.

Je tiens à remercier les autres doctorants de l'équipe pour leur apport important tant sur le plan scientifique que sur le plan social. Je remercie tout d'abord Pierre Lecaruyer qui a malheureusement quitté le laboratoire avant sa soutenance et qui a ouvert la voie à la méthode d'autocalibration et à une autre méthode nous permettant d'arriver à l'heure au laboratoire, Mohamed Nakkach pour sa bonne humeur, ses explications calmes et ses rollers et, bien entendu, Aurélien Duval, avec qui j'ai partagé mon bureau et mes problèmes durant cette thèse, pour sa participation active à ma vie au laboratoire, ses conseils, ses questions, ses avis et que je félicite pour sa soutenance réussie.

Je remercie également toute l'équipe de l'unité U955 de Michel Goossens de l'INSERM à l'Hôpital Henri Mondor de Créteil et plus particulièrement Laure Lecerf, Valérie Vélayoudame et Natacha Martin pour leur travail sur le dépôt matriciel, sur la purification des simples brins d'ADN et pour le partage de leur connaissance en biologie. Je remercie également Emmanuelle Girodon pour sa participation au colloque IFSBM (Institut de Formation Supérieure BioMédicale) et pour tous ses conseils et remarques concernant la mucoviscidose.

Mes remerciements vont aussi au corps enseignant de l'IFSBM dont la formation m'a beaucoup apporté sur le plan des connaissances biologiques ainsi qu'à tous mes « camarades de classe » qui ont suivi ce même parcours rajoutant une teinte biomédicale à leur formation en science dure.

Enfin, je tiens naturellement à remercier tous ceux qui, dans ma vie hors laboratoire, m'ont supporté, soutenu, détendu et surtout permis de mener cet Nième diplôme jusqu'au bout. Je pense à mes parents, ma famille, mes amis qui entourent l'éternel étudiant que je suis.

Merci à vous aussi qui lisez ces lignes et qui allez jeter un coup d'œil au résumé de trois années et demi de recherche.

INTRODUCTION *9*

1. État de l'art **16**

1.1. Observations des interactions biomoléculaires 17

1.1.1. Les biopuces à fluorescence 18

1.1.2. Les biocapteurs électrochimiques 22

1.1.3. Les biocapteurs acoustiques 25

1.1.4. Les biocapteurs optiques sans marqueurs 26

1.2. Interactions ADN-ADN 28

1.2.1. Qu'est-ce que l'ADN ? 28

1.2.2. Introduction à la température de fusion 36

1.2.3. Diagnostic génétique 39

1.3. Résonance de Plasmon de Surface 43

1.3.1. Historique 43

1.3.2. Caractéristiques 43

1.3.3. Profil de résonance 47

1.3.4. Sensibilité du système 48

1.3.5. Cinétique d'interaction 53

1.4. Conclusion 56

2. Système de détection **60**

2.1. Bloc opto-thermo-mécanique 60

2.1.1. La partie optomécanique 61

2.1.2. La fluidique 72

2.1.3. La régulation de température 74

2.2. Fonctionnalisation 83

2.2.1. Substrat 84

2.2.2. La fonctionnalisation MUA-PEI 86

2.2.3. La fonctionnalisation Dextran 87

2.2.4. Régénération de la surface 95

2.2.5. Autre chimie de surface 97

2.3. Dépôt matriciel 99

2.4. Matériel Biologique 103

2.5. Acquisition et analyse des données 111

2.6. Conclusion 116

3. Caractérisation des interactions ADN-ADN **120**

3.1. Introduction à la caractérisation 120

3.2. Impact de la concentration de différents produits 125

3.2.1. Concentration en Na^+ 126

3.2.2. Concentration en sondes 131
3.2.3. Concentration des cibles 140
3.3. Autocalibration 141
3.3.1. Inhomogénéité du transducteur 141
3.3.2. Artéfacts temporels 145
3.3.3. Inhomogénéité de la concentration des sondes 147
3.3.4. Cycle de correction 151
3.3.5. Application au diagnostic génétique 154
3.3.6. Conclusion 158
3.4. Température 159
3.5. Structures secondaires 168

CONCLUSION 177

ANNEXES 181

BIBLIOGRAPHIE 204

INTRODUCTION

À l'heure où la recherche génétique explose [i], à l'heure où les grandes entreprises et centres de recherche se font concurrence du point de vue de l'innovation technologique mise à disposition des centres médicaux [ii, iii, iv] mais aussi des particuliers [v, vi], les biocapteurs se trouvent sous les feux des projecteurs médiatiques à l'occasion de la révision de la loi de bioéthique (déposée avant fin 2009, mise en application premier trimestre 2010 [vii]) ciblant la médecine prédictive. Ces détecteurs biomoléculaires ont, pour la plupart, l'avantage d'avoir de multiples applications tant dans la génomique que dans la protéomique.

Ces applications entrent directement dans la tendance médicale d'aujourd'hui dont le but ultime est de prévenir la maladie plutôt que d'avoir à la guérir. Qui, de nos jours, n'a pas perçu cette 'nouvelle médecine préventive individuelle' par le biais des médias (télévision, radios, affiches, …) comme, par exemple, le « Programme national de dépistage du cancer du sein » [viii] ? Dans ce cadre, de plus en plus de fonds sont mobilisés pour le développement de tests de prédisposition ou de dépistages présymptomatiques. À titre d'exemple, pour le dépistage du cancer du sein, le coût varie de 2500 à 77000 euros par année de vie gagnée.

Quand 13 ans et 2.7 milliard de dollars ont été nécessaires pour le premier séquençage du génome humain en 2001, deux mois et 'seulement' 1.5 millions de dollars ont été nécessaires pour séquencer le génome de J. Watson en 2007. Malgré l'effondrement considérable des sommes nécessaires pour la recherche génétique, les coûts de cette recherche restent très élevés pour une généralisation et une utilisation en routine en hôpital. De plus l'analyse génétique préventive utilisant le séquençage soulève des questions d'éthique fondamentale. Avec une carte d'identité génétique à sa disposition, l'employeur, par exemple, pourrait choisir son employé en fonction de ses gènes et l'assureur pourrait fixer ses tarifs en fonction de la prédisposition génétique des clients.

Au centre de ces biocapteurs se trouvent les biopuces qui, depuis leurs premières utilisations comme capteurs biologiques en 1956 [ix], sont la base de la majorité des bio-détecteurs. Même si les systèmes de détection basés sur ces biopuces ont beaucoup évolué depuis les premières puces à ADN des années 1980, le domaine de recherche reste toujours

Biocapteur : Un biocapteur est, de manière générale, constitué d'un détecteur d'origine biologique: enzyme, anticorps, récepteur... et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique (qui par exemple sera la fixation de l'antigène à détecter sur l'anticorps) en un signal aisément exploitable (généralement électrique ou lumineux).

Les mots soulignés sont définis dans le glossaire en Annexe 1

dynamique du fait de leurs multiples possibilités d'application et de leur production à forte cadence entraînant un coût attractif.

Aux vues de la quantité d'études réalisées sur les biopuces à ADN en particulier, nous pourrions croire qu'une innovation dans ce domaine semble utopique et que ces biocapteurs ont révélé tous leurs secrets et atteint leur limite d'utilisation. Avec l'avènement de la chute des frontières entre les domaines de recherche (biologie, médecine, sciences physiques, électronique, chimie, …), il s'avère qu'une multitude d'adaptations de techniques en vue d'utilisations toujours plus innovantes s'offre au domaine de la recherche sur ces biopuces à ADN.

C'est précisément à la frontière entre la physique, la biologie moléculaire, la chimie et l'informatique que se situent mes travaux de thèse. Au sein de l'équipe MaCSyBio (Matériaux, Composant et Systèmes pour la Biophotonique) du laboratoire Charles Fabry de l'IOGS (Institut d'Optique Graduate School), j'ai réalisé diverses études sur un système capable de transformer un signal biochimique en signal optique. Ces études entraient dans le cadre de la création d'un consortium regroupant quatre laboratoires académiques : l'INT (Institut National des Télécoms), l'ICMPE (Institut de Chimie et des Matériaux de Paris Est), l'Unité U955 de l'INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) de l'Hôpital Henri Mondor et l'IOGS (Institut d'Optique – Graduate School) et deux partenaires industriels : GenOptics et Genomics. Ce consortium devait se regrouper atour d'un projet à financement européen visant à créer un système optique, basé sur biopuce à ADN et sur la résonance de plasmon de surface, permettant un diagnostic génétique rapide, peu onéreux et sans équivoque de maladies génétiques héréditaires (Figure 1).

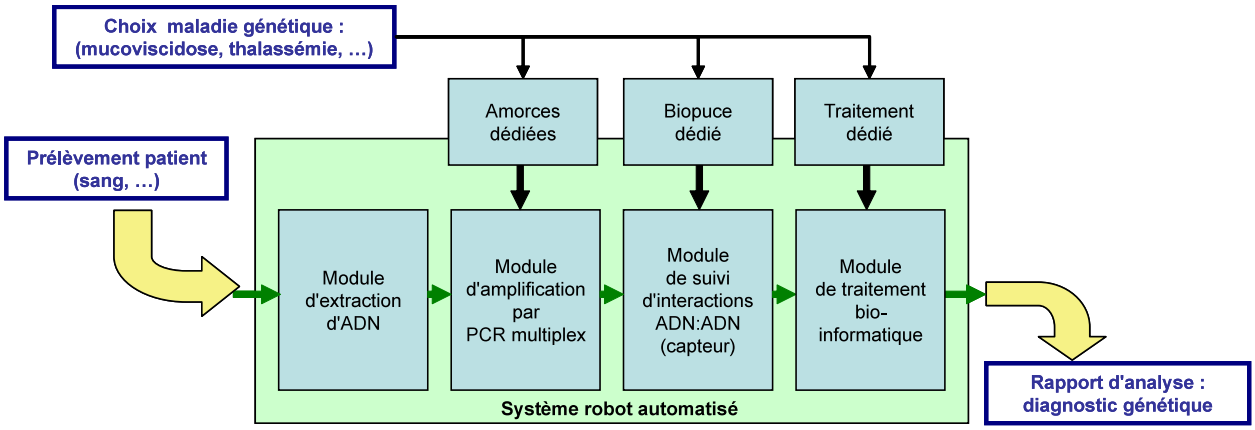


Figure 1 : Schéma de principe du système présenté à la commission européenne pour le financement du projet du consortium.

Le projet n'ayant pas été retenu par la commission européenne, seule une partie du consortium, constituée de GenOptics, de l'Unité U955 de l'INSERM de l'Hôpital Henri Mondor de l'ICMPE et de l'IOGS, a continué le projet. Mes recherches de thèses, financées par GenOptics, se sont centrées sur la maladie de la mucoviscidose qui avait été choisie comme application directe du projet en vue d'un transfert technologique vers l'industrie. L'utilisation du phénomène des plasmons de surface bien décrit et maîtrisé en physique couplé à une technique de biopuce à ADN s'affranchissant des marqueurs fluorescents représente bel et bien une innovation technique et une amélioration des systèmes utilisés à l'heure actuelle.

La principale difficulté de l'élaboration de cette recherche réside dans sa caractéristique pluridisciplinaire (Figure 2). Une maîtrise de l'ensemble du phénomène physique de la résonance de plasmon de surface, des comportements biochimiques des brins d'ADN et de leurs dépendances aux paramètres thermodynamiques sont nécessaires. Le projet implique également la connaissance de la fonctionnalisation des surfaces, pour permettre aux molécules d'être fixées sur la puce, ainsi que le développement d'un système informatisé pour l'imagerie et l'analyse des données. Il faut, enfin, établir un dialogue avec les médecins spécialistes de la maladie génétique de la mucoviscidose afin d'adapter les expérimentations aux demandes médicales.

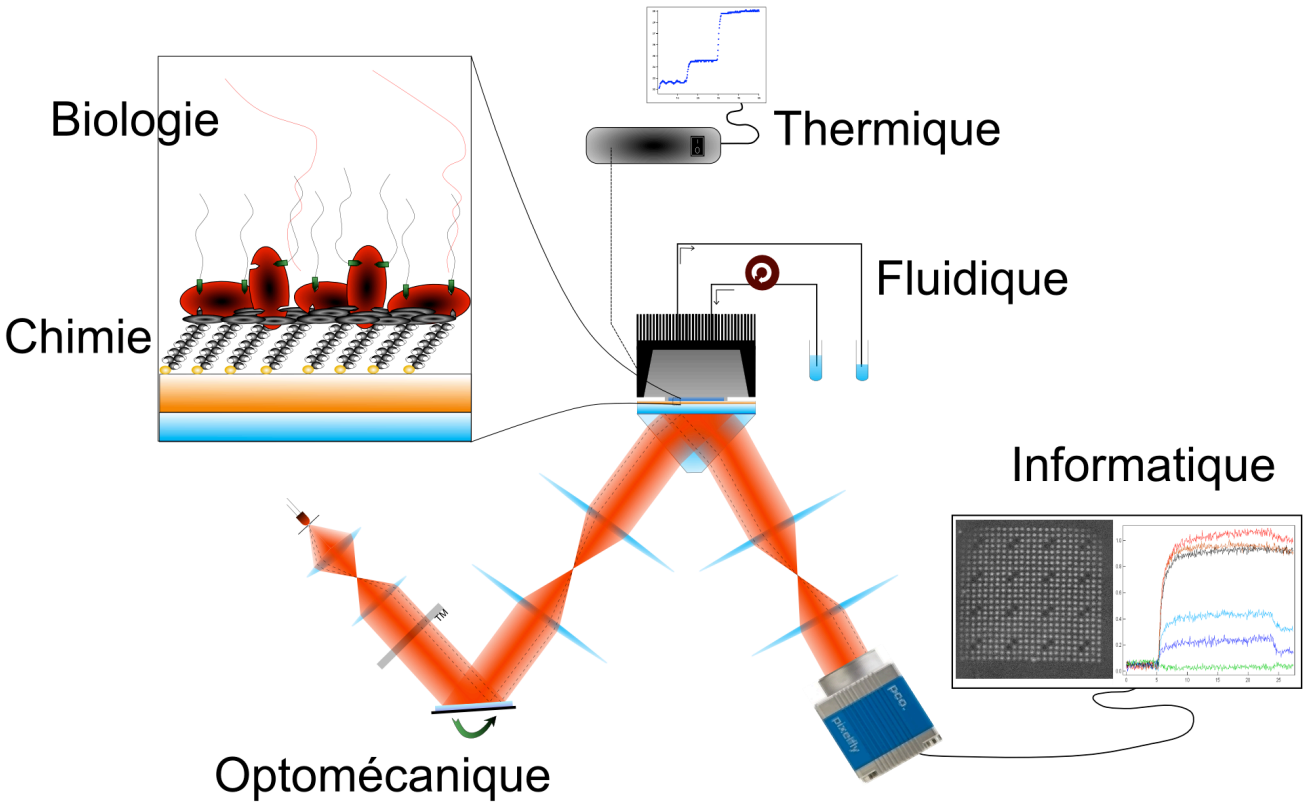


Figure 2 : Schéma global du système.

Dans le but de compléter mes connaissances biologiques afin d'améliorer la rapidité du dialogue avec les partenaires médicaux, j'ai suivi une formation parallèle à l'IFSBM (Institut de Formation Supérieure BioMédicale) de Villejuif. Cette formation en trois ans (6 modules d'une semaine chacun ainsi que l'organisation d'un colloque et plusieurs présentations orales) m'a permis de mieux appréhender la caractéristique pluridisciplinaire de mes travaux de thèse.

Le premier chapitre de mon manuscrit dressera un état de l'art concernant les biocapteurs moléculaires. J'y aborderai les techniques les plus courantes permettant la détection d'une interaction entre deux molécules pour finir sur la particularité de notre système de détection optique. Je décrirai ensuite la molécule biologique utilisée lors de cette thèse : l'ADN et j'en donnerai les caractéristiques nous permettant l'identification d'une séquence par notre capteur optique. Je finirai ce premier chapitre par la description du phénomène physique sur lequel se base notre biodétecteur : la résonance de plasmon de surface.

Le deuxième chapitre s'architecturera autour du système de détection à proprement parler. Une première partie décomposera le bloc opto-thermo-mécanique du système et ses améliorations apportées durant ma thèse, une deuxième s'attardera sur la fonctionnalisation de surface, une troisième partie décrira la méthode de dépôt des molécules sondes sur la puce, une quatrième partie détaillera le matériel biologique utilisé durant ma thèse et une dernière partie se consacrera au traitement des données que j'ai en partie développé.

Le dernier chapitre concerne les caractérisations que j'ai effectuées sur les biopuces à ADN. J'y aborde les relations complexes entre les caractéristiques du système (la concentration en matériel génétique, en sel, la température, l'accessibilité des molécules à détecter) et le signal de réflectivité obtenu par notre détecteur. Ce chapitre présente aussi la nécessité de l'utilisation d'une méthode de correction des données développée durant ma thèse.

Le manuscrit se terminera par une réflexion sur l'ensemble des résultats obtenus et sur leurs comparaisons avec les calculs théoriques soit rencontrés dans la littérature, soit réalisés dans le cadre de la thèse.

Chapitre 1 : État de l'art

Résumé :

Dans ce chapitre j'aborderai les différents systèmes de détection biomoléculaire en passant par les appareils à fluorescence, électrochimiques et acoustiques pour finir sur les détecteurs optiques et particulièrement ceux basés sur la résonance de plasmon de surface dont fait partie notre système.

Je parlerai ensuite de la molécule biologique sujet de mes recherches de thèse : l'ADN. J'en décrirai sa structure, ses caractéristiques et les problèmes engendrés par sa modification. Je parlerai des paramètres thermodynamiques qui régissent les interactions entre deux molécules d'ADN et j'introduirai la notion de température de fusion pour finir sur la définition du diagnostic génétique.

Pour clore ce premier chapitre, je traiterai de la résonance de plasmon de surface, phénomène physique à la base de notre système de détection, j'en donnerai les principales caractéristiques et ses avantages utilisés par notre biodétecteur.

1. État de l'art

De manière générale, nous pouvons considérer le fonctionnement d'une cellule et par extension, d'un être vivant, comme la succession de réactions biochimiques en chaîne qui s'autorégulent de manière complexe. Certaines de ces réactions ont été clairement identifiées et comprises, comme le cycle de fabrication de l'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) au sein des mitochondries, dit cycle de Krebs [x,xi]. D'autres, au contraire, restent encore du domaine de la recherche du fait de leur complexité (facteurs de mise en route de l'apoptose [xii,xiii], etc.). Les principaux acteurs et maîtres d'œuvre de ces réactions ne sont autres que les protéines, expressions directes des gènes portés par les chromosomes. À l'heure actuelle, seulement un faible pourcentage des protéines identifiées est attribué à une ou plusieurs fonctions. La protéomique, ou science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, organelle, tissu, organe ou organisme à un moment donné et sous des conditions données, est un terme récent qui n'apparaît qu'en 1997 [xiv,xv] par analogie avec la génomique. Cette science a pour but de comprendre les interactions existantes entre les protéines afin d'en identifier la ou les fonctions. Et c'est par le biais de ces études spécifiques qu'ont pu être mis en évidence des défauts de fonctionnement de protéines, dus à certaines malformations dans un ou plusieurs de leurs domaines actifs. Par conséquent, dans un monde cellulaire où chaque interaction biomoléculaire entraîne une cascade de réactions pouvant être très diverses, la moindre anomalie sur une protéine peut engendrer des conséquences plus ou moins importantes et plus ou moins irréversibles sur le fonctionnement d'une cellule, organelle, organe, etc… De ce fait, de nombreuses techniques (gels d'électrophorèse, cristallographie, séquençage, etc..) ont vu le jour et permettent entre autres d'identifier des protéines non-fonctionnelles, d'en définir la cause (virus, maladie génétique, etc …) et d'y trouver une thérapie quand cela est possible. Lorsqu'une ou plusieurs modifications d'une protéine sont connues, il est possible de la (les) détecter dans un prélèvement de patient afin d'identifier une maladie.

Il existe une multitude de techniques de diagnostic, par exemple la choriocentèse pour la trisomie 21 (réalisation d'un caryotype à partir des cellules des villosités choriales [xvi]), le dosage protéique pour la maladie d'Alzheimer (dosage du fluide cébrospinal pour détecter la concentration des protéines Tau, Aβ et Tau phosphorylées [xvii]) et, plus récemment, les biopuces. Cette dernière technique consiste à étudier par différents moyens des interactions

entre un produit biologique attaché à une surface (appelé « sonde ») et un produit biologique en solution (appelé « cible »), mis en contact avec la puce. Depuis ces trente dernières années, l'utilisation de ces capteurs s'est de plus en plus répandue et de nombreuses techniques d'identification de molécules se sont développées. Les paragraphes qui suivent vont premièrement détailler plusieurs types de ces biocapteurs puis décrire la molécule d'ADN qui est au centre des études de ma thèse et enfin aborder le principe physique de base de détection de notre biocapteur.

1.1. Observations des interactions biomoléculaires

Chacune des interactions d'intérêt concernant un objet biologique en particulier (protéine, ADN, etc...) et se déroulant in vivo peut être théoriquement observée in vitro sur un biocapteur complexe. Cet appareil permet de transformer une interaction biochimique en signal observable et utilisable pour diverses caractérisations. Son principe, représenté Figure 3, a été développé en utilisant différentes méthodes. Dans un premier temps, je décrirai le principal détecteur utilisé à l'heure actuelle, les biopuces à fluorescence. J'aborderai des méthodes moins répandues mais ayant un fort potentiel comme les méthodes électrochimiques et acoustiques. Je terminerai par les méthodes optiques permettant une détection sans marquage préalable. Grâce à cette technique, plusieurs analyses peuvent être réalisées comme par exemple des études d'interactions entre protéines [xviii], ou protéine-sucres [xix], protéine –ADN [xx, xxi], ADN-ADN [xxii], etc…

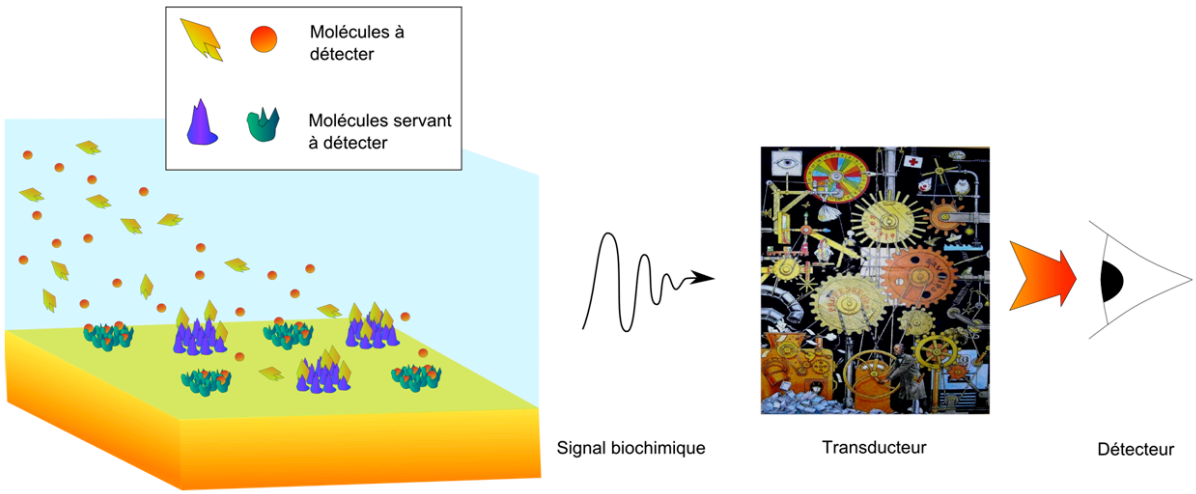


Figure 3 : Schéma de principe d'un système de détection basé sur une biopuce. Les molécules à détecter sont injectées sur la puce. Les interactions qui s'y déroulent sont transformées par le transducteur en signal visualisable par l'utilisateur.

1.1.1. Les biopuces à fluorescence

Depuis la fin des années 80, la méthode de détection des interactions biomoléculaire la plus utilisée est la fluorescence. Elle permet en routine d'observer plusieurs milliers d'interactions sur un même support. Quelques entreprises ont développé un certain nombre de machines permettant la lecture de ces interactions, comme par exemple Affimetrix, Agilent ou Nanogen [[xxiii],[xxiv],[xxv]]. Il existe plusieurs sortes de biopuces à fluorescence. La première, et certainement la plus répandue, consiste en l'ajout d'un fluorophore sur la ou les cibles à envoyer sur les sondes. Là où les sondes sont déposées sur la puce par la technique du 'spotting' (Technique décrite dans le chapitre 2.3.Dépôt matriciel), une solution de la ou des cibles est envoyée sur la puce. Ces cibles interagissent avec les sondes sur cette puce. Cette dernière est ensuite rincée pour éliminer les cibles non accrochées, séchée, puis passées sous le faisceau d'un laser qui va exciter les fluorophores. Un détecteur va capter l'émission de la fluorescence et faire une cartographie en intensité de fluorescence de la puce (Figure 4).

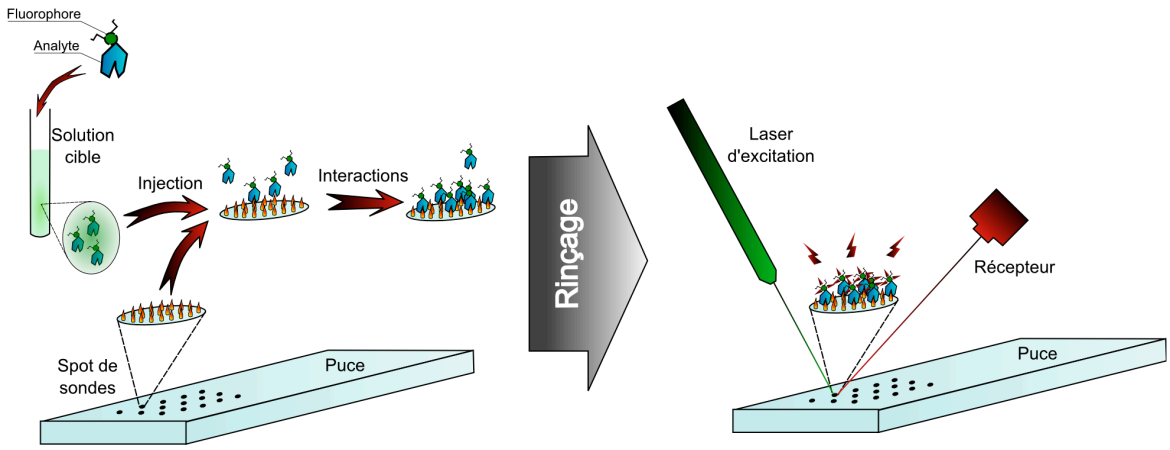


Figure 4: Schéma de principe de l'utilisation d'une biopuce à fluorescence. Les molécules sondes sont fixées sur la puce en spots (voir chapitre 2.3.Dépôt matriciel), les analytes sont couplées à des fluorophores et diluées dans une solution cible puis injectées sur la puce. Les cibles interagissent avec les sondes. La puce est rincée, séchée, exposée à une source lumineuse excitatrice des fluorophores pour être analysée par le détecteur.

Les résultats attendus peuvent être de natures diverses. La recherche de couples protéiques ligand-récepteur stables, par exemple dans le cas d'une recherche de nouveaux médicaments, est facilitée par ce genre de systèmes à très haute cadence car ils permettent de mieux cibler quelles catégories de molécules correspondent aux attentes. Avec une seule injection de produit cible, de nombreuses constantes d'interaction entre la cible et les sondes peuvent être observées révélant ainsi l'importance de l'affinité d'une cible pour plusieurs

autres molécules fixées sur la puce (Figure 5). Cette capacité peut être améliorée en utilisant simultanément plusieurs fluorophores, sensibles à des longueurs d'ondes différentes, fixés sur différents types de cibles. Ainsi, une cible est mise en contact avec plusieurs sondes et une sonde est mise en contact avec plusieurs cibles ; l'analyse des états d'équilibre tiendra compte d'un milieu de plus en plus complexe se rapprochant petit à petit du milieu in vivo (Figure 6). L'intensité de chaque signal correspond à la quantité de cibles ayant interagi avec la sonde. Cette technique est très utilisée dans les analyses d'hybridation compétitive (transcriptome…)

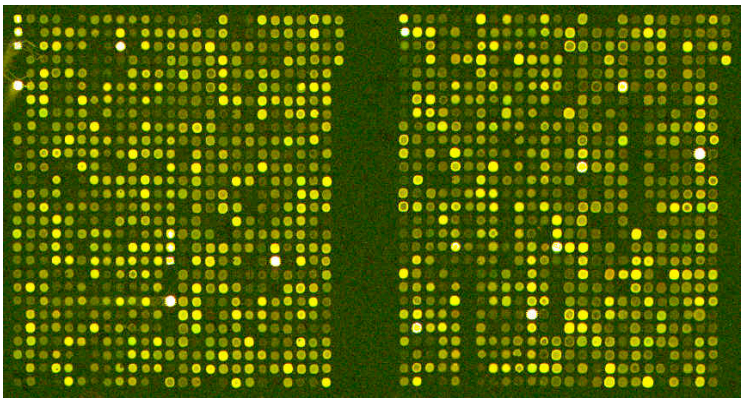


Figure 5 : Exemple de résultat obtenu sur une biopuce à fluorescence. L'intensité collectée par le récepteur est dépendante du nombre de molécules cible accrochées sur le spot. Ce nombre sera proportionnel à l'affinité de la cible pour la sonde du spot. [xxvi] : GS. Gerhard, DNA Micro-array gene expression (2003)

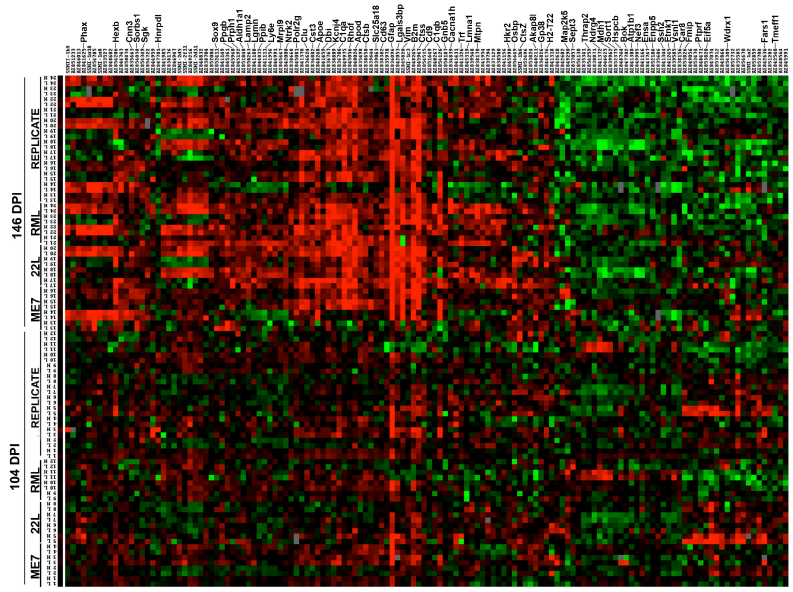


Figure 6 : Exemple de résultat obtenu sur une biopuce à fluorescence utilisant un marquage double. Six cibles différentes sont injectées s'accrochant sur les sondes avec lesquelles elles ont le plus d'affinité. Cette étude met en évidence une altération de l'expression de gènes particuliers produits par trois types de souris. [xxvii]PJ Skinner, BMC genomics (2006).

La dernière sorte de puces à fluorescence que nous allons décrire utilise la méthode dite de 'sandwich'. Les sondes sont préalablement marquées d'un fluorophore et les cibles ne sont pas modifiées. Suite à l'injection des cibles sur la puce, un autre ligand complémentaire à la cible et marqué par un deuxième fluorophore est injecté (Figure 7).

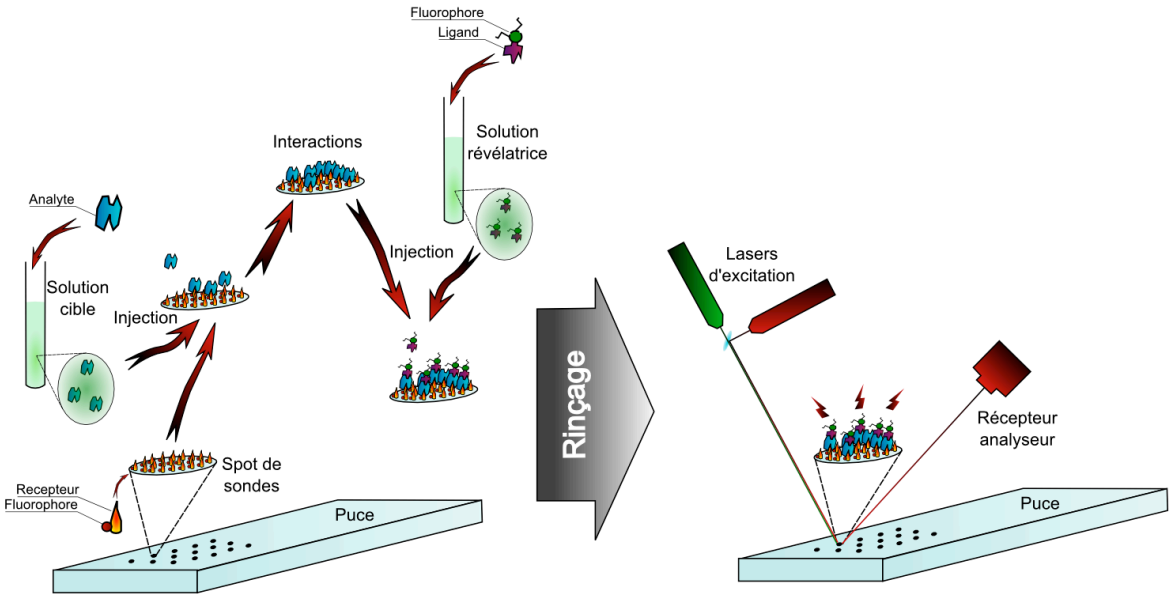


Figure 7 : Schéma de principe de l'utilisation d'une biopuce à fluorescence basée sur la méthode de 'sandwich'. Les molécules sondes couplées à des fluorophores sont fixées sur la puce en spots (voir chapitre 2.3.Dépôt matriciel), les analytes sont dilués dans une solution cible puis injectés sur la puce. Les cibles interagissent avec les sondes. Une solution contenant un deuxième ligand de l'analyte et couplé à un deuxième fluorophore est injectée sur la puce. La puce est ensuite rincée, séchée, exposée à une ou plusieurs sources lumineuses excitatrices des fluorophores et enfin analysée avec un récepteur.

Grâce aux informations apportées par les deux fluorophores, il est possible d'observer les constantes d'affinité entre l'analyte et le récepteur sans marquer directement le produit à cibler. Les molécules servant de révélateurs d'interactions seront des molécules de type plus ou moins standard, comme des anticorps dont la partie fixe sera marquée et dont la partie variable sera adaptée à l'analyte à étudier (Figure 8). Cette méthode permet l'utilisation de molécules marquées standardisées, réduisant ainsi le coût des analyses et simplifiant leurs processus. En effet, si l'on veut analyser l'interaction d'une famille de protéine avec un récepteur, il sera plus facile d'utiliser un marqueur commun de chacune des protéines à injecter successivement que de toutes les marquer. Mais les révélateurs doivent être bien sélectionnés car le signal que l'on perçoit reflète aussi l'affinité entre la molécule à analyser et ce révélateur et non pas la seule affinité entre la molécule cible et les sondes fixées sur la puce.

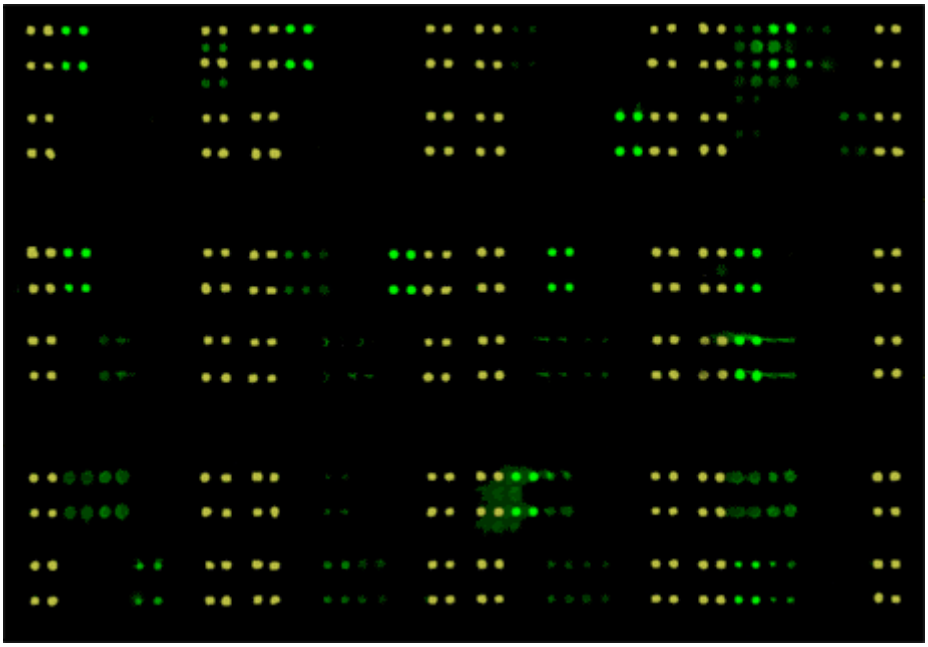


Figure 8 : Exemple de reconstitution de l'image obtenue par le récepteur analyseur [xxviii] La biopuce a été réalisée en fixant des ligands communs du lupus (incluant ADN, histones et autres protéines du noyau) à une surface fonctionnalisée par de la poly-L lysine. Les révélateurs sont des anticorps modifiés avec un fluorophore Cy3 (correspondant aux spots verts). Les spots jaunes correspondent aux sondes qui permettent une orientation de l'image.

Cette technique de biopuce à fluorescence est une technique très populaire pour les analyses en routines et à fort débit de la recherche génétique et protéomique. Son développement nous permet d'obtenir de plus en plus d'information (les biopuces à ADN atteignent le million de sondes [xxiii]). Mais cette technique n'est pas optimale pour toutes les études biomoléculaires.

Il existe 2 principaux inconvénients à cette technique pour notre projet. Le premier est le marquage, bien qu'à l'heure actuelle des techniques performantes ont été développées afin de diminuer le coût du marquage fluorescent et d'en augmenter la rapidité. En effet, l'ajout d'une molécule sur une cible ou une sonde a de grandes chances de perturber son comportement vis-à-vis des interactions à observer. Même si cette étape est réalisée en routine, elle reste une étape supplémentaire ayant un coût certain en temps et en personnel réalisant l'opération du marquage qu'elle soit réalisée sur les amorces pour une amplification PCR ou sur le produit final.

Le deuxième, et le plus important des inconvénients de cette technique, est le fait que l'observation ne se situe qu'à l'équilibre et après rinçage de la puce. Or, dans le vivant, une interaction entre molécules est régulièrement perturbée par les changements de composition du milieu ambiant. Pour caractériser dans son entier une interaction entre différents produits,

comme par exemple pour l'élaboration d'un nouveau médicament, il faut connaître les dynamiques d'interaction pour chacun des produits sondes et cibles. L'étape de rinçage, en plus d'éliminer le surplus de produits n'ayant pas interagit, va dénaturer certaines interactions faibles qui ne seront pas observées par l'analyseur (Figure 9).

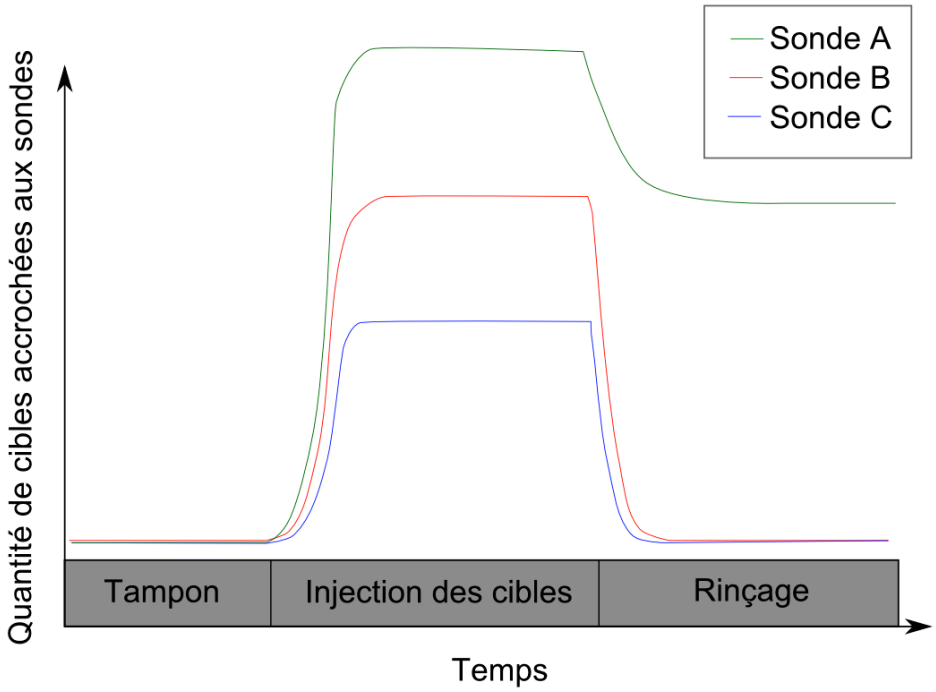


Figure 9 : Graphique de principe de la quantité de cibles accrochées aux sondes en fonction du temps. Sur les trois sondes qui réagissent lors de l'injection d'une cible, seule le duplexe formé sur la sonde A persiste lors de l'étape de rinçage. Les deux autres réactions ne seront pas observées.

1.1.2. Les biocapteurs électrochimiques

La technique de détection de biomolécules par biocapteurs électrochimiques est la plus ancienne et se décline sous une multitude de manières. Il existe des détecteurs potentiométriques [xxix , xxx], ampérométriques [xxxi], conductimétriques [xxxii, xxxiii] (Figure 10), certains utilisent des méthodes plus ou moins complexes. Plusieurs équipes de recherche ont développé de puissantes techniques de détection d'interactions basées sur les nanoparticules. Le principe repose sur la capture de nanoparticules d'or [xxxiv] ou d'argent [xxxv], par exemple, par les cibles ayant interagi suivi d'une mesure électrochimique par stripping anodique [xxxvi, xxxvii].

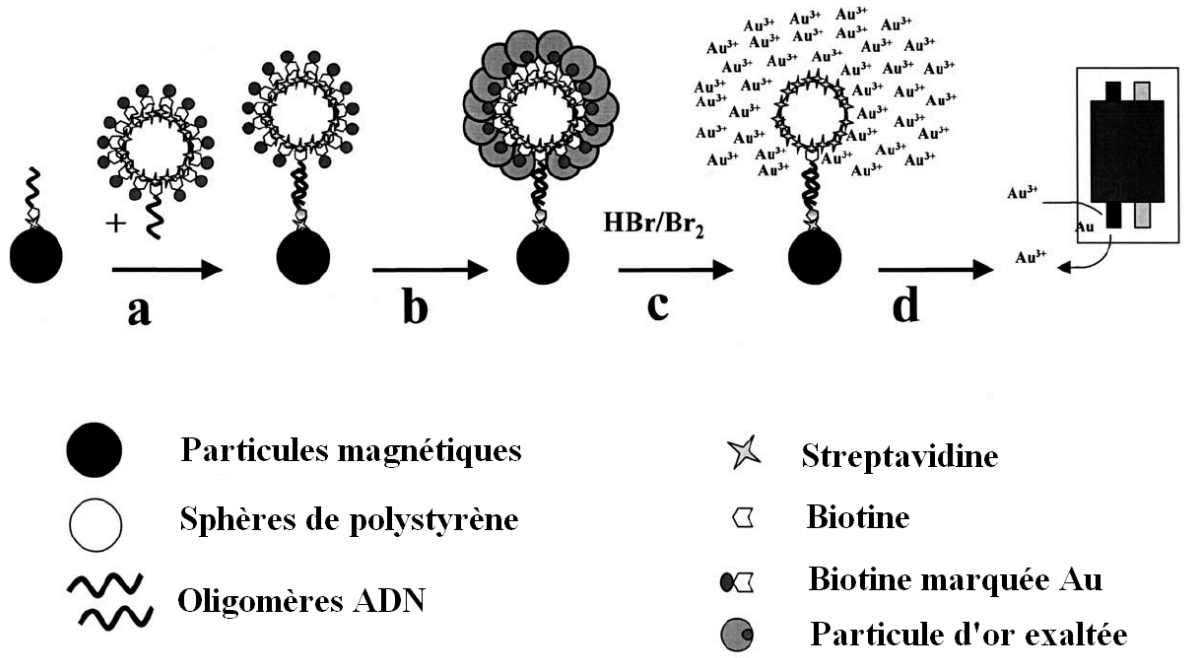


Figure 10 : Schéma de principe de détection d'une hybridation ADN-ADN par une méthode électrochimique [35]. La molécule sonde (simple brin d'ADN) est fixée à une particule magnétique et la molécule cible (simple brin d'ADN complémentaire) est fixée à une sphère de polystyrène fonctionnalisée et couplée à des molécules d'or. L'hybridation (a) permet de rapprocher les particules d'or de la particule magnétique. Ces particules d'or vont être exaltées (b) puis détachées de la sphère de polystyrène par ajout d'acide dans la solution (c) et les ions ainsi créés vont être détectés par une électrode (d).

L'avantage principal de cette méthode de détection basée sur les nanoparticules est le seuil de concentration détectable qui peut aller jusqu'au nanomolaire voir picomolaire. Mais l'utilisation de cette technique n'a d'intérêt que lorsque le but est de montrer une et une seule interaction possible entre seulement deux molécules. Dans bien des cas, une interaction partielle n'engendre aucun signal car seule l'appariement stable entre deux molécules permet la formation d'un agrégat de particules sous la forme d'une nanostructure amplifiant le signal [xxxviii]. Le système est donc très sélectif sur l'information qu'il peut apporter sur les affinités d'une molécule avec ses possibles ligands, ce qui en réduit les possibilités d'utilisation. De plus, le couplage des molécules étudiées à de grosses particules peut, encore cette fois-ci, perturber le comportement des cibles et des sondes utilisées.

Il existe aussi une technique électrochimique, plus apparentée aux biopuces à proprement parler, qui consiste à fixer des sondes sur une grille de transistor à effet de champ [xxxix] (Figure 11). Les interactions entre les cibles et les sondes vont perturber la densité de charge entre la grille en SiO2 et le substrat de Si. Lorsque le transistor est mis sous

tension, c'est la grille qui va réguler le transfert de charge entre la source et le drain. La modification de la structure du semi-conducteur engendrée par les interactions cibles/sondes sur la grille va modifier le signal transmis. Il est donc possible de repérer de manière quantitative les interactions spécifiques qui se produisent sur la grille du transistor grâce au suivi en temps réel de la modification du potentiel entre la source et le drain. En plus de son avantage important sur les autres biocapteurs de par son potentiel de détection dynamique en temps réel, la biopuce à transistor permet de quantifier l'interaction observée. En effet, le signal est proportionnel à la charge intrinsèque des molécules cibles se fixant sur la surface de la grille. Plus les cibles ont une affinité importante avec les sondes, plus la quantité de matière déposée sera grande et plus la densité de charge sera modifiée. D'un autre côté, l'injection d'un mélange de cible n'est pas réalisable étant donné que le signal obtenu par l'utilisateur ne permet en aucun cas discerner plusieurs interactions de natures différentes sur la surface de la puce. Dans le cas de l'expérience menée par J. Fritz et al. [39], nous pouvons comparer l'évolution du potentiel du transistor pour trois injections différentes. La première est une injection de cible n'ayant aucune affinité avec la sonde, la deuxième ayant une très forte affinité avec cette même sonde et la dernière ayant une affinité moindre (Figure 12).

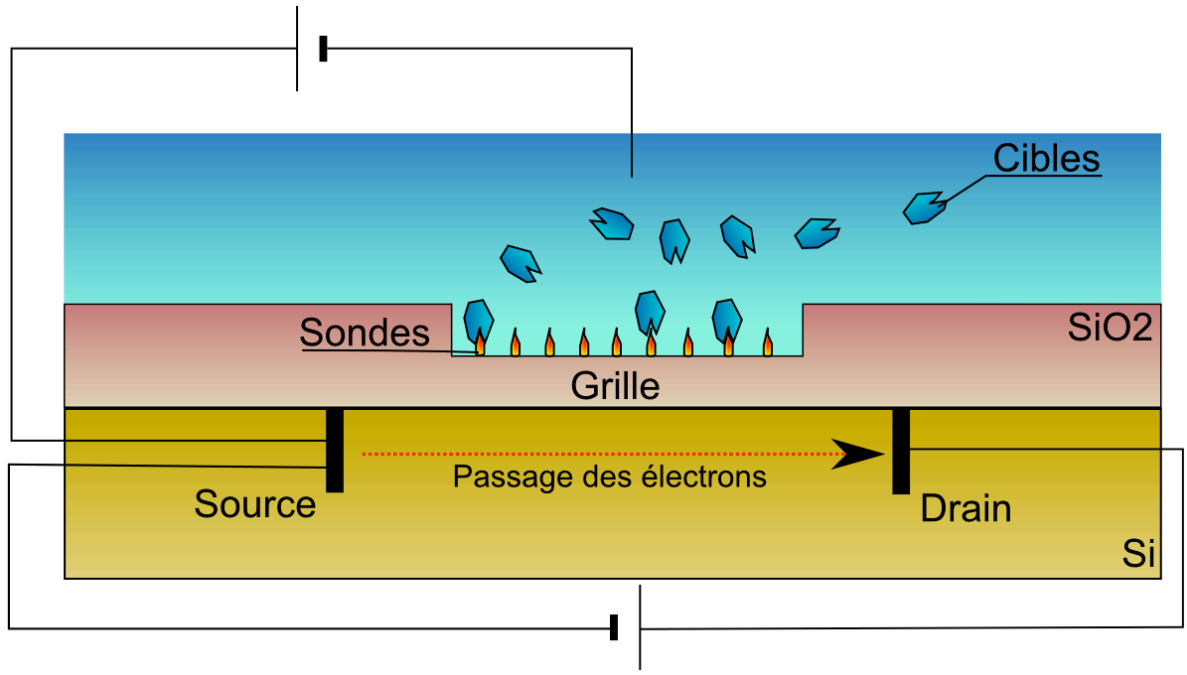


Figure 11 : Représentation schématique d'un biocapteur à transistor [35]. Les interactions entre les cibles et les sondes entraînent une modification de la densité de charge sur la grille qui va perturber le passage des électrons entre la source et le drain. Cette technique permet une détection en temps réel d'interactions spécifiques.

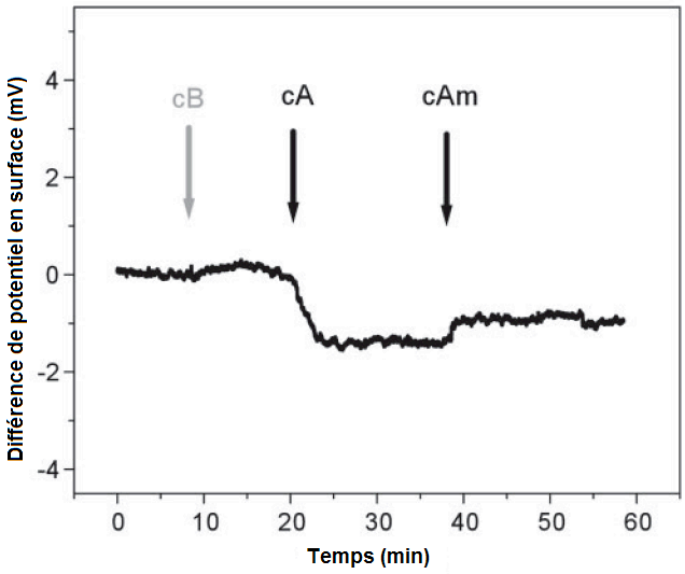


Figure 12 : Exemple de signal obtenu avec un biocapteur à transistor [39]. Le signal représente l'évolution de la différence dans le temps de potentiel en surface. L'expérience montre une succession d'injections de trois types de cibles différentes. Le premier, cB, n'interagit pas avec les sondes de la grille. Le deuxième, cA, va interagir fortement avec les sondes. La charge de la molécule cible étant négative, la différence de potentiel va diminuer avec la présence des cibles en surface. Le dernier type, cAm, correspond à une cible cA modifiée qui n'aura pas autant d'affinités avec les sondes que la cible cA. La quantité de charge négative en surface sera donc moindre car les duplexes cibles(cAm)/sondes formés seront moins stable.

1.1.3. Les biocapteurs acoustiques

Basés sur les caractéristiques piézoélectriques de composés comme les cristaux de quartz dont la fréquence de résonance dépend de la configuration du système, les biocapteurs acoustiques sont des outils sensibles et performants pour la détection de biomolécules [xl]. Comme pour les détecteurs électrochimiques, les interactions peuvent être suivies en temps réel. Le principe repose sur la capacité de ces matériaux à être sensibles à une masse de l'ordre de 10^{-1} à 10^{-2} ng. Leur fréquence d'oscillation, lorsque le signal électrique appliqué reste identique, va être perturbée (Figure 13). Il devient alors facile d'observer des interactions spécifiques entre des cibles et des sondes lorsque ces dernières sont fixées sur le matériau piézoélectrique. Il est tout de même à noter que les vibrations parasites extérieures peuvent perturber le signal et qu'un très grand soin doit être apporté à l'élaboration du capteur afin de garantir la plus grande spécificité des réactions. En effet, n'importe quelle molécule se fixant sur le matériau est source de perturbation du signal.

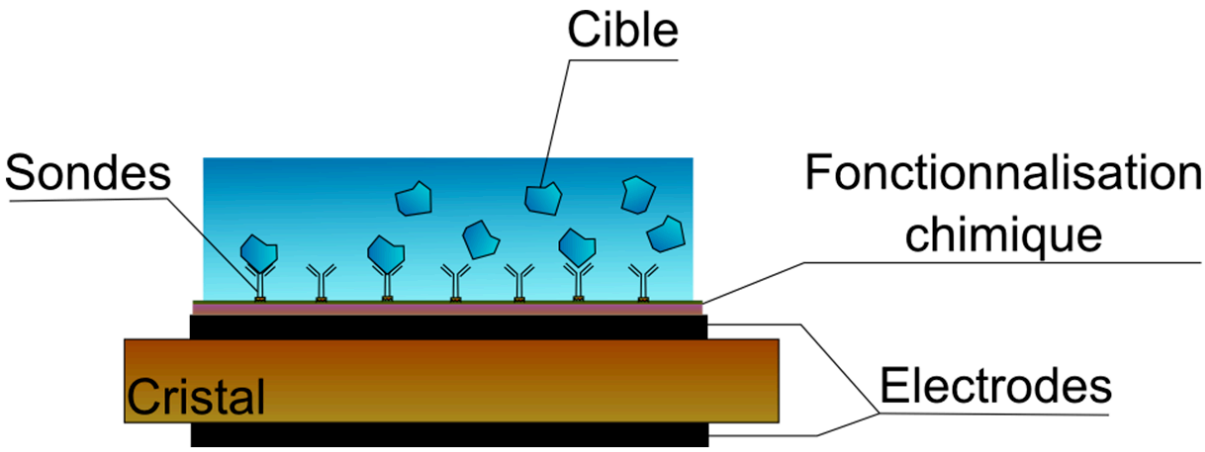


Figure 13 : Représentation schématique d'un biocapteur acoustique [36]. Les interactions entre les cibles et les sondes sont traduites par une diminution de la fréquence d'oscillation du cristal pour une tension de commande des électrodes identique. Il est possible d'établir une relation entre le taux d'affinité cible/sonde – correspondant à la quantité de duplexe formés – et le décalage de la fréquence d'oscillation du matériau piézoélectrique.

1.1.4. Les biocapteurs optiques sans marqueurs

Considérons le biocapteur comme un empilement de milieux différents. Il serait composé d'une couche de support, d'une couche (simple ou complexe) du matériau sensible (comme le cristal pour le biodétecteur acoustique de la Figure 13), d'une couche biologique (incluant les sondes fixées sur la couche sensible) et d'une couche de milieu variable (solution dans laquelle évoluent les cibles). Lorsqu'une molécule cible interagit avec une molécule sonde en surface d'un biodétecteur, le duplexe, de par sa formation, change les caractéristiques de la couche biologique (Figure 14).

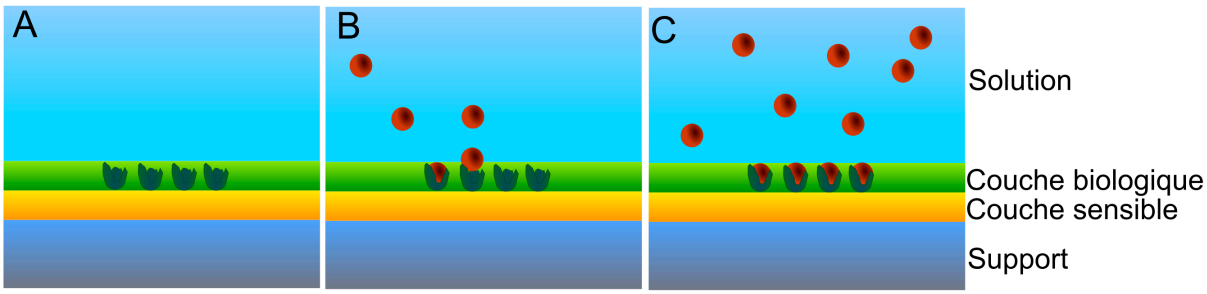


Figure 14 : Schéma de principe d'un biocapteur sensible aux changements des caractéristiques de la couche biologique. A) L'état de référence, B) injection des molécules cibles, C) état final avec interactions entre cibles et sondes. Les caractéristiques de la couche biologique a évolué à l'endroit où les interactions ont eu lieu.

C'est typiquement ces changements que vont détecter des biocapteurs optiques sans marqueurs. L'ajout d'une certaine quantité de matière (cible) va entrainer le changement de l'indice de réfraction de la couche biologique par exemple. De nombreux biocapteurs se sont ainsi développés autour de l'analyse des modifications optiques du système. C'est le cas des biocapteurs optiques se basant sur des miroirs résonants [xli], des guides d'ondes [xlii] ou sur la résonance de plasmon de surface [xliii] par exemple. Une très bonne description et comparaison entre ces différents types de capteurs est reportée dans la thèse d'Emmanuel Maillart [xliv] un précédent doctorant de notre équipe. C'est pourquoi, nous nous contenterons ici de décrire les biocapteurs optiques à résonance de plasmon de surface qui est la méthode de transduction utilisée sur notre système. Cette technique, développée à partir des années 1980 initialement sous forme de mono capteur (un seul type d'interaction observée), a de multiples avantages. Le principal atout d'un biocapteur optique basé sur la résonance en plasmon de surface est le suivi en temps réel. En effet, par comparaison aux biocapteurs optiques les plus utilisés, les capteurs à fluorescence, les interactions sont observées de manière dynamique, c'est-à-dire qu'il est possible d'enregistrer l'évolution d'une interaction en fonction du temps. Ainsi, plus d'informations sont obtenues sur l'interaction étudiée (Voir chapitre 1.3.Résonance de plasmon de surface). Un autre avantage important distinguant ces biocapteurs dynamiques des biocapteurs électrochimiques ou acoustiques est le nombre d'interactions que l'on peut suivre en parallèle sur la même puce [xxii]. Plusieurs entreprises, dont Biacore AB [xlv] et GenOptics [xlvi], ont développé des capteurs optiques basés sur cette technique. À l'heure actuelle, les analyseurs commerciaux ne permettent pas le suivi d'un grand nombre d'interactions en parallèle. La plupart se contente même d'un seul type de sonde [xlv]. La diversité des duplexes étudiés se fait par injections consécutives sur une même puce et donc sur une seule catégorie de sonde mais qui peut être extrêmement sensible (concentration de cible détectable inférieur au nM pour des oligonucléotides [xlv]). De petites entreprises, comme GenOptics, se sont lancées dans la réalisation de biocapteurs optiques permettant non seulement le suivi dynamique des interactions de surface mais aussi de la fixation de multiples sondes sur la puce.

Notre système dynamique, bien qu'un peu moins sensible à celui de Biacore AB (concentration des cibles entre 10nM et 100nM toujours pour des oligonucléotides), et dont est issu celui de GenOptics permet de suivre des centaines d'interactions en parallèle (jusqu'à

900 sites d'interactions) [xxii], ce qui peut s'avérer nécessaire pour l'étude très rapide des ligands potentiels d'un seul récepteur. En effet, en fixant sur la puce différentes molécules ayant une affinité potentielle avec une cible à étudier, nous pouvons, avec une seule injection de cette cible, observer son affinité avec toutes les sondes en même temps. Notre système est aussi multifonctionnel. Il est possible d'y observer n'importe quel type d'interaction (protéine – protéine, ADN – protéine, ADN – ADN, sucre… [xxii]). Dans les chapitres suivants, nous allons décrire le matériel biologique étudié pour mon travail de doctorat : l'ADN. Nous décrirons ensuite le phénomène physique de base de notre système de détection optique : la résonance de plasmon de surface.

1.2. Interactions ADN-ADN

Parmi les nombreuses applications des biocapteurs, comme la détection des interactions protéines-protéines par exemple, il existe notamment l'identification des mutations génétiques (Plus de détails sur les mutations génétiques sont apportés en annexe 2) engendrant la formation de protéines non-fonctionnelles ou mal-fonctionnelles. Elle se base sur la détection des interactions ADN-ADN. Les molécules sondes sont des simples brins d'ADN dont la séquence est choisie et correspond à une séquence potentiellement mutée du gène du patient à identifier. Les molécules cibles sont des simples brins d'ADN issus du gène du patient sur lequel la mutation à détecter est recherchée. Ces interactions entre cibles et sondes sont soumises à des lois de thermodynamique que nous allons décrire dans les paragraphes suivants.

1.2.1. Qu'est-ce que l'ADN ?

L'histoire de la génétique débute au XIXème siècle lorsque Gregor Mendel en 1865 pose les bases théoriques de l'hérédité moderne par l'observation de lignées hybrides de petits pois et la transmission de caractères phénotypiques et génotypiques [xlvii]. August Weismann en 1883, émet l'hypothèse d'un support matériel pour la transmission de ces caractères génétiques [xlviii] mais ce n'est que 60 ans plus tard en 1944 qu'Oswald Avery découvre que l'ADN est responsable de la transformation génétique des bactéries, et suppose que ce serait

bien le support de l'hérédité [xlix]. De cette molécule, James D. Watson et Francis Crick en 1953 en décrivent la structure [l]. Cette grande découverte a permis un important développement de la génétique qui est toujours à l'heure actuelle un domaine dynamique.

Ce n'est vraiment qu'à partir de l'analyse réalisée par Watson et Crick de la diffraction par rayons X, obtenue par Rosalind Franklin en 1953 [li], que la molécule d'ADN a commencé à révéler sa structure. Leur modèle repose sur une conformation en double brins formant chacun une hélice centrée sur un même axe. Le squelette de ces brins est composé d'un enchaînement de phosphates et de résidus sucrés sur lesquels s'articulent des bases azotées. On appelle alors un ensemble « phosphate + résidus sucré + base azotée » un nucléotide. Chaque nucléotide est caractérisé par la nature de sa base. Dans les molécules d'ADN, il existe 4 sortes de bases azotées : l'adénine (A) et la guanine (G), qui sont des purines, la cytosine (C) et la thymine (T) qui sont des pyrimidines (Figure 15).

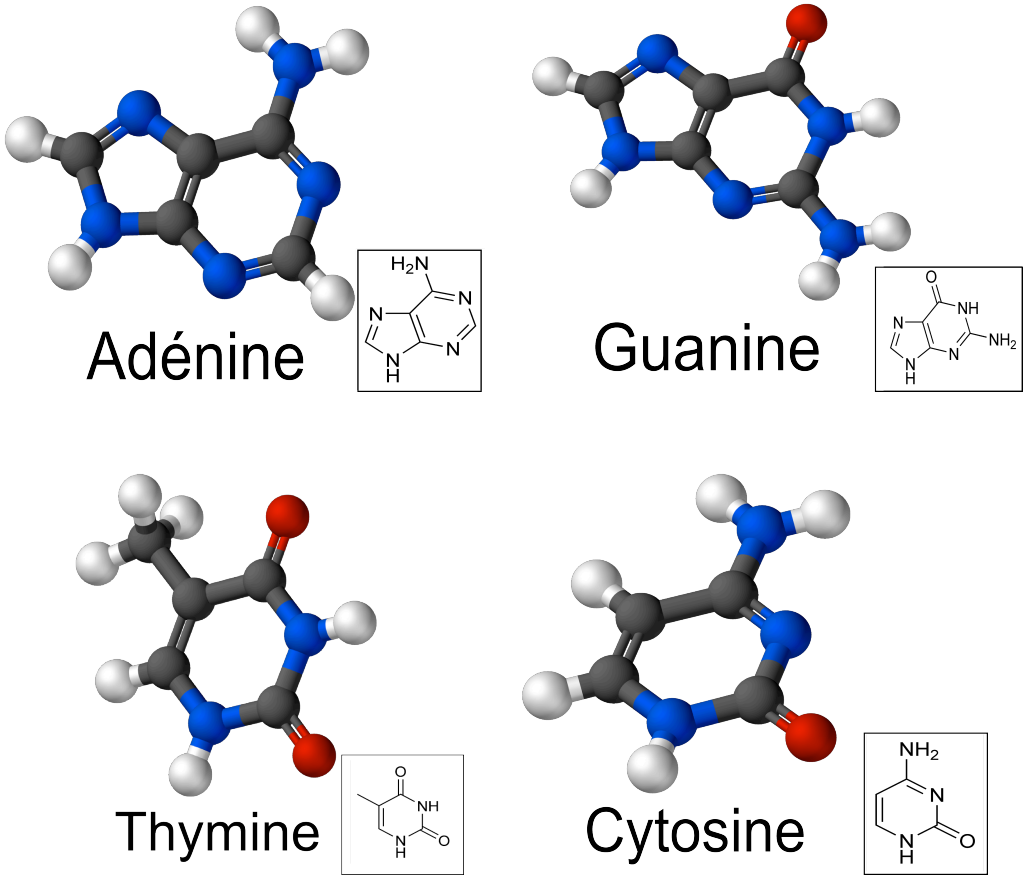


Figure 15 : Représentations moléculaires des quatre bases azotées de l'ADN : l'adénine (A), la guanine (G), la thymine (T) et la cytosine (C) [issue du site www.wikipedia.com]. Les atomes marqués en bleu sont des atomes d'azote, d'oxygène en rouge, d'hydrogène en blanc et de carbone en noir.

C'est Erwin Chargaff qui, le premier en 1951, arriva à la conclusion d'un appariement des bases suivant le modèle : A-T (ou T-A) et C-G (ou G-C) [lii]. Cette conclusion énoncée dans la loi Chargaff est obtenue par identification du pourcentage de chacune des bases dans la composition de l'ADN humain (A=30.9%, T=29.4%, C=19.8% et G=19.9%). Chaque purine est associée à une pyrimidine par le biais de ponts hydrogènes. Il existe deux ponts hydrogène entre les bases A et T et trois ponts hydrogène entre les bases C et G ce qui rend la liaison entre les bases C et G plus stable qu'entre les bases A et T (Figure 16). Ce sont ces liaisons entre les bases qui permettent aux deux brins d'ADN d'être attachés l'un à l'autre. On dira d'une base qu'elle est complémentaire à une autre si elles forment un couple C-G ou A-T et, par extension, on dira d'une succession de bases, appelée séquence, qu'elle est parfaitement complémentaire à une autre si toutes les bases de la première séquence sont complémentaires de la deuxième. Dans ce manuscrit, une attention particulière est portée sur la distinction importante entre deux séquences parfaitement complémentaires et deux séquences quasiment complémentaires. Deux séquences parfaitement complémentaires s'hybrident parfaitement et chacune des bases d'une séquence se lie à sa complémentaire sur l'autre séquence. Dans le cas d'une hybridation quasiment complémentaire, il existe un ou des mésappariements entre les deux séquences. Etant donné que la majeure partie des bases de ces deux séquences sont complémentaires, les deux brins vont s'hybrider, mais les mésappariement de bases non complémentaires vont créer une déstabilisation du duplexe.

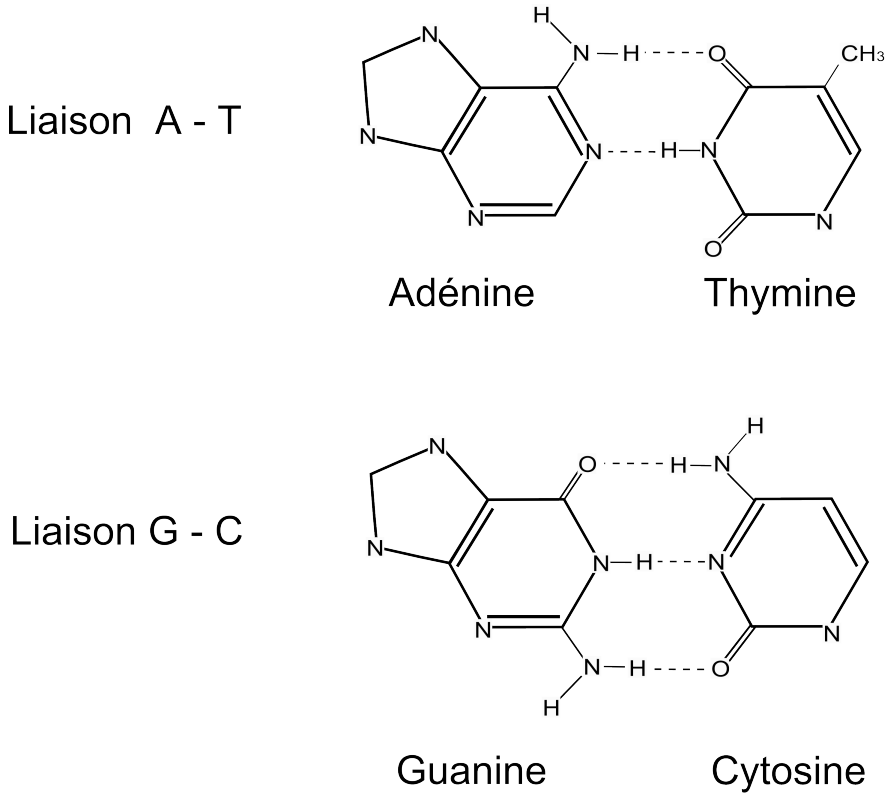


Figure 16 : Les bases azotées de l'ADN forment des paires. Pour chacune des paires, il faut une purine (A ou G) et une pyrimidine (T ou C). Les deux types de liaisons réellement stables sont les liaisons entre A et T et les liaisons entre G et C. La liaison entre une adénine et une thymine est basée sur deux ponts hydrogènes, tandis que la liaison entre une guanine et une cytosine est basée sur trois de ces ponts.

Un brin d'ADN est orienté. On note 5' l'extrémité correspondant au carbone 5 du résidu sucré sur lequel se fixe un phosphate et 3' l'extrémité opposée du résidu sucré sur lequel se fixe le nucléotide suivant. L'appariement ou hybridation entre les deux brins d'ADN se fait de manière antiparallèle c'est-à-dire que le premier brin est orienté dans le sens 5'-3' et que le deuxième se fixe sur le premier dans le sens 3'-5' (Figure 17). Les deux brins ne sont reliés que par les liaisons entre leurs bases azotées.

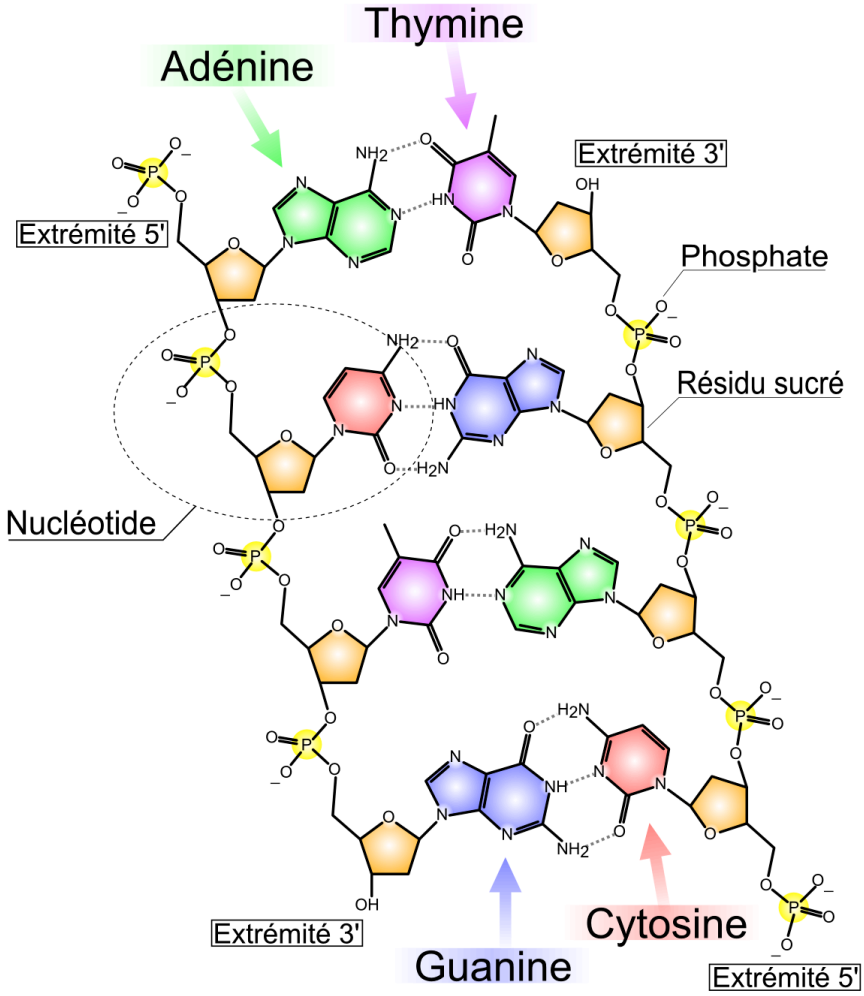


Figure 17 : Représentation d'un fragment de double brin d'ADN [issue du site www.wikipedia.com]. Les nucléotides, formés d'un phosphate, d'un sucre et d'une base azotée, se lient par leurs phosphates au nucléotide suivant dans le sens 5' –> 3'.

Afin d'illustrer les termes de complémentarité et d'hybridation de deux brins d'ADN, nous allons prendre un exemple fictif de séquence d'ADN. Dans la pratique, une séquence d'ADN est symbolisée par la succession de ses bases azotées soit dans le sens 5'-3' (brin sens), soit dans le sens inverse (brin anti-sens), l'enchaînement des sucres et des phosphates étant identiques pour chacun des nucléotides de la séquence. Pour garder une homogénéité dans la notation des séquences dans ce manuscrit, chacune d'entre elles sera écrite dans le sens 5'-3' (brin sens) et les symboles 5' et 3' seront conservés.

Soit une séquence A1 : 5' TGTTCTCAGTTT 3' et la séquence B1 qui lui est parfaitement complémentaire : 5' AAACTGAGAACA 3'. Ces deux séquences vont s'hybrider de manière parfaite. Il arrive que des bases soient modifiées durant divers phénomènes intracellulaires, comme par exemple une modification du 6ème nucléotide de la séquence B1 qui deviendrait : 5' AAACT**T**AGAACA 3' notée B2 (Figure 18). Cette

séquence comporte une majorité de bases complémentaires avec la séquence A1. Les deux séquences vont pouvoir s'hybrider mais la liaison du 6ème nucléotide au lieu d'être C-G, deviendra C-T. La thymine et la cytosine ne créeront pas une liaison forte et la stabilité globale du duplexe A1-B2 sera moins importante que celle du duplexe A1-B1. La transformation d'une séquence en une autre est appelée 'mutation'. Il existe différentes sortes de mutations comme les délétions (une partie de la séquence est enlevée), l'addition (une partie de séquence est ajoutée), la répétition (une ou plusieurs bases sont répétées), etc… Dans le cas particulier où une seule base de la séquence originelle (dite saine) est changée en une autre base dans la séquence transformée (dite mutée), la mutation s'appelle une SNP (Single Nucléotide Polymorphisme). Ici, la mutation transformant la séquence B1 en séquence B2 est une SNP.

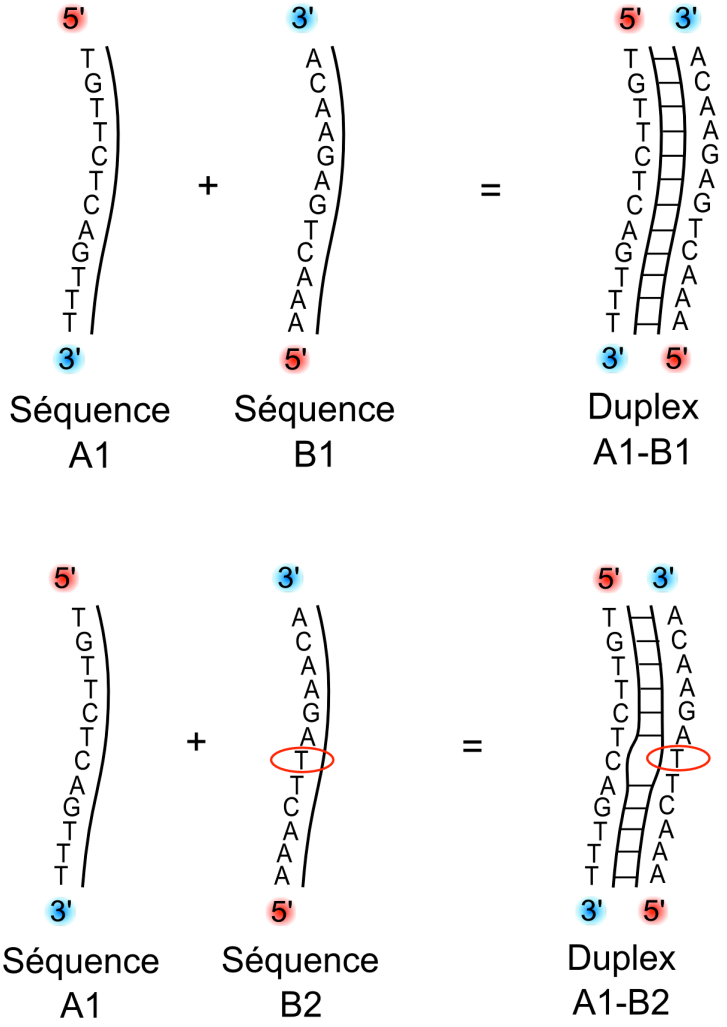


Figure 18 : Exemple d'hybridation entre deux séquences d'ADN. La séquence B1 est parfaitement complémentaire à la séquence A1 tandis que la séquence B2 est quasiment complémentaire à la séquence A1. Le duplexe A1-B1 sera plus stable que le duplexe A1-B2.

Lors de sa formation, la molécule d'ADN s'enroule et le squelette de sucres et de phosphates entoure les bases azotées. Cette double hélice peut prendre plusieurs formes possibles en fonction du milieu ambiant. La représentation la plus couramment utilisée est appelée ADN-b. C'est la conformation décrite par Watson et Cricks et c'est celle qui semble prédominante dans les cellules (Figure 19). Lorsque la double hélice se présente sous cette forme, la distance entre deux nucléotides successifs est de 0.34 nm et la molécule effectue une rotation complète autour de son axe longitudinal sur 3.32 nm. Les deux autres conformations rencontrées chez les organismes vivants sont appelées ADN-a et ADN-z. Leurs structures, proche de l'ADN-b, se distinguent les unes des autres par un pas (ADN-a : 0.26 nm ADN-z : 0.37 nm), une distance de rotation (ADN-a : 2.46, ADN-z : 4.56) différente. De même, le centre autour duquel tourne l'hélice n'est pas positionné de manière identique pour chacune des formes.

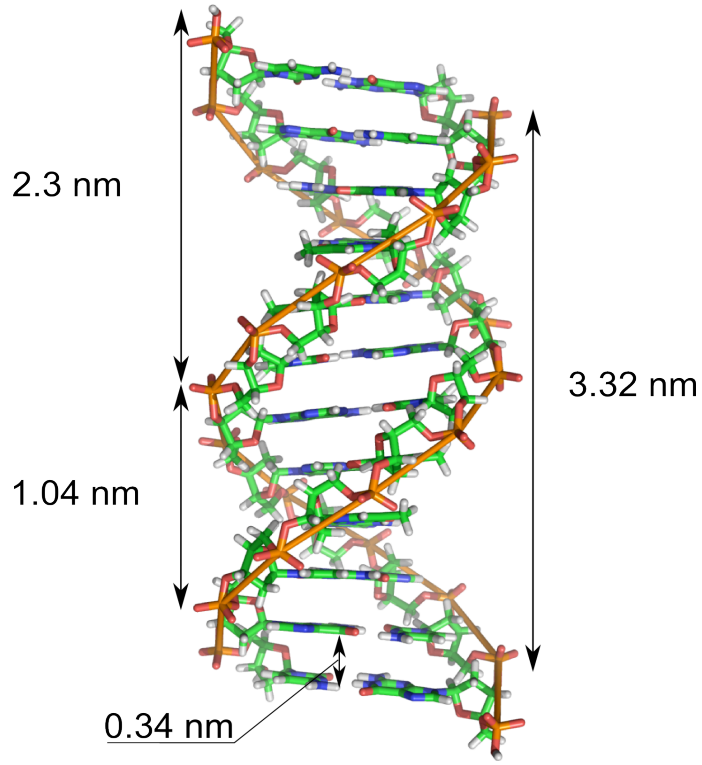


Figure 19 : Structure en double hélice du brin d'ADN-b [issue du site www.wikipedia.com]. Un simple brin effectue une révolution sur 3.32 nm et la distance entre les bases azotées de deux nucléotides successifs est de 0.34 nm.

Dans son état double brin, l'ADN est une molécule résistante à beaucoup de contraintes externes. Elle est très flexible et conserve sa structure interne sous des contraintes modifiant sa forme macroscopique (enroulement, nœuds, etc…). Cette flexibilité descend jusqu'à une échelle d'environ 46-50 nm dépendamment du milieu ambiant, soit environ 140

paires de bases. Cette longueur est appelée par abus de langage : longueur de persistance. De part l'agitation thermique et des nombreuses interactions entre l'ADN et les molécules d'eau environnantes, il est difficile de réellement observer un ADN rectiligne. Cette longueur de persistance est donc, sur une moyenne temporelle, la longueur d'ADN à partir de laquelle l'orientation du polymère devient décorrélée d'un facteur 'e' ($e \approx 2.718$).

Dans notre cas, les sondes comme les cibles sont des simples brins d'ADN. Ces simples brins sont beaucoup moins résistants aux contraintes mécaniques externes. Leur flexibilité peut aussi être étudiée. Comme pour la double hélice, la longueur de persistance dépendra du milieu ambiant et notamment de sa teneur en sel. La solution tampon utilisée dans notre équipe est une solution phosphate saline notée : PBS (Phosphate Buffer Salin). Utilisée à une concentration 1x, la teneur en sel est de 0.138 M. Pour une température de 24°C environ, la longueur de persistance de nos simples brins est d'environ 2.6 nm, soit une séquence entre 7 et 8 bases [liii] (Figure 20). Cette caractéristique de l'ADN est problématique dans le cas d'une utilisation de simples brins. En effet, il est possible que le duplexe A1 puisse se replier sur lui-même en créant une auto-hybridation, c'est à dire qu'une partie de sa séquence est complémentaire d'une autre partie de sa séquence. Si ces bases sont suffisamment éloignées, le brin peut s'hybrider sur lui-même. Dans certains cas, cette caractéristique permet, grâce à la formation d'une boucle (ou hairpin) et l'utilisation d'un marqueur d'extrémité, de distinguer plusieurs conformations de l'ADN. Mais dans un système sensible à la quantité de duplexe formés, l'auto-repliement peut être une gêne. Il devient difficile pour le simple brin B1 de venir former un duplexe avec le simple brin A1 replié. Cette forme d'auto-repliement est appelée structure secondaire.

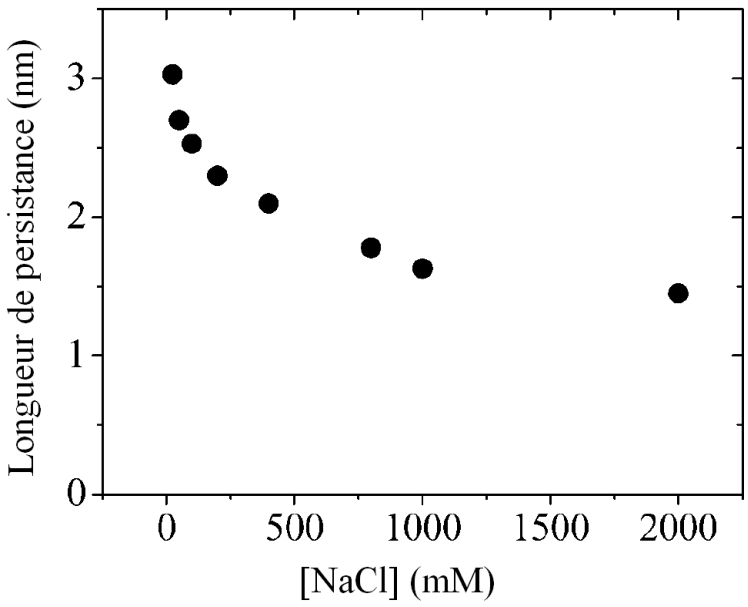


Figure 20 : La longueur de persistance d'un simple brin diminue avec l'augmentation de la concentration en sel. Le graphique montre la longueur de persistance en fonction de la concentration en NaCl. Il est tiré du travail de MC. Murphy [47].

La formation et la stabilité de la double hélice d'une molécule d'ADN par hybridation de deux simples brins d'ADN sont régulées par des lois thermodynamiques complexes. Elles dépendent de la composition du milieu ambiant, de la température, des séquences des deux simples brins d'ADN mis en contact, etc… Cette double hélice est aussi dissociable. La séparation des deux simples brins d'ADN est appelée dénaturation. Pour dénaturer un double brin d'ADN, il faut réussir à déstabiliser les liaisons hydrogènes établies lors de l'hybridation entre les deux simples brins. En thermodynamique des interactions ADN-ADN, la grandeur caractéristique permettant de quantifier une affinité est la température de fusion (Melting Temperature : T_M). En raison de l'importance de cette grandeur caractéristique pour les biopuces à ADN, la partie suivante est dédiée à la description de cette température de fusion.

1.2.2. Introduction à la température de fusion

La double hélice d'ADN est un assemblage de deux sous ensembles liés par des ponts hydrogènes. Comme tous les duplexes, il est possible d'étudier sa stabilité. Une des caractéristiques de ce duplexe de simples brins d'ADN est la séquence des deux simples brins

mis en contact. Il est à noter que, quelque soit la séquence des deux simples brins d'ADN, il existe une probabilité non nulle qu'une liaison s'établisse. Cette liaison devient plus stable à mesure que le nombre de mésappariements diminue entre les deux séquences. Lorsque nous étudions une interaction entre deux brins d'ADN, la principale valeur thermodynamique à laquelle nous sommes confrontés est la température de fusion notée T_M (pour Melting Temperature). Cette température est la valeur de référence qui rend compte de l'affinité entre les molécules étudiées.

En pratique, le T_M s'obtient par identification du taux de liaisons établies entre les deux molécules mises en présence dans une solution. Lorsque la composition du milieu est fixée et si le seul paramètre modifiable du système est la température de la solution, il est possible d'observer le passage de l'état lié à l'état séparé du duplexe moléculaire par augmentation de l'agitation thermique [liv]. Dans notre cas, ce duplexe moléculaire sera un double brin d'ADN et les molécules indépendantes seront de l'ADN simple brin. Le T_M d'une interaction ADN-ADN sera la température de la solution pour laquelle 50% du matériel génétique sera sous forme de double brin et 50% sous forme de simple brin. De manière générale, la forme théorique de la courbe représentative de l'évolution de l'interaction en fonction de la température est une sigmoïde (Figure 21).

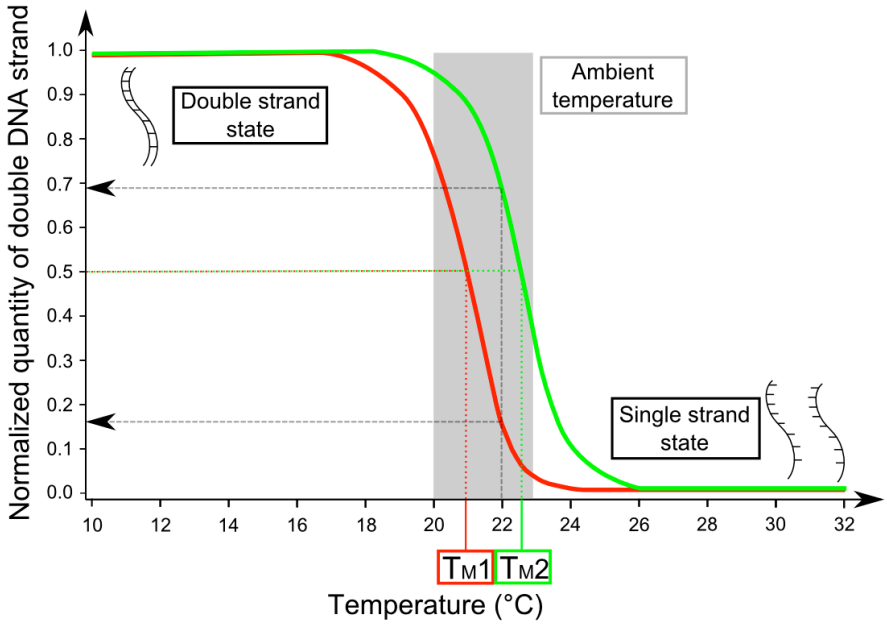


Figure 21 : Quantité normalisée d'ADN double brin dans une solution en fonction de la température du milieu pour deux couples ligand-récepteur (Figure 18). Les courbes (rouge et verte) correspondent à deux duplexes de simples brins. La valeur caractéristique du TM de chacune de ces interactions est la température pour laquelle il y a 50% d'ADN double brin et 50% d'ADN simple brin dans la solution.

Cette figure représente le taux de duplexes dans la solution. Moins un duplexe est stable, moins le T_M est élevé. En reprenant l'exemple précédent (Figure 18) des duplexes A1-B1 et A1-B2, la température de fusion T_M1 du premier duplexe sera plus élevée que celle du deuxième, T_M2. En effet, le mésappariement qu'engendre la modification du 6ème nucléotide dans le duplexe A1-B2 déstabilise le double brin.

Cette température dépend des paramètres thermodynamiques de l'interaction.

$$T_M = \frac{\Delta H}{\Delta S + R\ln(C_1 - \frac{C_2}{2})} \qquad \text{Eq.1.1}$$

pour une concentration $[Na^+]$ de la solution égale à 1 M. Avec ΔH l'enthalpie du système et ΔS son entropie, R est la constante des gaz parfaits (R = 1.987 cal.Mol^{-1}.K^{-1}), C_1 est la concentration molaire des produits en excès (généralement les sondes ou les amorces) et C_2 est la concentration molaire des produits limitants (les cibles). Pour une concentration $[Na^+]$ différente de 1 M, on doit utiliser la formule suivante :

$$\frac{1}{T_M(Na^+)} = \frac{1}{T_M(1M)} + (4.29 f(G.C) - 3.95)\times 10^{-5}.\ln[Na^+] + 9.40\times 10^{-6}\ln^2[Na^+] \qquad \text{Eq.1.2}$$

Où f (G.C) est la fraction de bases G et C sur le nombre total de bases du brin (dans le cas de duplexes complémentaires). [lv]

De multiples études ont été réalisées par des équipes de recherches afin de prédire par le calcul quel sera le T_M d'une interaction entre deux séquences d'ADN. Toutes les valeurs des T_M utilisées dans cette thèse et issues de simulations sont obtenues grâce aux travaux de John SantaLucia Jr. [lvi, lvii, lviii, lix]. Lui et son équipe proposent un calcul du T_M basé sur la méthode du 'next nearest neighbour' qui prend en compte l'interaction possible d'un nucléotide du brin sens avec le nucléotide du brin anti-sens lui correspondant en incluant jusqu'à l'interaction de la paire de nucléotides suivante dans l'ordre de la séquence. Cette méthode a été choisie comme support théorique par notre équipe lors de la thèse précédente de Nathalie Bassil [lx]. L'ensemble des valeurs de ΔH et ΔS obtenues de manière empirique

pour toutes les combinaisons possibles est reporté en annexe 4. Ces valeurs tiennent compte d'un certain nombre de paramètres comme par exemple la concentration en matériel génétique, la concentration en sel et la concentration en magnésium dans le milieu. Plusieurs programmes disponibles en ligne sur http://mfold.bioinfo.rpi.edu/ et réalisés par Michael Zuker sur la base des calculs de John SantaLucia Jr. permettent d'obtenir entre autres le T_M d'une interaction entre deux brins d'ADN ou d'ARN et les structures secondaires les plus probables d'un simple brin d'ADN ou d'ARN. Une étude plus approfondie sur ce phénomène d'auto repliement de l'ADN a fait l'objet d'un chapitre détaillé en 3ème partie de cette thèse.

Application numérique : Si nous reprenons l'exemple des séquences A1, B1 et B2 (Figure 18), les TM donnés par les prédictions de John SantaLucia Jr. sont :

T_M (A1-B1) : 40.7°C

T_M (A1-B2) : 23.6°C

Ces résultats sont obtenus sur la page internet de Mickael Zuker 'two state hybridization' [lxi] et pour les conditions suivantes : ADN à 22°C, concentration de Na^+ = 0.138, concentration de Mg^{++} = 0 M, concentration de brins : 5µM.

Attention toutefois de bien noter que chacune des valeurs de T_M est obtenue pour une solution où les sondes et les cibles seraient mélangées. Dans le cas d'une interaction de surface, où seules les cibles sont en solution et où les sondes sont fixées sur une surface, les degrés de liberté des molécules n'étant pas les mêmes, les valeurs de T_M sont différentes. Le T_M d'une interaction de surface sera inférieur au T_M de cette même interaction. Cette différence entre les T_M des interactions en solution et les T_M des mêmes interactions en surface sont dues à la difficulté d'accès des séquences sondes dans le spot [lxii]. Cet encombrement surfacique diminue virtuellement la concentration des sondes. C'est-à-dire que les sondes se gênant les unes les autres sur la surface, la cible n'aura pas la possibilité d'interagir avec toutes les sondes déposées sur la surface.

1.2.3. Diagnostic génétique

L'origine de la non-fonctionnalité d'une protéine peut être diverse comme l'action du matériel génétique d'un virus sur sa formation par le ribosome ou un défaut sur la séquence d'ADN qui code pour elle, etc… C'est à cause de cette origine génétique qu'une autre

approche de diagnostic n'utilisant pas directement les protéines a vu le jour. En connaissant la séquence du gène codant pour une protéine fonctionnelle et celui codant pour une des formes non fonctionnelles de la protéine, nous pouvons les comparer au gène d'un patient afin de savoir si son gène code pour une protéine fonctionnelle ou non. En utilisant une biopuce pour réaliser cette comparaison, il suffit de prendre un simple brin d'ADN sens orienté 5'-3' comme sonde fixée sur la surface. Les cibles seront constituées de fragments simple brin d'ADN contenant la séquence à comparer orientés 3'-5' (anti sens). Ces cibles peuvent être directement issues du patient après amplification du gène d'intérêt par PCR. Dans le cadre de cette thèse, cette amplification est effectuée à l'Hôpital Henri Mondor dans l'équipe U 955 de l'INSERM.

Dans la majorité des mutations génétiques, seul un petit nombre de bases sont modifiées sur le gène muté. Le reste de la séquence du gène muté est identique à celle du gène sain. Un produit cible 3'-5' aura donc une affinité pour les deux types de sondes, saine et mutée, mais s'hybridera préférentiellement avec celle dont la séquence sera parfaitement complémentaire à la sienne et dont le T_M sera le plus élevé. Avec un système pouvant comparer la quantité de doubles brins présents sur les sondes saines à la quantité de doubles brins présents sur les sondes mutées, nous pouvons obtenir un diagnostic génétique sans équivoque. Dans notre cas, le système d'analyse est basé sur le phénomène de Résonance de Plasmon de Surface (SPR) que nous décrirons dans le chapitre suivant.

Comme le T_M d'une interaction parfaitement complémentaire (sonde et cible de même type) est supérieur au T_M d'une interaction quasiment complémentaire (sonde de séquence mutée et cible de séquence saine par exemple), il suffit de se placer à une température médiane (entre les deux valeurs de T_M) pour que la quantité de duplexe observée pour une interaction parfaitement complémentaire soit la plus élevée (Figure 21). En normalisant le signal d'interaction et en le représentant en fonction de la température soustraite du T_M des interactions étudiées, nous superposons les courbes d'évolution théorique. Prenons l'exemple de deux interactions ayant un ΔT_M de 10°C, c'est-à-dire qu'une des deux interactions a un T_M inférieur de 10°C à l'autre. En présence d'une même cible, deux sondes ayant une affinité différente pour cette molécule ne formeront pas le même taux de duplexes. De plus, en fonction de la température d'expérimentation, nous pouvons faire varier cette différence de quantité de duplexe (Figure 22).

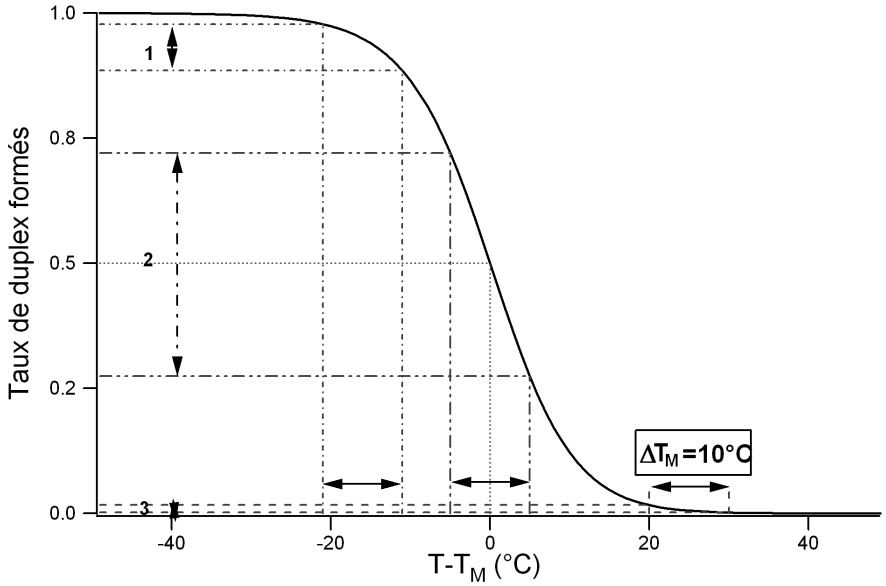


Figure 22 : Représentation normalisée de la quantité de duplexe en fonction de T-T_M. Pour trois températures d'expérimentation différentes (20, 25 et 30 °C), la différence de quantité de duplexe varie.

La discrimination entre les deux interactions sera d'autant plus facile que la différence de quantité de duplexe observée sera grande. Cette différence atteint un optimum pour une valeur de température centrée entre les deux valeurs de T_M correspondant aux interactions parfaitement et quasiment complémentaires (Figure 23).

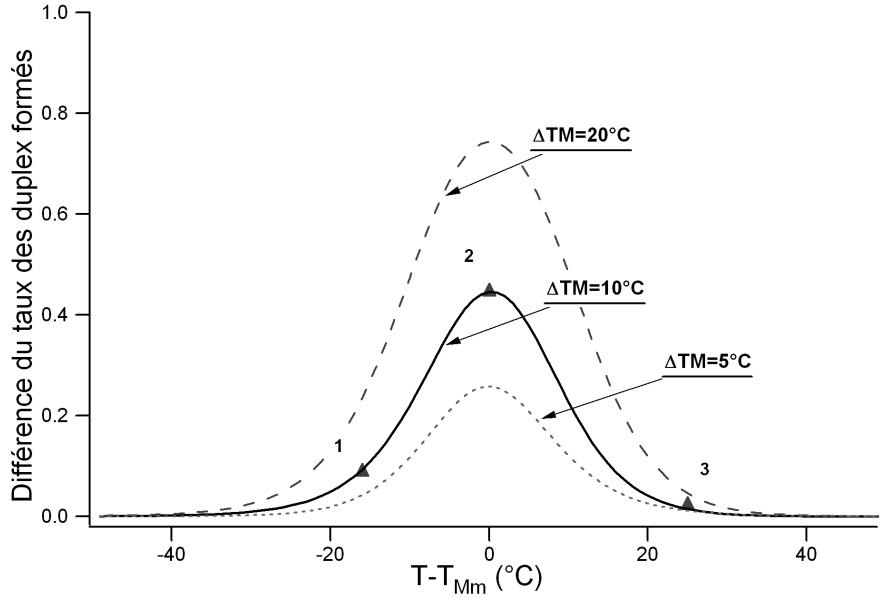


Figure 23 : Variation normalisée de la différence de quantité de duplexe en fonction de T-T_{Mm}(où T_{Mm} est la moyenne des deux valeurs de T_M pour les deux types de duplexes formés). La courbe noire en trait plein correspond à la Figure 22. Les valeurs 1, 2 et 3 correspondent aux trois différences de quantité de duplexe obtenues pour les trois températures d'expérimentation (20, 25 et 30 °C).

Il existe un grand nombre d'application pour lesquelles les biocapteurs à ADN peuvent être utilisés. Par exemple pour la modulation de l'expression génétique [lxiii], le dosage protéique dans le sang [lxiv] ou l'identification virale [lxv]. Certaines applications nécessitent une méthode quantitative de détection, d'autres, une méthode plus qualitative. Le cas le plus évident de cette méthode qualitative concerne les maladies génétiques. Les biopuces sont une bonne alternative à un séquençage lourd et coûteux. En ciblant le fragment du gène concerné, il est possible de le comparer très rapidement à un ensemble de séquences connues et de déterminer son type génétique pour chacune des mutations déposées sur la puce. En effet, une mutation génétique entraîne une modification de la séquence d'un gène. Comme la séquence d'un gène peut être très longue (plus de 100 000 bases), il peut exister plusieurs mutations différentes situées sur le gène entraînant la formation d'une protéine non-fonctionnelle ou mal-fonctionnelle. Parmi ces mutations il existe des mutations plus ou moins rares, c'est-à-dire qu'elles n'ont été observées que dans peu à très peu de cas mais qu'elles entraînent les mêmes effets invalidant sur la protéine. C'est le cas de la maladie génétique de la mucoviscidose dont la grande majorité des 2500 mutations recensées à l'heure actuelle ne concerne qu'un nombre réduit de patients. Pour couvrir 95% des patients du type caucasien, il suffit de cibler les 68 mutations qui sont les plus fréquentes. Cette restriction des tests génétiques permet une meilleure précision sur l'information, une plus grande rapidité dans le diagnostic et une utilisation plus faible des ressources (matériaux biologiques, outils mécaniques, composants chimiques, temps de personnel).

Afin qu'un diagnostic génétique soit efficient, il faut qu'il prouve la présence ou l'absence de chacune des mutations les plus courantes. Grâce à un grand nombre d'interactions observées en parallèle à l'aide de biocapteurs optiques, la séquence génétique d'un patient peut être comparée aux séquences fonctionnelles et non-fonctionnelles de chacune des mutations potentielles de manière rapide. Notre système de détection basé sur la résonance de plasmon de surface permet d'avoir une sensibilité suffisante pour différencier deux interactions dont le taux d'affinité est très proche (typiquement des SNP avec un ΔT_M entre 5 et 10 °C). Le chapitre suivant décrit le phénomène physique de base de notre système.

1.3. Résonance de Plasmon de Surface

Nous avons vu que de nombreux capteurs permettent de détecter différentes interactions biologiques. Chacun présente des avantages (nombre d'interactions étudiées, dynamique,..) et des défauts. Dans le but de détecter des interactions entre brins d'ADN, notre équipe a conçu un système de détection basé sur le phénomène de résonance de plasmon de surface. Le présent chapitre décrit la physique derrière ce phénomène et son utilisation dans le cadre d'un capteur sensible et dynamique.

1.3.1. Historique

La résonance de plasmon de surface (SPR – Surface Plasmon Resonance) est un phénomène physique qui fut découvert par R.W. Wood en 1902 alors qu'il observait le spectre de diffusion d'une source continue de lumière blanche [lxvi]. Le faisceau lumineux étant réfléchi sur un réseau de diffraction, il constata de fines bandes sombres dans le spectre diffracté. Ces anomalies ont été, par la suite, interprétées théoriquement par U. Fano en 1941 qui les a associées à une onde électromagnétique évoluant à la surface du réseau de diffraction [lxvii]. Mais ce n'est qu'avec les configurations différentes d'Otto en 1968, basée sur une réflexion totale atténuée [lxviii], puis, la même année, de Kretschmann et Reather, basée sur le même principe [lxix], que les plasmons de surfaces ont pu réellement être étudiés.

De nombreuses études portant sur les caractéristiques des plasmons de surface se sont alors développées, comme les propriétés de phase ou de dépendances spectrales des ondes plasmoniques [lxx, lxxi, lxxii]. Avec l'avènement des biocapteurs optiques, des méthodes de détection basées sur la SPR ont vu le jour [lxxiii, lxxiv, lxxv, lxxvi].

1.3.2. Caractéristiques

La résonance des plasmons de surface est un phénomène physique qui a lieu à l'interface entre un métal et un diélectrique [lxxvii, lxxviii]. Lorsqu'une onde incidente arrive sur cette interface, un transfert d'énergie, ente les photons et les électrons libres du métal, peut

s'effectuer. Dans certaines conditions, décrites dans les paragraphes suivants, les ondes incidentes peuvent entrer en résonance avec les modes électromagnétiques de surface et créer une onde évanescente dite onde plasmonique se propageant sur l'interface entre le métal et le diélectrique. D'après les lois de l'électromagnétisme, le couplage entre l'onde incidente et les plasmons de surface ne fait intervenir qu'une des deux polarisations du faisceau lumineux : la polarisation TM. L'onde évanescente est produite par un mouvement collectif des charges en surface du métal et se propage de manière rectiligne suivant la projection sur l'interface du vecteur directeur de l'onde lumineuse incidente. Son vecteur de propagation est donné par l'équation suivante :

$$K_{SPR} = \mathrm{Re}\left\{\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right\} \cdot \frac{\omega}{c} \qquad \text{Eq.1.3}$$

Où ε_m et ε_d sont les permittivités respectives du métal et du diélectrique, ω la fréquence angulaire et c la célérité de la lumière. Cette grandeur caractéristique va nous permettre de calculer trois longueurs propres de l'onde évanescente. Les premières sont les longueurs de pénétration dans les deux milieux formant l'interface notées L_{zd} pour la longueur de pénétration dans le diélectrique et L_{zm} pour celle du métal. La troisième grandeur est la longueur de propagation sur l'interface notée L_x. Ces trois valeurs correspondent à la distance où l'amplitude du champ évanescent est réduite à 1/e de sa valeur maximale (Figure 24) ($e \approx 2.718$). La valeur de ces trois grandeurs est donnée par les équations suivantes :

$$L_{zd} = \frac{c}{\omega}\left\{\mathrm{Im}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_d{}^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right)\right\}^{-1} \qquad \text{Eq. 1.4}$$

$$L_{zm} = \frac{c}{\omega}\left\{\mathrm{Im}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m{}^2}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right)\right\}^{-1} \qquad \text{Eq.1.5}$$

$$L_x = \frac{c}{\omega}\left\{\mathrm{Im}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}\right)\right\}^{-1} \qquad \text{Eq. 1.6}$$

Dans le cas d'une application à notre biopuce, nous utilisons de l'or ($n = 0.208 + i \cdot 3.3$ à $\lambda = 660$ nm) mis en contact avec un tampon salin noté PBS (Phosphate Buffer Saline) à une concentration 1x (soit : [KCl] = 2.7 mM, [KH_2PO_4] = 1.5 mM, [NaCl] = 0.138 M,

[Na2HPO4] = 8 mM et n = 1.334 à λ = 660 nm). Les longueurs de pénétration ont pour valeur : L_{zd} = 102 nm et L_{zm} = 13 nm. La longueur de propagation est L_x = 7 µm. La majeure partie de l'énergie de l'onde évanescente est contenue dans le diélectrique (environ 90%). La distance de pénétration L_{zd} est suffisamment importante pour détecter des variations d'états du milieu diélectrique et suffisamment courte pour n'être sensible qu'à des variations proches de la surface (<100 nm).

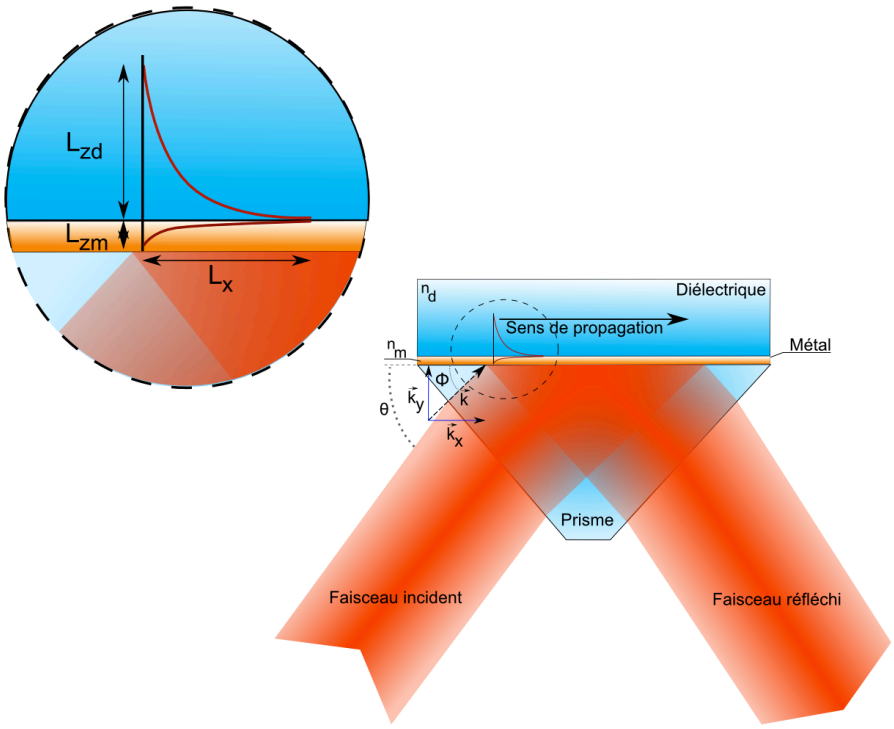


Figure 24 : Schéma de principe du transfert d'énergie entre une onde lumineuse et une onde plasmonique de surface dans le cadre d'une SPR dans la configuration de Kretschmann [58]. L'onde incidente traverse le prisme de haut indice pour se réfléchir sur le métal avec un angle Φ. L'onde plasmonique prend naissance à l'interface entre le métal et le diélectrique. Son énergie est répartie à la fois dans le métal et à la fois dans l'isolant et son sens de propagation correspond à la projection du vecteur d'onde du faisceau incident sur l'interface.

L'excitation de cette onde évanescente requiert des conditions bien particulières. En effet, pour que l'énergie de l'onde incidente soit transmise à l'onde plasmonique de surface, il faut que la projection sur l'interface du vecteur de propagation de la première soit identique au vecteur de propagation de la seconde. C'est-à-dire que :

$$k_x = \frac{\omega}{c} \times \sin\phi = K_{SPR} \qquad \underline{Eq.\ 1.7}$$

où k_x est la projection sur la surface du vecteur de propagation de l'onde incidente, θ est son angle d'incidence et K_{SPR}, la valeur du vecteur de propagation de l'onde plasmonique (Eq .1.3). Cette relation n'est pas réalisable dans des conditions normales où l'onde lumineuse se propagerait dans l'air avant de traverser la couche métallique. Il faut que l'indice optique du milieu incident soit supérieur (Figure 25) à l'indice plasmonique équivalent afin de vérifier l'équation 1.8 :

$$n_i \times \sin\phi_i = N_{SPR} \qquad \underline{Eq.1.8}$$

où n_i est l'indice du milieu incident, Φ_i est l'angle du faisceau incident et N_{SPR} est la valeur effective de l'indice de l'interface où se propagent les ondes plasmoniques.

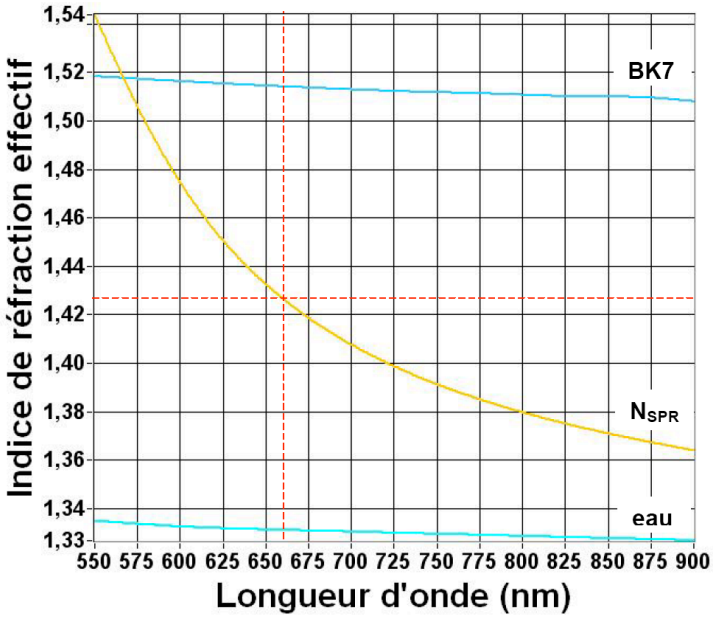


Figure 25 : Evolution des indices optiques pour l'eau, le BK7 et l'interface de propagation du plasmon. L'indice de l'eau est inférieur à N_{SPR} sur la fenêtre de longueurs d'onde étudiées. Pour une source lumineuse à λ = 660 nm, N_{SPR} a une valeur d'environ 1.43.

Pour qu'il puisse y avoir égalité entre les vecteurs d'onde donnés par la relation 1.7, il faut alors augmenter celui de l'onde incidente. Trois techniques ont été mises au point afin d'exciter facilement les ondes plasmoniques de surface. La première consiste à graver un réseau sur la couche métallique. La deuxième consiste à utiliser un guide d'onde optique. La dernière consiste à placer un prisme haut-indice soit sur le diélectrique (Configuration de Otto), soit sur le métal (Configuration de Kretschmann [58]). C'est pour cette dernière

configuration que nous avons opté (Figure 24). Elle simplifie la fabrication de la puce en n'utilisant qu'une simple couche d'or sans microstructures, et, du fait que le prisme soit placé du côté métallique de l'interface, elle laisse au diélectrique la possibilité d'être accessible et de nature évolutive. Dans cette configuration, la couche métallique a une épaisseur limitée. En se basant sur la méthode de Rouard étendue [lxxix, lxxx] nous pouvons prévoir que la résonance de plasmon de surface est maximale pour des épaisseurs d'or comprises entre 40 et 60 nm environ. L'optimum à angle d'incidence fixé (12°) est atteint pour une longueur d'onde de 658 nm et une épaisseur d'or de 51 nm (Figure 26).

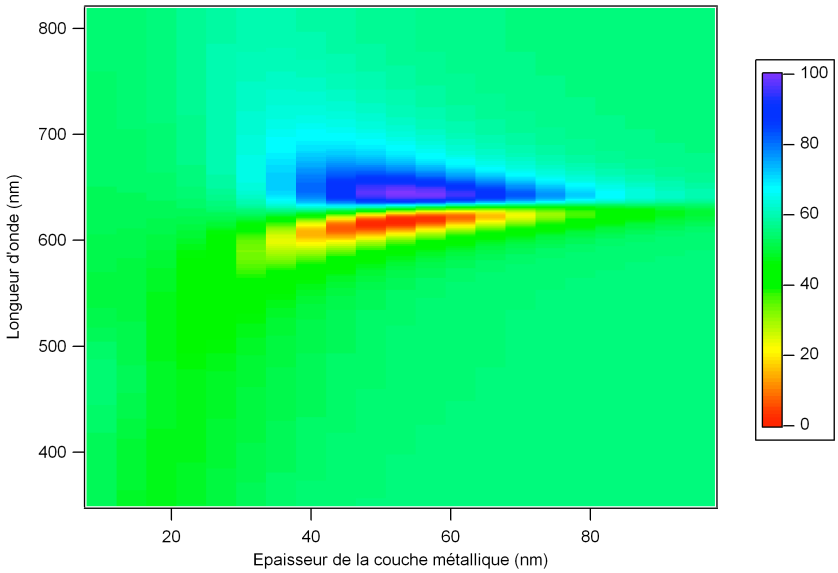


Figure 26 : Représentation normalisée du couplage entre l'onde incidente et l'onde plasmonique en fonction de la longueur d'onde et de l'épaisseur de la couche métallique.

1.3.3. Profil de résonance

Comme nous l'avons dit précédemment, les ondes plasmoniques de surface sont créées à partir de l'énergie de l'onde lumineuse incidente transférée à l'interface entre le métal et le diélectrique. Il en découle naturellement une baisse de l'énergie lumineuse dans le faisceau réfléchi, une partie de l'énergie incidente ayant été couplée aux ondes de surface. Ce couplage vérifiant l'Equation 1.7 est très sensible aux variations du système : l'indice de réfraction du métal, du diélectrique, l'angle d'incidence du faisceau lumineux et la longueur d'onde de la source. Il est ainsi très facile d'obtenir le profil de ce couplage en faisant varier l'angle d'incidence et en observant l'intensité du faisceau réfléchi. Le transfert d'énergie entre l'onde incidente et l'onde de surface est optimal pour le couple « angle d'incidence » et

« longueur d'onde de source » obtenu par l'Equation 1.7. La réflectivité chute alors pour des angles s'approchant de cet angle de résonance pour lequel la quasi-totalité de l'énergie est transférée aux ondes plasmoniques. Une courbe théorique du profil de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence est représentée Figure 27. Lorsque l'angle est trop petit ou trop élevé, très peu d'énergie est transférée à l'interface. Le couplage n'est pas efficace et l'intensité du faisceau réfléchi reste égale à celle d'une réflexion sur une couche métallique épaisse. Par contre, lorsque l'angle d'incidence du faisceau lumineux se rapproche de l'angle de résonance, le couplage devient alors plus efficace et nous pouvons observer une baisse de la réflectivité qui traduit un pic de transfert d'énergie. Grâce à la possibilité de faire varier les conditions de couplage de manière dynamique en modifiant l'indice de réfraction du diélectrique (exemple : le diélectrique est un liquide dont on fait varier la composition) nous pouvons observer des variations de réflectivité pour un angle d'incidence judicieusement choisi après avoir dressé le profil de couplage.

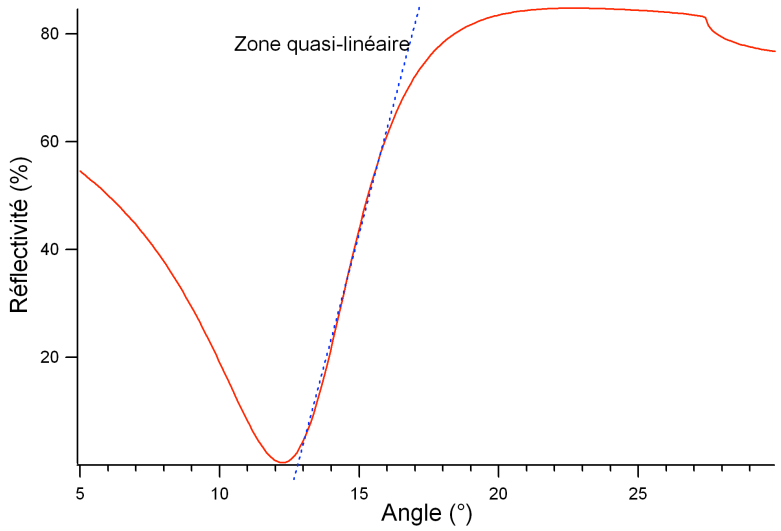


Figure 27 : Profil de couplage théorique obtenu pour une interface entre une couche d'or (n = 0.208 + i·3.3 à λ = 660 nm) et une solution tampon de PBS (n = 1.334 à λ = 660nm). L'angle de résonance est situé pour un angle de 12.2°. Le profil de couplage montre en particulier la présence d'une zone quasi-linéaire à forte pente en % par ° d'incidence pour des angles compris entre 13.5° et 16°.

1.3.4. Sensibilité du système

Si nous considérons l'indice de réfraction du métal comme une constante temporelle, les modifications de l'indice de réfraction du diélectrique peuvent alors être la source d'une

perturbation du couplage. Par exemple, lorsque l'indice du diélectrique augmente, les conditions de résonance entre les ondes incidentes et les ondes plasmoniques de surface changent. Cela induit une translation de la courbe du profil de couplage (Figure 28).

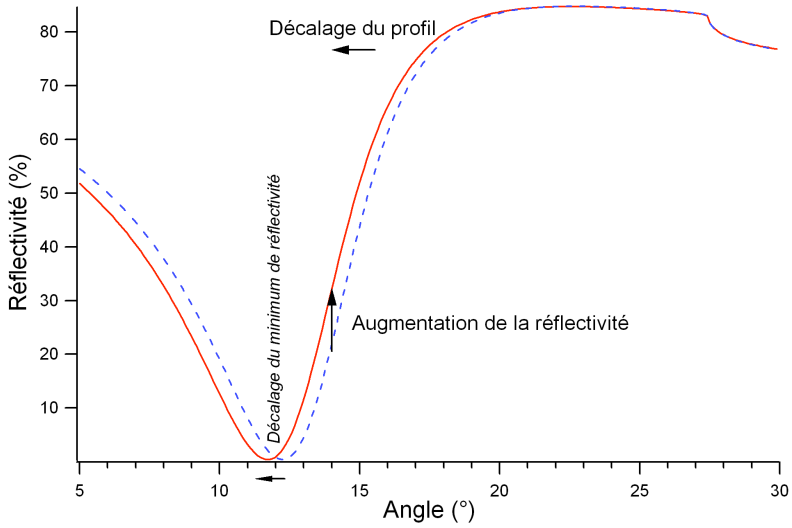


Figure 28 : Représentation théorique du décalage du profil de couplage entre l'onde lumineuse incidente et l'onde plasmonique de surface lors de l'augmentation de l'indice du diélectrique. La courbe en pointillés bleus est la courbe initiale, la courbe rouge est la courbe finale. Dans l'exemple théorique, le métal est de l'or (n=0.208 + i·3.3 à λ=660 nm) et le diélectrique du PBS (n=1.334 à λ=660 nm). L'augmentation d'indice du diélectrique correspond à un dépôt d'une couche de 2nm d'ADN (n=1.46 [lxxxi]) sur la surface.

Suivant le système utilisé, il est possible d'identifier ces changements d'indices par plusieurs méthodes. La première consiste à suivre l'évolution de l'angle optimal de résonance. Pour chaque changement de l'indice de réfraction du diélectrique, il est possible d'effectuer un balayage angulaire et d'identifier l'angle particulier pour lequel le faisceau réfléchi est le moins intense (Figure 28). Cette technique est assez longue et n'est efficiente que si le diélectrique reste le même pendant chaque balayage angulaire. Dans le cas d'une biopuce, le diélectrique est constitué d'une solution dont la composition peut être modifiée de manière très rapide. Afin de pouvoir observer immédiatement une interaction de molécules de la solution avec la surface, une deuxième méthode est ici utilisée. En choisissant judicieusement l'angle d'incidence du faisceau de manière à se situer au-delà du pic de transfert d'énergie et sur une partie quasi-linéaire du profil de couplage, chaque augmentation de l'indice de réfraction du diélectrique induit une augmentation de la réflectivité. Il existe une plage angulaire idéale pour laquelle la variation de réflectivité observée pour un changement de l'indice de réfraction du diélectrique est maximale. Cette plage angulaire est montrée Figure

29. Dans le cas d'une réalisation d'une biopuce plane et homogène, nous pouvons restreindre la zone quasi-linéaire à la plage angulaire pour laquelle nous obtenons au moins 90 % de la valeur maximale de la dérivée de la réflectivité (90% de MaxD). Dans le cas plus classique d'une biopuce inhomogène, nous utilisons une plage plus large pour laquelle nous obtenons au moins 50 % du maximum de la dérivée de la réflectivité (50% de MaxD) comme le montre la Figure 29. Lors d'une interaction entre des molécules du diélectrique et la surface métallique, l'augmentation locale de la concentration de la solution va induire une augmentation locale de l'indice de réfraction du diélectrique au voisinage de la surface. Cette interaction va donc perturber localement le couplage entre l'onde incidente et les ondes plasmoniques de surface. Pour résumer, une interaction entre des molécules de la solution diélectrique et la surface entraîne une hausse de l'intensité observable du faisceau réfléchi si l'angle d'incidence est préalablement judicieusement choisi. L'angle d'incidence une fois déterminé est appelé 'angle de travail'.

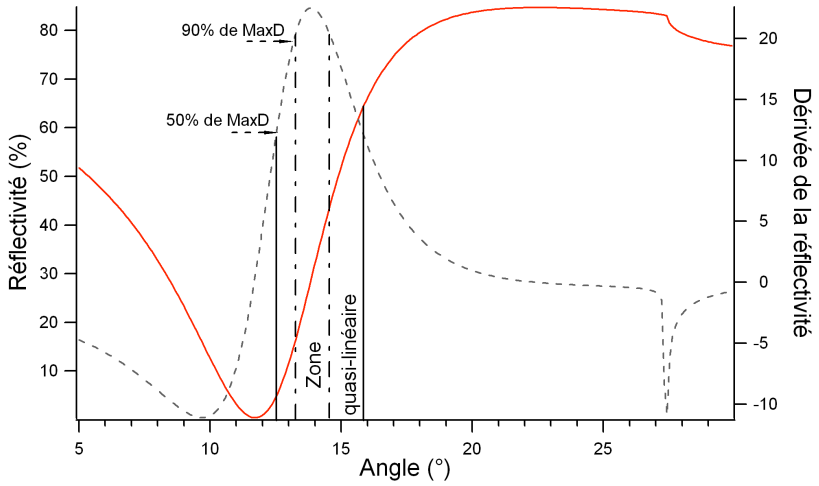


Figure 29 : Courbe dérivée de la variation de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence (en grisée pointillée). La plage angulaire pour laquelle la variation de réflectivité est optimale est située dans la zone quasi-linéaire de la variation de réflectivité (courbe rouge). La zone de 90 % du maximum de la dérivée est délimitée par les droites en tirets et la zone de 50 % du maximum de la dérivée par les droites pleines.

La variation de réflectivité ne sera positivement proportionnellement positive à la quantité de matière déposée sur la surface qu'à condition de toujours se situer dans la zone quasi-linéaire du profil de couplage. Il apparaît évident que si la translation du profil de couplage induite par une augmentation de la quantité de matériau biologique en surface est trop importante, la réflectivité va tendre vers une saturation. De plus, la dynamique de

réflectivité accessible est dépendante du point de référence de départ choisi. C'est-à-dire que plus l'angle de travail défini au moment de la circulation de la solution diélectrique de référence est proche de l'angle de résonance maximale, plus la zone quasi-linéaire restante du profil de couplage sera importante. Il faut tenir compte de cette caractéristique très importante de la SPR. En effet, l'efficacité du transfert d'énergie est dépendante de l'indice du diélectrique, elle est donc dépendante de sa composition. Dans le cas des biopuces en général, une fonctionnalisation chimique est construite afin de faire lien entre la surface métallique et les molécules qui y sont attachées. Il en découle alors une dispersion des indices optiques sur la surface de la biopuce correspondant à une dispersion d'épaisseur et de concentration de la couche chimique de liaison. Suivant l'hétérogénéité de la fonctionnalisation chimique, la dispersion du profil de couplage sur la surface de la biopuce sera plus ou moins grande et le choix de l'angle de travail, sujet à un compromis (Figure 30). Il faut en effet que le système puisse rendre compte d'une variation de réflectivité proportionnelle à la quantité de matière déposée pour la majeure partie de la surface de la biopuce analysée.

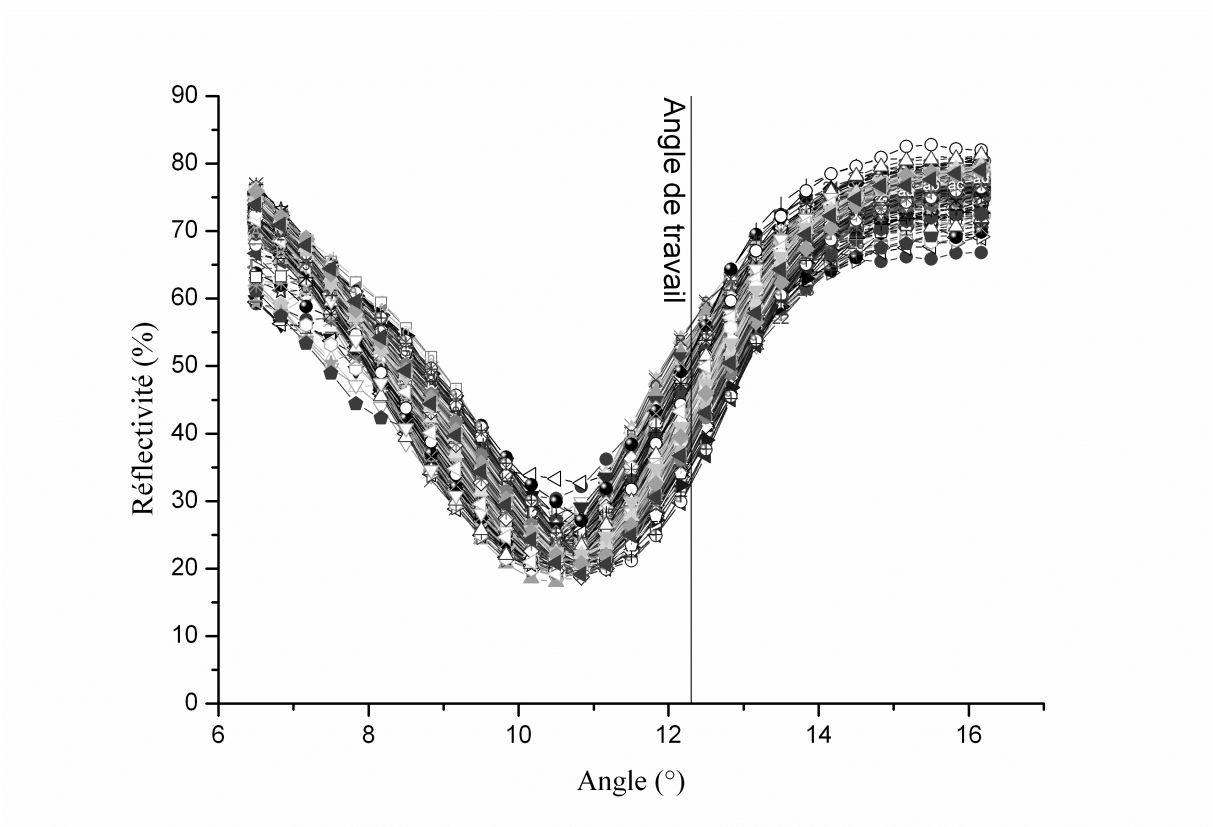


Figure 30 : Courbes expérimentales des variations de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence pour plusieurs zones d'une même biopuce d'une surface d'environ 0.8 cm². La dispersion observée est due à l'inhomogénéité de la surface de la puce (voir chapitre 3.3.Autocalibration). Ici, l'angle de travail choisi était 12.3°.

Dans notre cas particulier, cette sensibilité peut être ramenée à l'impact de l'évolution du dépôt d'une couche biologique compacte sur la réflectivité observée. Cette couche biologique compacte peut être assimilée à une couche théorique ou équivalente, d'épaisseur 'e', d'indice de réfraction égal à celui de l'ADN. La sensibilité de notre système sera quantifiée par :

$$S_{SPR} = \frac{\Delta R}{\Delta e} \qquad \textit{Eq.1.9}$$

où ΔR est la variation de réflectivité et Δe est la variation d'épaisseur de la couche équivalente. La Figure 31 montre cette sensibilité pour une lame de BK7 (n = 1.51) sur laquelle est déposée 3.32 nm de chrome (n = 3.05+i3.38) puis 48.3 nm d'or (n = 0.208+i3.3). L'indice de la couche biologique est celui de l'ADN simple brin (n = 1.46 [71]) et la solution dans la cuve est de l'eau (n = 1.33). Nous pouvons voir que la partie quasi-linéaire de la courbe s'étend sur 9 nm de couche biologique déposée. La pente de cette zone quasi-linéaire est de 5.6% de réflectivité par nanomètre d'ADN compact.

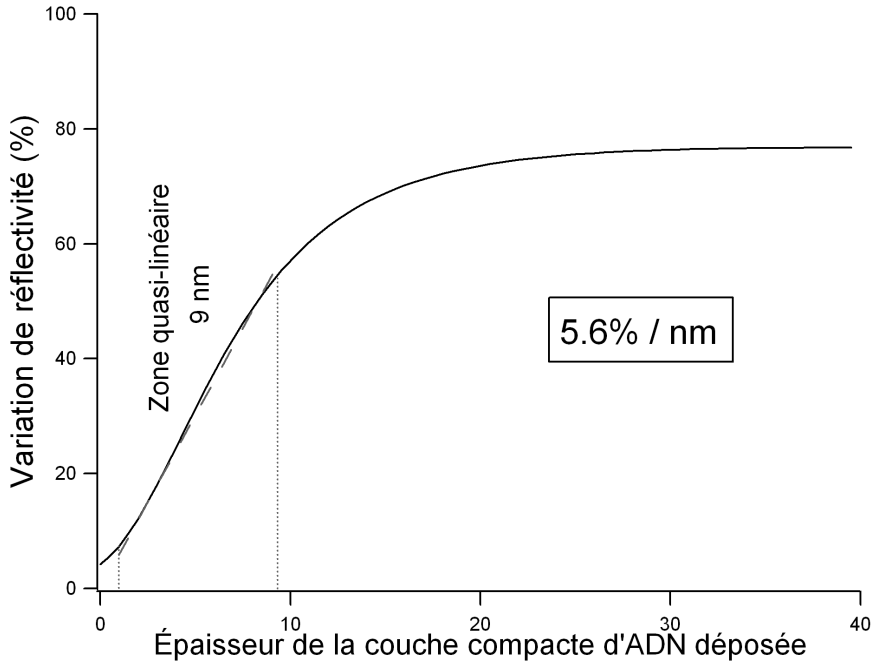


Figure 31 : Courbes de la variation de réflectivité en fonction de l'épaisseur équivalente de la couche biologique déposée sur la biopuce. La zone quasi-linéaire de la courbe a une pente de 5.6% par nanomètre d'ADN compact déposé.

Lors des expérimentations de ma thèse, les signaux perçus avaient une amplitude de l'ordre de 0.5 à 1.5 % de variation de réflectivité. Notre système est donc capable de détecter une couche équivalente de 0.1 à 0.3 nm d'ADN compact à l'état d'équilibre de la formation des duplexes. En pratique, notre couche biologique est composée de simples brins d'ADN

d'une longueur d'environ 37 bases (soit environ 12.6 nm) disposés sur la surface selon la disponibilité des sites de fixation pour biotines sur la couche de streptavidine, dernière étape de la fonctionnalisation (voir chapitre 2.2.3.Fonctionnalisation Dextran). Une détection de couche équivalente d'ADN de 0.1 à 0.3 nm d'épaisseur correspond alors à une couche d'ADN de 12.6 nm d'épaisseur (37 bases) remplie de 1 à 3 % ce qui correspond à l'accrochage équivalent de 4000 à 11000 molécules environ d'ADN de 12.6 nm de long par μm^2 sur la puce. Ce calcul donne un ordre de grandeur qui ne tient pas compte de la nature double brin du duplexe résultant de l'hybridation entre cibles et sondes et qui suppose identiques les tailles des simples brins mis en contact. Dans notre cas, cet ordre de grandeur pourra évoluer en fonction de la nature des sondes utilisées (oligonucléotides courts de synthèse ou produits long issus de PCR de patient).

1.3.5. Cinétique d'interaction

Comme nous l'avons mentionné plus haut seules les modifications du diélectrique sur une centaine de nanomètres de profondeur, équivalant à la longueur de pénétration L_{zd}, seront détectables. Un système basé sur la SPR peut alors être considéré comme un système de détection de phénomènes surfaciques. Si nous observons l'évolution de la réflectivité en fonction du temps, nous pourrons alors suivre directement l'évolution des interactions entre la surface de la biopuce et les molécules de la solution diélectrique. Ces évolutions temporelles sont appelées cinétiques d'interaction. Elles rendent compte de la variation du taux de recouvrement de la surface en fonction du temps [[lxxxii],40]:

$$\Gamma = \frac{\Delta R(t)}{(\delta n / \delta C) \cdot S_{SPR}} L_z \qquad \text{Eq.1.10}$$

où Γ est le taux de recouvrement exprimé en g/cm^2, $\Delta R(t)$ la variation de réflectivité en fonction du temps, $\frac{\partial n}{\partial c}$ la variation de l'indice en fonction de la concentration exprimée en g^{-1} et qui oscille entre 0.18 et 0.19 $cm^3.g^{-1}$ pour de l'ADN ou des protéines [[lxxxiii], [lxxxiv]40], S_{SPR}, la sensibilité du système et L_z, la longueur de pénétration de l'onde évanescente dans le diélectrique ($L_z \approx 100$ nm). La sensibilité théorique du système valant 5.6% par nanomètre d'ADN déposé en surface peut être obtenue expérimentalement en faisant varier l'indice du

diélectrique entre deux valeurs connues (saut d'indice). Dans notre cas, nous utilisons une solution tampon de PBS 1x (n = 1.334) puis une solution de PBS 1.25x (n = 1.335).

$$S_{SPR_{\text{exp érimental}}} = \frac{\Delta R_{saut_d'indice}}{\Delta n_{saut_d'indice}} \qquad \underline{Eq.1.11}$$

Nous pouvons alors simplifier l'équation Eq.1.10 :

$$\Gamma = \frac{L_z}{\delta n / \delta C} \Delta n_{saut_d'indice} \frac{\Delta R(t)}{\Delta R_{saut_d'indice}} \approx 0.54 \Delta n_{saut_d'indice} \frac{\Delta R(t)}{\Delta R_{saut_d'indice}} \mu g.mm^2 \qquad \underline{Eq.1.12}$$

En pratique, le $\Delta n_{saut_d'indice}$ vaut 1.10^{-3} et les $\Delta R_{saut_d'indice}$ sont typiquement de l'ordre de 1.2%, ce qui nous donne un taux de recouvrement $\Gamma = 0.44.\Delta R(t) ng.mm^2$.

Une mesure typique de cinétique se décompose en trois étapes. La première est la mise en contact de la biopuce avec une solution tampon dont l'indice de réfraction sera pris comme référence. La deuxième étape consiste en l'injection de la molécule cible diluée dans le même tampon et qui va interagir avec les molécules sondes accrochées en surface. C'est l'étape dite d'association. En fonction de la concentration de la solution en molécules cibles, nous allons pouvoir extraire différentes caractéristiques de la ou des interactions étudiées. Une faible concentration apporte une visualisation du régime dynamique des interactions. Une forte concentration se focalisera sur les états d'équilibre de ces interactions. La dernière étape consiste en une injection de la première solution tampon afin d'éliminer les molécules en excès et de pouvoir distinguer les interactions faibles se dissociant rapidement des interactions fortes plus persistantes. C'est l'étape dite de rinçage (Figure 32).

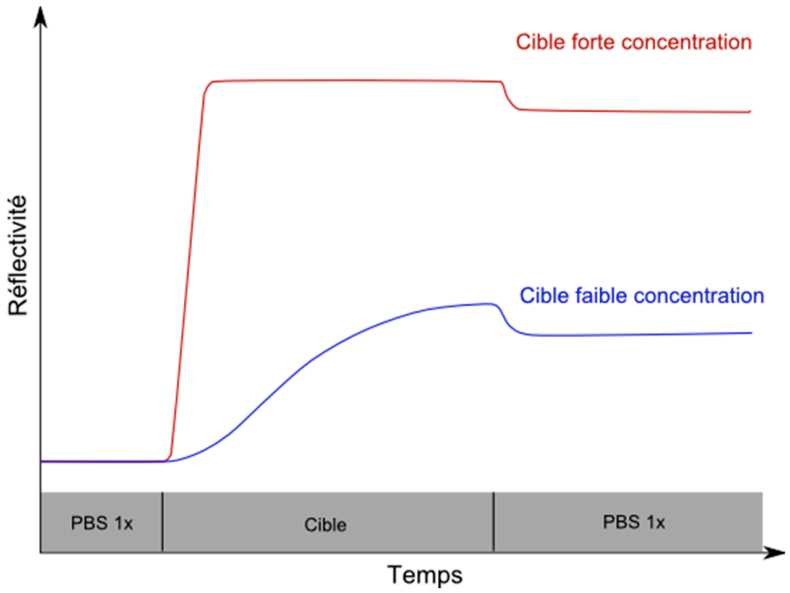


Figure 32 : Schéma de principe d'une cinétique d'interaction pour une cible en forte concentration (courbe rouge) et en faible concentration (courbe bleue). Les étapes d'injection sont indiquées au bas du graphique. Trois injections se suivent : le PBS 1x, la cible puis le PBS 1x.

Il apparaît évident que la dilution des molécules cibles dans la solution tampon va modifier son indice de réfraction. C'est pourquoi, dans certains cas d'études portant sur une injection d'une cible fortement concentrée, nous analysons les variations de réflectivité entre l'état initial et l'étape de rinçage, pendant laquelle le tampon injecté, a exactement le même indice optique. Les variations de réflectivité observées ne seront alors dues qu'à une augmentation de la densité de matière en surface et non à l'augmentation de l'indice de réfraction de la solution tampon. Pour les autres études, et notamment pour les études portant sur le caractère dynamique des interactions, des sondes de référence permettent de s'affranchir du saut d'indice engendré par la dilution des cibles dans la solution tampon (Voir chapitre Autocalibration).

L'intérêt de travailler sur ces cinétiques réside dans le fait qu'elles traduisent directement la quantité de matériau biologique accumulé sur le spot observé. Plus la matière s'y sera accumulée, plus le niveau d'équilibre (à forte concentration) ou la pente de l'interaction (à faible concentration) seront élevés. Et plus ces valeurs seront grandes et plus l'affinité entre la cible circulant dans la solution et la sonde contenue dans le spot sera

importante. Ainsi, par comparaison de l'importance de ces valeurs, nous pourrons distinguer quelle sonde a le plus d'affinités avec la cible circulant dans la puce.

1.4. Conclusion

Dans cette première partie de thèse, nous avons vu une multitude de techniques servant à observer des interactions biomoléculaires. Ces techniques ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients. D'un côté, nous avons les biodétecteurs à fluorescence qui permettent une mesure d'un nombre très important d'interactions (jusqu'au million) en état d'équilibre mais nécessitant l'ajout d'un marqueur. D'un autre, nous avons les biodétecteurs électrochimiques ou acoustiques qui permettent le suivi en temps réel (dynamique) d'une interaction entre un type unique de sondes et une ou plusieurs cibles. La technique de détection optique basée sur la résonance de plasmon de surface, quant à elle, permet une détection d'un nombre moyen d'interactions (jusqu'au millier) en temps réel. C'est la méthode qui est apparue comme étant le plus judicieuse dans notre cas d'une biopuce à diagnostic ciblé.

En effet, ce biodétecteur doit avoir une sensibilité assez importante pour permettre une différenciation entre les affinités d'une cible pour deux sondes distinctes et dont la séquence peut ne différer que d'un seul nucléotide. Il doit permettre un diagnostic génétique sur la totalité du gène ciblé et doit pouvoir faire cette différenciation en parallèle pour toutes les mutations étudiées. Enfin, le suivi des interactions entre cibles et sondes doit être en temps réel afin de minimiser le temps de test pour un diagnostic génétique. Plus le test est long, plus la quantité de produit utilisé est importante et plus le coût d'un test sera élevé (matériel et coût du personnel). Le but final étant toujours de pouvoir transférer la technologie issue du laboratoire en hôpital, le nombre de patients testés dans une journée et le temps passé sur chacun des tests doivent être optimisés.

Chapitre 2 : Système de détection

Résumé :

Afin de répondre aux caractéristiques requises pour un biodétecteur permettant un diagnostic génétique sans équivoque, nous avons réalisé un système de détection utilisant la résonance de plasmon de surface et basé sur une biopuce à ADN.

Dans le chapitre suivant, je vais décrire l'ensemble du système utilisé en passant par le bloc opto-thermo-mécanique, puis en détaillant la fonctionnalisation de la surface du métal. Je parlerai de la méthode de dépôt matriciel et du matériel biologique déposé. Je finirai par le programme d'acquisition et d'analyse des données.

2. Système de détection

Afin d'observer des interactions entre molécules biologiques par le biais de la résonance de plasmons de surface, notre équipe à développé un système que nous allons décrire dans le paragraphe suivant. Ce système comporte plusieurs parties distinctes.

Le premier ensemble est composé du bloc opto-thermo-mécanique. Il a été optimisé lors de travaux antérieurs comme ceux d'Emmanuel Maillart, un précédent doctorant de l'équipe [40]. Ma principale contribution au premier bloc consiste en l'ajout d'une partie thermo-régulée décrite dans le chapitre 2.1.3.La régulation de température afin de pouvoir étudier l'impact de la température sur le signal, son contrôle ou encore sa stabilité.

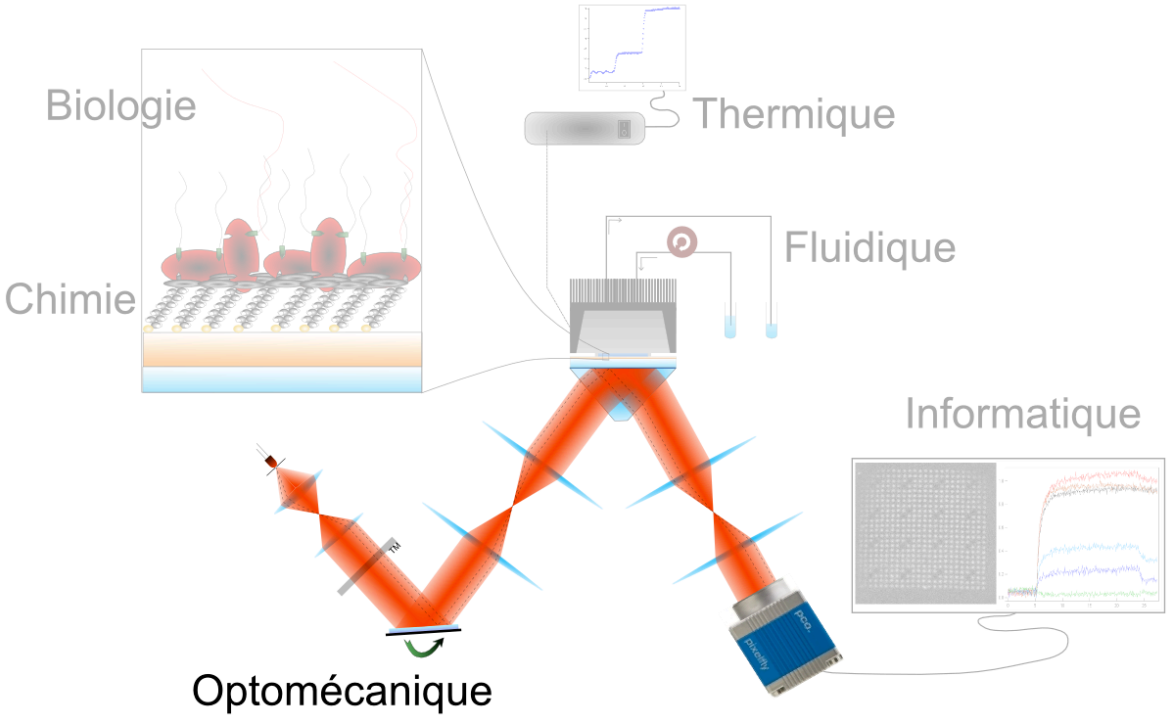
La deuxième partie de ce système de détection concerne la fonctionnalisation de surface dont j'ai principalement étudié le comportement sur notre système comme la régénérabilité, la stabilité ou encore la dispersion. Cette partie du système, très importante, a pour rôle d'établir un lien entre le métal, servant d'interface à la SPR, et les molécules biologiques sondes fixées sur la puce.

Dans la fin de ce chapitre décrivant notre système de détection, nous parlerons de notre matériel biologique observé : l'ADN, de l'outil de dépôt matriciel des sondes sur la puce utilisé depuis mes travaux de thèse et du programme d'analyse des données extraites du système à la réalisation duquel j'ai beaucoup participé.

2.1. Bloc opto-thermo-mécanique

Les différents éléments décrits dans cette partie seront cités suivant le parcours du faisceau lumineux en ce qui concerne les éléments opto-mécaniques. Les éléments thermo-régulant et servant à la circulation des fluides seront décrits en fin de chapitre.

2.1.1. La partie optomécanique



2.1.1.1 La source lumineuse

La source lumineuse utilisée sur le système de détection a été choisie de manière à obtenir un bon compromis entre la sensibilité nécessaire pour observer des interactions entre brins d'ADN et la résolution latérale découlant de la longueur de propagation du plasmon (Eq. 1.6). Cette résolution latérale limite la densité des spots réalisables sur la puce. La sensibilité du système varie suivant la longueur d'onde de la source lumineuse. Elle correspond à la pente maximum obtenue à droite de l'optimum de transfert d'énergie sur le profil de couplage plasmonique (Figure 27) et est dépendante du matériau utilisé.

Plus la longueur d'onde augmente, plus cette pente est importante et plus le pic de transfert d'énergie est étroit (Figure 33). Lorsque l'on compare les différents profils de couplages obtenus en fonction de la longueur d'onde utilisée, on remarque que le maximum de couplage (égal au minimum de réflectivité) entre l'onde incidente et l'onde plasmonique n'est pas constant.

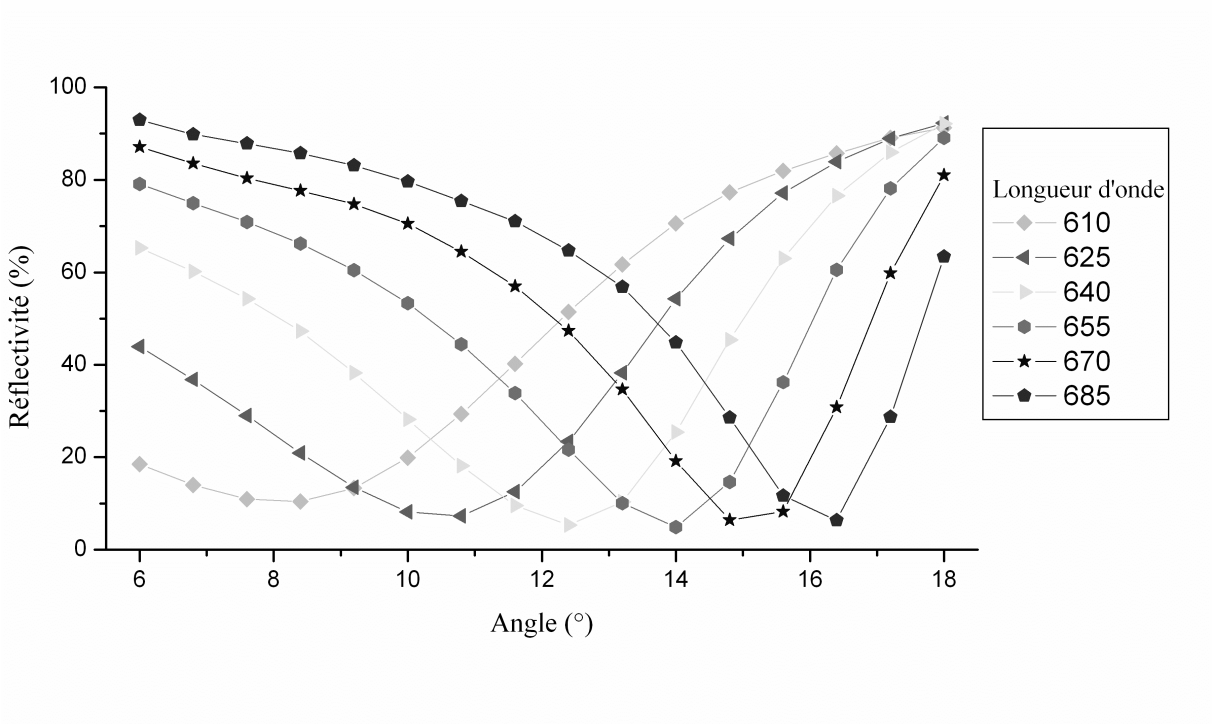


Figure 33 : Variation de la réflectivité en fonction de l'angle d'incidence du faisceau lumineux pour une gamme de longueur d'onde allant de 610 nm à 685 nm sur une lame BK7 (n = 1.517 à λ = 660 nm) avec un dépôt de 3 nm de titane et de 50 nm d'or (n = 0.208 + i0.33 à λ = 660 nm)

La valeur maximale de ce couplage est obtenue pour une longueur d'onde située entre 655 et 670 nm. C'est pour ces longueurs d'onde que la dynamique optique du système d'imagerie sera la plus grande. De plus, la largeur du pic de transfert d'énergie doit être choisie en fonction du système. Ici, la chimie de surface utilisée (Voir chapitre 2.2.Fonctionnalisation), de par son inhomogénéité découlant de sa complexité d'élaboration, induit une dispersion des profils de couplages sur la surface (exemple en Figure 30). Si le pic de transfert d'énergie est trop étroit, pour un angle d'incidence fixé, certaines parties des données ne se situant plus sur la partie quasi-linéaire de la courbe risquent d'être inexploitables. La figure 33 montre l'histogramme des minimums des réflectivités de la Figure 30. On peut voir les deux courbes de réflectivité extrêmes et l'angle de travail choisi permettant de se placer sur la zone quasi-linéaire de chacune des courbes de réflectivité pour chacune des zones étudiées sur la puce. Cette dispersion angulaire des profils de couplage peut atteindre 5°. C'est-à-dire qu'entre l'angle de résonance le plus faible et l'angle de résonance le plus élevé, les profils angulaires de réflectivité sont séparés de 5°. Un pic de résonance suffisamment large permet d'utiliser une partie de la zone quasi-linéaire des profils de couplage pour chacune des zones étudiées.

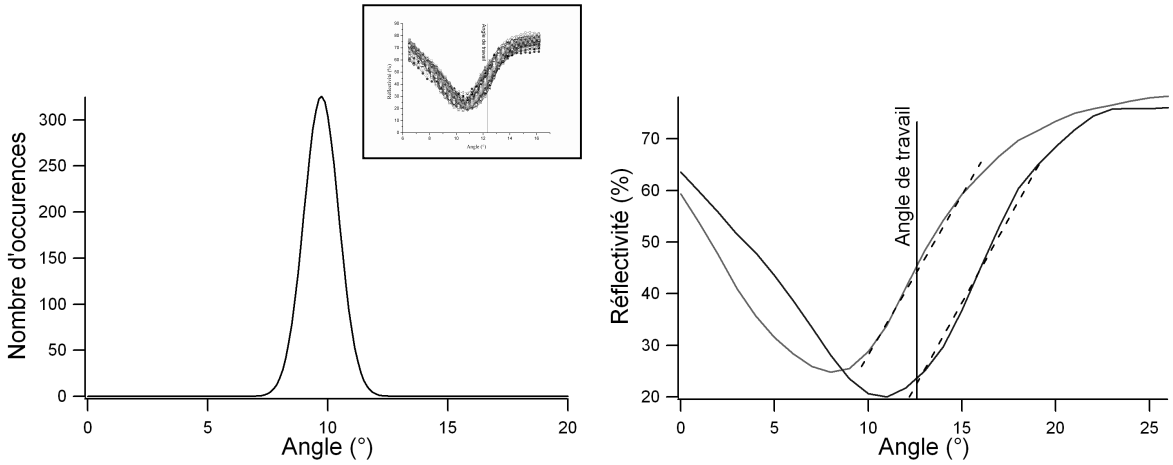


Figure 34 : Histogramme des angles de réflectivité minimum (gauche) et courbes de réflectivités en fonction de l'angle d'incidence (droite). Les deux courbes de réflectivités représentées à droite sont les courbes extrêmes de la Figure 30. L'angle de travail choisi est celui permettant d'obtenir une plage de la zone quasi-linéaire sur toutes les courbes des zones étudiées sur la puce.

Le choix s'est porté sur une longueur d'onde de 660 nm qui est le juste compromis entre sensibilité élevée et pic suffisamment large pour la chimie utilisée. La source lumineuse employée est une diode électroluminescente (Radiospare, Intensité lumineuse typique : 22mCd, Angle de vision : 100°, Courant max : 25mA, Tension inverse crête max : 4V) dont la longueur d'onde centrale d'émission exacte est 657.7 nm et dont la largeur à mi-hauteur est de 19.4 nm (Figure 35). Cette source lumineuse a été modifiée au profit d'une diode électroluminescente des caractéristiques semblables mais de plus forte intensité (de l'ordre de 700 mCd) dans les dernières versions du système.

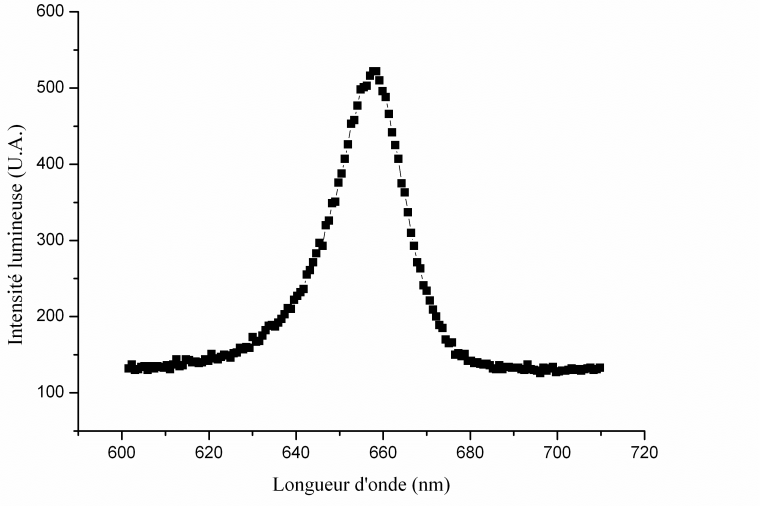


Figure 35 : Spectre d'émission de la source lumineuse. Sa longueur d'onde centrale d'émission exacte est de 657.7 nm et sa largeur à mi-hauteur est de 19.4 nm.

La cohérence spatiale de la source lumineuse est un problème allant à l'encontre d'une illumination homogène de toute la surface de la puce. En effet, bien qu'une largeur spectrale faible entraine une meilleure sensibilité du système (moins de longueurs d'onde superposées, moins de dispersion, plus de précision dans la mesure) elle favorise l'apparition d'un fourmillement lumineux (« speckle ») provoqué par des interférences aléatoires au sein du faisceau. Ce phénomène est dû à des causes variées comme la présence de poussières dans l'air traversées par le faisceau ou les variations d'indice de réfraction aux interfaces traversées. C'est pour cette raison que nous ne pouvons pas utiliser de laser. La diode, quant à elle, a tout de même une structure et l'intensité qu'elle fournit n'est pas non plus homogène sur tout son faisceau. Pour s'affranchir de cet effet, nous utilisons un simple matériau diffusant, permettant de diminuer la structure spatiale du faisceau, qui est positionné juste devant la source lumineuse. Le matériau utilisé ici est un morceau de ruban adhésif dépoli fixé sur un 'trou source' (diamètre 1 mm). Cet assemblage permet d'obtenir une source que l'on considérera comme quasi-ponctuelle et émettant de manière sphérique et homogène avec une cohérence spatiale négligeable.

2.1.1.2 Le collimateur

Nous avons vu que le couplage SPR est dépendant de la direction du faisceau incident. Il faut donc collimater l'onde lumineuse afin d'obtenir un couplage précis. Pour ce faire, nous utilisons un collimateur composé de deux objectifs de microscopes positionnés face à face. Le premier (Union) avec un grossissement de 20X et le deuxième (Leitz Wetzlar) placé en opposition par rapport au premier et à une distance de 1 cm avec un grossissement de 10X. Le diamètre du faisceau obtenu est de 1 cm et reste collimaté sur une distance de l'ordre de 5 m, bien supérieure à la taille du système (Figure 36).

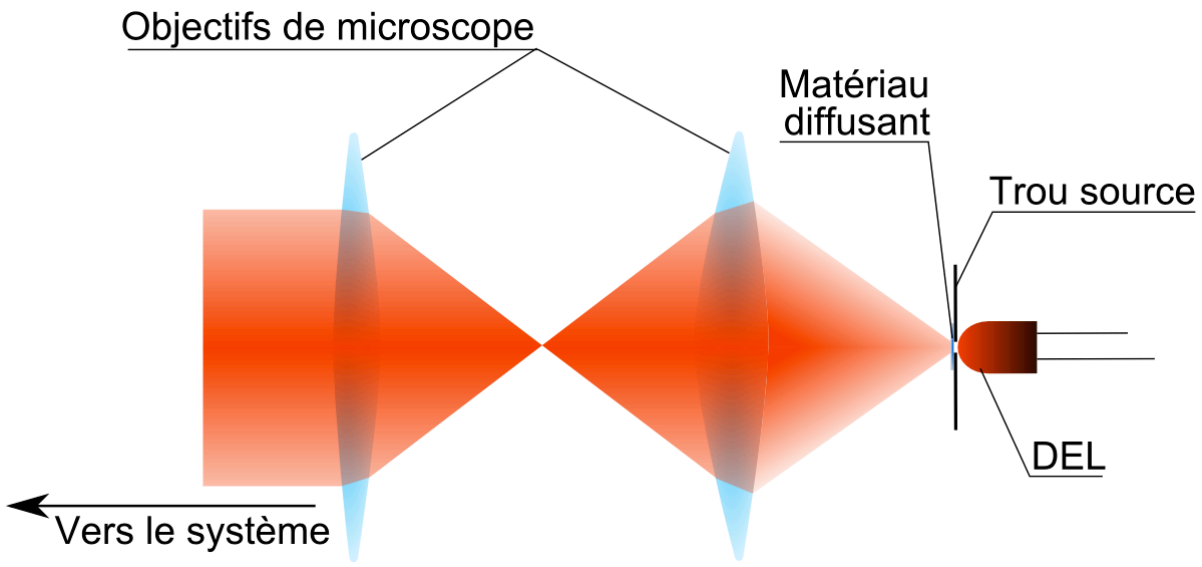


Figure 36 : Schéma de la source et du collimateur du système composé de deux objectifs de microscope. Le faisceau lumineux issu d'une diode électroluminescente (λ = 660nm) traverse un matériau diffusant afin d'en diminuer la cohérence spatiale.

2.1.1.3 Le polariseur

Le couplage SPR n'intervient qu'entre une onde plasmonique de surface et la fraction polarisée TM de l'onde lumineuse incidente. De ce fait, nous utilisons un polariseur orientable permettant de sélectionner la polarisation du faisceau incident. La polarisation TE donnera la référence du maximum de réflectivité du système sachant que les ondes lumineuses TE ne se couplent pas avec les modes plasmon (Figure 37). La polarisation TM servira pour l'expérimentation et rendra compte des modifications de l'état de la surface par les perturbations du couplage qu'elles engendrent. Il est nécessaire d'avoir accès aux deux polarisations lors du réglage de l'expérimentation car les réflectivités observées sont normalisées par rapport au bruit lumineux ambiant, qui donne la limite inférieure (0%) et à la réflectivité obtenue en polarisation TE, qui donne la limite supérieure (100%). Ce polariseur est orientable manuellement et une version en développement, contrôlée par ordinateur, permettra, à chaque acquisition, d'utiliser pleinement la dynamique du capteur optique CCD placé en sortie du système (voir 2.1.1.9.Le capteur optique). Le système utilisé en routine ne permet, à l'heure actuelle, qu'un seul réglage dynamique de la plage de réception de la caméra CCD. Le polariseur est placé en position TE et la fréquence d'acquisition du capteur optique est réglée de manière à utiliser toute sa dynamique. Malgré le fait que cette évolution de

matériel n'ait pas pu être mise en place durant mon doctorat, faute de temps, la normalisation des données par rapport aux deux réflectivités de référence (0% et 100%) décrites précédemment est amplement suffisante compte tenu de la sensibilité requise pour l'application biomédicale de diagnostic de ma thèse.

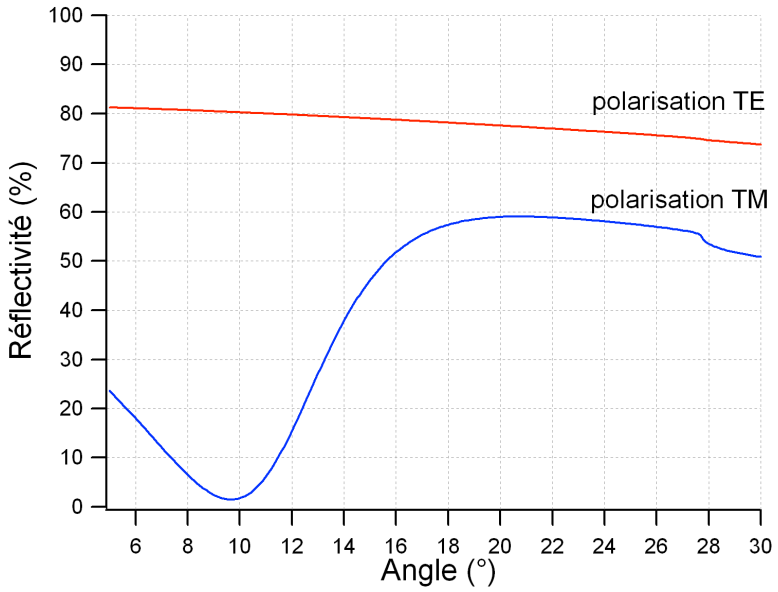


Figure 37 : Intensité du faisceau réfléchi pour les polarisations TE (rouge) et TM (bleu) en fonction de l'angle d'incidence. Ces courbes sont obtenues en fixant l'épaisseur de chrome à 3 nm (n = 3+i3.3), l'épaisseur de l'or à 50 nm (n = 0.208+i3.3) à λ = 660 nm et une solution d'eau

2.1.1.4 Le miroir rotatif :

Nous avons déjà vu que le couplage entre l'onde incidente et l'onde plasmonique dépend, entre autre, de l'angle d'incidence du faisceau lumineux. Comme il est nécessaire lors de chacune des expérimentations de se placer à l'angle où la sensibilité est la meilleure, un balayage angulaire doit s'effectuer à chaque début d'expérimentation. Dans le but d'éviter de déplacer le bras contenant la source lumineuse à chaque fois, un miroir rotatif contrôlé par ordinateur et inséré après le polariseur permet de maîtriser le balayage angulaire du faisceau incident. Ce miroir (Micro-contrôle) est contrôlé pas à pas par un boîtier de commande (Newport controller ESP100) relié au programme d'analyse développé sur LabView (Figure 38).

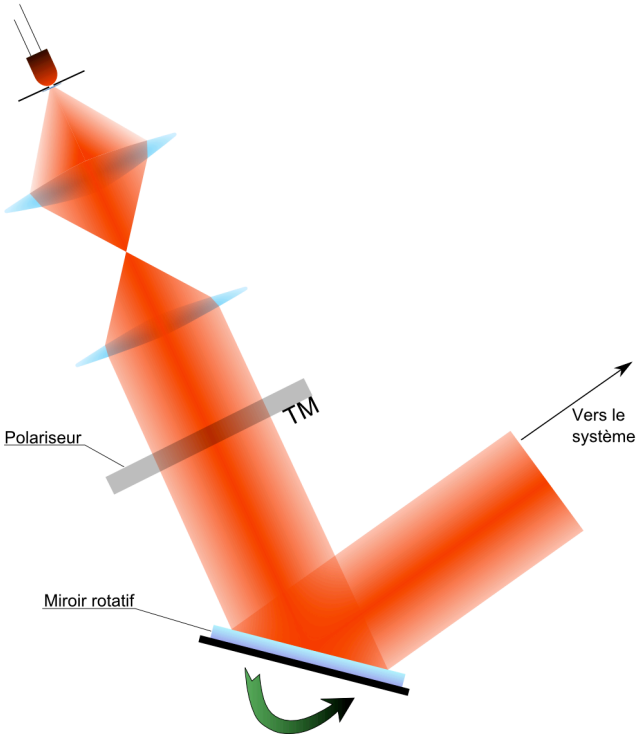


Figure 38 : Schéma du miroir rotatif du système. Le miroir permet de modifier l'angle d'incidence du faisceau lumineux sur la puce.

2.1.1.5 Système d'imagerie sur la puce

L'image du faisceau sur le miroir est conjuguée sur la lame d'or par le biais de 2 lentilles de focale 60 mm. La première lentille est placée à une distance de 60 mm du miroir rotatif, la deuxième à 120 mm de la première et la lame d'or est placée sur le foyer opposé de la deuxième lentille. Ainsi, la variation de l'angle que fait le faisceau sur l'interface, siège du couplage plasmonique, est la même que sur le miroir rotatif.

2.1.1.6 Configuration de Kretschmann

Pour se placer dans une configuration de Kretschmann, nous utilisons un prisme équilatéral en SF10 (n = 1.72 à λ = 660 nm, surfaces de 25 mm) assemblé au substrat de la lame fonctionnalisée par une huile d'indice (n = 1.72 à λ = 660 nm) (Figure 39).

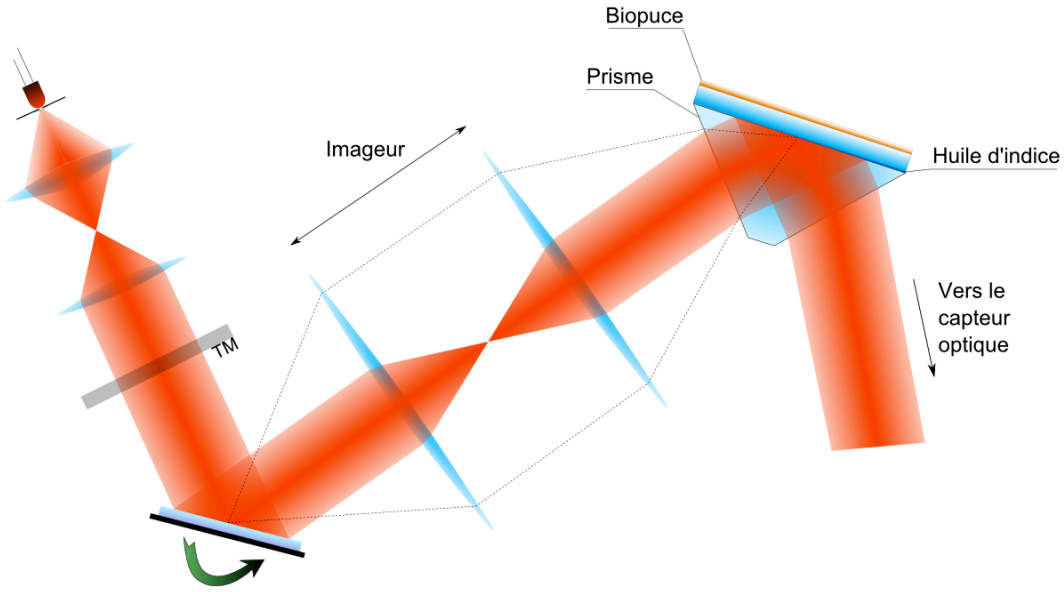


Figure 39 : Schéma de la configuration de Kretschmann du système. La biopuce est placée sur le prisme haut indice grâce à une huile d'interface dont l'indice de réfraction à 660 nm est le même que celui du prisme (n=1.72). L'imageur permet de conjuguer la réflexion du miroir sur la surface de la puce et la variation de l'angle d'incidence sur le miroir est reportée sur la puce.

2.1.1.7 La puce

La puce est constituée d'un substrat, soit de BK7, lame de microscope standard (n=1.517 à 660 nm), soit de SF10, lame de verre de haut indice polie à façon (n=1.72 à 660 nm) sur lequel est déposée une couche d'accroche de chrome (3 nm en moyenne). Cette couche d'accroche permet de faire la liaison avec la couche d'or (50 nm en moyenne) servant de matériau conducteur pour le couplage plasmonique. Cette couche d'or est fonctionnalisée afin de permettre le dépôt des sondes (voir fonctionnalisation surfacique). Durant ma thèse, trois sortes de lame d'or étaient à disposition. Pour chacune de ces lames, la méthode utilisée pour déposer les couches de métaux sur les substrats était l'évaporation. La première sorte de lame d'or est issue d'une fabrication industrielle réalisée par l'entreprise Schott. Les substrats de BK7 ou de SF10 étaient envoyés à l'entreprise pour un dépôt de 2 nm de chrome (+/- 0.5 nm) et 50 nm d'or (+/- 2 nm). Pour toutes les premières études de ma thèse, ces lames d'or donnaient de très bons résultats avec une fonctionnalisation en Dextran standard. Des problèmes imputés à la rugosité de l'or déposé par l'entreprise Schott nous ont obligé, depuis le premier semestre 2007, à trouver une alternative à ce fournisseur professionnel. En effet, certaines étapes de la fonctionnalisation de la surface, comme le bain d'acide bromo-acétique

(voir chapitre 2.2.3.La fonctionnalisation Dextran), ne fonctionnaient plus allant jusqu'au détachement de l'or du substrat. Lorsque toutes les étapes de fonctionnalisation arrivaient quand même à terme, le signal fournit par la biopuce n'excédait pas 40 % du signal habituel. Ce signal habituel pour une sonde était de l'ordre de 1.2 % de variation de réflectivité pour la capture d'une cible ADN parfaitement complémentaire soit les 4/5 d'une variation d'indice de 5.10^{-4} d'une solution tampon (1.5 % de variation de réflectivité). Grâce à une collaboration avec l'équipe de Bernard Bartenlian et de Philippe Gogol du laboratoire IEF (Institut d'Electronique Fondamentale) d'Orsay nous avons eu la possibilité de fabriquer des biopuces sur des lames d'or déposées par eux. Les caractéristiques des dépôts étaient moins régulières que celles des lames issues de l'entreprise Schott, avec des épaisseurs se répartissant entre 1.5 et 3.5 nm de chrome et 47 et 52 nm d'or. Mais le signal fourni par ces biopuces atteignait de nouveau un niveau acceptable avec 90 à 110 % du signal habituel. Le dernier type de biopuces utilisées dans cette thèse a été réalisé par Julien Moreau (Maître de conférences de l'équipe) et moi-même au laboratoire Charles Fabry sur une machine à évaporation de 1981. Les caractéristiques imposées au dépôt des métaux étaient 3nm de chrome et 50 nm d'or. Encore une fois le signal fourni pas ces biopuces était satisfaisant (de 90 % à 110 % du signal habituel).

Quelque soit l'origine de la lame d'or, la biopuce, au final, est un rectangle de substrat (verre BK7 ou SF10) de 2 cm par 2.5 cm sur lequel est déposé une accroche de chrome et une couche d'or qui est à son tour fonctionnalisée pour permettre une fixation avec les molécules sondes.

2.1.1.8 Système d'imagerie

Un deuxième doublet de lentilles placé sur le chemin optique du faisceau réfléchi permet d'imager la surface de la puce sur un détecteur optique. Comme dans le cas du premier imageur, les éléments sont placés aux foyers des lentilles qui ont une longueur focale de 60 mm.

2.1.1.9 Le capteur optique

Pour suivre en temps réel les modifications du couplage plasmonique induites par des interactions en surface de la biopuce, le capteur optique utilisé doit avoir à la fois une fréquence d'acquisition élevée et une résolution spatiale confortable permettant de distinguer des interactions sur de petites zones de surface. Ici, le capteur utilisé est une caméra CCD de marque PCO et de model PixelFly QE [lxxxv] (Figure 40). Sa résolution est de 1392x1024 pixels et chacun des pixels est un carré de 6.45x6.45 µm². Sa fréquence d'acquisition pour un pixel est de 20 MHz. Le temps d'exposition peut être contrôlé et fixé entre 5 µs et 65 s. Son efficacité quantique est de l'ordre de 40% autour de la longueur d'onde de travail : 660 nm. Cette caméra est pilotable par ordinateur via un utilitaire LabView. Du fait de l'inclinaison de l'image de la puce par rapport au faisceau réfléchi, la caméra devrait être placée de biais afin que tous les pixels soient éclairés par des rayons ayant tous parcouru le même chemin optique. Mais pour des raisons mécaniques, le capteur CCD, dans cette version du système, ne peut se placer que de manière normale au faisceau réfléchi. Il en résulte une légère défocalisation de l'image sur les bords de la cuve. Mais ce défaut d'alignement ne gène pas pour le suivi des interactions de surface.

Afin d'optimiser l'utilisation du capteur CCD, nous avons réalisé une étude du rapport signal à bruit du système. De manière à maximiser ce rapport, nous avons fait varier les taux d'exposition de la caméra entre 25 et 100 ms puis nous avons augmenté le nombre d'images accumulées. Les images enregistrées sont au format 16 bit (65536 niveaux) et le capteur a une dynamique de 18000 e^- par puits mais la configuration de notre système, utilisée en gain fort afin de diminuer le temps d'intégration par deux, la dynamique de la caméra utile est de 9000 e^- par puits. Le signal effectif correspond alors au nombre d'électrons effectif, N_{eff}, mesuré par le capteur :

$$N_{eff} = \frac{Niv}{2^{16}} \times N \qquad \text{Eq.2.1}$$

où N est égal au nombre d'électrons par puits et Niv le niveau de l'intensité du pixel.
Le rapport signal sur bruit pour un pixel, en supposant que le système est limité par le bruit de photon, est alors égal à :

$$RSB = \frac{Niv \times \sqrt{Ac}}{\sqrt{\frac{2^{16}}{N} \times Niv}} \qquad \text{Eq.2.2}$$

où Niv est le niveau de l'intensité du pixel, Ac le nombre d'accumulation d'images et N le nombre d'électrons par puits.

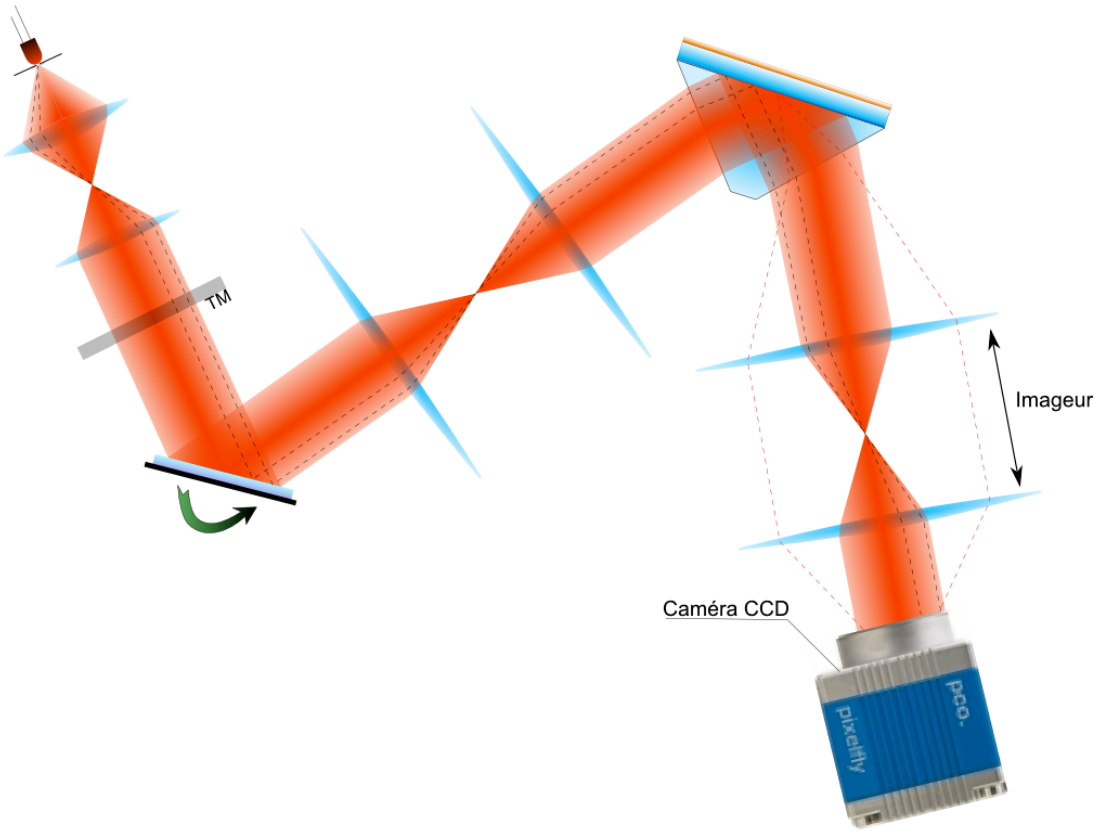


Figure 40 : Schéma global du système optique avec le capteur CCD. L'image de la puce est reportée sur la caméra grâce à un imageur.

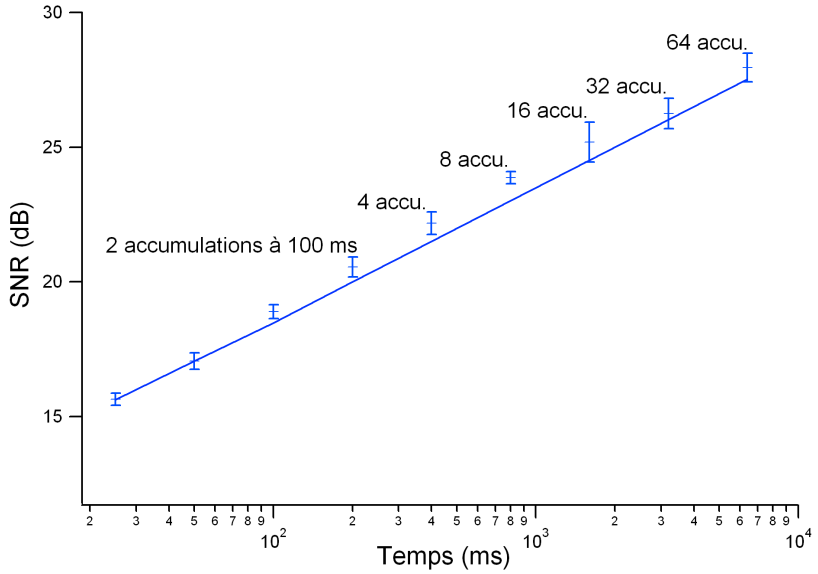
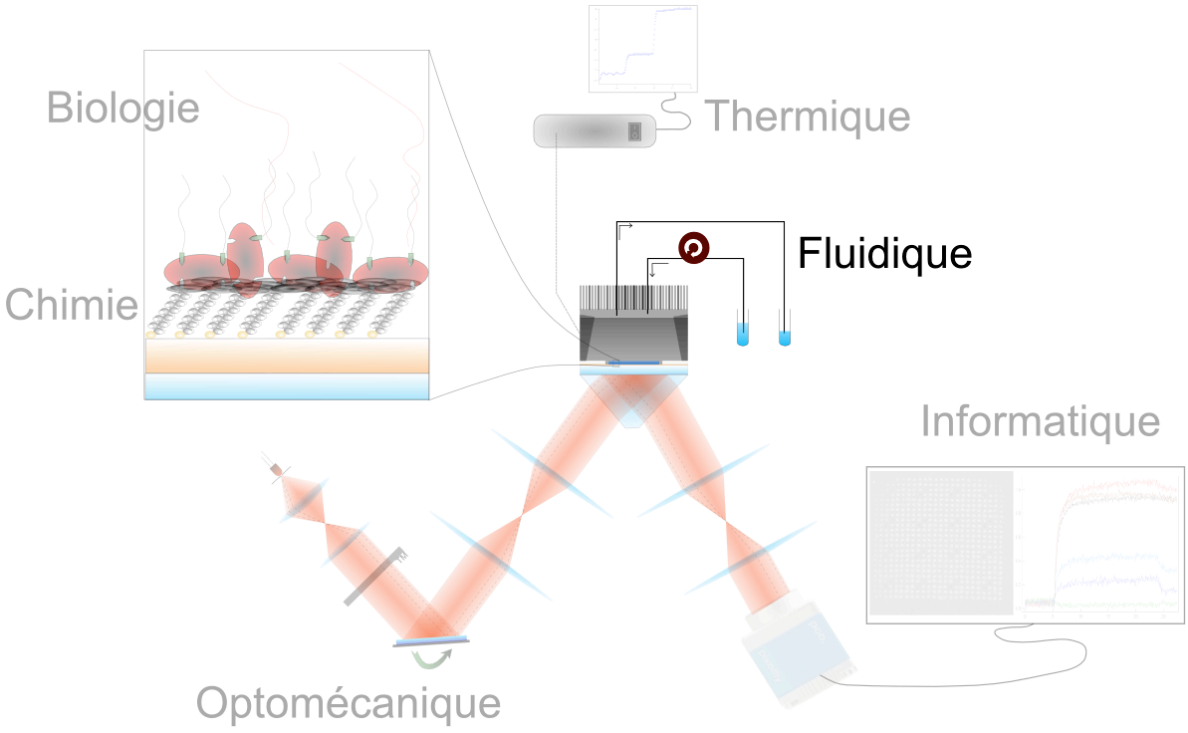


Figure 41 : Rapport signal sur bruit en dB en fonction du temps d'accumulation en ms. La droite en trait plein correspond au rapport signal sur bruit théorique limité par le bruit de photon.

Le système de détection est limité par le bruit de photon comme le montre la Figure 41. Le système d'enregistrement quant à lui est limité par le temps d'écriture des images sur le disque dur de l'ordinateur. En routine expérimentale, il fallait faire un compromis entre RSB optimum et temps d'enregistrement des données. Nous avons opté pour une accumulation de 16 images qui fait descendre le bruit à 0.3 % par pixel et permet un enregistrement cadencé à 15-20 relevés de signal par minute, soit une image résultante (16 images de 100ms accumulées) toutes les 3 ou 4 secondes environ. Notons que le signal utilisé est une moyenne sur une centaine de pixels. Cette moyenne diminue ainsi le bruit mesuré.

2.1.2. La fluidique



Il existe différents moyens permettant à une molécule cible de venir interagir avec les molécules sondes déposées sur une biopuce, comme par exemple les micro-canaux avec cycles d'injection assistés par ordinateur. Notre système utilise une solution moins coûteuse, moins efficace en terme de quantité de produit utilisée, mais qui a l'avantage de laisser un contrôle dynamique sur le temps de circulation du produit cible au dessus de la puce. Par exemple, dans certains cas, il peut être judicieux de mettre la solution cible en circuit fermé de manière à augmenter le temps d'interaction entre les cibles et les sondes sans devoir

augmenter la quantité de solution à injecter. Au cœur du système de fluidique, une cuve appliquée contre la biopuce permet les interactions entre les molécules cibles circulantes et les molécules sondes fixées sur la lame fonctionnalisée. J'ai testé et utilisé plusieurs types de cuves construites dans plusieurs matériaux durant ma thèse. La première de ces cuves utilisées était une cuve totalement moulée dans du téflon. Sur un corps principal parallélépipédique percé d'une arrivée et d'une sortie fluidiques cylindriques se découpe la partie creuse de la cuve. Les rebords d'une profondeur de 150µm et d'une épaisseur de 1 mm délimitent la cuve sous deux formes différentes : soit en forme de cercle de diamètre 0.8 cm (Figure 42-A), soit en forme d'hexagone de largeur 1 cm. L'avantage de l'utilisation du téflon est qu'il permet l'absorption des défauts de la surface de la biopuce ou des rebords mêmes de la cuve par sa capacité à se comprimer légèrement.

Le deuxième type de cuve est basé sur un corps principal en métal (titane ou inox) permettant un contrôle thermique de l'enceinte. Un film de téflon est projeté sur la surface de ce bloc principal, puis la forme creuse de la cuve est usinée à même le film (Figure 42-B). Cette technique permet une moins grande déformation de la puce lors de la pression de la cuve sur celle-ci. Ici, au lieu du rebord circulaire de 1 mm de largeur, c'est toute la surface autour de l'enceinte de la cuve qui est plaquée sur la lame fonctionnalisée.

Le dernier type de cuve utilisée est toujours basé sur un corps métallique mais les bords de la cuve sont formés par un anneau de téflon encastré dans le bloc principal (Figure 42-C). L'étanchéité est totale et la largeur de l'anneau (5 mm) permet de s'affranchir de la plupart des effets d'anneaux de diffraction comme nous verrons au chapitre 2.1.1.Substrat.

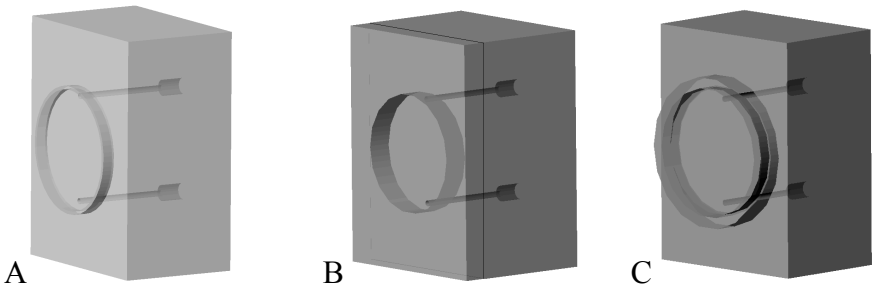


Figure 42 : A- Cuve circulaire en téflon. B- Cuve métallique avec dépôt de téflon. C- Cuve métallique avec anneau de téflon.

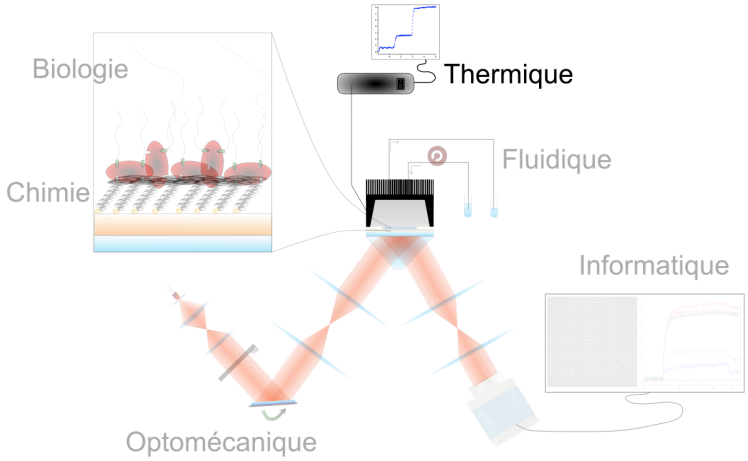
Afin de faire circuler les fluides à injecter dans la cuve, nous utilisons une pompe péristaltique (Minipuls, Gilson [lxxxvi]) dont le débit est contrôlé pour être de 50 µL par

minute Cette valeur a été choisie initialement de manière pragmatique afin de minimiser le temps de l'expérimentation et de minimiser la perte de produit lors des manipulations pour les diverses injections.

Cette pompe nous permet d'avoir un contrôle dynamique sur les produits cibles injectés. C'est-à-dire que l'utilisateur peut faire varier autour des 50 µL par minute le débit de la solution injectée en fonction des besoins de l'étude réalisée et la circulation peut aussi être arrêtée. L'arrêt de la circulation dans la cuve permet un échange d'échantillon non automatisé et rapide. La capacité du circuit fermé dépend de l'échantillon placé en entrée du circuit. Comme le tuyau d'entrée de la cuve et le tuyau de sortie sont placés dans le contenant de l'échantillon, la quantité de produit peut varier (tubes de 500 µL ou 200 µL par exemple). Le volume mort comprenant la capacité de la cuve et des tuyaux utilisés en plus de l'échantillon est de l'ordre de 120 µL.

L'impact de la profondeur de la cuve et du flux de la pompe est important sur les cinétiques d'interaction qui se déroulent sur la puce. La répartition spatiale de la solution cible dans la cuve influe sur les réponses des sondes à l'injection d'une cible. Si un défaut de surface existe ou si la profondeur de la cuve est trop faible, cette solution cible ne s'homogénéisera pas dans la cuve et toutes les sondes ne seront pas irriguées de la même manière. La différence de concentration influe sur le T_M des interactions. Il en découle que si un spot est défavorisé en terme de flux de cibles par rapport à un autre, les signaux issus de ces deux spots ne seront pas comparables. Expérimentalement, nous observons des problèmes d'homogénéisation de la cuve lorsque la profondeur de celle-ci est inférieure à 100 µm.

2.1.3. La régulation de température



Les interactions entre molécules biologiques dépendent d'un grand nombre de paramètres comme la stringence du milieu, la quantité de produit introduit, etc… Mais un des facteurs principaux à maîtriser pour obtenir des résultats reproductibles et pertinents est la température (voir chapitre 1.2.2.Introduction à la température de fusion). Pour contrôler cette température, la cuve est enchâssée dans un mord métallique sur lequel sont disposés deux modules Pelletier reliés à un dissipateur thermique à ailettes (Figure 43). L'énergie calorifique emmagasinée sur le dissipateur est évacuée à l'aide d'un ventilateur (5V – diamètre 5cm) fixé sous le système de régulation thermique. Les pelletiers sont contrôlés par ordinateur via une carte contrôleur (OvenInd MC362[lxxxvii]) et la température de la cuve est mesurée à l'aide d'une sonde de température (OvenInd TS67-170, 15 kΩ, de 0°C à 100°C ±1°C [lxxxviii])

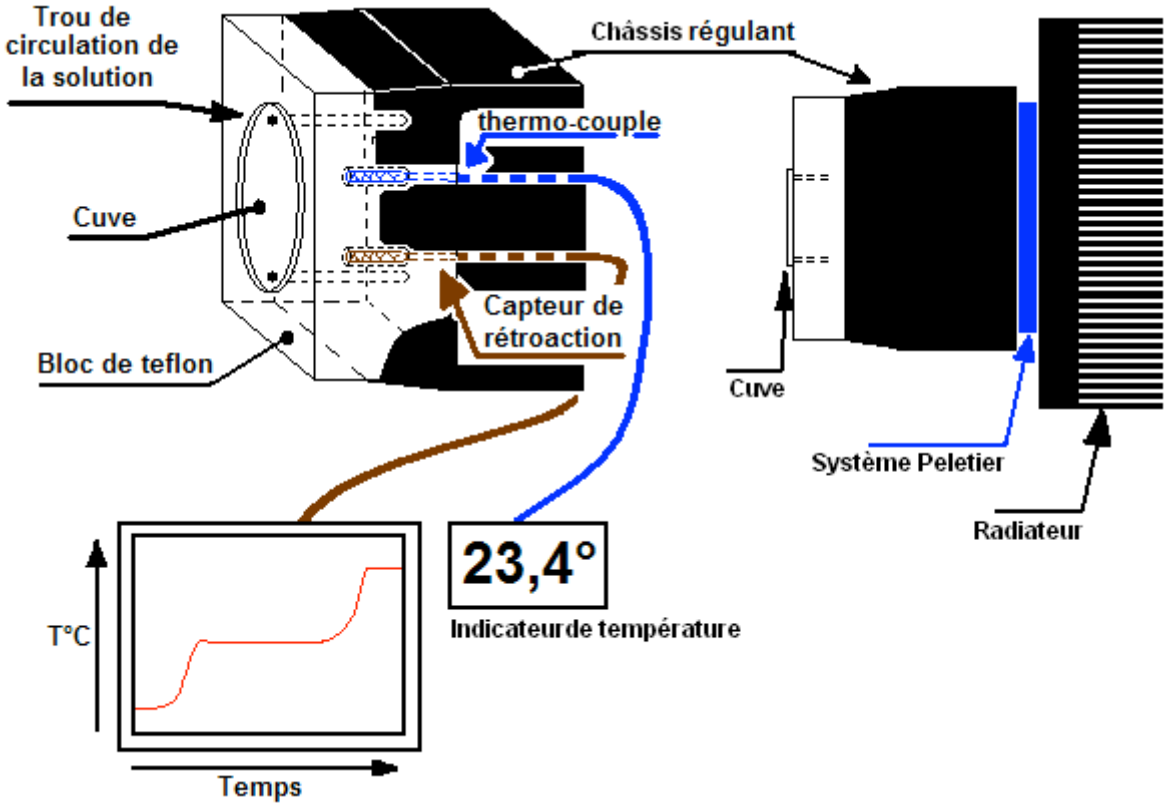


Figure 43 : Schéma de montage du régulateur de température. La cuve est placée dans un support métallique relié au système de dissipation par un double Peletier. Le capteur de rétroaction est relié au Pc via la carte contrôleur OvenInd. Il est possible d'enchâsser un thermocouple relié à un indicateur numérique pour suivre en temps réel l'évolution de la température.

Le système de régulation de la température est basé sur un asservissement par boucle de contre-réaction. Trois paramètres régissent cette boucle : le proportionnel, l'intégrateur et le dérivateur. Le principe de base consiste à prendre une mesure du signal à asservir et de la

comparer à une commande. La chaîne d'action (H- Figure 44) correspond à la partie active du régulateur de température, celle qui va chauffer ou refroidir la cuve, la consigne correspond à la valeur de température souhaitée par l'utilisateur et la sortie correspond à la valeur de température mesurée au sein de la cuve. La chaîne de retour (K) agit sur la valeur de sortie qui est ensuite comparée à la valeur de consigne. Sans ces éléments de correction et à cause de l'inertie du système global de régulation de température, le signal de sortie oscillera autour de la valeur de consigne sans jamais se stabiliser. C'est pourquoi il est nécessaire de placer des éléments de contrôle sur la boucle de contre réaction. Le premier paramètre à régler est le gain proportionnel, P. L'action établie sur le signal de sortie sera proportionnelle à la différence sortie – consigne. En fonction de la valeur du gain P fixée, cette différence entrainera un réchauffement plus ou moins rapide de la cuve. Plus le gain est important, plus la réponse du système va être rapide. Mais l'inertie du système entraine un dépassement et un certain nombre d'oscillations pour un gain trop élevé. Il faut alors faire un compromis entre rapidité de temps de montée et nombre d'oscillations avant stabilisation. Avec une contre réaction se basant seulement sur le gain proportionnel, le signal de sortie ne pourra alors se stabiliser qu'à une valeur correspondant à la consigne plus l'erreur statique rajoutée par la chaîne de retour (Figure 44).

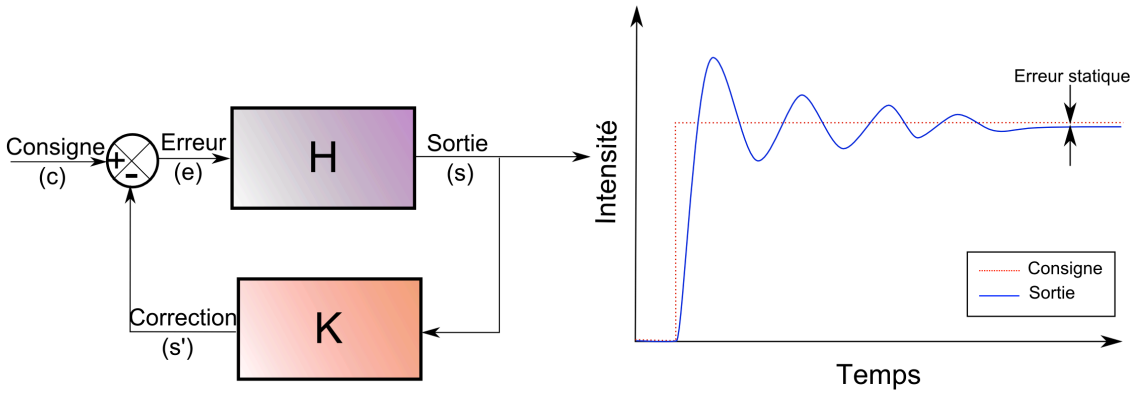


Figure 44 : Schéma de principe d'une boucle à contre réaction. La courbe de droite montre l'évolution du signal de sortie en fonction du temps pour un système à contre réaction basé sur un gain proportionnel seul. Le signal emporté par l'inertie du système dépasse la consigne. Le nombre d'oscillations déprendra du gain imposé à la boucle de contre réaction et des caractéristiques du système. La valeur de sortie finale sera toujours différente de la consigne et l'écart entre la sortie et la consigne est appelé erreur statique.

Afin d'éviter un trop grand dépassement et de minimiser le nombre d'oscillations, la chaîne de retour comporte un deuxième élément correcteur : l'intégrateur. Cet élément intègre le signal de sortie et a pour rôle d'anticiper sa valeur pour restreindre la chaîne d'action et corriger l'inertie du système. Mais la précision gagnée par cet élément diminue la rapidité du système. L'intégrateur est alors couplé à un troisième élément de la chaîne de retour : le dérivateur. Avec une observation de la pente de la sortie du système, on contre balance la diminution du temps de réponse.

L'ensemble de la boucle de contre-réaction PID bien optimisée permet un asservissement paramétrable selon les besoins de l'utilisateur d'un système. La réponse peut être très rapide avec un dépassement fort et plusieurs oscillations précédant la stabilisation de la valeur de sortie, ou très lente avec une tendance asymptotique.

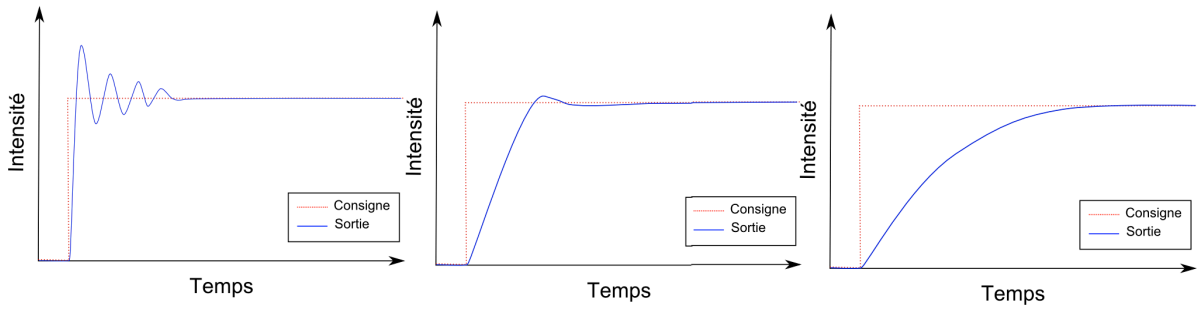


Figure 45 : Graphiques de principe du signal de sortie en fonction du temps pour trois types de correction PID, le premier en régime oscillant, le deuxième en régime optimal, le troisième en régime lent.

Dans notre système, la chaîne d'action est soumise à deux types de consigne : un échelon ou une rampe. Dans le premier cas, la réponse souhaitée doit correspondre à la deuxième courbe de la Figure 45. Une grande rapidité de réaction et une stabilité nécessitant le moins d'oscillations possible. Dans le deuxième cas, la réponse ne doit souffrir d'aucune oscillation et respecter une pente linéaire s'approchant le plus possible de celle de la consigne.

Quelque soit le besoin expérimental, le matériau dans lequel est réalisé la cuve est important pour la réactivité du système. Le téflon n'étant pas un très bon conducteur thermique, les cuves les plus récentes ont été réalisées en métal. Comme le volume de solution contenu dans la cuve est très faible (7.5 mm^3 environ), la température initiale de la solution ne perturbe pas la régulation thermique.

La carte contrôleur de température OvenInd MC362 nous permet de régler plusieurs paramètres importants comme les paramètres PID, les valeurs maximales et minimales de températures à ne pas franchir, etc ... (Figure 46)

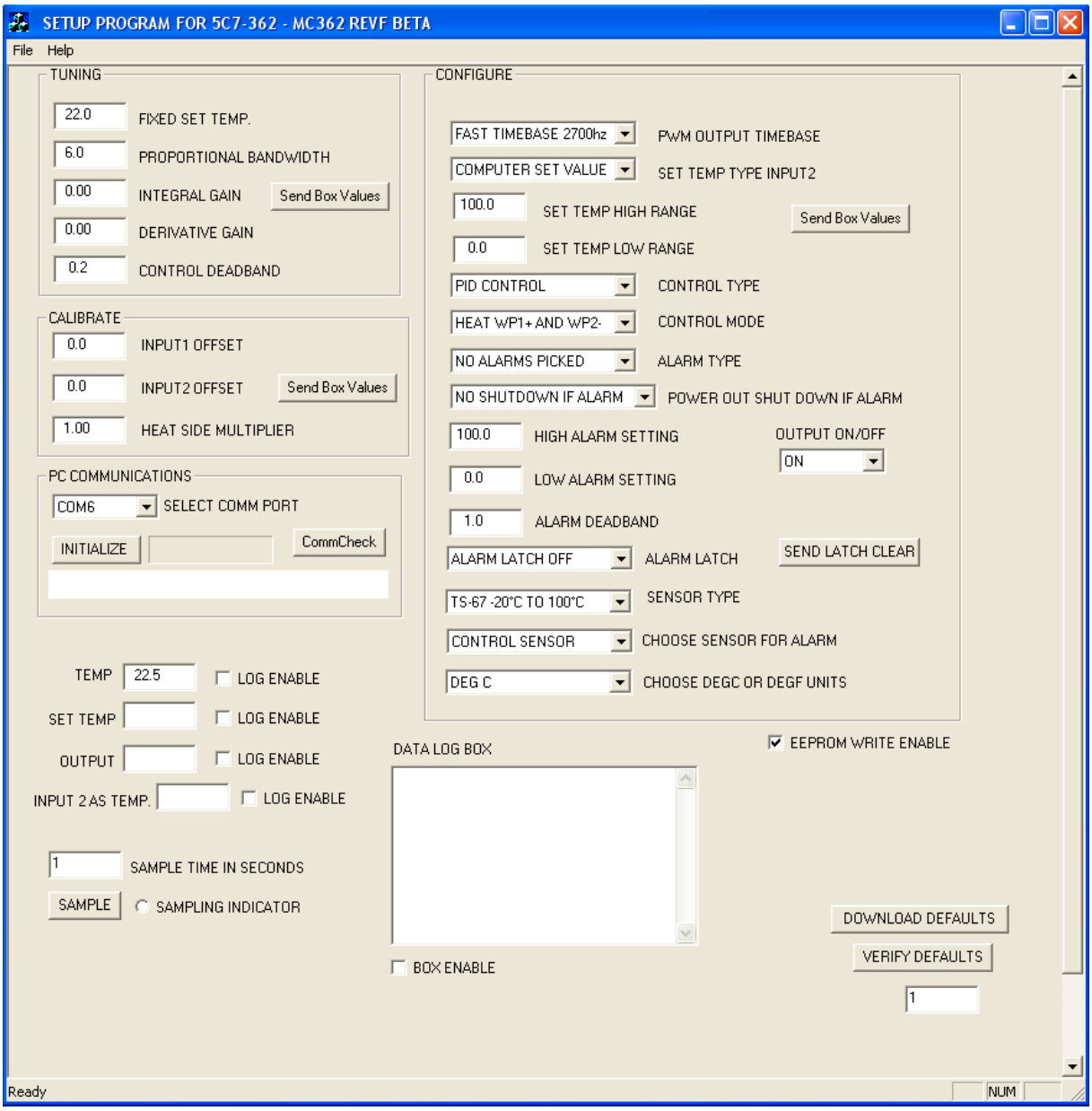


Figure 46 : Programme de contrôle propriétaire d'OvenInd permettant le paramétrage de la carte contrôleur de température. Les principales valeurs à régler sont la température de consigne (Fixed Set Temperature), la valeur du gain proportionnel (Proportional Bandwidth), le gain intégrateur (Integrated Gain) et le gain dérivatif (Derivated Gain). Il permet aussi d'afficher certaines valeurs comme la température mesurée, la température de commande et l'intensité fournie aux modules Pelletier.

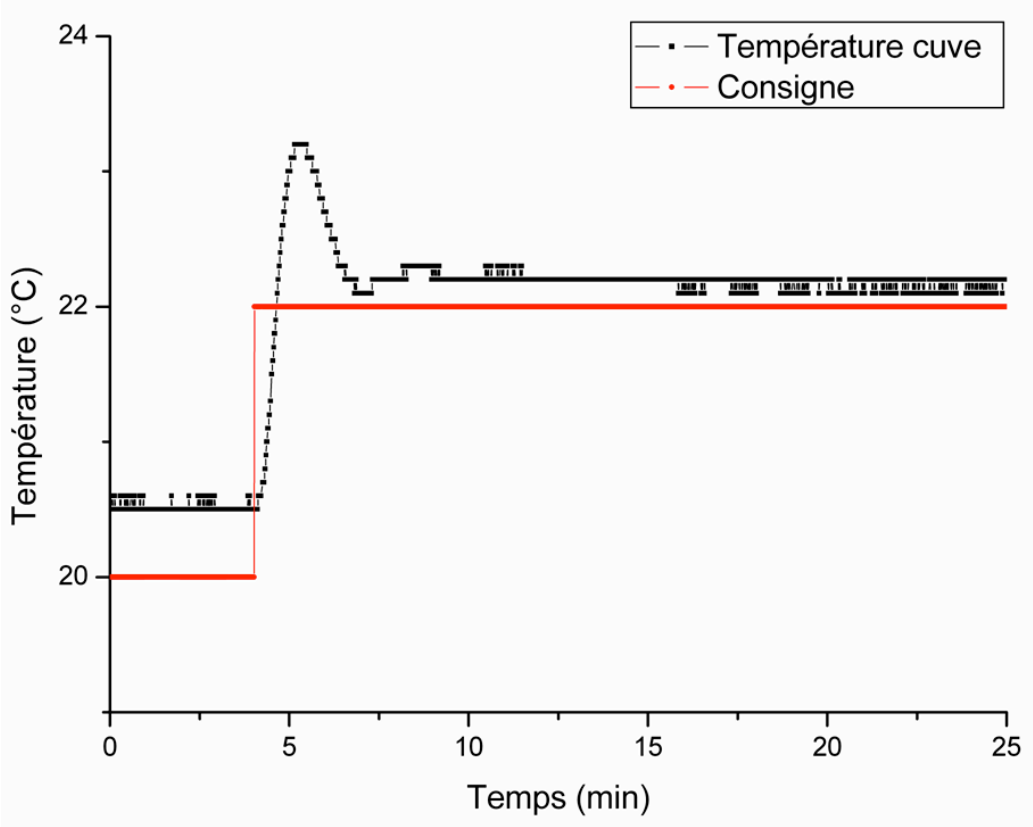


Figure 47 : Courbe expérimentale de la réponse en température du système à une commande en fonction du temps. La courbe rouge correspond à la consigne qui passe de 20°C à 22°C (+/- 0.05°C). La courbe noire correspond à la température mesurée sur la cuve. Les paramètres utilisés pour cette stabilisation sont : Proportional Bandwidth = 6, Intergral Gain = 0, Derivative Gain = 0, Control Deadband = 0.1. La température finale oscille entre 22.1°C et 22.2°C (+/- 0.05°C).

Le contrôleur étant numérique et la carte ayant une sensibilité de 0.1°C, les valeurs de température observées oscillent à +/-0.05°C autour de la valeur réelle de la cuve. Typiquement, pour une commande fixée à 22°C, la température de la cuve oscille entre 22.1°C et 22.2°C (Figure 47). Cet offset est dû à l'erreur statique de la correction n'utilisant que le facteur de gain proportionnel.

En fonction des besoins, il arrive qu'une stabilisation longue de la température de la cuve soit nécessaire. Des expérimentations faites sur des produits à très faible concentration nécessitent un temps de circulation dans la cuve pouvant excéder les 2 heures. Nous avons alors vérifié que la stabilisation en température ne divergeait pas à partir d'une certaine période de régulation. Sur une durée d'environ 1090 minutes (18 heures), le signal de température reste stable à +/-0.05°C alors que la température de la pièce enregistre une chute de 1°C due aux changements d'activité dans la pièce au cours du temps (Figure 48).

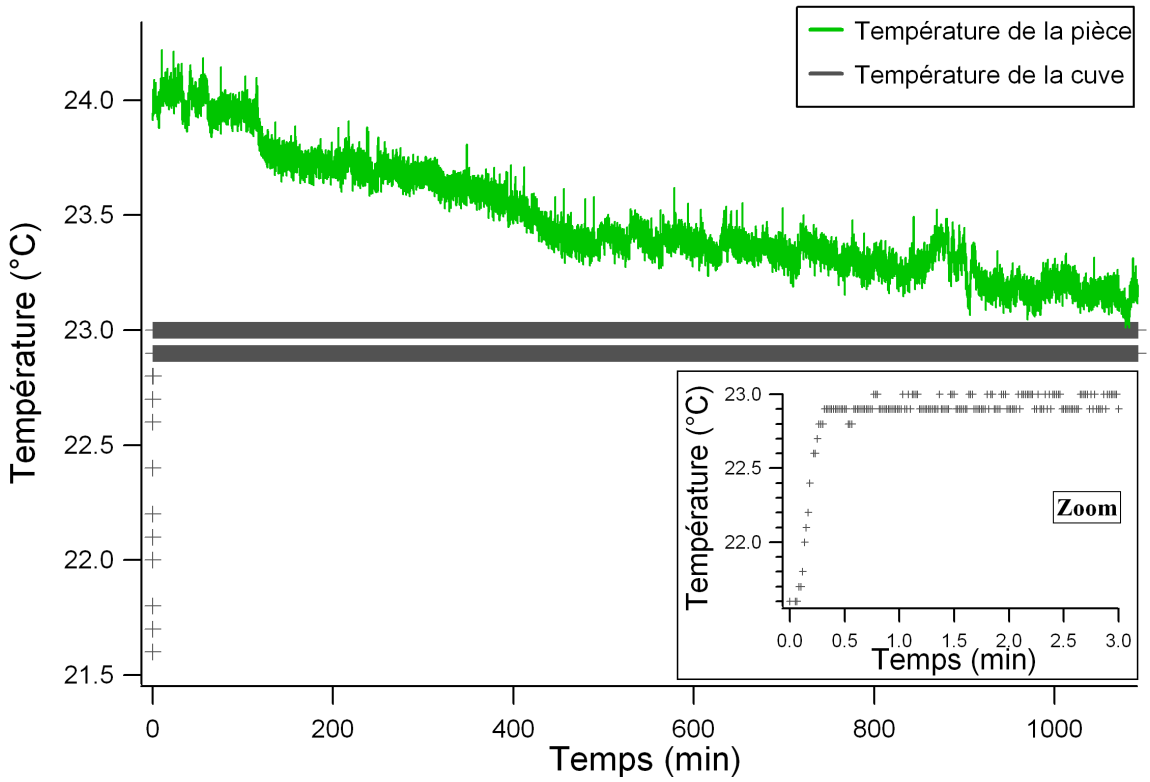


Figure 48 : Température de la cuve et de la pièce en fonction du temps pour une longue durée (18 heures). En gris, la courbe de température de la cuve avec un agrandissement des 3 premières minutes. En vert la température de la pièce. La commande était de 23 °C, la température de la puce se stabilise entre 22.9 et 23 °C à partir de 45 secondes.

Afin d'améliorer les possibilités d'utilisation du contrôleur de température, nous avons développé un programme de commande sous LabView. Ce programme, outre le fait de représenter les températures de consigne, de cuve, et de deux autres sondes de références, une placée dans le système et l'autre relevant la température de la pièce, permet la programmation d'une rampe de température. Afin de pouvoir observer l'évolution d'interactions en fonction de la température en temps réel, il suffit de fixer la température de consigne de départ, celle d'arrivée et de définir le nombre de degrés par seconde que la carte doit imposer au système. Typiquement, et afin d'éviter toutes oscillations dues à l'inertie du système, nous utilisons un pas de l'ordre de 0.1°C pour 30 secondes (Figure 49)

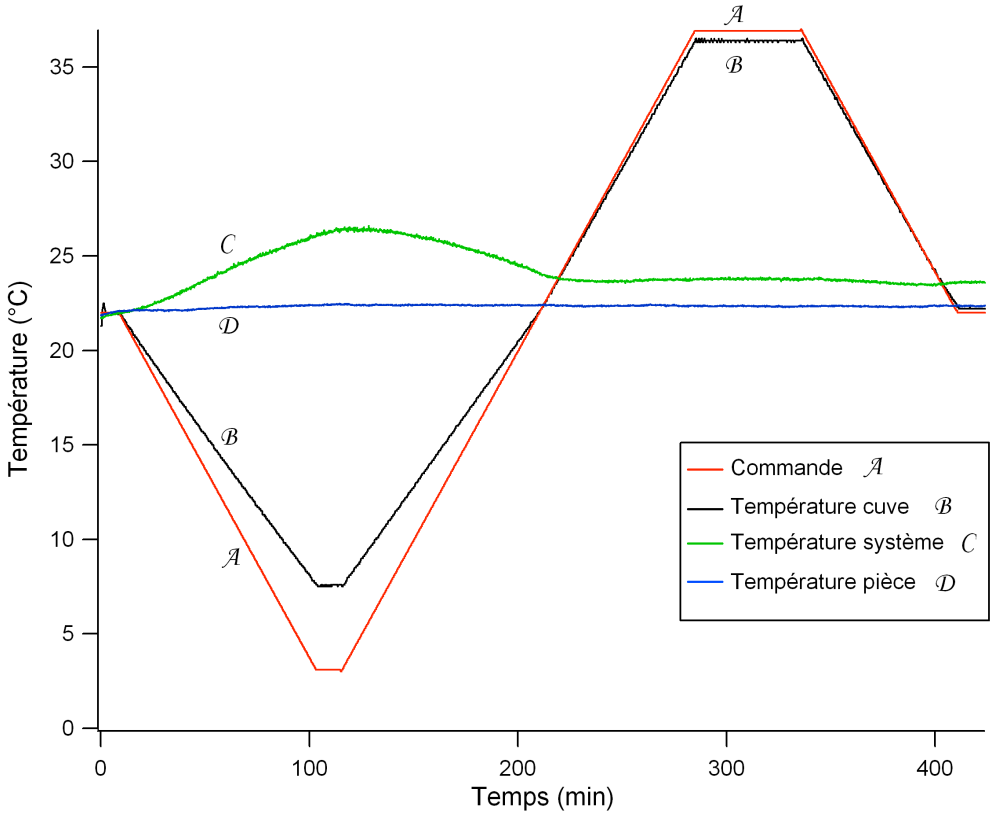


Figure 49 : Graphique expérimental d'une rampe de température. La courbe rouge correspond à la consigne, la noire, à la valeur de la température interne de la cuve, la verte, à la température environnant le système, la bleue, à la température de la pièce. L'augmentation de la température du système est due au refroidissement de la cuve qui transfert sa chaleur dans l'espace environnant.

Le décalage observé entre la consigne et la valeur de stabilisation de la sortie dépend de la valeur de la consigne. Pour des températures de consignes inférieures à 22°C, la température de la cuve se stabilise au dessus de la consigne alors que pour des consignes supérieures à 22°C, la température de la cuve se stabilise en dessous. Ces décalages s'expliquent par une dissymétrie du module Peletier. Il est plus efficace en chauffage qu'en refroidissement. Dés que la consigne est fixée en dessous de la température ambiante, la température de stabilisation en est plus éloignée du fait d'une efficacité moins grande du module. De plus le radiateur sur lequel sont fixés les modules Peletier se servant de dissipateur est sous dimensionné et ne peut absorber toutes les calories échangées avec la cuve via les modules Peletiers. Pour les besoins actuels des expérimentations, cette complexification du système n'a pas été faite et les valeurs de la température de la cuve sont simplement conservées, indépendamment de la valeur de consigne, pour les différentes études.

L'incidence de l'augmentation de la température de la cuve de un degré Celsius sur le signal de réflectivité est de -0.25 % (±0.02 %) pour une lame d'or fonctionnalisée avec une chimie de surface Dextran (voir chapitre 2.2.3La fonctionnalisation Dextran). Cette relation est mise en évidence pour un angle de travail placé au centre de la zone quasi-linéaire de la variation de réflectivité angulaire. Les paliers de température sont espacés de 2°C (température de commande). La Figure 50 montre l'évolution de la réflectivité pour une zone de la puce en fonction du temps pour différentes températures. La moyenne sur la surface de la puce et l'écart type y sont représentés pour chacun des paliers de température.

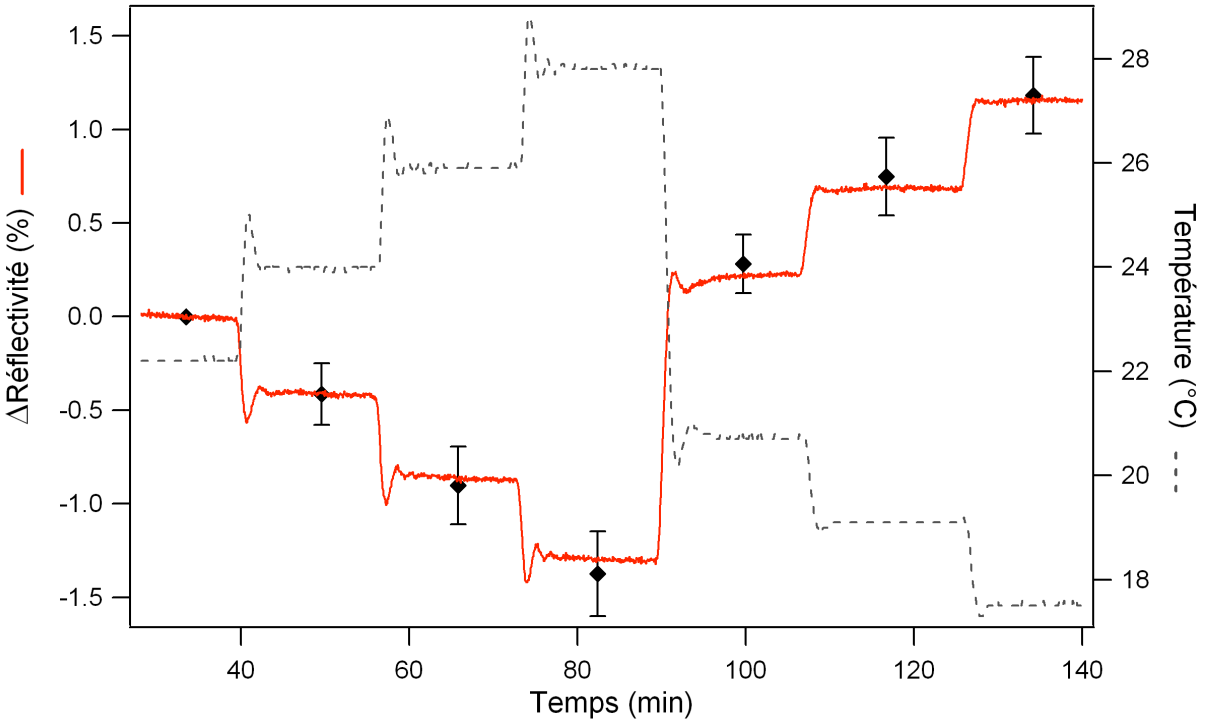
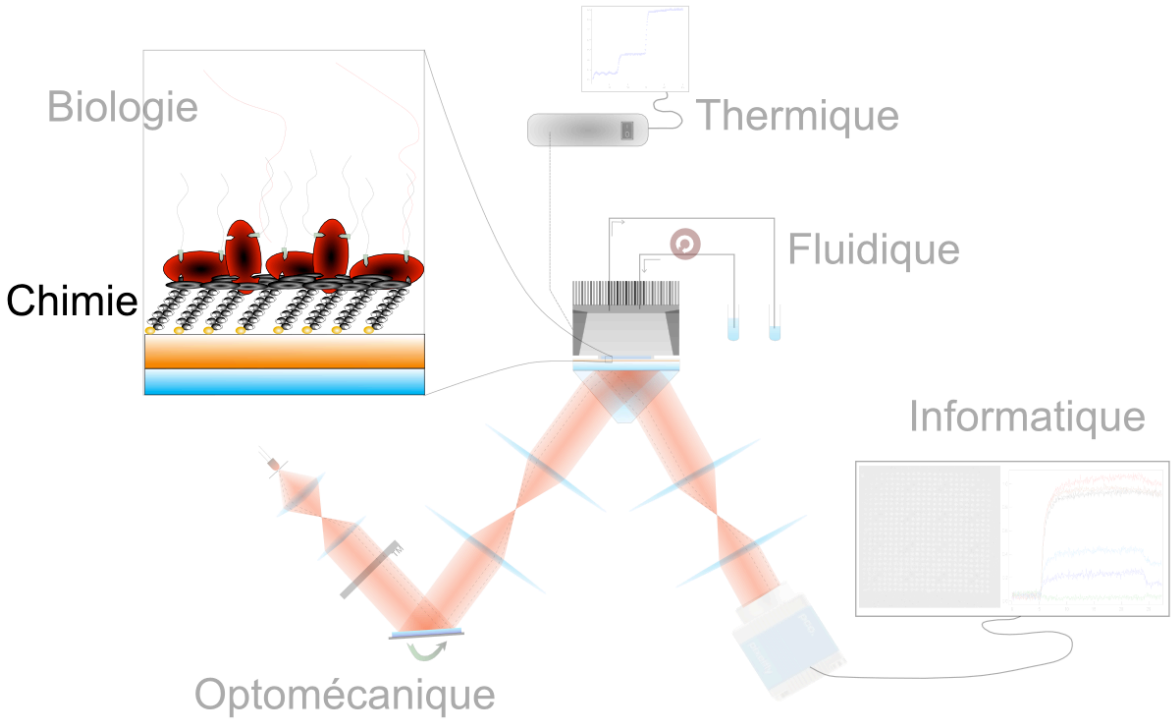


Figure 50 : Evolution de la réflectivité en fonction du temps (courbe rouge) pour différentes températures. La courbe en pointillés représente l'évolution de la température de la cuve en fonction du temps. La valeur moyenne sur la surface de la puce de la réflectivité est représentée par un losange noir pour chacun des plateaux de température et les barres d'erreur représentent l'écart type à cette moyenne.

2.2. Fonctionnalisation



L'étape de la fonctionnalisation de surface est une étape clef du bon fonctionnement d'une détection par SPR. En effet, il est nécessaire de fixer les sondes au métal de la puce afin de détecter leurs interactions avec les cibles. Mais cette fixation n'est pas évidente à mettre en place. Il faut que la surface sur laquelle nous déposons les sondes n'accepte aucune autre molécule biologique par la suite. L'accrochage d'une molécule (cible ou autre) directement sur la surface entraînerait un signal appelé signal non spécifique, c'est-à-dire qu'il ne correspondrait pas à une réelle interaction avec une sonde. Ce signal viendrait s'ajouter aux signaux d'intérêts et perturberait les données d'une étude. Il faut donc que la chimie de surface soit très spécifique pour éviter une accumulation de matière supplémentaire durant l'expérimentation. Un plus grand soin doit être apporté à cette fonctionnalisation de surface que pour les puces à fluorescences, par exemple, où la spécificité ne doit être obtenue qu'entre les spots. Ici, toute la surface doit être passive à tous produits circulant dans la cuve et rester très stable.

Durant cette partie je décrirai les fonctionnalisations que j'ai utilisées durant mes travaux de thèse. Afin de suivre la logique de construction de la biopuce, j'aborderai en premier lieu le choix du substrat sur lequel est déposé le métal et qui se fixera sur le prisme de

notre configuration de Kretschmann. Cette première partie est incontournable car elle met en lumière des problèmes liés au choix des matériaux utilisés pour la réalisation du système. J'aborderai ensuite les deux fonctionnalisations de surface que j'ai utilisées pendant ma thèse en approfondissant la fonctionnalisation basée sur le Dextran et j'introduirai la dernière fonctionnalisation développée au sein de notre équipe. Je parlerai, pour finir, de la technique de dépôt matriciel des molécules sondes puis du matériel biologique utilisé.

2.2.1. Substrat

Le substrat utilisé pour nos biopuces était originellement un substrat de BK7 (n = 1.51). Nous avons constaté que la différence d'indice entre ce substrat et le prisme en SF10 (n = 1.72) créait des problèmes quant à l'huile de contact utilisée (indice semblable à celui du SF10). En effet, en fonction de la quantité d'huile déposée sur le prisme, de l'hydrophobie de ce dernier, du temps de l'expérimentation, de la température de manipulation et d'autres facteurs encore, des franges d'interférences pouvaient apparaître. Le système utilisé pour fixer la puce sur la cuve étant un système à pression, la force appliquée sur la lame va comprimer l'huile d'indice. Cette dernière va, petit à petit, fuir la zone centrale pour sortir de l'interface entre le prisme et la lame. C'est le gradient d'épaisseur de liquide induit par le système de pression qui va être à l'origine des franges d'interférences observées. De plus, comme la fuite de l'huile d'indice est longue dans le temps, les franges, lorsqu'elles étaient observées, évoluent elles aussi rendant les données extraites des expérimentations inexploitables. En effet, les variations dues aux franges d'interférences peuvent atteindre 3 à 6% de signal de réflectivité et évoluent en fonction du temps alors que les interactions spécifiques étudiées ne dépassent guère les 1.5% de signal (Figure 51). Le signal d'intérêt est alors perdu au milieu des perturbations engendrées par ces franges. Ces anneaux de diffraction ne perturbent les expérimentations que pour les cuves circulaires. Avec les cuves en téflon hexagonales, ces franges sont parallèles et extérieures à la zone intérieure des cuves (Figure 52). Mais pour des raisons d'inertie thermique lors du contrôle de température, les cuves en téflon ont été remplacées par des cuves à bases métalliques dont les méthodes de réalisation sont incompatibles avec une forme hexagonale.

Dans de telles conditions, nous avons dû adapter l'indice des lames à celui du prisme afin de s'affranchir d'une différence d'indice de réfraction qui posait problème. Un substrat

SF10 (n=1.714) a donc été préféré au BK7. L'huile de contact est restée la même et ainsi le faisceau lumineux n'observe qu'un seul et même indice de réfraction entre son entrée dans le prisme et sa sortie sur la surface métallique.

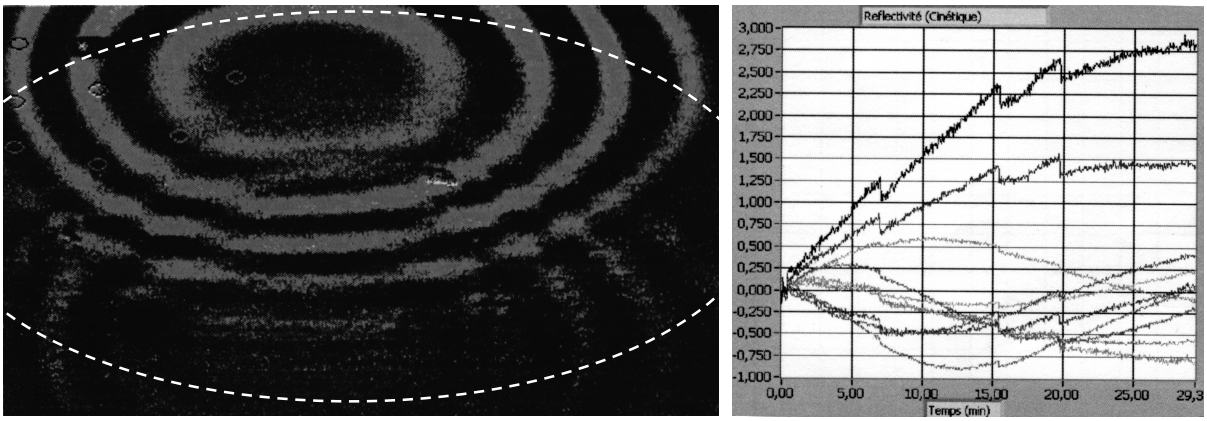


Figure 51 : Image des anneaux de diffraction observés pour une mauvaise application de l'huile d'interface entre le prisme et le substrat pour une expérimentation avec une cuve circulaire. Les rebords de la cuve sont rajoutés en pointillés blancs. Ces anneaux évoluent dans le temps du fait de la fuite centrifuge de l'huile. La différence de signal entre un maximum et un minimum de ces franges est bien supérieure à la valeur du signal d'intérêt à observer (1 à 6% de réflectivité contre 0.5 à 1% de réflectivité). Les courbes montrent l'évolution du signal en fonction du temps pour différentes zones de l'image sans aucun changement de produits. Seule l'épaisseur de l'huile à l'interface substrat/prisme induisant les anneaux modifie le signal.

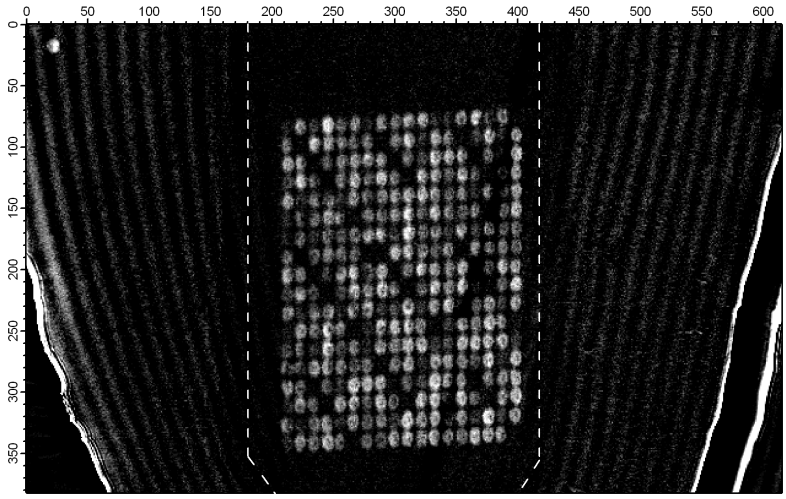


Figure 52 : Image de différence entre l'état d'équilibre après une injection d'une cible et la circulation de la solution tampon de référence pour une expérimentation avec une cuve hexagonale. Les rebords de la cuve sont rajoutés en pointillés blancs. Les franges de diffraction sont situées à l'extérieur de la cuve et ne perturbent pas le signal.

2.2.2. La fonctionnalisation MUA-PEI

Historiquement, l'équipe utilisait une fonctionnalisation de surface basée sur une structure MUA-PEI [lxxxix]. Cette fonctionnalisation utilise la grande affinité entre l'or et les fonctions thiols du MUA (acide 11-mercapto-undecanoïc) comme base de la structure. Le bras espaceur de ce premier composé permet de former une monocouche auto-assemblée ayant la propriété théorique d'isoler le reste des réactifs de la couche d'or [xc]. La fonction carboxylique du MUA permet une bonne fixation du PEI (poly(éthylène imine)) qui va servir de lien entre le MUA et l'Extradivine, dernière molécule déposée sur la biopuce. Cette fonctionnalisation de surface ainsi construite permet d'attacher solidement des brins d'ADN biotinylés sur la lame (Figure 53). Les biopuces obtenues par la procédure MUA-PEI ont des performances satisfaisantes en termes de sensibilité, spécificité et reproductibilité. La méthode de préparation est simple et peu coûteuse et ne nécessite qu'une nuit pour l'organisation du MUA en monocouche auto assemblée puis 2h pour le dépôt des autres réactifs. De plus, ces biopuces sont stables dans les conditions utilisables pour une hybridation ADN-ADN. Le problème principal de cette chimie de surface réside dans le fait qu'elle ne soit pas bien régénérable. Pour chacune des interactions que l'on souhaite étudier, il faut changer de biopuce. Comme certaines études longues nécessitent un envoi de plusieurs cibles successives dont on cherche à comparer les réponses, la régénération de la puce est une des raisons pour lesquelles la fonctionnalisation de la surface avec la méthode MUA-PEI a été abandonnée au profit d'une nouvelle fonctionnalisation de surface basée sur le Dextran.

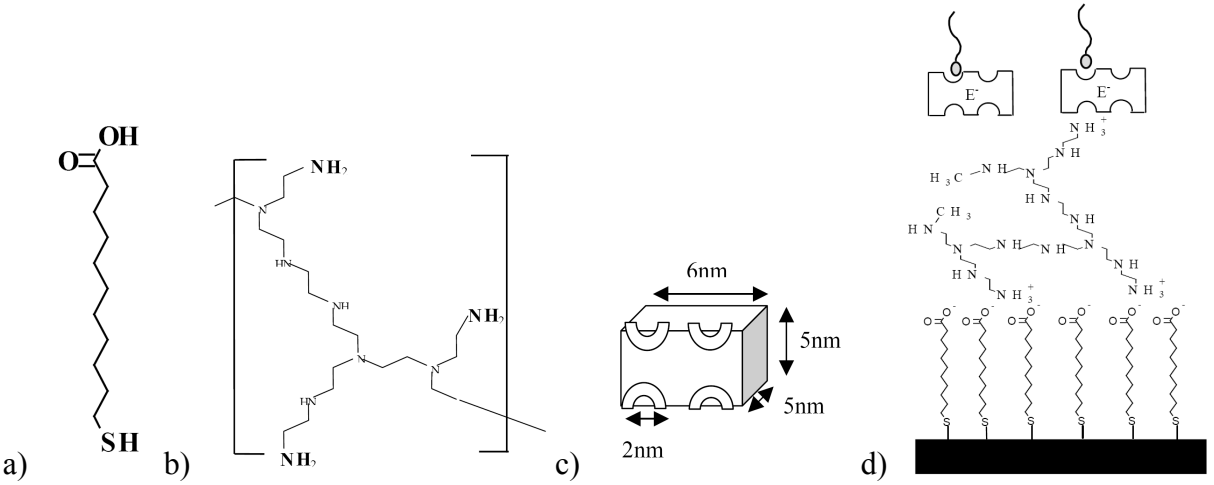


Figure 53 : a) Représentation chimique du MUA. b) Représentation chimique du PEI. c) Représentation schématique de l'extravidine avec ses 4 sites actifs et ses dimensions. d) Représentation globale de la fonctionnalisation chimique en MUA-PEI avec les sondes ADN fonctionnalisées avec de la biotine.

2.2.3. La fonctionnalisation Dextran

Nous avons par la suite développé, notamment Ilaria Manelli (post-doctorante chimiste de l'équipe), une autre fonctionnalisation de surface afin de remédier au problème de régénération. La chimie Dextran est une procédure très utilisée pour l'immobilisation de biomolécules sur une surface d'or [[xci], [xcii], [xciii]]. Elle nécessite l'adsorption successive sur la surface de plusieurs produits commerciaux décrits ci-dessous :

2.2.3.1 11-Mercapto-1-undecanol

Le 11-Mercapto-1-undecanol est un composé similaire au MUA de la chimie précédente qui a été choisi pour sa fonction thiol permettant à un fort accrochage sur la surface d'or de l'édifice de fonctionnalisation. Le bras espaceur permet de créer une monocouche auto assemblée servant à isoler la couche d'or du matériel biologique déposé ou circulant au dessus. Enfin, sa fonction alcool terminale rend la surface hydrophile et permettra l'accrochage de l'Epichlorhydrine (Figure 54). Sa formule moléculaire est $HS(CH_2)_{11}OH$ et sa masse molaire est de 204.37 g/mole. Il est soluble dans l'éthanol absolu.

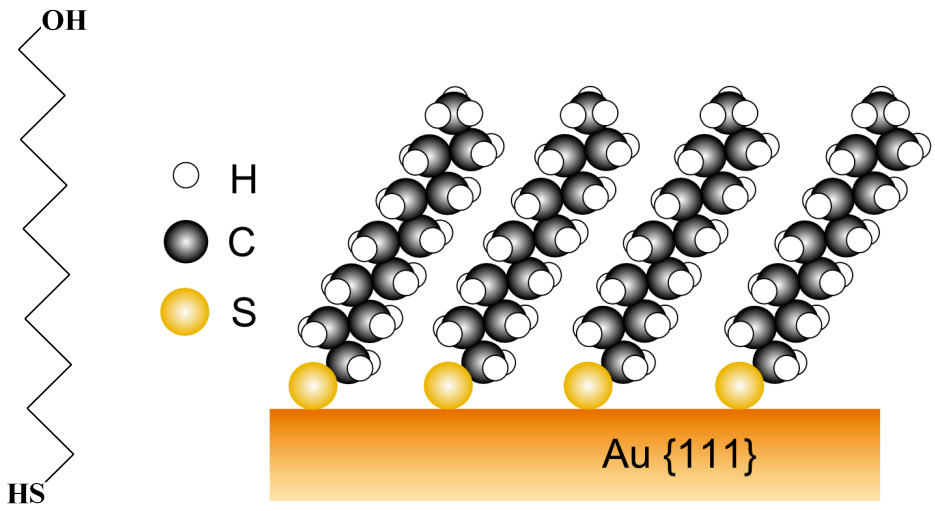


Figure 54 : Représentation chimique du 11-Mercapto-1-undecanol. La fonction thiol permet un accrochage fort avec la surface d'or. Le corps carboné isole l'or du reste de la fonctionnalisation chimique et la fonction alcool fera le lien avec le reste de la fonctionnalisation.

2.2.3.2 Epichlorydrin

L'epichlorydrin est un agent alkylant servant de liaison entre la monocouche auto-assemblée du 11-Mercapto-1-undecanol et le polymère de Dextran dont il va orienter les groupes OH internes par liens croisés. Sa formule moléculaire est C_3H_5ClO (Figure 55) et sa masse molaire est de 92.52 g/mole.

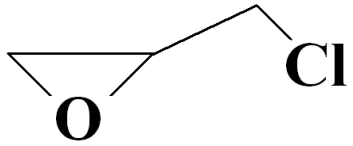


Figure 55 : Représentation chimique de l'epichlorydrin.

2.2.3.3 Diglyme

Le Diglyme (Diethylene glycol dimethyl ether) est un solvant permettant de catalyser l'interaction entre L'Epichlorhydrine et le 11-Mercato-1-undecanol. Sa formule moléculaire est $(CH_3OCH_2CH_2)_2O$ (Figure 56) et sa masse molaire est de 134.14 g/mole.

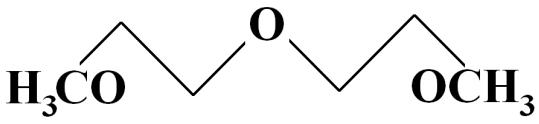


Figure 56 : Représentation chimique du diglyme.

2.2.3.4 Dextran

Le Dextran est le composé servant de polymère permettant de recouvrir toute la surface sur une certaine épaisseur et de combler les défauts éventuels de la couche auto-assemblée. L'accumulation de ce polymère créé une sorte d'éponge contenant une grande quantité de sites actifs pouvant servir d'encrage à la streptavidine, protéine utilisée pour fixer les sondes. Ce polymère qui est non orienté à l'état naturel va se structurer grâce à l'action de l'Epichlorhydrine (Figure 57). Sa formule moléculaire est $(C_6H_{10}O_5)_n$. Le Dextran utilisé est un Dextran d'une masse moyenne de 500 kDa.

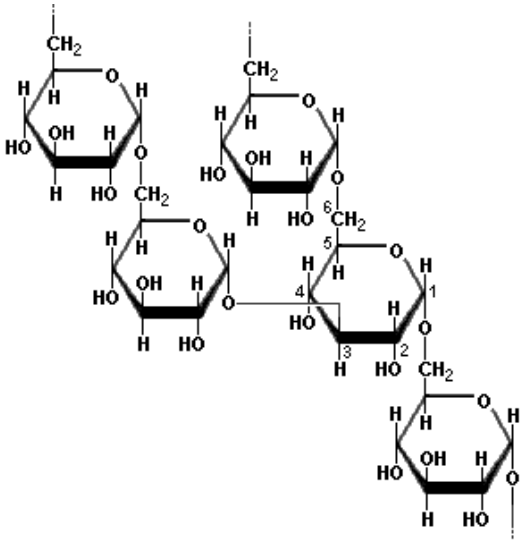


Figure 57 : Représentation chimique du Dextran.

2.2.3.5 Acide Bromoacétique

L'acide Bromoacétique est un composé qui va transformer les groupes OH internes du Dextran en groupe carboxyliques COOH sur lesquels prendra forme la partie active finale servant de liaison avec la streptavidine. Sa formule moléculaire est $BrCH_2COOH$ et sa masse molaire est de 138.95 g/mole (Figure 58).

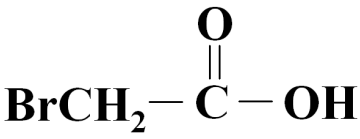


Figure 58 : Représentation chimique de l'acide Bromoacétique.

2.2.3.6 NHS - EDAC

Le NHS (N-Hydroxysuccinimide) couplé à l'EDAC (N-Ethyl-N′-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) va s'assembler sur les groupes carboxyliques du Dextran modifié par l'acide bromoacétique et former le point d'encrage de la streptavidine. Leur formule moléculaire respective est $C_4H_5NO_3$ (NHS) et $C_8H_{17}N_3 \cdot HCl$ (EDAC) (Figure 59). Leur masse moléculaire est de 115.09 g/mole (NHS) et de 191.70 (EDAC)

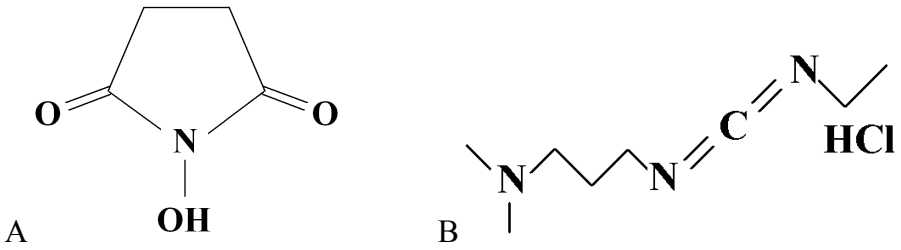


Figure 59 : A- Représentation chimique du NHS. B- Représentation chimique de l'EDAC.

2.2.3.7 Streptavidine

La Streptavidine est une protéine de la famille de l'Avidine. C'est une protéine tétramérique de 53 kDa purifiée à partir de la bactérie Streptomyces avidinii. Sa particularité est de posséder 4 sites de fixation spécifiques à la biotine (vitamine B7 ou encore vitamine H), une molécule facilement synthétisable. L'interaction entre l'avidine (ou ses dérivées : Streptavidine, Neutravidine, Extravidine, etc…) et la biotine est une des plus fortes interactions non-covalantes connues à l'heure actuelle dans le monde du vivant avec une constante de dissociation $K_D=10^{-15}$ M. Cette protéine se fixera sur la surface grâce à ses fonctions amine (NH_2) qui vont fortement interagir avec le groupement actif issu de l'étape précédente de la fonctionnalisation de la surface (Figure 60).

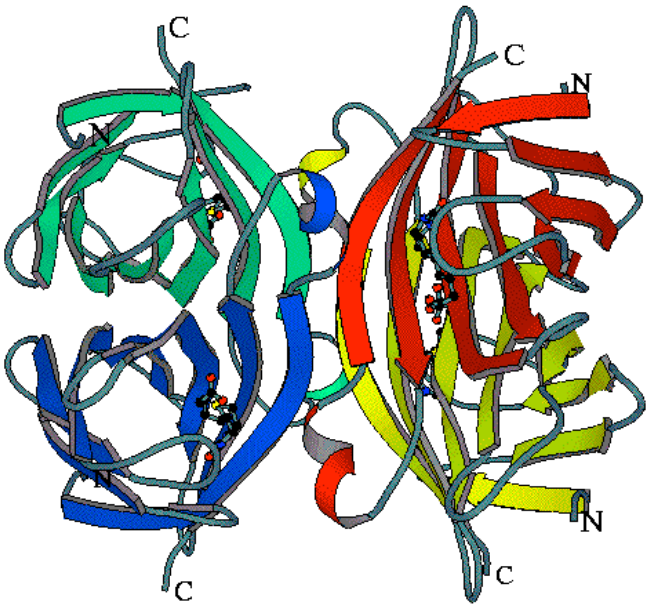


Figure 60 : Représentation simplifiée de la streptavidine basée sur cristallographie. Les quatre sous structures, contenant chacune un site actif, sont mises en évidence par des couleurs différentes.

2.2.3.8 Procédé

La première étape de fonctionnalisation de la surface d'or est le nettoyage. Une solution à base d'hydrogène peroxyde (eau oxygénée en rapport 1 :5 :5) permet, par un bain à 80°C pendant 10 minutes, d'éliminer la majeure partie des résidus organiques accrochés à la surface. Le nettoyage se termine par un rinçage à la pissette à eau, puis à la pissette à éthanol, de nouveau un rinçage à la pissette à eau et un dernier rinçage à l'éthanol termine la phase de nettoyage de la lame.

Afin d'obtenir une structure chimique recouvrant le maximum de surface, il faut des « fondations » les plus homogènes possibles et les mieux fixées au substrat d'or. Le 11-Mercapto-1-undecanol grâce à sa fonction thiol permet un très bon ancrage sur l'or et sa chaine carbonée s'arrange en monocouche auto-assemblée (SAM : Self-Assembled Monolayer) avec ses proches voisines (Figure 61).

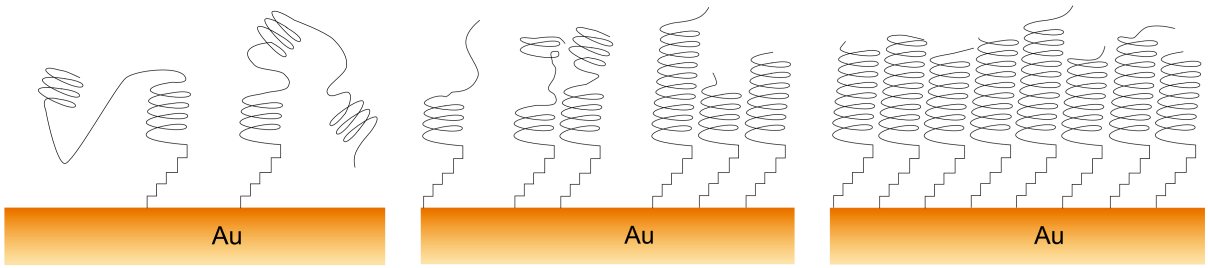


Figure 61 : Recouvrement théorique de la surface d'or par la SAM.

Les lames sont disposées dans une solution à 1 mM de 11-mercapto-1-undecanol dans de l'éthanol absolu (soit 6 mg dans 30 mL d'éthanol). Il faut un bain d'un minimum de 48h à l'abri de la lumière pour obtenir une SAM suffisamment dense pour rendre la surface hydrophile et pouvoir soutenir le reste de la structure chimique.

L'étape qui suit permet de préparer la fonction OH terminale de la SAM en y ajoutant un groupe fonctionnel qui va orienter le Dextran déposé par la suite. Après avoir nettoyé les lames avec une pissette à eau, il faut verser sur les lames une solution de 400 mM de Diglyme et de 600 mM d'Epichlorhydrine dans de la soude à 400 mM (soit dans 9,6 mL d'eau pure : 400 µL de NaOH (à 10 M), 10 mL de Diglyme et 940 µL d'Epichlorhydrine). Les lames resteront dans ce bain durant 4h. A la fin de cette étape, la SAM est activée (Figure 62).

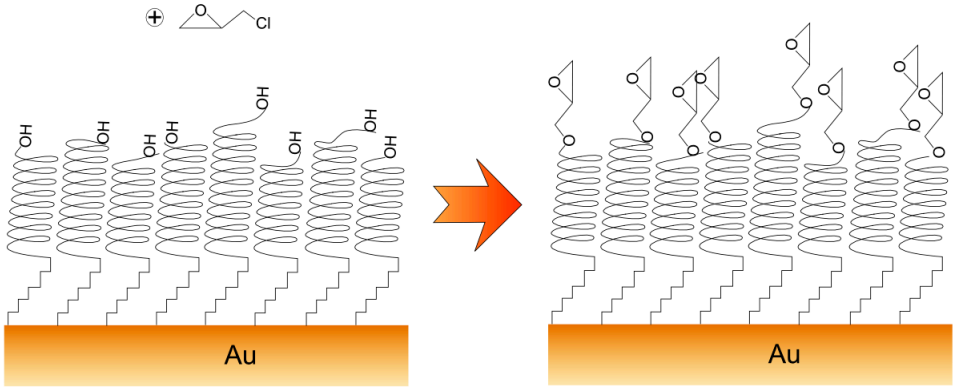


Figure 62 : Activation des fonctions alcool de la SAM par l'Epichloridrine.

La lame est ensuite nettoyée à la pissette à eau pure. Elle est plongée dans un bain de 6 mg de Dextran (500 Da) diluée dans une solution de soude à 100 mM (soit 200 µL de NaOH à 10 M dans 19.8 mL d'eau pure). Les lames resteront dans ce bain pendant au moins 20h. Le Dextran alors interagit avec la SAM activée et les sites OH internes du polysaccharide vont s'orienter pour permettre la construction de la suite de l'édifice chimique.

Après un nouveau lavage à la pissette d'eau pure, les puces sont plongées pendant 16h dans un bain contenant une solution de 1 M d'acide bromoacétique dilué dans de la soude à 2 M (soit 2.8 g d'acide bromoacétique et 4 mL de NaOH à 10 M dilués dans 16 mL d'eau pure). Cette étape va permettre la transformation des groupes OH internes du Dextran en groupe carboxyliques COOH (Figure 63).

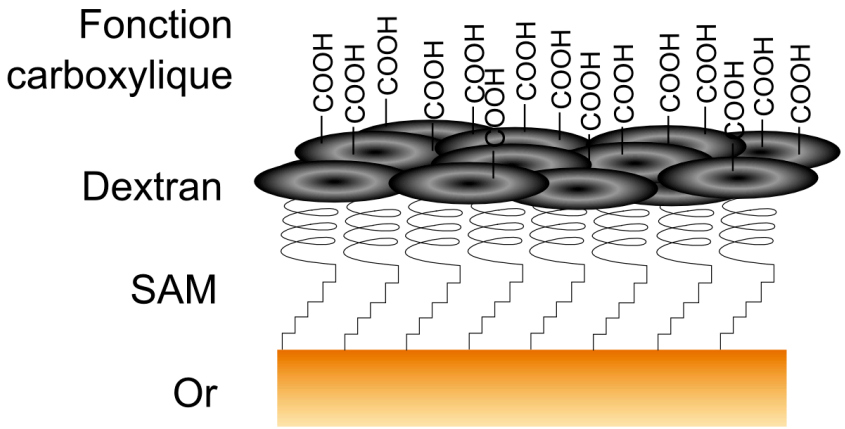


Figure 63 : Activation du Dextran par l'acide Bromoacétique. Les groupes carboxyliques forment la dernière étape de cette fonctionnalisation.

Après 16h, les puces sont abondamment rincées avec une pissette d'eau pure. Elles sont ensuite recouvertes pendant 7 minutes d'une solution de 50 mM de NHS et de 200 mM d'EDC dilués dans l'eau (soit 17.4mg de NHS et 114.9mg de EDC dilués dans 3 mL d'eau pure). Cette étape permet de transformer la fonction carboxylique précédemment obtenue en un groupe actif très réactif aux fonctions amines (NH2) des protéines (Figure 64).

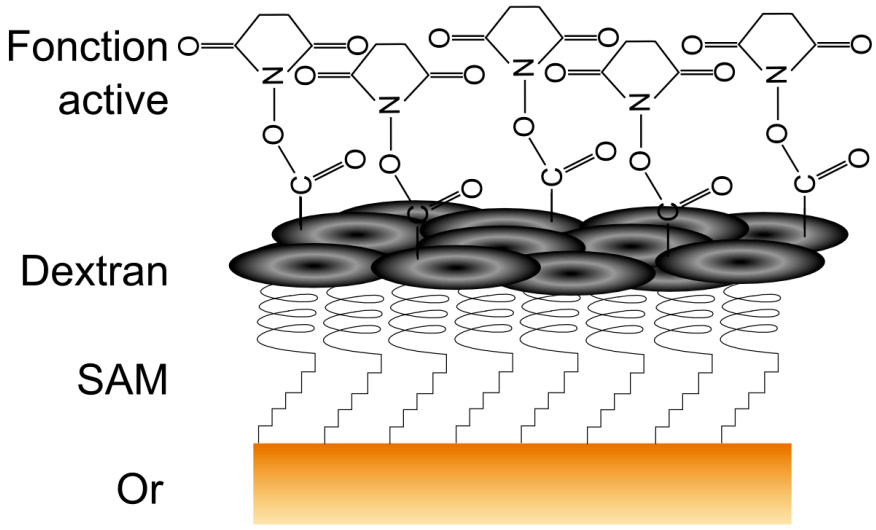


Figure 64 : Activation de la surface pour former des groupes amines qui serviront de liens avec les protéines à y déposer.

Après avoir vidé, sans rinçage à la pissette d'eau pure, la surface des lames de la solution de NHS – EDC, ces dernières sont recouvertes d'une solution de Streptavidines (2 µg/mL) diluées un tampon acétate à 10 mM de pH = 5 pendant 20 minutes. Les fonctions amines (NH2) des protéines vont se lier fortement aux groupements actifs obtenus lors de l'étape précédente et le pH acide va permettre de diminuer le temps de la réaction en chargeant positivement la solution de Streptavidine, le reste de l'édifice chimique étant globalement chargé négativement.

La dernière étape permet de désactiver les groupes actifs encore libres formés par le couple NHS-EDC afin d'éviter une interaction non-spécifique avec un quelconque réactif. Après avoir vidé, sans rinçage à la pissette d'eau pure, les lames de la solution de streptavidine, elles sont recouvertes d'une solution d'éthanolamine (concentration 1 M et pH 8.6) pendant 20 minutes.

La structure chimique ainsi construite sur la surface d'or permet à n'importe quel réactif biotinylé d'être fixé à la surface de manière extrêmement forte grâce à l'interaction Avidine-Biotine. Sur les biopuces que nous développons, nous avons déposé principalement sur la surface active de streptavidines des simples brins d'ADN dont la terminaison 3' était modifiée avec une biotine. Les cibles sont des simples brins d'ADN non modifiés qui peuvent s'hybrider avec ceux fixés à la surface. La structure chimique décrite ci-dessus, nous permet de réutiliser les biopuces créées. En effet, en changeant la stringence de la solution cible, il est possible de déshybrider les double brins formés et d'injecter d'autres cibles pour étudier d'autres interactions. La durée de fabrication d'une fonctionnalisation de surface basée sur du Dextran est bien plus importante que pour la fabrication de l'ancienne chimie MUA-PEI (on passe de 1 jour et demi à 5 jours), mais le gain qu'apporte la régénération de la biopuce nous permet d'utiliser le même support pendant 2 à 3 jours, soit plus de 10 études successives, sans perte significative de signal.

Résumé du protocole de fonctionnalisation Dextran :

- Nettoyage des lames dans une solution eau oxygénée (en rapport 1 :5 :5) pendant 10 minutes à 80°C.
- Bain de solution de Mercapto-1-undecanol (1mM) dans de l'éthanol pendant minimum 48h.
- Bain dans une solution de diglyme et epichlorydrin dilué dans du NaOH (400 mM) pendant 4h
- Bain dans une solution de Dextran (6mg) dilué dans du NaOH (100 mM) pendant un minimum de 20h.
- Bain dans une solution d'acide bromoacétique (1 M) dans du NaOH (2M) pendant 16h.
- Bain dans une solution de NHS (50 mM) et EDC (200 mM) pendant 7minutes.
- Bain dans une solution de streptavidine diluée dans une solution de tampon acétate (10 mM ; pH=5) pendant 20 minutes.
- Bain dans une solution passivante d'ethanolamine (1 M ; pH=8.6) pendant 20 minutes.

2.2.4. Régénération de la surface

Le temps de préparation d'une biopuce à fonctionnalisation de surface Dextran est contrebalancé par son énorme avantage sur une biopuce basée sur du MUA-PEI : la régénération. En effet, grâce à sa structure très stable, la fonctionnalisation Dextran résiste à des pH très acides. Il est alors possible, en injectant une solution d'HCl, de rompre les liaisons ADN-ADN établies lors de la phase d'hybridation entre les sondes et les cibles en conservant l'intégrité et la spécificité de la surface de la biopuce, les liaisons avidine/biotine étant résistantes à cette étape de dénaturation. Cette caractéristique de la chimie Dextran n'est pas observable avec une chimie MUA-PEI qui se désagrège en même temps que les liaisons ADN-ADN.

Afin de montrer la robustesse de la fonctionnalisation de surface Dextran, nous avons envoyé la même cible ADN plusieurs fois de suite sur la biopuce qui subit une régénération à l'HCl 11 mM (pH = 1.3) entre chaque injection de cible. Le protocole expérimental est le suivant :

- Injection d'une solution tampon de référence sur la puce
- Injection d'une cible sur la puce
- Dénaturation des duplexes ADN-ADN par injection d'une solution HCl (11 mM)
- Injection de la solution tampon pour revenir au niveau de référence
- Début d'un deuxième cycle (injection de la solution cible), …

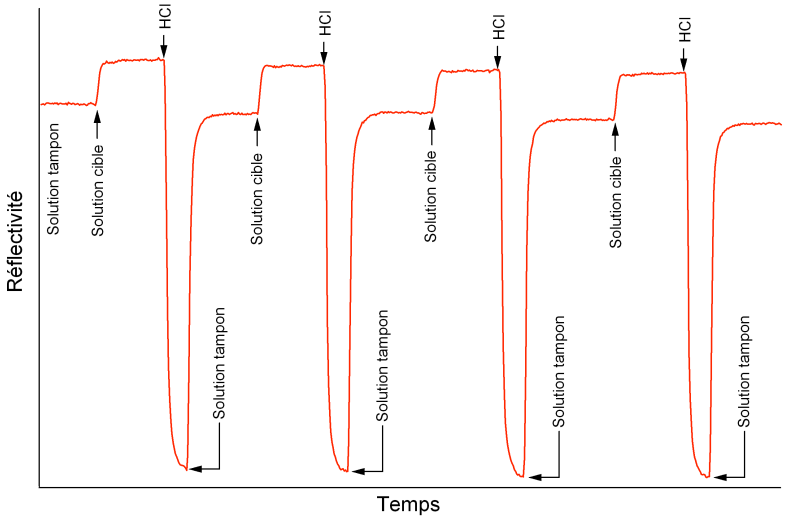


Figure 65 : Exemple de 4 cycles successifs de régénération de la surface de la puce. La courbe représente l'évolution du signal de réflectivité en fonction du temps. La réflectivité de référence est celle correspondant à l'injection sur la puce de la solution tampon. Chacune des injections successives est représentée par une flèche.

La Figure 65 montre un exemple de 4 cycles de régénérations successives d'un spot de sonde sur la même puce. Le signal représente la réflectivité du spot étudié en fonction du temps. Nous pouvons suivre les dynamiques d'interactions entre les cibles injectées et les sondes sur la surface suivies des dénaturations des duplexes lors de l'injection de l'HCl. Le signal de référence obtenu lors de l'injection du tampon reste inchangé au cycle suivant. Le fait que cette ligne de base reste identique d'un cycle sur l'autre montre bien que la surface de la biopuce reste identique. En effet, si une partie de la surface s'était modifiée, la valeur du signal de réflectivité lors de l'injection du tampon pour le cycle suivant serait différente, la réflectivité dépendant de la composition de la surface.

La biopuce comportait 42 réplicats de la même sonde et la moyenne des écarts type de la réflectivité pour une injection sur l'ensemble de ces sondes est de l'ordre de 17% sans aucune correction (Signaux rouges sur la Figure 66). Ces valeurs brutes dépendent des conditions initiales de l'expérimentation comme, par exemple, la concentration des sondes dans les spots et l'inhomogénéité de la fonctionnalisation de surface. En normalisant ces valeurs brutes par rapport à celle obtenue lors de la première injection, on ne conserve que l'évolution de cette dispersion en fonction des régénérations qui est la grandeur qui nous intéresse (Signaux noirs sur la Figure 66). La moyenne des écarts type est alors ramenée à 6%. Cette méthode de correction est détaillée dans le chapitre 3.3.Autocalibration.

L'expérience a été réalisée sur 18 régénérations successives et le signal a perdu 25% de sa valeur moyenne entre le premier cycle d'hybridation et le dernier. Cette perte de signal, malgré son importance, ne va pas à l'encontre de l'utilisation d'une même biopuce sur plusieurs régénérations. La dispersion reste constante à 2% près au cours des régénérations (Figure 66). Autrement dit, la valeur de réflectivité d'un réplicat au cours des régénérations reste stable par rapport à la valeur moyenne de la réflectivité sur l'ensemble de la puce.

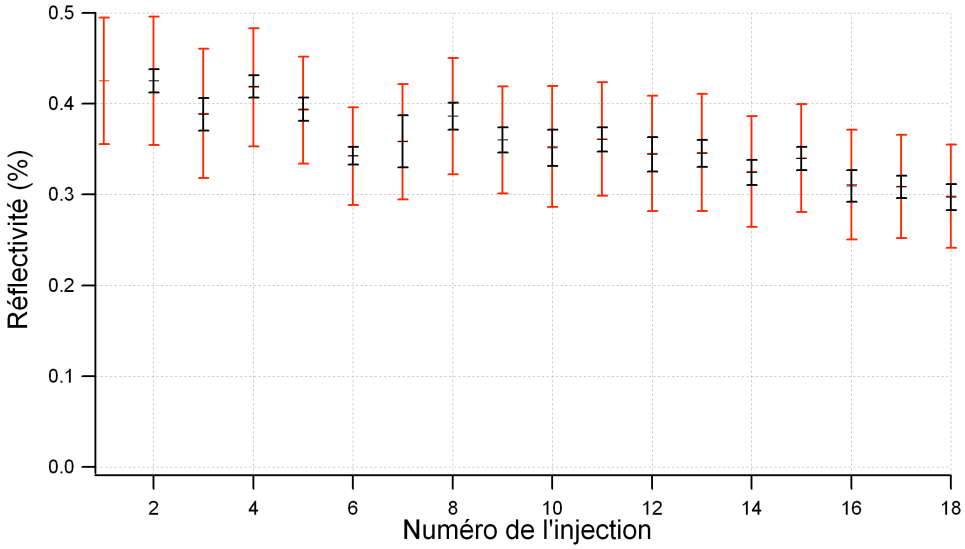


Figure 66 : Moyenne et écart type des réflectivités des réplicats de la biopuce en fonction du numéro de l'injection. En rouge sont représentées les valeurs brutes non corrigées, en noir, les valeurs corrigées par normalisation rapportée à la première injection.

2.2.5. Autre chimie de surface

Compte tenu de la durée importante de réalisation d'une fonctionnalisation de surface Dextran, Jolanda Spadavecchia (post-doctorante de l'équipe) a développé une chimie de surface basée sur de la cysteamine [xciv]. Cette fonctionnalisation, au lieu de prendre 1 semaine comme celle du Dextran, ne prend qu'une journée et demi de réalisation. Son deuxième avantage est d'être encore plus résistante aux régénérations que la fonctionnalisation Dextran (Figure 67). Mais surtout, cette chimie de surface est aussi beaucoup moins sensible à la rugosité de l'or de la lame (voir chapitre 2.1.1.7.La puce) que la fonctionnalisation Dextran et les lames dont le dépôt a été réalisé par l'entreprise Schott donnent des résultats équivalant aux autres lames. Ce qui permet de s'affranchir des effets gênants de cette rugosité et de son impact sur la réalisation des puces.

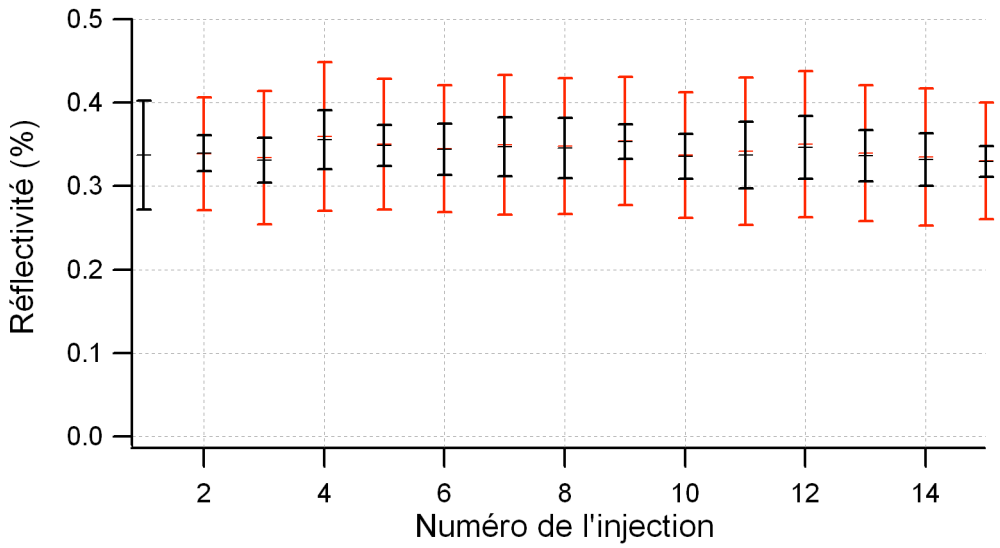


Figure 67 : Moyenne et écart type des réflectivités des réplicats de la biopuce en fonction du numéro de l'injection. En rouge sont représentées les valeurs brutes non corrigées, en noir, les valeurs corrigées par normalisation rapportée à la première injection.

Pour la réalisation de cette chimie de surface, la surface d'or est nettoyée dans une solution de H2O2 (30 %), NH3 (30 %) et H2O milliQ dans un rapport 1 :1 :5 qui est portée à ébullition pendant 10 minutes. La puce est ensuite nettoyée avec de l'eau milliQ est placée dans une solution d'éthanol ultra pur (Normapur, 99 %) pendant une nuit. Comme résumé en la surface est ensuite immergée dans une solution de β mercaptoethylamine (Cysteamine) à 10 mM dans de l'éthanol ultra pur, à température ambiante pendant 6 heures. La puce est ensuite rincée à l'éthanol ultra pur puis à l'eau milliQ pour enlever l'excès de thiol. La lame d'or est traitée avec 0.2 % (w/v) de PDITC dilué dans une solution composée de 10 % de Pyridine et de 90 % de Dimethylformammide (DMF) durant 2 heures à température ambiante. L'échantillon est ensuite rincé d'abord au DMF puis à l'éthanol ultra pur et est enfin séché sous flux d'azote. L'étape suivante consiste en l'adsorption, par la surface d'isothiocyanate résultante de l'étape précédente, d'une couche de Neutravidine (protéine similaire à la Streptavidine utilisée en Dextran) en recouvrant la puce pendant 40 minutes d'une solution de Neutravidine (250 µg/mL dans un tampon à pH = 9). Cette lame est ensuite rincée avec le même tampon à pH = 9 puis recouverte d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin, 1 mg/mL dans un tampon à pH = 9) permettant de bloquer toutes les zones non recouverte de Neutravidine pendant 20 minutes. La puce est ensuite rincée avec la solution tampon à pH = 9 puis à l'eau milliQ puis séchée sous flux d'azote. Elle est immédiatement fonctionnalisée avec les sondes biotinylées. L'ensemble de la fonctionnalisation prend 1.5 jours.

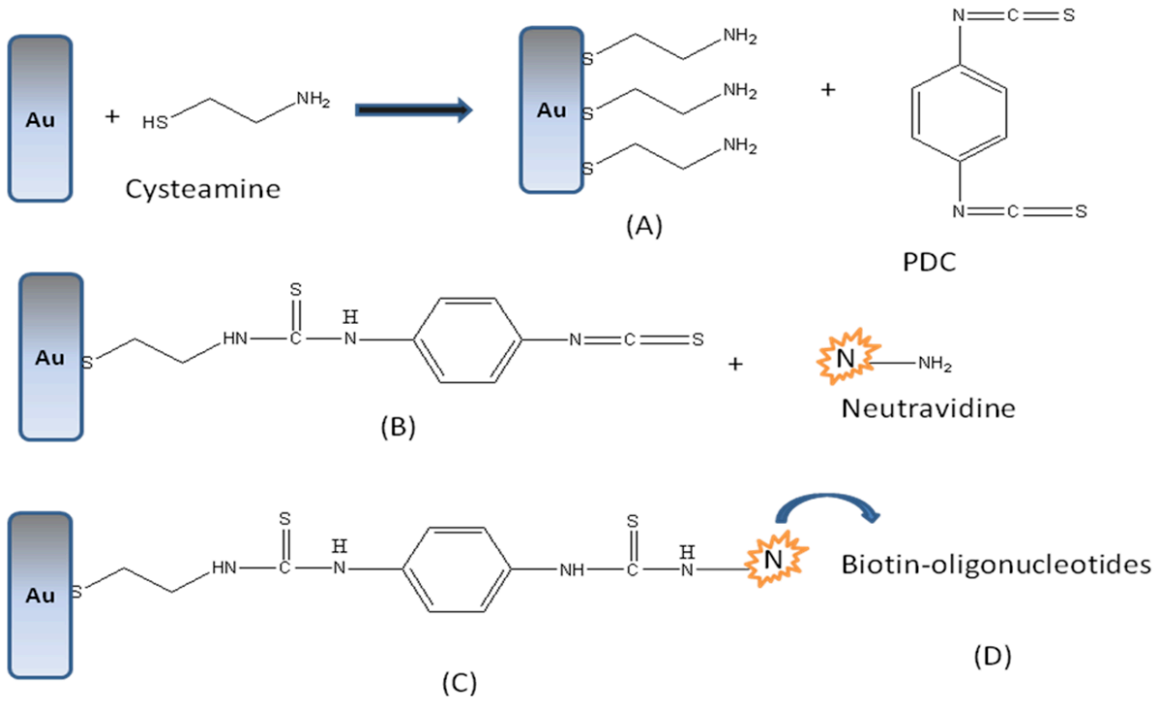


Figure 68 : Mécanisme de structuration de surface pour un accrochage covalent entre la Neutravidine et une surface d'or. A) Mono couche auto assemblée de cysteamine. B) Accrochage covalent de PDC. C) Accrochage de Neutravidin amino-modifiée. D° Lien entre les fonctions avidines et les sondes biotinylées.

Le problème principal de cette fonctionnalisation de surface réside dans la nécessité de devoir déposer les sondes le jour même de sa réalisation. Alors qu'une puce dont la fonctionnalisation est basée sur le Dextran reste active jusqu'à 2 ans après sa réalisation (conservée dans un tube étanche et dans un réfrigérateur). Pour un dépôt effectué le lendemain sur une puce dont la fonctionnalisation est basée sur la cysteamine, nous enregistrons une perte importante de l'ordre de la moitié du signal. La surface fonctionnalisée devient inactive au bout de 3 jours. Les dernières expérimentations en cours sur le diagnostic génétique et sur l'étude des structures secondaires (voir chapitre 3.5.Structures secondaires) se font sur cette chimie de surface.

2.3. Dépôt matriciel

Le rôle de la fonctionnalisation chimique est de faire le lien entre la surface métallique et les molécules sondes à y accrocher. En effet, le métal utilisé, l'or, absorbe de manière non spécifique n'importe quelle molécule organique. Les chimies de surface décrites dans le

chapitre précédent permettent de sélectionner la molécule pouvant s'y accrocher. La dernière étape de chacune des fonctionnalisations consiste en un dépôt uniforme de streptavidine. L'utilisation de ce composé couplé à la biotine est très répandue dans le monde de la recherche biologique et médicale [[xcv],[xcvi],[xcvii]]. De plus, les procédés de couplage de la biotine avec d'autres molécules se sont standardisés les rendant financièrement très accessibles. L'interaction biotine-avidine est très rapide et le duplexe formé reste très stable évitant ainsi certaines répercussions des phénomènes de séchage des gouttes déposées sur la fixation des sondes et permettant une utilisation quasi-immédiate des puces. C'est pour ces différentes raisons que l'équipe a décidé de se baser sur ce couplage pour fixer les molécules sondes sur la surface de la puce. Chaque molécule sonde est alors fixée à une biotine. Cette étape ne s'effectue ni dans notre laboratoire ni au sein d'une équipe partenaire mais chez nos fournisseurs. Ainsi, le dépôt peut s'effectuer immédiatement après la finalisation de la fonctionnalisation de surface.

À l'origine, les sondes étaient déposées en partenariat dans l'unité U955 de l'INSERM à l'Hôpital Henri Mondor. Bien que donnant des résultats satisfaisants, le temps utilisé sur les trajets entre Créteil et Orsay étaient trop importants pour nous permettre d'être réactifs à la suite des nombreux tests réalisés dans ma thèse. Nous avons fait l'acquisition d'une machine à dépôt matriciel de laboratoire : l'arrayer 'SPRi-Arrayer' de la société GenOptics. L'arrayer est un automate composé d'un support de pointes ou d'aiguilles amovible, d'un support de lames, d'un support de micro-puits fixes (Figure 69) et d'un régulateur d'humidité. Les lames fonctionnalisées sont placées sur le support de lames et les produits sondes biotinylés sont déposés dans les micro-puits.

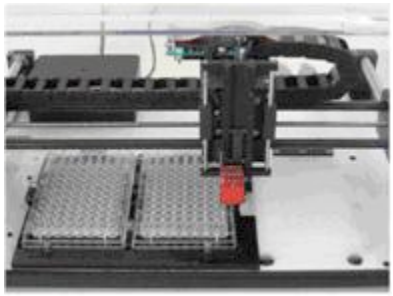
A B 

Figure 69 : A- SPRi-Arrayer de GenOptics. Appareil de dépôt matriciel de grande précision (précision : 1µm en x/y) avec stabilisateur d'humidité. L'arrayer est programmable sur ordinateur à l'aide d'une interface Python. B- Zoom sur la partie microplaque de l'arrayer.

Deux techniques peuvent alors être utilisées pour le dépôt des sondes. La première consiste en l'utilisation d'une aiguille creuse (Figure 70-A). Son principe réside dans l'absorption du produit par capillarité. Le capillaire utilisé a un diamètre de 200 µm. Le support abaisse l'aiguille qui prélève le produit du micro-puits, puis la positionne au dessus de la lame aux coordonnées pré-programmées, abaisse l'aiguille jusqu'à obtenir un contact avec la lame pour vider le capillaire. Ce contact rapide permet le dépôt d'une goutte, ou spot, d'un diamètre d'environ 350 µm de produit sonde sur la surface. Même après le contact avec la lame, le capillaire contient toujours du produit. Un lavage long de l'ordre de 10 secondes est alors nécessaire. Comme tous les spots sont dupliqués sur la puce, nous avons tout d'abord essayé d'éviter un prélèvement entre chaque dépôt. Mais il existe une différence notable entre chacun des spots effectués par la pointe (diamètre, homogénéité). Cette méthode n'a donc pas été retenue et un rinçage et séchage de la pointe après chaque dépôt a été mis en place.

La deuxième technique consiste en l'utilisation d'une pointe pleine métallique (Figure 70-B). Cette pointe était à l'origine utilisée à l'Hôpital Henri Mondor par l'U955 de l'INSERM sur un arrayer forte cadence. Comme les spots déposés avec cette pointe étaient de bonne qualité (forme et homogénéité), nous avons essayé de l'utiliser sur l'arrayer de GenOptics. Le prélèvement des sondes par une pointe métallique, dont le potentiel n'est pas fixé et pouvant être du même signe que les molécules à prélever, peut poser des problèmes. En se basant sur des études réalisées sur l'action du potentiel sur l'hybridation cibles/sondes sur des biocapteurs [xcviii, xcix], le potentiel de la pointe est élevé à 100mV et le potentiel de la lame à 300mV. Le support abaisse la pointe dans le micro-puits. Les sondes, qui dans notre cas sont des brins d'ADN (Voir chapitre 2.4 Matériel biologique), ayant un potentiel négatif [c], s'y accrochent. Le potentiel électrostatique appliqué sur la pointe aide à l'accrochage des sondes. Le support positionne la pointe au dessus de la lame aux coordonnées pré-programmées et l'abaisse jusqu'à obtenir un contact avec la surface. Pour chacun des spots réalisés, la pointe effectue deux contacts successifs avec la surface en se rechargeant de sondes dans le micro-puits entre chacun d'entre eux afin d'homogénéiser le spot et d'en augmenter la concentration en sondes. Les spots déposés ont un diamètre de l'ordre de 200µm. Ici aussi, un potentiel positif appliqué sur la lame d'or aide à la transition des sondes de la pointe à la surface. Comme quasiment tout le liquide sonde est déposé par le contact rapide entre la pointe et la lame, le lavage peut être plus court qu'avec l'aiguille précédente (2 secondes).

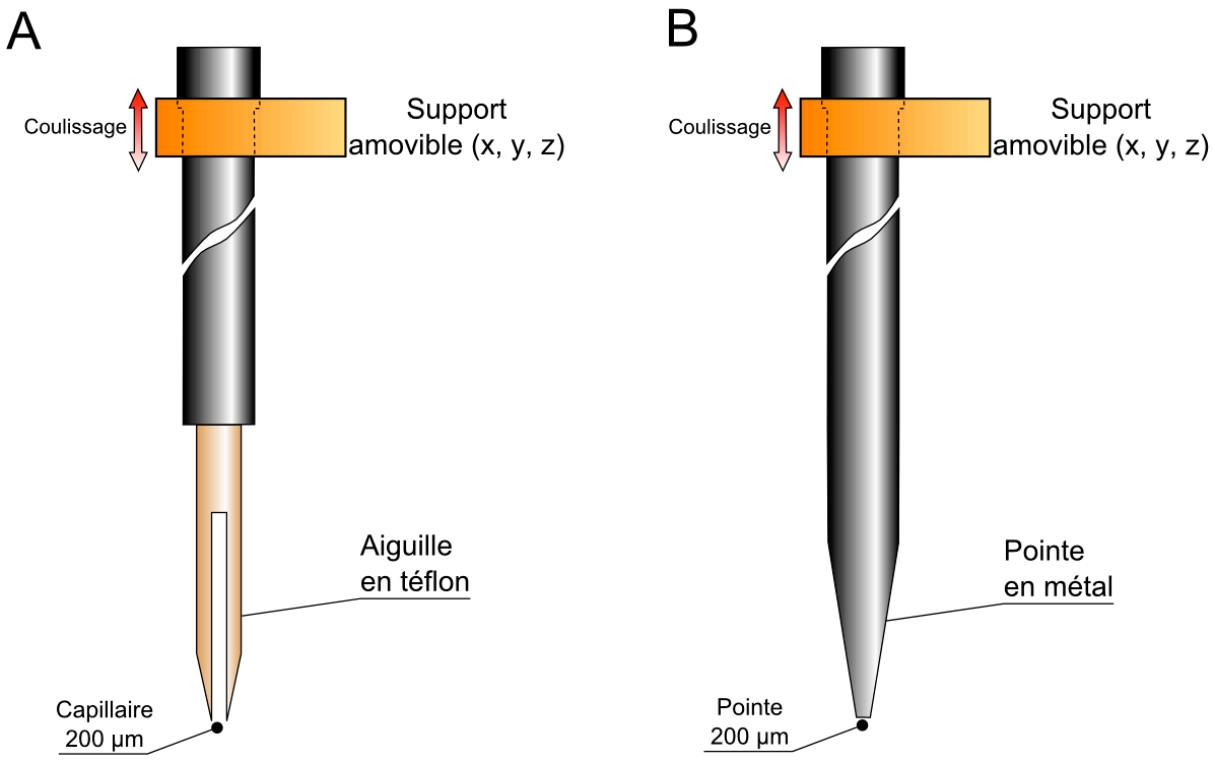
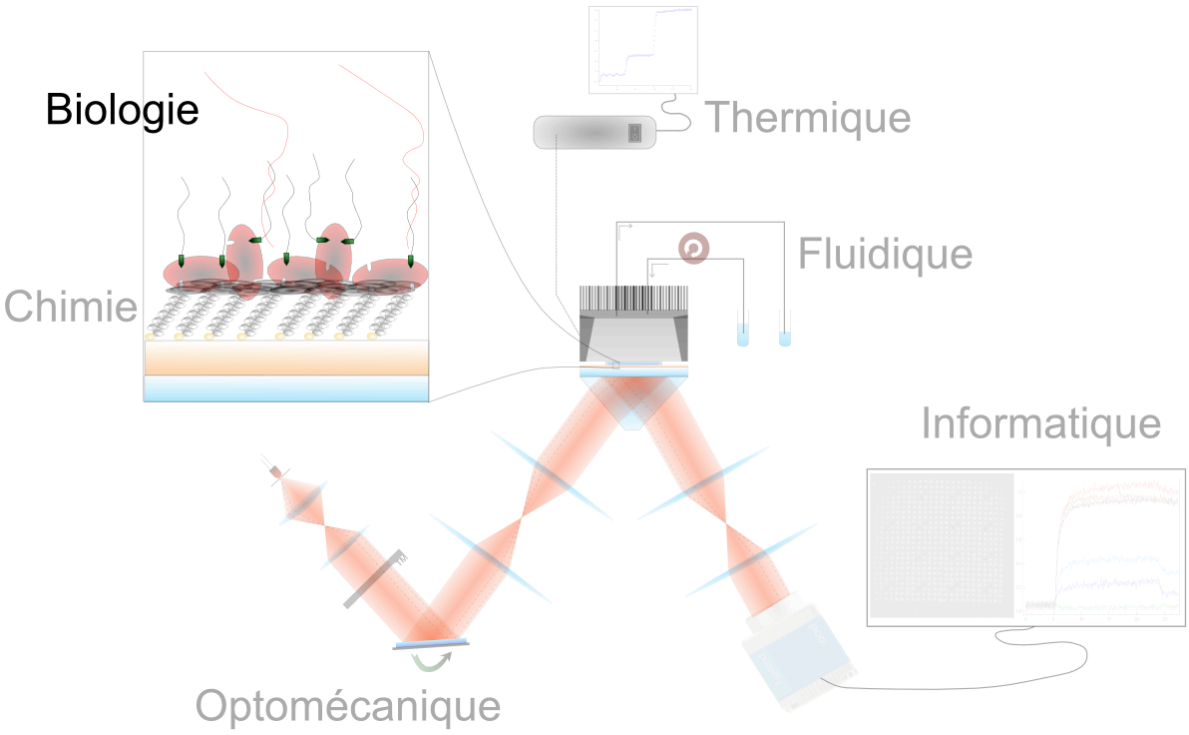


Figure 70 : A- Aiguille creuse en céramique de diamètre 200 µm. B- Pointe métallique de diamètre 200 µm.

L'objectif principal de l'équipe étant d'obtenir des spots les plus petits possible et les plus homogènes, nous avons donc décidé d'utiliser la pointe pleine. Même s'il a fallu modifier le système de dépôt en ajoutant un potentiel sur la pointe et sur la lame et même si le dépôt doit se faire en deux fois, la densité de spots déposés sur la lame par la pointe pleine est supérieure d'un tiers par rapport à l'aiguille en téflon. De plus, l'homogénéité d'un gros spot est difficilement contrôlable. Les spots réalisés par la pointe métallique seront donc de meilleure qualité que ceux réalisés par la pointe creuse.

L'arrayer utilisé avec la pointe métallique pleine a un débit faible comparé aux arrayers haut débit plus onéreux. Il faut environ 1h40 pour effectuer un dépôt d'une matrice 18x18 spots. Son avantage est sa maniabilité, sa petite taille et surtout le fait qu'il soit disponible immédiatement après la réalisation de la fonctionnalisation de surface.

2.4. Matériel Biologique



La problématique médicale à laquelle cette thèse propose des solutions concerne le diagnostic génétique de la mucoviscidose. La mucoviscidose est une maladie génétique de transmission autosomique récessive, parmi les plus fréquentes dans la population caucasienne (1 personne sur 30 en France est porteuse d'une mutation du gène impliqué dans la maladie). Cette dernière a pour origine un dysfonctionnement d'une protéine membranaire, la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), qui a un rôle important d'échange ionique pour les cellules des muqueuses. Lorsque la protéine CFTR produite par une cellule ne fonctionne pas, l'insuffisance de transfert des ions Cl^- entre l'intérieur et l'extérieur de la membrane [^{ci}] entraine un dérèglement de la production de la muqueuse qui perturbe le fonctionnement des organes atteints. Cette perturbation va, dans les poumons, permettre le développement inhabituel de bactéries pouvant être nocives pour l'organisme. À l'heure actuelle, plus de 1600 mutations du gène ont été référencées, certaines avec plus ou moins d'impact sur la capacité de la protéine à remplir son rôle dans l'organisme. Le gène *CFTR* comprend environ 190 000 paires de bases et comprend 27 exons. Comme un séquençage systématique total de ce gène serait inutile et apporterait une problématique d'interprétation des mutations « indésirables » identifiées difficilement interprétables, les techniques mises en

place pour le scanner se contentent de cibler les principales mutations connues, celles qui concernent le plus grand pourcentage de population. Si l'on classe ces mutations par ordre de fréquence dans la population caucasienne, c'est la mutation ΔF508 qui arrive en tête, étant retrouvée sur 66 % des chromosomes mutés. La seconde mutation en termes de fréquence chez les patients est G542X avec 2.4 % puis G551D avec 1.6 %. A partir de la 6ème mutation la plus fréquente (R553X), les pourcentages ne dépassent plus les 1 % des cas sur l'ensemble de la population mondiale [cii].

Actuellement, dans l'Unité Fonctionnelle de Génétique de l'hôpital Henri Mondor, laboratoire de référence pour la mucoviscidose, un kit de diagnostic est utilisé en routine, basé sur le principe de ligation d'oligonucléotides et détection par fluorescence, et qui cible 32 mutations. L'utilisation de ce kit permet d'identifier environ 85 % des allèles mutés chez les patients d'origine caucasienne. La limite de sensibilité des ces kits due à la quantité trop faible de mutations testées laisse clairement ouverte une voie au développement de nouvelles techniques de diagnostic plus performantes. C'est pour cette application qu'un système de détection d'interactions biomoléculaires basé sur la résonance en mode de plasmon de surface pourrait apporter une grande amélioration par rapport aux techniques mises en place actuellement.

Dans le but d'utiliser les performances de la SPR (sensibilité, rapidité, …) à cette fin médicale, le système, muni d'une chimie de surface appropriée comme décrite ci-dessus, va nous permettre d'étudier des interactions entre brins d'ADN. En effet, identifier la présence de la maladie chez un patient, revient, soit à identifier une protéine CFTR non fonctionnelle pour la mucoviscidose, soit une mutation sur le gène dont est issue cette protéine. De plus, on sait que 2 simples brins d'ADN ne s'apparient ou s'hybrident de manière stable que si un nombre minimum de bases successives d'un brin est complémentaire d'une séquence de l'autre brin (voir chapitre 1.2.Interaction ADN-ADN). Afin d'identifier la (ou les) mutation(s) potentielle(s) sur le gène du patient, sa (ses) séquence (s) est comparée avec des séquences de mutations connues. Pour ce faire, il faut digérer un des deux brins d'ADN du gène CFTR du patient et de la faire interagir avec des simples brins d'ADN de synthèse dont la séquence correspond aux mutations à identifier. Comme le gène de la CFTR est très long (>190 kbases), il est préalablement découpé en exons et introns dont on ne sélectionnera seulement que ceux qui sont potentiellement porteurs des mutations ciblées. Dans notre cas, nous avons choisi (notamment Emmanuelle Girodon, médecin de l'Unité Fonctionnelle de Génétique et de

l'U955 de l'Hôpital Henri Mondor) 68 mutations les plus fréquemment rencontrées au centre Henri Mondor ce qui recouvre 95% de la population caucasienne à l'heure actuelle. Les fragments du gène choisi sont les exons 3, 4, 5, 6a, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14a, 14b, 16, 17b, 18, 19, 20 et 21 et les introns 11 et 19 (Figure 71). De plus, dans certaine population, la sensibilité du test pourrait passer de 40 % à 65 % par exemple évitant les tests complémentaires effectués pour déterminer la présence de mutation n'appartenant pas aux kits standards et ciblant ces populations particulières.

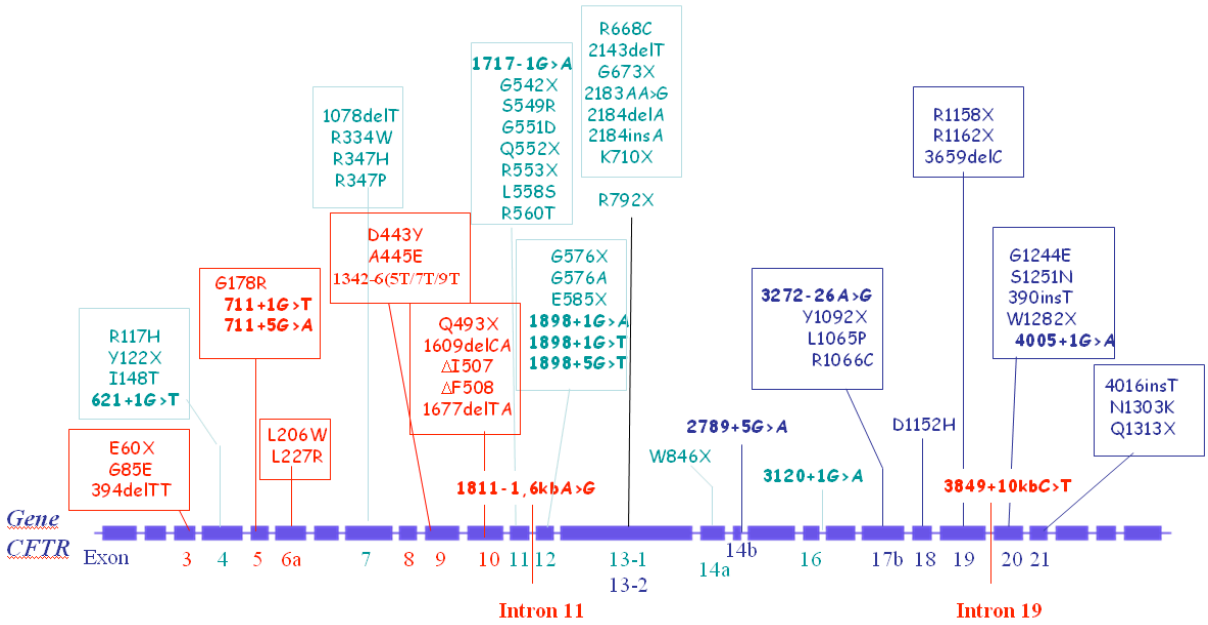


Figure 71 : Position des différentes mutations sélectionnées sur le gène de la CFTR. Même en divisant ce gène en fragments, il reste toujours beaucoup de matériel génétique à analyser. C'est pourquoi les 68 mutations ont été réparties en 3 mix. En rouge, les fragments rassemblés dans le premier mix de sondes (exons : 3, 5, 6a, 9, 10 et Introns : 11 et 19) ; en vert les fragments rassemblés dans le second mix (exons : 4, 7, 11, 12, 13-1, 14a et 16) ; en bleu les fragments rassemblés dans le troisième (exons : 13-2, 14b, 17b, 18, 19 20 et 21)

La longueur de chacun de ces fragments fait, en moyenne, 400 paires de bases. Ils sont extraits du gène par une amplification PCR spéciale à l'aide de deux types d'amorces. Les amorces anti-sens sont marquées à l'ion phosphate alors que les amorces sens ne sont pas modifiées. Cette technique permet, après obtention des fragments double brins amplifiés, de digérer chacun des brins anti-sens afin d'obtenir une solution constituée de simples brins d'ADN correspondant au fragment amplifié. Cette technique est réalisée à l'Hôpital Henri Mondor par Laure Lecerf et Valérie Velayoudame. Ces simples brins d'ADN sont les cibles dites « cibles PCR » pour lesquelles nous chercherons à savoir si des mutations sont présentes.

Ils sont dilués à 8 ng/µL dans une solution tampon de PBS 1x. La technique de digestion d'un des deux brins par réaction enzymatique pour créer la cible simple brin est l'étape la plus contraignante et la moins robuste du protocole de réalisation des cibles PCR. Elle dépend, entre autre, de la qualité de l'enzyme de digestion utilisée et n'est généralement pas parfaite. Il reste une quantité de produit double brin équivalente à la quantité de simple brin produite dans la solution cible finale (Figure 72 et Figure 73).

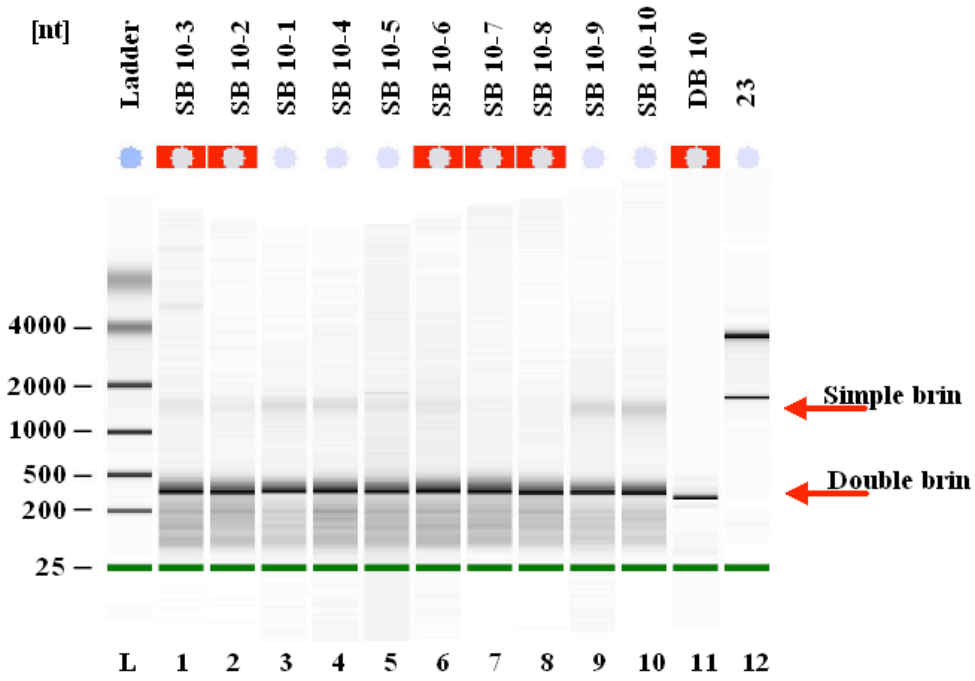


Figure 72 : Gel de migration de produits PCR issus de la digestion simple brin. Les produits SB 10 du numéro 1 au numéro 10 sont les exons 10 obtenus après digestion enzymatique. Le produit DB 10 est l'exon 10 sous forme double brin. Nous pouvons noter la présence importante de matériel double brin dans les produits SB.

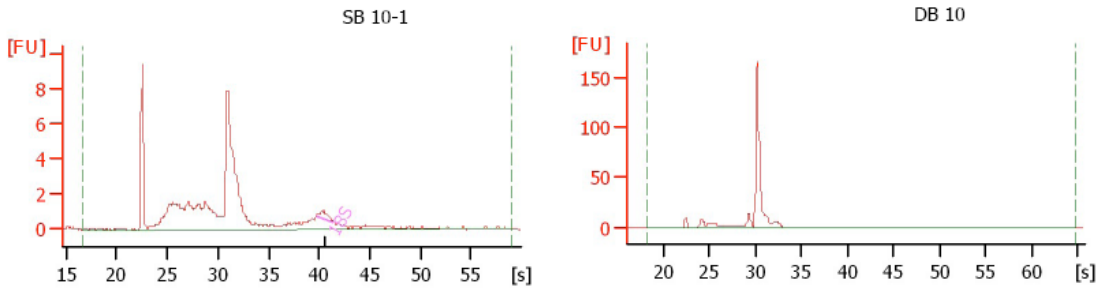


Figure 73 : Représentation graphique des gels de migration pour le SB 10-1 et le DB 10. Sur cette représentation, il apparaît une quantité importante de matériel double brin dans le produit SB 10-1 représenté par le second pic (30-35 s).

Comme la technique de PCR permettant d'obtenir l'ensemble des exons et introns désirés en un seul lot n'était pas réalisable au début de ma thèse, nous avons séparé ces fragments en 3 mix (Figure 71) par le biais de trois PCR multiplex. Cette technique a été mise au point par Virginie Courtois (post-doctorante dans l'unité INSERM U955 de l'hôpital Henri Mondor et cofinancée par Rosatech [[ciii]])

Les biomolécules sondes qui vont s'hybrider avec ces cibles pour y identifier la présence d'une mutation sont des simples brins d'ADN anti-sens de synthèse dont la longueur a été calculée pour permettre d'obtenir un T_M centré sur la température de travail, historiquement la température ambiante, après correction de surface. Ces sondes sont constituées de 3 parties. La première est une séquence 'espaceur' de 10 bases T dite « poly-T », pour éloigner le reste de la sonde de la surface. La deuxième est une séquence de 12 bases dite « séquence de calibration » qui va permettre de quantifier la concentration de sondes déposées. Et la dernière est la séquence spécifique correspondant à une mutation donnée et dont la longueur de la séquence est calculée afin d'obtenir un T_M de 40ºC pour l'interaction avec une cible parfaitement complémentaire. En fonction de la proportion de A/T et de C/G les séquences spécifiques font entre 12 et 15 bases (Figure 74). Ces sondes sont biotinylées à la base du poly-T afin de pouvoir les fixer fortement à la surface.

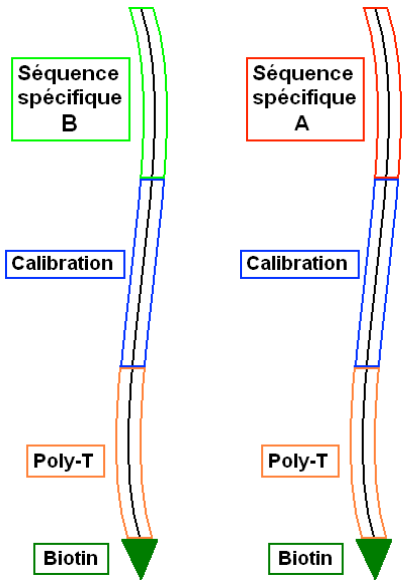


Figure 74 : Schéma de deux sondes ciblant chacune une séquence différente (A et B). Chacune est décomposée en 3 parties. La première est la séquence 'espaceur' de poly-T, la deuxième est la séquence de calibration et la troisième est la séquence spécifique à chacune de la cible à étudier.

Le principe de base du diagnostic génétique opéré par notre système est de comparer deux types d'interactions. Les interactions parfaitement complémentaires et les interactions quasiment complémentaires. En effet, la différence entre les séquences saines et les séquences mutées des cibles résident en de petites modifications de 1 à 3 bases en général. De ce fait, une séquence mutée s'hybride de manière assez stable sur une séquence saine quasiment complémentaire à 1-3 bases près et vice versa. Pour être sûr de la composition des cibles, il faut alors déposer sur la puce deux types de sonde pour chacune des mutations ciblées. Le premier type de sonde contient la séquence saine anti-sens ou Wild notée WS (Wild Sequence). Le deuxième type de sonde contient la séquence mutée anti-sens ou Mutated notée MS (Mutated Sequence). Chaque type de sonde est alors déposé sous forme de spots sur la surface à l'aide d'un micro-arrayer ce qui permet d'isoler spatialement chacune des sondes les unes des autres. La matrice ainsi obtenue est divisée en sous matrices 2x2 appelées « balances » et qui cibleront une seule mutation. Ces balances sont constituées de 2 spots contenant des sondes WS et 2 spots contenant des sondes MS. Comme un brin cible s'hybride de manière plus stable et en plus grande quantité sur la sonde qui lui est parfaitement complémentaire, il sera possible d'identifier la séquence contenue par ce brin cible en constatant laquelle des sondes WS ou MS de la balance interagit le plus avec cette cible.

Afin d'éviter une utilisation trop massive de produits issus de patients et de pouvoir réaliser des tests rapides, les expérimentations sont préalablement réalisées à l'aide de simples brins d'ADN de synthèse appelés oligonucléotides (commandés à Eurogentech) dont la longueur est de l'ordre de 20 à 25 bases. Nous nous servons de 2 types d'oligonucléotides. Les premiers sont des oligonucléotides de 25 bases et dont la séquence, correspondant à un fragment d'un exon ou d'un intron du gène CFTR, est centrée sur une mutation à identifier. Par conséquent, pour chacune des mutations testées par la puce nous utilisons deux oligonucléotides, l'un avec une séquence WS et l'autre avec une séquence MS. Ces cibles de synthèse peuvent être utilisées en forte concentration (typiquement 5 µM) afin d'étudier les états d'équilibre des interactions observées, mais aussi en faible concentration (jusqu'à 0.1 µM voire 0.01 µM) pour permettre une étude dynamique des interactions entre réactifs. Le deuxième type d'oligonucléotides utilisé est un oligonucléotide dit de calibration. Sa séquence de 20 bases comporte en son centre l'exacte séquence complémentaire de la partie calibration de la sonde (située entre le poly-T et la partie spécifique). Cet oligonucléotide est utilisé la plupart du temps en forte concentration (5 µM) afin d'identifier la concentration de sondes

déposées dans chacun des spots (voir chapitre autocalibration). De plus, nous utilisons deux sondes de références créées artificiellement. Ce sont les sondes Non-relevante (NR) et Non-relevante-non-calibrée (NRNC). La séquence des sondes NR est la suivante : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCTGCGGGTACAGCA 3'. Elle est décomposée en trois parties, l'espaceur de 10 bases T, la séquence de calibration (12 bases) et une séquence zip définie comme ne correspondant pas au génome humain [civ]. Cette séquence spécifique ne réagira pas avec les cibles injectées. En effet, les interactions qui ont lieu dans la cuve sont extrêmement spécifiques [24]. La séquence de la sonde non-relevante n'a donc pas d'interaction avec une cible issue des exons ou introns du gène de la CFTR. En revanche, cette sonde réagira bien à l'injection de la cible spécifique de calibration.
La séquence des sondes NRNC est la suivante :
5' TTTTTTTTTTTCCAGAACTGAACATCGATCACAGC 3'. Cette sonde est particulière car elle n'a pas de séquence de calibration qui a été remplacée par une autre séquence zip de 12 bases. Sa séquence spécifique est une troisième séquence zip. Cette sonde n'est sensée réagir avec aucune des cibles injectées qu'elles soient issues d'un patient ou servant à la calibration.

À l'origine, il n'y avait pas de sonde NRNC. À la place étaient laissés des spots vides servant de référence pour l'absorption non spécifique de la lame. Mais nous nous sommes rendu compte que lors d'une injection d'un produit, le signal de ces spots vides était supérieur à ceux composés de sondes ne devant pas réagir avec la cible (Figure 75). Le recouvrement de la surface dû aux sondes déposées dans les spots réduit l'adsorption non spécifique sur la puce sous ce spot. Les endroits laissés vides, quant à eux, sont plus réactifs aux molécules de la solution cible.

Pour s'affranchir des perturbations engendrées sur les spots vides de référence par la solution cible, nous les avons remplacés par des spots de sondes NRNC qui réagissent comme n'importe quelle sonde non complémentaire à la cible injectée, c'est-à-dire que son signal est nul et toujours inférieur aux signaux des spots contenant des sondes quasiment complémentaires.

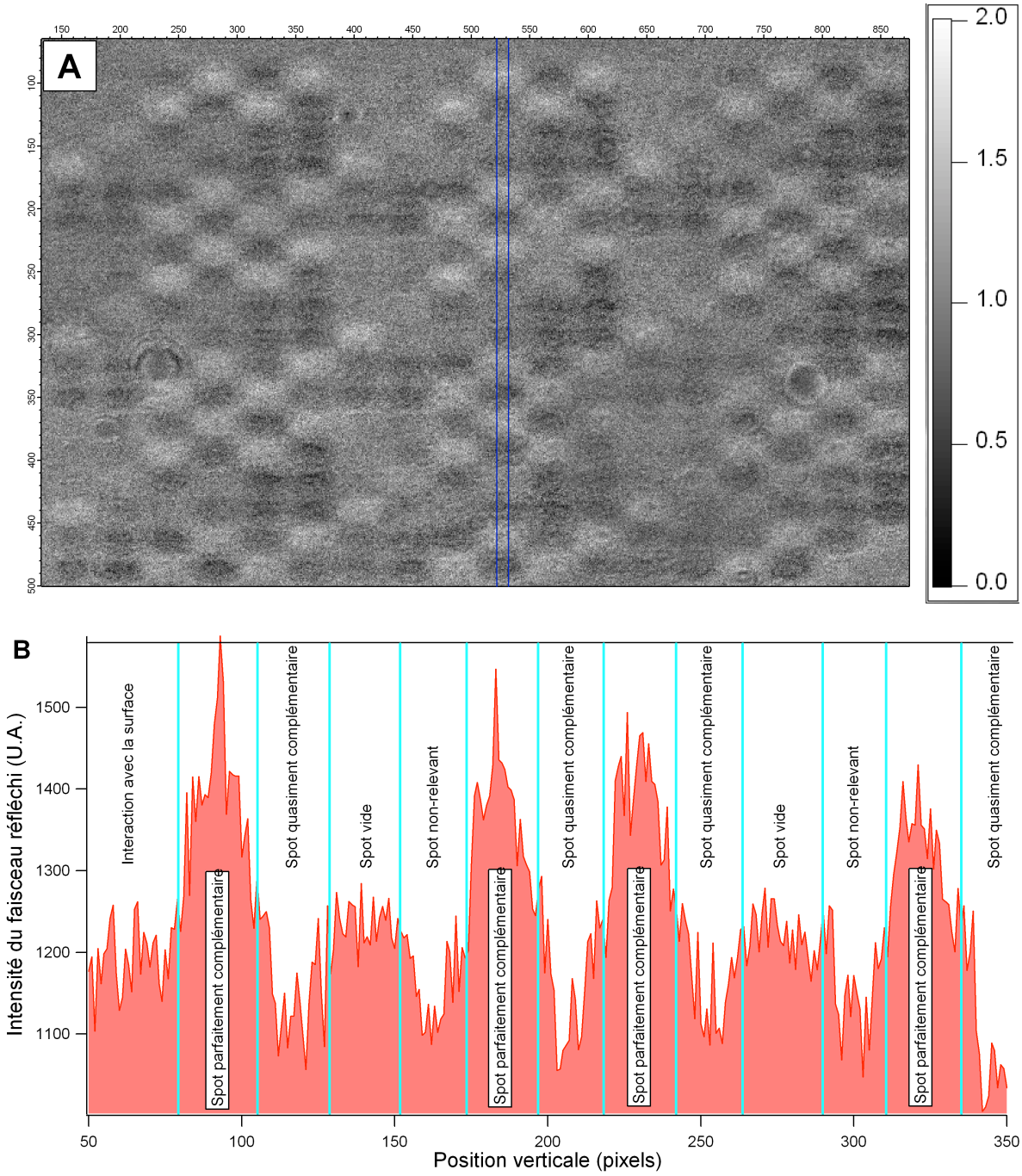
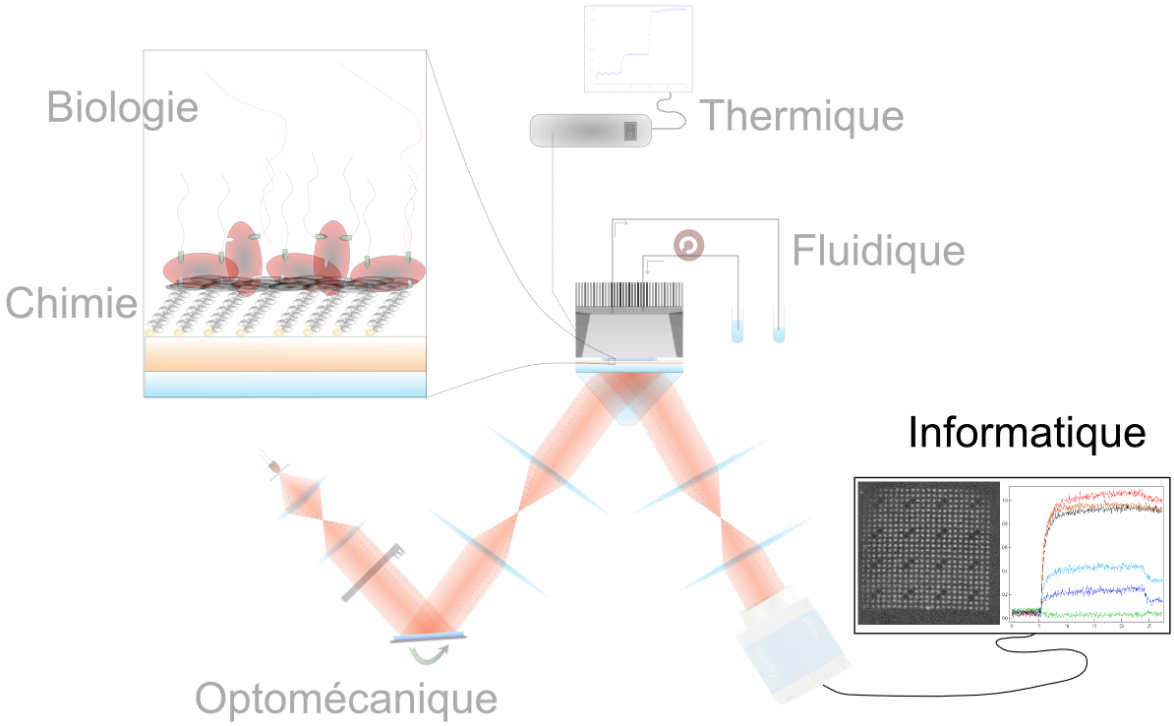


Figure 75 : A : Image de différence d'une puce entre l'état d'équilibre lors de la circulation d'une cible (ΔF508 WT) et l'état de référence lors de la circulation de la solution tampon avant l'injection. B : Profil de l'intensité lumineuse de l'image de différence moyenné sur 10 pixels entre les lignes bleues (A). Apparaissent quatre zones distinctes : les spots parfaitement complémentaires, les spots quasiment complémentaires, les spots non relevant et les vides.

2.5. Acquisition et analyse des données



Dans sa version actuelle, le programme d'acquisition des données expérimentales est un programme LabView développé à la base par Fabrice Bardin (un post-doctorant de l'équipe), mis à jour et amélioré par Alain Bellemain (permanent de l'équipe) et qui permet d'obtenir un certain nombre de valeurs. Dans un premier temps, il est demandé à l'utilisateur d'acquérir la réponse plasmonique angulaire du système. Ce profil diffère d'une expérience à l'autre car il est dépendant de la nature (épaisseur d'or, quantité de sondes, qualité de la fonctionnalisation chimique, …) de la biopuce observée. Pour ce faire, l'utilisateur identifie spatialement l'emplacement des spots de la matrice de sondes sur l'image de la biopuce. Une fois ces coordonnées entrées dans le logiciel, habituellement sous forme de matrice à positionner sur l'image, le miroir balaie la fenêtre angulaire définie par l'utilisateur et la caméra CCD transmet à l'ordinateur l'évolution de l'intensité du faisceau réfléchi pour la totalité de l'image. Pour chacune des coordonnées définies par l'utilisateur, le logiciel trace alors le profil angulaire dépendant directement de l'efficacité du couplage local et variant en fonction de l'angle d'incidence du faisceau. Ce profil global donne la possibilité de choisir l'angle d'incidence du faisceau optimal permettant de se placer sur la partie quasi-linéaire du profil de couplage. L'angle est en effet fixé de manière à ce que l'augmentation de réflectivité d'un spot soit proportionnelle à la quantité de matière déposée sur le spot.

L'expérimentation en elle-même consiste en une succession d'injections de produits différents dans la cuve et en une observation de l'évolution de la réflectivité en fonction du temps. Cette évolution traduit directement le comportement des produits injectés au contact des sondes fixées sur la surface. Plus les produits cibles vont interagir avec les sondes, plus le signal de réflectivité augmentera. Afin de pouvoir comparer les variations de réflectivité de chacun des spots, toutes les courbes temporelles de variation de réflectivité ($\Delta R(t)$) obtenues sont superposées en leur origine ou à un temps choisi par l'utilisateur. Pour chacun des spots prédéfinis, le programme va enregistrer les courbes cinétiques de l'évolution de la réflectivité en fonction du temps nous permettant de suivre en direct les évolutions des interactions entre les cibles et les sondes. Les données brutes en elles mêmes sont constituées de la pile d'images sauvegardées durant l'expérimentation. Le nombre d'images sauvegardées dépend de la rapidité du système informatique utilisé. Sur notre système, le logiciel enregistre 1 image toute les 3 secondes. Chacune de ces images 16 bits sauvegardées est une somme sur une accumulation de 16 images brutes 12 bits fournies par la caméra.

Le programme permet une correction des signaux de réflectivité par soustraction des balances de référence en première approche pour le suivi des expérimentations. L'analyse complète des données se fait, pour l'instant, à posteriori par un programme d'analyse codé sous Igor. Ce programme permet de corriger les données et de les mettre en forme. En reprenant la pile d'images acquises durant l'expérimentation, il est possible d'améliorer la sélection des pixels d'intérêt pour ne garder que les données correspondant aux interactions étudiées. La première étape de création d'un masque consiste, durant l'expérimentation, à injecter une phase de 5 minutes de tampon pour la référence puis d'injecter durant 10 minutes une solution de cibles de calibration qui réagira avec toutes les sondes, révélant, entre autres, leur emplacement. En effectuant la différence entre une image obtenue lors de la stabilisation de l'état d'équilibre de l'interaction cibles de calibration / sondes, et une image obtenue lors de la circulation du tampon, seuls les pixels correspondant à des zones contenant des sondes vont apparaître hors du bruit. Il suffit alors de séparer ces données utiles du reste du signal par un seuillage, par exemple, pour créer un masque ne sélectionnant que les pixels actifs des spots (Figure 76). Par la suite, ce masque est multiplié à chacune des images de la pile pour éliminer l'information superflue et pouvoir effectuer la moyenne de la réflectivité d'un spot.

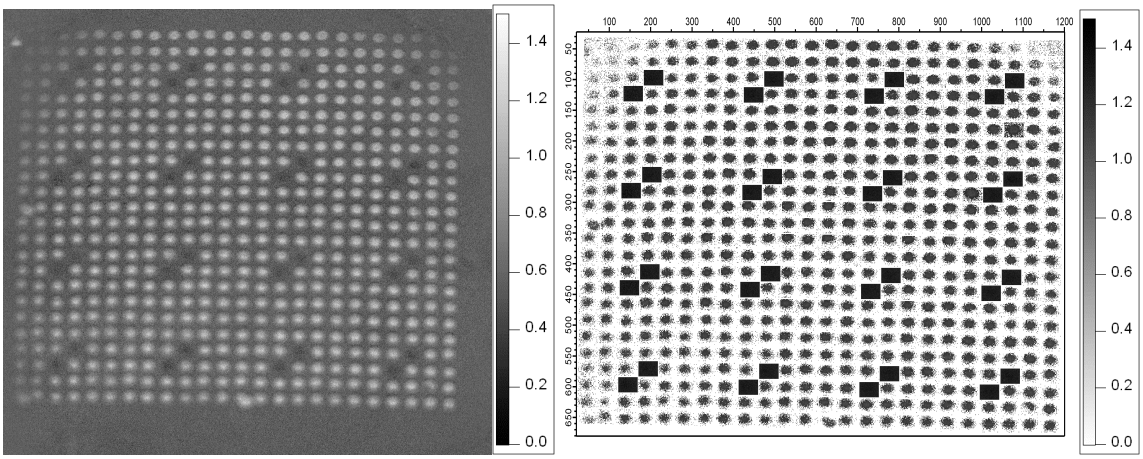


Figure 76 : Exemple de construction d'un masque de données. A gauche l'image différence obtenue entre le moment où les nucléotides cibles de calibration circulent dans la cuve (état hybridé) et le moment où ne circule que du produit tampon (état de référence). La matrice des spots s'observe clairement. Toutes les informations autour de cette matrice et entre chacun des spots est superflue. A droite, le résultat de la sélection des zones d'intérêt sur l'image de gauche en inversion de niveaux de gris (les valeurs nulles sont représentées en blanc). Les seules informations restantes sont des informations utiles concernant les zones où se déroulent des interactions. Les zones initialement fixée comme spot de référence (voir sondes non-relevante non-calibrée) restent noire car elles sont utilisées par le programme de correction des données bien que n'interagissant pas avec les cibles de calibration.

Le programme va ensuite reconstruire les cinétiques d'interaction de chacun des spots, corriger chacune des courbes par autocalibration (voir chapitre 3.3.Autocalibration) puis mettre en forme les données. Le but final de cette mise en forme est de donner un résultat qualitatif sur la composition du produit injecté. La présence ou l'absence des mutations testées pourra ainsi être déterminée. Pour ce faire, le programme classe les spots par type de mutation et par type de séquence (WS ou MS). Dans un premier temps, l'utilisateur peut visualiser une superposition des cinétiques rangées par balance correspondant à une mutation particulière et pouvoir apprécier la différence entre les signaux issus des spots WS et des spots MS. Le signal dont l'amplitude sera la plus élevée mettra en évidence la séquence portée par le fragment d'ADN cible (Figure 77). Si les spots WS ont la réponse la plus importante, le patient sera de type sain, noté WT pour Wild Type, pour la mutation particulière correspondant à la balance observée. Dans le cas contraire, le patient sera de type muté, noté MT pour Mutated Type (Figure 78). Lorsque le patient n'est pas homozygote pour la mutation étudiée, c'est-à-dire que l'un des deux allèles est porteur d'un gène sain et l'autre d'un gène muté, les réponses des spots WS et MS sont moins déséquilibrées. Le patient sera alors de type hétérozygote, noté HT pour Heterozygote Type. Ainsi, l'utilisateur pourra établir un

profil exact du type du patient pour chacune des mutations testées sur la biopuce, soit WT, MT ou HT.

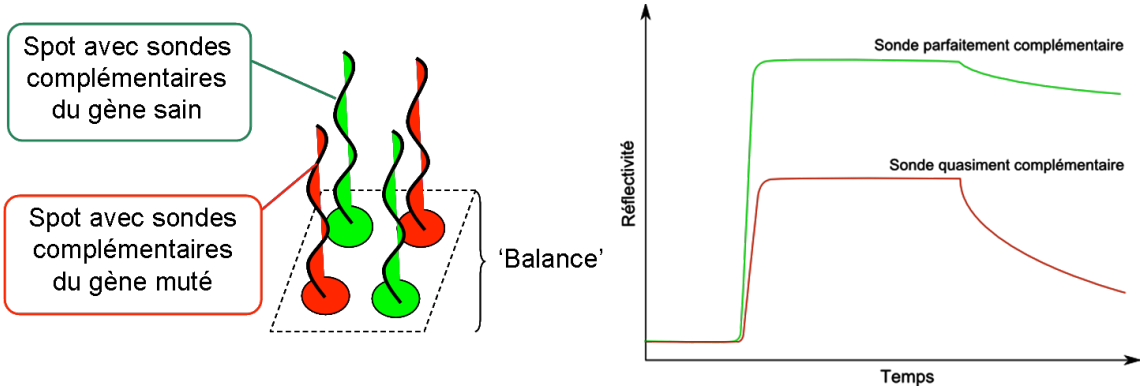


Figure 77 : Exemple d'analyse de signaux. A gauche, la structure matricielle est décomposée en balance avec deux sondes WS et deux sondes MS. A droite, le schéma de principe représente la variation de réflectivité des sondes WS et MS de la balance en fonction du temps. La courbe ayant le signal le plus élevé correspond à la sonde parfaitement complémentaire de la cible, ici c'est la sonde WS. La cible est donc saine pour la mutation qui est scannée sur cette balance.

Pour finir, un graphique sera proposé à l'utilisateur. C'est un résumé de l'ensemble des cinétiques d'interactions des mutations testées par la puce. Chacune des balances par une soustraction des courbes WS-MS donne un résultat sur le type du patient pour une mutation. Si le patient est WT, la courbe sera positive, si le patient est MT, la courbe sera négative et si le patient est HT, la courbe sera sensiblement neutre [cv].

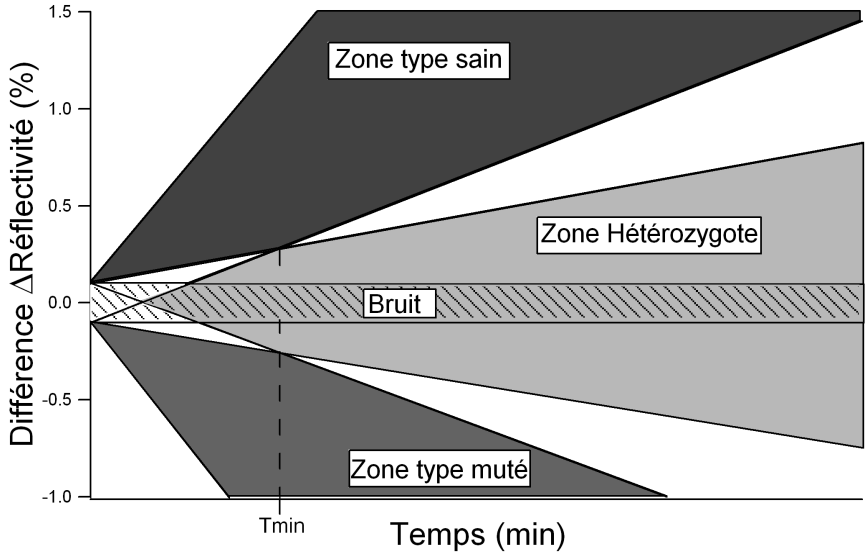


Figure 78 : Cônes de principe des courbes de différences issues des balances de diagnostic. Trois zones se distinguent, la zone supérieure où la séquence du brin qui interagit est saine, la zone inférieure où la séquence du brin qui interagit est mutée, et la zone centrale où les deux types de brins sont présents dans le produit de patient.

Il est important de noter que cette représentation de principe est à adapter pour chacun des couples sonde WS / sonde MS. En effet, comme la différence entre le T_M de la cible WT sur la sonde WS et le T_M de la cible WT sur la sonde MS n'est jamais la même que la différence entre le T_M de la cible MT sur la sonde WT et le T_M de la cible MT sur la sonde MS, l'ensemble du graphique représentant les cônes de principe d'évolution temporelle de la différence de réflectivité (Figure 78) sera déformé. Par exemple, si nous prenons la mutation ΔF508 qui représente 66% des cas de la mucoviscidose, les valeurs de T_M lors de l'injection d'une cible WT sont :

WT -> Sonde WS : 50.5°C WT -> Sonde MS : 36.2°C ΔT_M = 14.3°C

Et les valeurs de T_M lors de l'injection d'une cible MT sont :

MT -> Sonde WS : 28.7°C MT -> Sonde MS : 49.6°C ΔT_M = 20.9°C

Lors de l'injection d'une cible WT, la pente sera moins importante que lors de l'injection d'une cible MT du fait du ΔT_M inférieur. De plus, si le patient est HT, la moyenne des valeurs de T_M étant plus élevée pour les interactions avec la sonde de séquence mutée (Figure 79), la résultante (sonde WS - sonde MS) aura une pente négative. Dans le cas réel d'un patient HT, le signal reçu sur les sondes WS ne correspondra pas exactement à la moyenne des signaux comme sur l'exemple de la Figure 79. Il y aura une compétition entre les cibles WT et les cibles MT sur chacune des sondes (WS ou MS). Malgré tout, un des deux types de sondes sera favorisé.

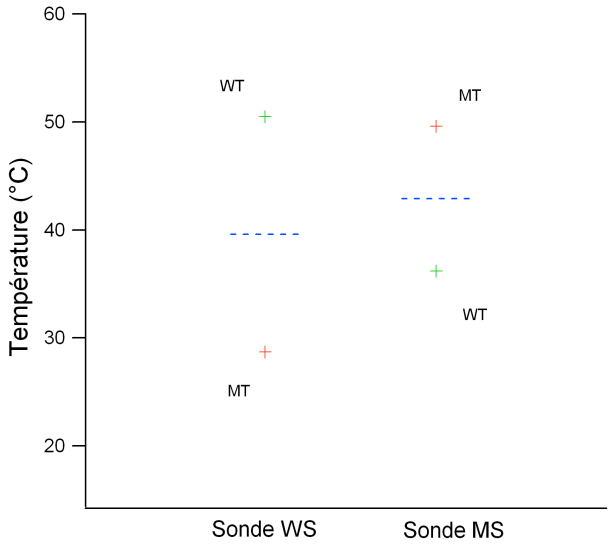


Figure 79 : Graphique de principe du T_M pour chacune des sondes WS et MS et pour chacune des cibles WT et MT. Les croix vertes représentent l'injection de la cible WT, les croix rouges représentent l'injection de la cible MT, Les tirets bleus représentent la moyenne pour chacune des sondes des T_M à l'injection d'une cible HT.

La représentation de principe des cônes d'évolution des différences de réflectivité va donc être décalée et l'ensemble des zones de la Figure 78 sera modifié d'un facteur de pente négatif.

2.6. Conclusion

Afin de répondre à la problématique médicale du diagnostic génétique de la mucoviscidose, nous avons développé un système de détection optique basé sur la résonance de plasmon de surface et les biopuces à ADN. Nous avons vu que ce système permettait d'obtenir un signal de réflectivité dont la variation temporelle est proportionnelle à la quantité de matière déposée sur la surface. La réalisation de ce système requiert divers domaines de compétence. Tout d'abord, le bloc opto-mécanique nous permet de créer la résonance de plasmon de surface puis d'imager la perturbation de ce couplage sur la caméra CCD. Les choix des éléments utilisés, notamment de la source, influent sur la sensibilité du système. La fonctionnalisation de surface fait le lien ente la couche de métal nécessaire à la résonance et les molécules sondes. Cette partie du système est déterminante dans la spécificité des interactions observées. La cuve, la pompe et l'ensemble de la fluidique ont un impact sur l'homogénéité de l'ensemble des cinétiques d'interaction sur la puce. La régulation de température permet une meilleure reproductibilité des résultats et son contrôle améliore la discrimination en cible saine et cible mutée. Le dépôt des sondes sur la puce doit être régulier de manière à éviter les différences de signaux entre les spots d'une même puce. L'acquisition et l'analyse des données se fait par des programmes développés dans l'équipe sous LabView ou Igor. Cette partie informatique du système est le lien nécessaire entre le transducteur et l'utilisateur mettant en forme les données.

Pour que ce système complexe soit robuste il faut que toutes ses parties soient optimisées et plus particulièrement dans le domaine du médical où les erreurs de diagnostics doivent être exclues.

Chapitre 3 : Caractérisation des interactions ADN-ADN

Résumé :

Ce chapitre regroupe les différentes études des caractérisations du comportement des interactions ADN-ADN réalisées dans le but d'obtenir un diagnostic génétique de la mucoviscidose sur une cible issue d'un patient. Dans un premier temps, je rappellerai les éléments clef de la détection de mutations sur notre système. Nous verrons, ensuite, l'influence de la concentration en Na^+ dans la solution sur la formation de duplexes ADN-ADN et son impact sur l'identification de la bonne séquence cible par discrimination. Nous nous intéresserons à l'importance de la concentration du matériel biologique sur la puce ou dans la solution. Nous décrirons notre méthode de correction nous permettant de nous affranchir des inhomogénéités de surface et des artéfacts temporels. Nous détaillerons l'influence de la température sur les interactions cible/sonde sur la puce et nous finirons par une approche des effets des structures secondaires sur l'accessibilité des séquences cibles dans les produits injectés sur la puce.

3. Caractérisation des interactions ADN-ADN

Dans le but de répondre à la problématique médicale du diagnostic génétique de la mucoviscidose, j'ai réalisé un certain nombre d'études concernant les interactions ADN-ADN avec notre système de détection optique. Ce chapitre regroupe mes principales contributions à l'amélioration de notre compréhension des phénomènes d'hybridation sur nos biopuces. Dans le but d'un transfert de technologie de notre laboratoire vers les centres médicaux pour l'utilisation en routine de notre système de diagnostic, l'ensemble de mes études tendent à améliorer la sensibilité du détecteur et la discrimination entre les cibles WT, MT et HT par le contrôle de différents paramètres.

Dans un premier temps, je ferai un résumé des notions servant à la compréhension des études qui suivent, de manière à rappeler les principes de base des interactions observées et des grandeurs utilisées. J'aborderai, par la suite, les dépendances de la réponse du système à la concentration en Na^+, qui est un des principaux acteurs des interactions entre brins d'ADN, en sondes et en cibles. Je parlerai de notre méthode de correction dite d'autocalibration et je finirai sur les études des interactions en fonction de la température et des structures secondaires des molécules biologiques.

3.1. Introduction à la caractérisation

Comme nous l'avons mentionné dans les chapitres précédents, la grandeur caractéristique d'une interaction moléculaire est la température de fusion, T_M. Cette grandeur est définie par l'équation :

$$T_M = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln(C_1 - \frac{C_2}{2})} \qquad \textit{Eq1.1}$$

pour une concentration [Na^+] de la solution égale à 1M, avec ΔH l'enthalpie du système et ΔS son entropie, R est la constante des gaz parfaits (R = 1.987 cal.$Mol^{-1}.K^{-1}$), C_1 est la concentration molaire des produits en excès (généralement les sondes ou les amorces) et C_2 est la concentration molaire des produits limitant (les cibles).

Dans le cas d'une interaction ADN-ADN, la valeur du T_M dépend de la séquence des deux brins qui vont s'hybrider. Nous avons déjà vu qu'il était possible de définir le type (sain ou muté) d'un simple brin d'ADN par diagnostic génétique en comparant les T_M des duplexes formés avec un brin muté et un brin sain connus. Le principal problème de cette méthode de diagnostic est la difficulté à quantifier le nombre de duplexes et de simples brins formés dans une solution. L'utilisation d'un système de détection basé sur la SPR simplifie énormément cette quantification.

Pour chacune des mutations à identifier, nous créons 2 sondes différentes. Chacune est composée de trois parties (voir chapitre 2.4.Matériel biologique). C'est le dernier fragment de séquence, la séquence spécifique, qui diffère entre les deux sondes. Les deux sondes créées pour chaque mutation correspondent au brin complémentaire de la séquence saine et au brin complémentaire de la séquence mutée. Reprenons l'exemple de la Figure 18 en désignant les fragments B1 et B2 comme les séquences des deux types de patients, sain et muté, à injecter sur la puce. Ce fragment correspond à la séquence d'une partie de l'exon10 du gène de la CFTR où une mutation a été identifiée, c'est la mutation Q493X. La séquence B1 correspond au gène sain de ce fragment de l'exon10 et la séquence B2 correspond au gène muté de ce fragment. La différence d'un nucléotide entre les deux séquences s'appelle une SNP (Single Nucleotide Permutation). Comme calculé précédemment, les T_M entre la sonde simple brin A1 et les séquences B1 et B2 sont les suivantes :

T_M (A1-B1) : 40.7°C

T_M (A1-B2) : 23.6°C

La séquence A1 est un fragment d'ADN parfaitement complémentaire à la séquence B1 qui est une séquence saine du gène de l'exon10 pour la mutation Q493X. La sonde saine créée pour cette mutation aura pour séquence spécifique la séquence A1. Nous introduisons alors une sonde dont la séquence spécifique est A2 : 5' TGTTCTAAGTTT 3' qui correspond à la sonde mutée et ses valeurs de T_M pour les interactions avec les séquences B1 et B2 seront les suivantes :

T_M (A2-B1) : 19.3°C

T_M (A2-B2) : 36.6°C

Le principe de diagnostic génétique utilisé dans notre système est dépendant de ces différences de T_M entre les interactions parfaitement complémentaires et les interactions quasiment complémentaires. Sur la puce sont fixées les sondes A1 et A2 et un produit de patient cible est injecté dans la cuve. Ce produit de patient contient soit la séquence saine (WS) du gène soit sa séquence mutée (MS) si le patient est homozygote. Rappelons que la cible va donc s'hybrider sur les deux sondes mais formera plus de duplexes avec sa sonde parfaitement complémentaire. Notre système de détection se base sur la SPR qui est sensible au changement d'indice à l'interface métal/diélectrique. Ici, plus les cibles s'hybrident aux sondes, plus la concentration locale en molécule est importante et plus l'indice local augmente. Comme nous l'avons détaillé dans le chapitre1.3.Résonance de plasmon de surface, en fixant l'angle d'incidence à une valeur supérieure à celle de l'angle de résonance, une augmentation de l'indice optique du diélectrique induit une augmentation de l'intensité du faisceau réfléchit. En observant la variation de la réflectivité en fonction du temps, nous suivons directement la variation de concentration en cible en surface et donc de la quantité de duplexe formés. Grâce au dépôt matriciel des sondes par spotting (voir chapitre 2.3.Dépôt matriciel), nous sélectionnons, à l'aide du logiciel LabView d'acquisition des données, les spots sur la puce à étudier. Dans le cas d'un diagnostic de la mutation Q493X sur l'échantillon injecté, nous sélectionnons deux types de spots. Les premiers contiennent des sondes dont la séquence spécifique est une WS et les deuxièmes, des sondes dont la séquence spécifique est une MS. En suivant l'intensité lumineuse des spots, nous pouvons observer en temps réel la quantité relative de cibles s'accrochant sur la surface pour chacun d'entre eux. Plus le spot est lumineux, plus la quantité de cibles hybridées aux sondes sur la surface est importante. Et plus la quantité de cibles hybridées est importante, plus l'affinité entre ces cibles et les sondes du spot est grande. Par la technique de comparaison intra-balance (voir chapitre 2.5.Acquisition et analyse des données), il devient facile d'identifier la séquence de la cible. Comme le niveau de réflectivité des spots découle de la quantité de duplexe cibles/sondes formés, nous pouvons différencier le spot contenant les sondes avec la séquence parfaitement complémentaire de la cible du spot contenant les sondes avec la séquence quasiment complémentaire (Figure 80). Le type de séquence des sondes composant chacun des spots étant connu lors du dépôt matriciel, il devient alors facile de remonter à la séquence de la cible. Dans le cas d'un produit

patient, la solution contient un mélange des deux allèles codant pour la CFTR. Le type de la cible sera alors homozygote sain : WT, homozygote muté : MT ou hétérozygote : HT.

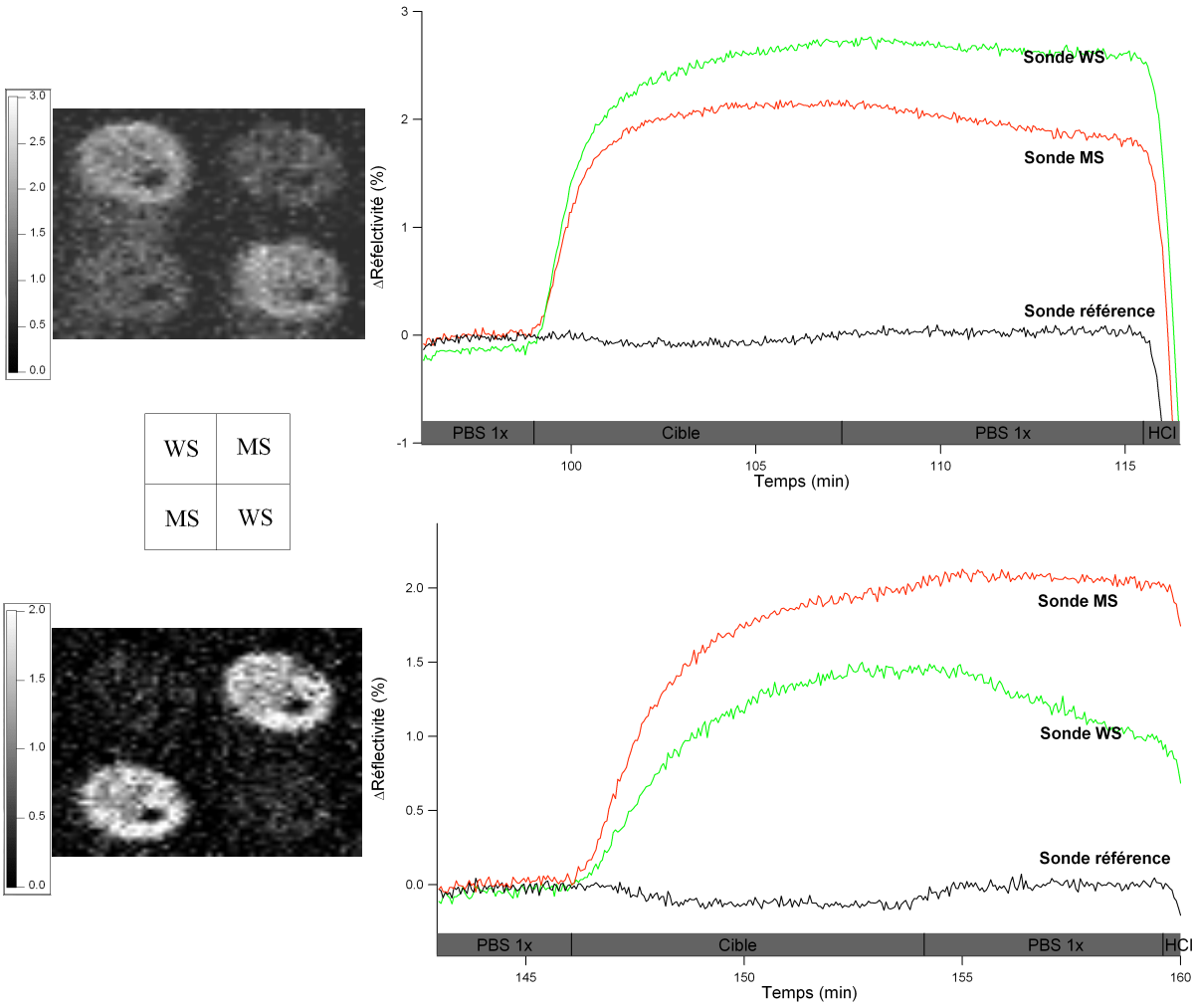


Figure 80 : Exemple de réponse de balance pour la mutation ponctuelle Q493X. En haut, l'injection d'une cible avec une séquence WS entraine une plus forte réponse des sondes WS. En bas, sur la même balance, lors de l'injection d'une cible avec une séquence MS, la réponse est inversée. La réponse nulle sur la sonde de référence qui contient une séquence différente de la séquence Q493X montre bien la spécificité des interactions sur la puce. Sur la gauche les images de différence entre la fin du rinçage au PBS 1x et l'instant de référence avant injection de la cible.

Dépendamment de la fréquence d'acquisition des images, l'évolution de la réflectivité découlant de la quantité de cibles ayant interagit avec les sondes permet de suivre en temps réel l'affinité entre les deux éléments des duplexes formés. En effet, le capteur CCD enregistre l'image de la puce sur le faisceau réfléchi. L'intensité sur un des pixels du capteur traduit l'état de la surface correspondante à ce pixel sur la puce. La différence d'intensité

observée sur l'image suivante enregistrée pour ce même pixel montre l'évolution de l'indice du diélectrique localement. Et, par conséquent, montre également localement l'évolution de l'interaction entre les sondes et les cibles par le biais du changement local de l'indice optique qu'engendre la formation d'un duplexe. Comme chaque spot a un diamètre d'environ 200µm, il est composé d'environ 350 à 400 pixels. De plus, la répartition des sondes sur la surface à l'intérieur du spot n'est pas homogène. Comme le montré la Figure 81, le spot apparaît sous la forme d'une ellipse. Sans cibles circulant dans la cuve, la variation de l'intensité du faisceau réfléchi pour chacun des pixels est très proche de 0% à un facteur de bruit de photon près. Après 10 minutes de circulation des cibles dans la cuve, l'intensité de chacun des pixels du spot a changé. Ce qui nous amène à calculer la moyenne de l'évolution de l'intensité pour l'ensemble des pixels du spot qui donne, dans le cas de la Figure 81, 1,1% de variation de réflectivité. Cette variation est normalisée par rapport à deux images de références (voir le chapitre 2.5.Acquisition et analyse des données).

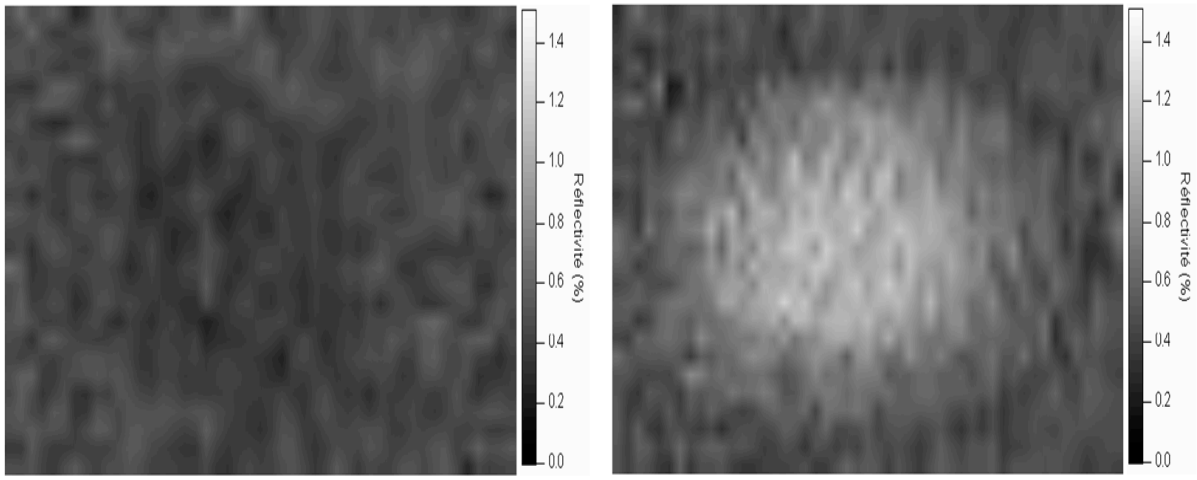


Figure 81 : Image d'un spot de diamètre 200 µm. Chaque image correspond à une surface de 225 µm par 225 µm. L'image de gauche correspond à la circulation du tampon dans la cuve et l'image de droite correspond à l'état de l'hybridation cible/sonde après une circulation de 10 minutes de produit cible à 5 µM. La différence de réflectivité entre la moyenne effectuée sur le spot de l'image de droite et celle de la moyenne de l'image de gauche est de 1,1 %.

Sur la Figure 81 nous pouvons observer que l'intensité du spot sur l'image de différence pendant l'état d'équilibre de l'interaction est inhomogène. Cette intensité est plus importante au milieu du spot que sur ses bords. Lors de l'analyse des données, seule la moyenne des intensités des pixels du spot est attribuée au spot lui-même. C'est-à-dire que le

programme d'analyse effectue une moyenne sur la zone définie en tant que spot de l'image et attribue cette valeur d'intensité à la sonde dont est constitué le spot. Il apparaît clairement sur l'image de différence que certaines zones répondent plus que d'autres. C'est pourquoi un nouveau programme d'analyse est en cours de développement dans l'équipe afin d'extraire le plus de données utiles et d'enlever un maximum de pixels diminuant le signal.

Nous avons vu que l'affinité entre deux molécules dépendait de nombreuses caractéristiques et notamment de la composition du milieu, de la concentration des produits mis en contact et de la température ambiante. Les chapitres suivants détaillent l'influence de ces facteurs sur les interactions ADN-ADN au sein de notre biopuce.

3.2. Impact de la concentration de différents produits

Le diagnostic génétique est l'application biomédicale sur laquelle se base le sujet de ma thèse. Il faut rappeler que l'efficacité de notre système de détection optique à établir le type (WT, MT ou HT) du fragment du gène injecté dans la cuve repose sur la différence de quantité de produit ayant interagi entre les sondes WS et les sondes MS. Pour qu'un tel diagnostic puisse être obtenu pour chacun des types de patient sur une même puce, il faut qu'aucune des sondes ne soit trop favorisée par rapport aux autres. C'est-à-dire que l'affinité des cibles saines ou mutées avec les sondes doit être calculée afin qu'aux conditions habituelles d'observation (température, pression, etc…) la sonde parfaitement complémentaire réagisse plus que la sonde quasiment complémentaire. Pour chacune des 68 mutations de la mucoviscidose testées sur notre biopuce, la longueur des séquences est calculée pour que, lors d'une injection de cibles à température ambiante, le T_M de l'interaction parfaitement complémentaire soit de l'ordre de 40°C. Ce calcul théorique a été réalisé par Virginie Courtois et al. en fixant les concentrations des produits sondes et cibles et les concentrations de Na^+ et Mg^{++} et en ne faisant varier que les longueurs des séquences mises en contact. L'ensemble des séquences et des T_M calculés est regroupé en annexe 3. Suite à ce calcul, des études expérimentales ont été réalisées sur l'impact de la concentration des produits (cibles, sondes et sodium) sur les signaux de réflectivité.

La première étude réalisée dans ce chapitre permet de montrer l'influence de la concentration en Na^+ sur les interactions ADN-ADN. Dans l'étude suivante, nous faisons varier la concentration des sondes déposées sur la puce. Pour finir, nous parlerons de

l'influence de la concentration des cibles injectées sur la dynamique de réaction des hybridations.

3.2.1. Concentration en Na^+

L'étude a pour but d'observer l'évolution des affinités entre les cibles et les sondes en fonction de la concentration en Na^+ de la solution injectée. Cette étude est théorique et compare deux méthodes de calcul. La première, développée par Michael Zuker sur les observations de John Jr. SantaLucia, est disponible sur son site internet : http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php. La deuxième, basée sur les mêmes observations de John Jr. SantaLucia, a été développée au sein de notre laboratoire.

Dés le début de ma thèse, le matériel génétique servant de sonde et de cible avait déjà été acheté. Les études définissant leurs séquences et leurs longueurs avaient déjà été réalisées lors de la thèse de N. Bassil [[lx], [xxii]]. Mais d'autres paramètres influençant aussi l'interaction entre simples brins d'ADN restaient modifiables. La concentration en Na^+, par exemple, influence l'affinité entre les cibles et les sondes. Plus la concentration est élevée, plus le taux de double brin sera élevé.

La première méthode d'étude de l'influence de la concentration en Na+ utilise le logiciel MFold développé par Michael Zuker. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que n'importe quelle séquence peut être étudiée. Il n'y a pas de restriction de longueur entre les deux brins mis en contact. L'inconvénient réside dans la limitation de l'échelle des concentrations en Na+ disponible. Le logiciel n'accepte que les concentrations comprises entre 0.1M et 1M.

La cible utilisée pour cette simulation correspond au fragment d'ADN contenant le lieu de la délétion ΔF508 (60% des cas de la mucoviscidose) 5' CACCAAAGATGATAT 3'. Les sondes utilisées sont de deux formes. La première, dite sonde courte, ne contient que la séquence spécifique de la sonde directement complémentaire à la cible 5' ATATCATCTTTGGTG 3'. La deuxième, dite sonde longue, contient, outre la séquence spécifique, la séquence de calibration de 12 bases et la séquence espaceur de 10 bases T, 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGATATCATCTTTGGTG 3'. Les paramètres de base à entrer dans le programme seront (Figure 82) :

Energy rules: DNA at 22°C, [Na+] = x, [Mg++] = 0 M

Strand concentration: 0.000005 M

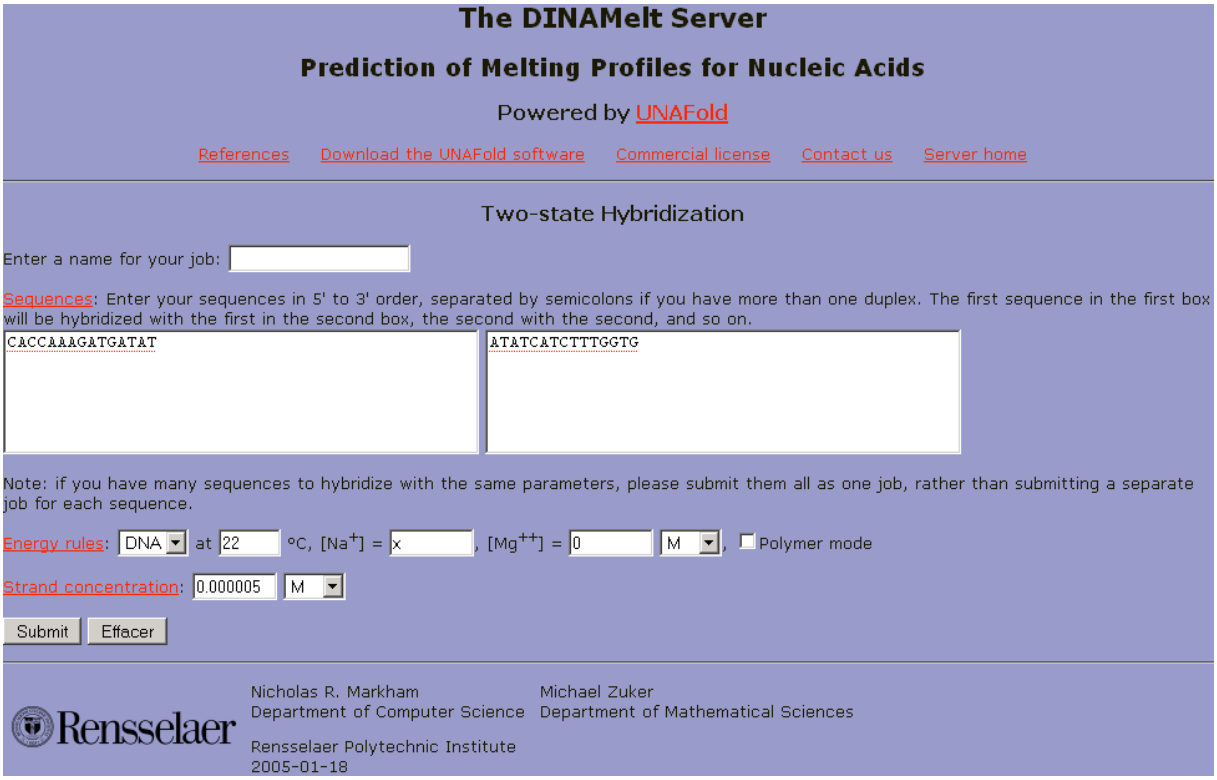


Figure 82 : Capture d'écran du site de Michael Zuker : Dinamelt server.

La valeur que l'on modifie est 'x' de 0.1M à 1M par pas de 0.1M. La concentration en Na^+ dans notre solution tampon est : $[Na^+] = 0.138$ M. C'est la concentration en Na^+ de base pour une solution de PBS 1x. De plus, le logiciel ne permet pas de différencier la concentration des cibles de celle des sondes. La concentration en produit (Cp) dépendra de la concentration des cibles, les sondes étant en excès. Cette concentration sera fixée à 5µM puis 1µM afin d'observer parallèlement l'influence de la concentration des produits sur le T_M. La concentration des cibles est forte de manière à observer directement les états d'équilibre.

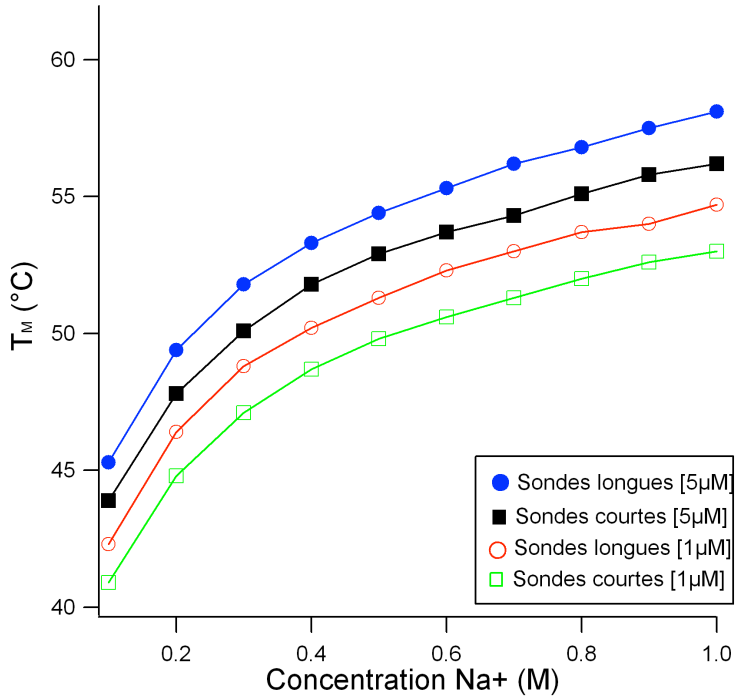


Figure 83 : Graphique du TM d'une interaction parfaitement complémentaire en fonction de la concentration en Na+ pour une injection de cibles à une concentration de 5 µM et 1 µM sur des sondes longues et courtes.

Les calculs théoriques fournis par le site de Michael Zuker montrent que plus la concentration en Na^+ dans la solution est importante, plus le T_M sera important. Ce qui implique que la stabilité du duplexe cible/sonde parfaitement complémentaire augmente avec la concentration de Na^+ dans la solution (Figure 83). Nous pouvons remarquer que la stabilité des duplexes ADN-ADN est plus importante pour une sonde longue que pour une sonde courte. Les appariements de bases aux deux extrémités de la cible sont renforcés par la présence de bases supplémentaires sur l'un des deux brins. Pour finir, le T_M est plus important pour une concentration en produit de 5 µM que pour une concentration de 1 µM.

Afin d'optimiser la solution, il faut aussi faire l'étude sur le duplexe quasiment complémentaire pour suivre son évolution en fonction de la concentration en Na^+. Les mêmes calculs ont été réitérés sur les séquences suivantes :

Cible : 5' CACCAAAGATGATAT 3' (identique à celle du calcul précédent)

Sonde courte : 5' *AATATC***ATT**GGTG*TT* 3'

Sonde longue : 5' TTTTTTTTTT**GACCGGTATGCG***AATATC***ATT**GGTG*TT* 3'

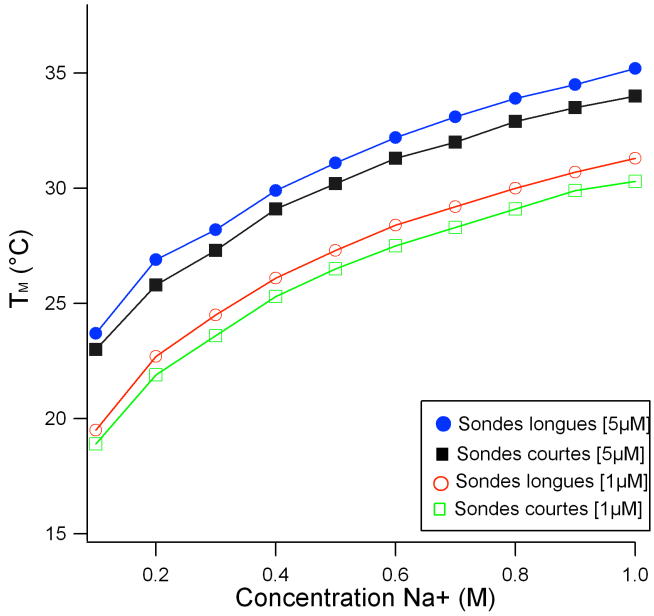


Figure 84 : Graphique du T_M d'une interaction quasiment complémentaire en fonction de la concentration en Na+ pour une injection de cibles à une concentration de 5µM et 1µM sur des sondes longues et courtes.

L'influence du Na^+ dans la solution est la même (Figure 84). Plus sa concentration est élevée, et plus le duplexe est stable. L'important reste toujours de pouvoir différencier la quantité de duplexe formés avec les brins parfaitement complémentaires par rapport à la quantité de duplexe formés avec les brins quasiment complémentaires à température ambiante contrôlée.

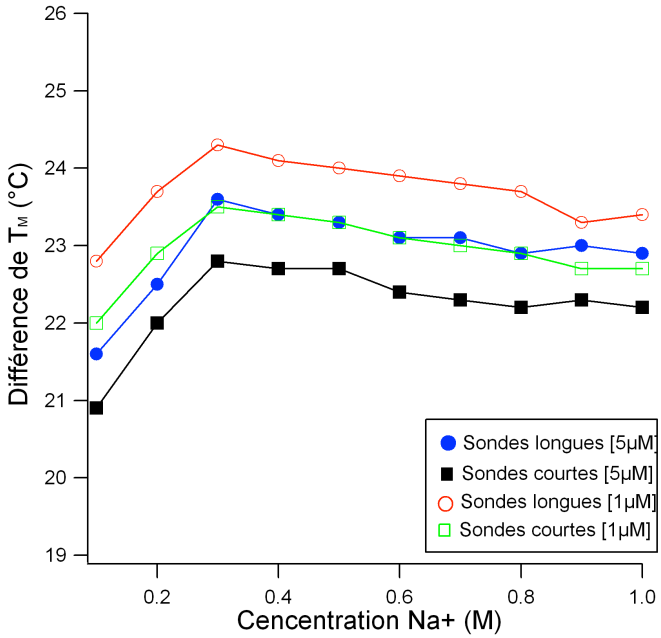


Figure 85 : ΔT_M en fonction de la concentration de Na^+ dans la solution pour deux concentrations (1 et 5 µM) et pour deux types de sondes (courte et longues).

La Figure 85 montre un optimum pour une concentration en Na^+ de 0.3 M. La plupart des expérimentations de cette thèse ont été réalisées dans une solution tampon de PBS 1x soit pour une concentration en sel de 0.138 M. Suite à l'étude précédente, il a été convenu que les expérimentations devraient préférentiellement être réalisées dans un tampon de PBS 2x dont la concentration en Na^+ est proche du point optimum obtenu théoriquement. La concentration de Na^+ est alors de 0.276 M ce qui nous place dans des conditions plus favorables de discrimination.

Les courbes obtenues par le biais du site de Michael Zuker ont été comparées à celles obtenues avec un programme développé par notre équipe et basé sur les équations de John SantaLucia Jr. [55, 56, 57]. Le programme était limité par le fait que les brins cibles et les brins sondes doivent être de même longueur pour qu'il soit possible d'en calculer le T_M. Nous n'avons pas pu calculer les interactions entre les cibles et les sondes longues. Nous pouvons tout de même observer la concordance des résultats et valider l'évolution du T_M en fonction de la concentration de Na^+ (Figure 86).

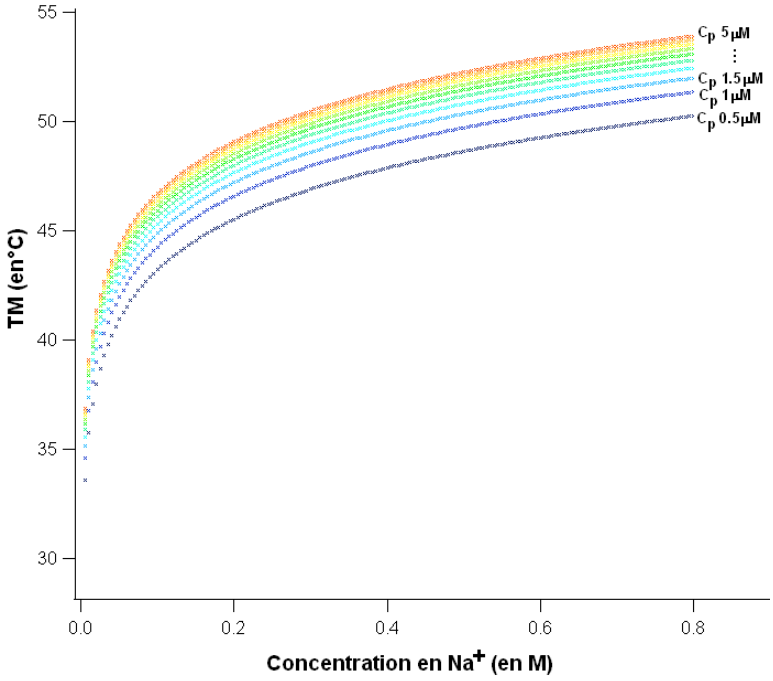


Figure 86 : Graphique du TM d'une interaction parfaitement complémentaire en fonction de la concentration en Na+ pour une injection de cibles à des concentrations comprises entre 0.5 µM et 5 µM sur des sondes courtes.

3.2.2. Concentration en sondes

La température de fusion est la grandeur caractéristique de l'affinité entre deux brins d'ADN. Cette grandeur dépend, outre de la concentration de Na^+ dans la solution, de la concentration en sondes sur la surface. Les conclusions tirées du signal analysé vont tenir compte du nombre de duplexes formés sur chacune des sondes WS et MS. Il est alors primordial que la concentration en produit sur chacun des spots soit identique. En effet, le signal de variation de réflectivité reçu dépendant de la quantité de matière qui s'est accrochée à la surface, si le nombre de sondes augmente, le nombre de duplexes augmente aussi. Il devient alors possible d'inverser un diagnostic si le nombre de sondes quasiment complémentaires est plus important que le nombre de sondes parfaitement complémentaires car le signal sur les spots quasiment complémentaires pourra être plus fort que celui sur les spots parfaitement complémentaires.

Il s'avère que, lors d'une commande de cibles synthétiques ou de sondes biotinylées chez Eurogentech, tous les produits sont livrés à une concentration théorique de base de 100µM. Afin de vérifier la concentration réelle de ces produits, nous avons joint une séquence commune sur chacune des sondes. Cette séquence réagissant à l'injection d'une cible parfaitement complémentaire, dite cible de calibration, de manière identique sur toutes les sondes, nous pouvons facilement en déduire l'homogénéité de la concentration surfacique des sondes.

Les premiers tests ont été réalisés sur 21 sondes différentes déposées sur une puce architecturée en matrice 18x18 spots. Cette matrice contient des sondes ciblant 6 mutations de l'exon 10 : la ΔF508 et la ΔI507 qui sont des délétions et la M470V, la Q493X, la 1716 et la V520F qui sont des SNP (Single Nucleotide Permutation). Les délétions étudiées sont facilement identifiables sur un brin cible. En effet, la différence entre les séquences saines et mutées est très importante (3 nucléotides) ce qui rend l'écart entre le T_M des interactions parfaitement complémentaires et celui des interactions quasiment complémentaires très important (voir tableau récapitulatif de la Figure 88). Les SNP sont moins facilement identifiables sur une cible. Les séquences saines et mutées ne diffèrent que d'un seul nucléotide. Les valeurs des T_M pour les interactions parfaitement complémentaires et les interactions quasiment complémentaires sont très proches. Afin de garantir la validité d'un diagnostic, nous avons développé une technique d'identification des SNP basée sur des

mutations artificielles. Au lieu de déposer deux spots de sondes saines et deux spots de sondes mutées, comme pour les délétions, nous déposons quatre sondes différentes. Un spot de sondes saines, de sondes mutées, de sondes saines avec mutation artificielle et de sondes mutées avec mutation artificielle. Cette mutation artificielle est une permutation de base supplémentaire dans la séquence spécifique de la sonde. Cette technique permet d'obtenir un plus grand écart entre les T_M de l'interaction parfaitement complémentaire et celui de l'interaction quasiment complémentaire avec mutation artificielle. En effet, si nous prenons l'exemple d'une cible saine, la sonde WS sera la sonde parfaitement complémentaire et son T_M sera élevé. La sonde MS aura une base de différence avec la sonde WS et son T_M avec la cible saine sera proche du précédent. La sonde WS avec mutation artificielle (notée WS+ma) aura aussi une base de différence avec la sonde WS. Son T_M avec la cible saine sera similaire à celui de la sonde MS. En revanche, la sonde MS avec mutation artificielle (notée MS+ma) aura deux bases de différence avec la sonde WS. Son T_M avec la cible saine sera beaucoup plus faible du fait de l'instabilité provoquée par l'ajout d'un mésappariement dans le duplexe (Figure 87).

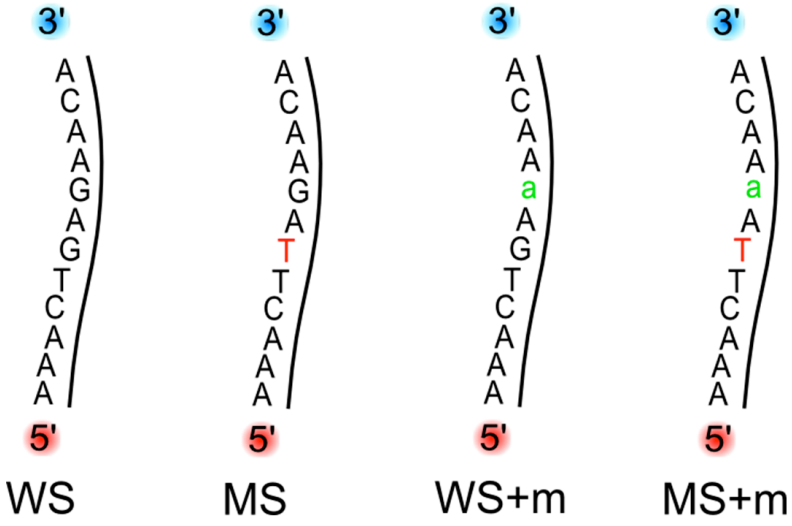


Figure 87 : Exemple de 4 séquences cibles ciblant la mutation Q493X. La première correspond à la séquence saine, la seconde, à la séquence mutée, la troisième à la séquence saine avec ajout d'une mutation artificielle et la dernière à la séquence mutée avec ajout d'une mutation artificielle.

Chacune des balances des délétions sera étudiée de la manière classique. Le signal des spots MS sera soustrait au signal des spots WS. Le signal le plus important sera le signal correspondant à la séquence parfaitement complémentaire. Si le résultat de la soustraction est positif, alors la cible est WT, si le résultat est négatif, la cible sera MT et enfin, si le résultat

est nul, la cible sera HT. Pour les balances des SNP, l'étude sera légèrement différente. La somme des signaux des sondes MS et MS+ma sera soustraite à la somme des signaux WS et WS+ma. Dans le cas d'une cible WT, le spot dont les sondes seront WS sera le spot dont le signal sera le plus important (interaction parfaitement complémentaire). Les spots contenant les sondes MS et WS+ma auront un signal équivalent et le spot contenant les sondes MS+ma aura un signal faible. Le résultat de la soustraction sera bien positif.

		cibles :	WT		MT
	Type de sonde	TM	ΔTM	TM	ΔTM
Q493X	WildSeq	42.1	0	21.1	-16.9
	MutatedSeq	32.2	-9.9	38	0
	WildSeq + ma	31.4	-10.7	4.2	-33.8
	MutatedSeq + ma	12.9	-29.2	26.5	-11.5
V520F	WildSeq	47.1	0	36.6	-6.7
	MutatedSeq	34	-13.1	43.3	0
	WildSeq + ma	30.7	-16.4	11.1	-32.2
	MutatedSeq + ma	13.7	-33.4	26.1	-17.2
1716-1 G>A	WildSeq	47.8	0	36.5	-8.6
	MutatedSeq	32.6	-15.2	45.1	0
	WildSeq + ma	39.7	-8.1	25	-20.1
	MutatedSeq + ma	16.6	-31.2	36.6	-8.5
M470V	WildSeq	42.2	0	30.6	-14.8
	MutatedSeq	35.2	-7	45.4	0
	WildSeq + ma	32.5	-9.7	17.1	-28.3
	MutatedSeq + ma	22.8	-19.4	36.2	-9.2
ΔF508	WildSeq	50.5	0	28.7	-20.9
	MutatedSeq	36.2	-14.3	49.6	0
ΔI507	WildSeq	43.1	0	35.1	-11.1
	MutatedSeq	28	-15.1	46.2	0

Figure 88 : Tableau récapitulatif des valeurs des TM pour les différentes sondes et pour l'injection des cibles WT et MT.

Sur la matrice seront alors déposées 20 sondes différentes plus la sonde de référence et un spot vide pour la vérification de la non-interaction des cibles avec la surface. Lors de l'injection de la cible de calibration (5' CGCGCGCATACCGGTCAAAA 3') les 21 sondes déposées, sonde de référence y compris, réagissent. Chacune comporte une séquence parfaitement complémentaire à cette cible. C'est la séquence de calibration (5' GACCGGTATGCG 3'). La cible de calibration comporte 4 bases A supplémentaires en extrémité 3' et une séquence de 4 bases : CGCG supplémentaire à l'extrémité 5' par rapport à

la séquence sonde qui ne comporte que 12 bases. Comme le signal est sensible à l'augmentation de la quantité de matière en surface du capteur, nous avons augmenté la taille des brins cible de manière à augmenter le signal issu de leur hybridation avec les sondes. Théoriquement, toutes les sondes devraient alors avoir une réponse identique. En pratique, nous observons des différences d'intensité entre chaque sorte de spot. Dans cette étude la concentration de la cible injectée (35 µM) était supérieure à celle de la concentration des sondes en surface, seules les différences de concentration des sondes interviennent dans cette dispersion d'intensité des spots. La Figure 89 montre l'état des interactions entre les sondes et les cibles après 10 minutes de circulation des cibles sur la puce (à l'équilibre). Cette variation de réflectivité est reportée sur la Figure 90 où nous pouvons observer une grande inhomogénéité de valeur.

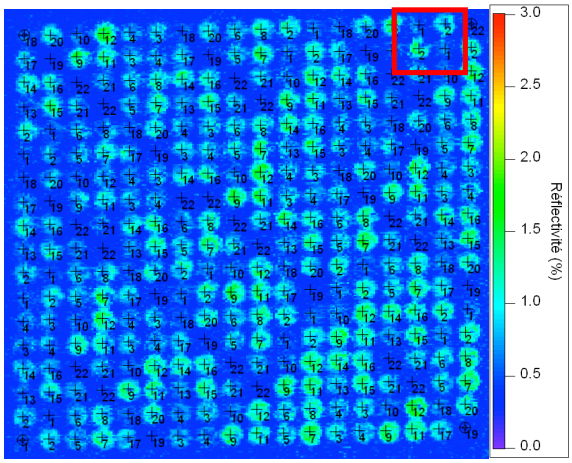


Figure 89 : Image de différence entre l'injection de la solution tampon et l'état d'équilibre après 10 minutes de circulation de la cible de calibration. La balance encadrée montre un gros déséquilibre entre la concentration surfacique des sondes n°1 et des sondes n°2 (sondes correspondant à la mutation ΔF508). Ce déséquilibre est susceptible de fausser un diagnostic.

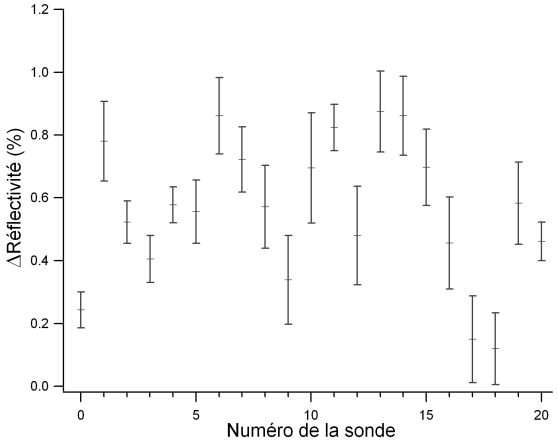


Figure 90 : Ensemble des valeurs de variation de réflectivité pour chacune des sondes de la puce entre l'état d'équilibre et la circulation de la solution tampon.

Afin de corroborer les résultats obtenus sur notre banc, nous avons dosé les produits sondes sur un appareil 'NanoDrop' qui calcule la concentration des produits par une mesure d'absorption à 250 nm et 280 nm. Les valeurs de concentrations sont regroupées dans le tableau suivant (Figure 91).

	Concentration (µM)
Sonde 1	61
Sonde 2	99
Sonde 3	81
Sonde 4	68
Sonde 5	88
Sonde 6	85
Sonde 7	115
Sonde 8	89
Sonde 9	96
Sonde 10	60
Sonde 11	91
Sonde 12	152
Sonde 13	66
Sonde 14	105
Sonde 15	106
Sonde 16	111
Sonde 17	66
Sonde 18	33
Sonde 19	5
Sonde 20	76
Sonde 21	30

Figure 91 : Concentration des sondes en µM relevé par le NanoDrop. La sonde numéro 12 est la plus concentrée avec 152 µM et la sonde 19 est la moins concentrée avec 5 µM. Le bon de livraison d'Eurogentech stipulait que la concentration de chacun des produits était de 100 µM.

Comme le montre l'image de réflectivité et le tableau des dosages des produits sonde, il y a une très grande dispersion dans la concentration des sondes. Si nous reprenons le cas de la balance encadrée sur la Figure 89. Les sondes n°1 sont des sondes WS et les sondes n°2 sont des sondes MS. Lors de l'injection d'une cible WT, nous devrions avoir une réponse sous forme de diagonale (Figure 92).

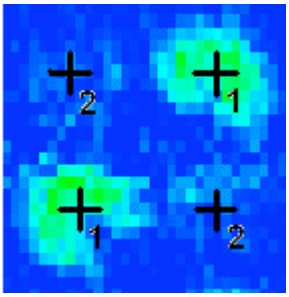


Figure 92 : Réponse normale de la balance à l'injection d'une cible WT. Les sondes n°1 réagissent beaucoup plus que les sondes n°2. Le diagnostic est alors sans équivoques et le patient est considéré comme sain pour cette mutation ciblée.

Dans notre cas, après une dénaturation de la puce, la réponse à une injection de cible WT ne correspond pas à la Figure 92. Malgré le fait que les sondes WS réagissent de manière beaucoup plus importante que les sondes MS pour la mutation ΔF508 (délétion), le diagnostic établirait que la cible est hétérozygote (HT), comme le montre la Figure 93.

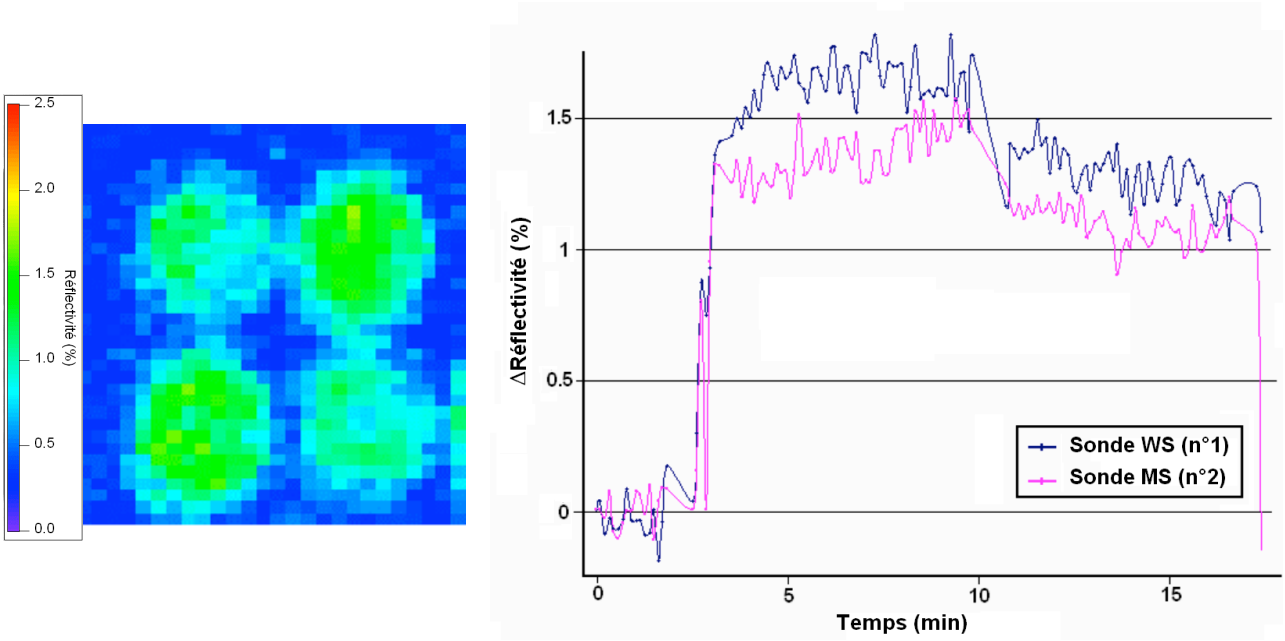


Figure 93 : A gauche, l'image de différence entre la circulation de la solution tampon (t=0min) et 5 minute d'équilibre (t=15min). Les quatre spots, aux défauts de surface près, réagissent de manière similaire. A droite, les courbes de l'évolution de la réflectivité en fonction du temps pour les deux types de spots. La première phase (de 0 à 3min) consiste en une circulation de la solution tampon de PBS 1x dans la cuve. La deuxième phase (de 3min à 10min) correspond à l'injection de la cible WT (à 5µM dans du PBS 1x) dans la cuve. Le produit est mis en circuit fermé grâce à la pompe péristaltique et les 200µL de solution circulent pendant les 7 minutes de l'expérimentation. La troisième phase (de 10min à 17min) correspond à nouveau à un changement de produit dans la cuve. Le circuit est ouvert et la solution tampon est réinjectée. La cible n'est plus apportée sur la surface de la puce. Les duplexes instables se dénaturent vite. La dernière phase (à 17min) correspond à la dénaturation totale de la puce par injection de HCl (à 11mM) durant 1min.

Les valeurs de réflectivité mesurées lors de l'injection de la cible de calibration ont été comparées aux concentrations des produits mesurées au Nanodrop pour en déduire l'impact de la concentration des sondes sur le signal de sortie (Figure 94).

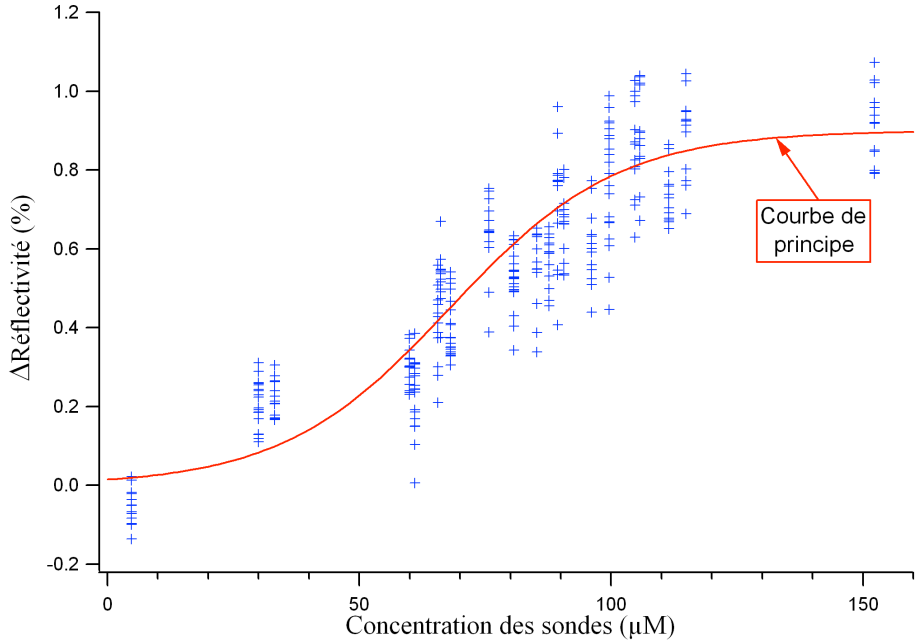


Figure 94 : Réflectivités des spots en fonction de leur concentration obtenue sur le Nanodrop. La dispersion verticale des valeurs de réflectivité correspond à l'inhomogénéité de concentration d'une même sonde sur la puce. La courbe rouge est une courbe de principe sur l'évolution du signal de réflectivité en fonction de la concentration des sondes.

Il apparaît évident qu'une puce dont la dispersion des concentrations des sondes est si importante ne pourra pas donner de résultats utilisables tels quels lors d'un diagnostic médical. De plus, les valeurs de réflectivités obtenues pour les spots dont la concentration était réellement celle commandée (100 µM) se situent en deçà de la valeur de saturation observée expérimentalement pour des concentrations supérieures à 120 µM (Figure 94). Deux conclusions ont été tirées de cette première étude sur la concentration des sondes. La première étant la nécessité d'utiliser un 'marqueur' de sonde pour en obtenir la concentration par spot (voir chapitre 3.3.Autocalibration), la deuxième étant l'étude de la concentration optimale des spots pour un meilleur signal de réflectivité.

Nous avons émis l'hypothèse d'une corrélation entre l'évolution du signal de réflectivité et la concentration des sondes (courbe de principe de la Figure 94). Afin de vérifier ce comportement, nous avons spécialement architecturé une biopuce. Les sondes déposées correspondent à la mutation ΔF508. La matrice est composée de balances standard avec 2 spots de sondes WS et 2 spots de sondes MS. Une troisième sorte de sonde de type NR (Non-relevante) a aussi été déposé. Chacune de ces trois sondes sont spottées à plusieurs concentrations sur la biopuce. A partir de la solution mère réajustée à 100 µM, nous réalisons

des solutions filles à 1.5, 5, 7, 9, 10, 12, 15, 20, 25 et 30 µM. C'est dans ces solutions filles que la pointe du micro-arrayer va prélever le produit à spotter.

Les trois sondes déposées sont :

Sonde ΔF508 WS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGATATCATCTTTGGTG 3'

Sonde ΔF508 MS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGAATATCATTGGTGTT 3'

Sonde Non-relevante : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGACCGGTATGCG 3'

La matrice déposée est architecturée autour d'une maille élémentaire de 6 spots par 6 spots (Figure 95).

1	2	11	22	5	6
3	4	21	12	7	8
13	24	31		17	28
23	14		31	27	8
15	26	9	10	19	30
25	16	10	9	29	20

Figure 95 : Maille élémentaire de la matrice déposée. En rose, les sondes MS, en vert les sondes WS et en jaune les sondes NR. Les deux spots blancs sont les spots laissés vides et servant de référence pour d'éventuelles absorptions non spécifiques de la surface.

Les sondes numéro 1 à 10 sont les sondes non-relevantes issues des solutions filles d'une concentration allant de 1.5 à 30 µM. Les numéros 11 à 20 sont les sondes ΔF508 WS et les sondes numéros 21 à 30 sont les sondes ΔF508 MS. Les 8 balances extérieures entourent la balance centrale composée de spots de référence (avec sonde non-relevante) et de spots vides. La sonde non-relevante de la balance centrale est déposée à une concentration de 7µM qui est la concentration usuelle utilisée dans l'équipe. Les spots laissés vides permettent de rendre compte de l'absorption non spécifique de la surface et de corriger d'éventuels artéfacts lors de l'expérience. Cette maille élémentaire est répétée 9 fois sur la puce pour former une matrice 18x18.

Les successions de produits injectés sont les mêmes qu'habituellement. La solution de PBS 1x est mise en circulation pendant 5 minutes afin d'obtenir un plateau stable de réflectivité de référence pour l'ensemble de la puce. La cible de calibration est ensuite injectée pendant 10 minutes jusqu'à obtention d'un plateau d'équilibre. La Figure 96 est une image de différence entre ce plateau d'équilibre et le plateau de référence obtenu par circulation du PBS 1x. Sur cette image en fausse couleur, apparaissent en évidence les spots de la matrice.

L'échelle des couleurs représente le pourcentage de variation de réflectivité de cette image de différence. En bleu, pas de variation, en rouge, une forte variation.

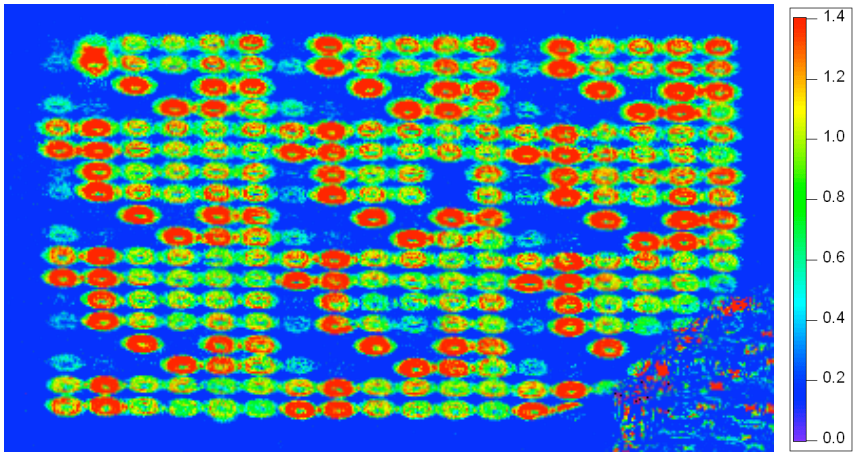


Figure 96 : Image de différence entre l'état d'équilibre lors de la circulation de la cible de calibration et l'état de référence avant cette injection.

La relation entre la concentration en sondes des spots et leur variation de réflectivité n'est pas linéaire. La variation de réflectivité augmente jusqu'à une concentration de 10 µM puis sature. L'encombrement stérique en surface pourrait être à l'origine de cette saturation. Pour être sûr que la concentration des cibles ne devienne pas le critère limitant, nous avons répété le cycle d'injection avec des cibles de plus en plus concentrées. Chaque cycle étant terminé par une dénaturation de la puce par injection d'HCl 11mM d'une minute (Figure 97).

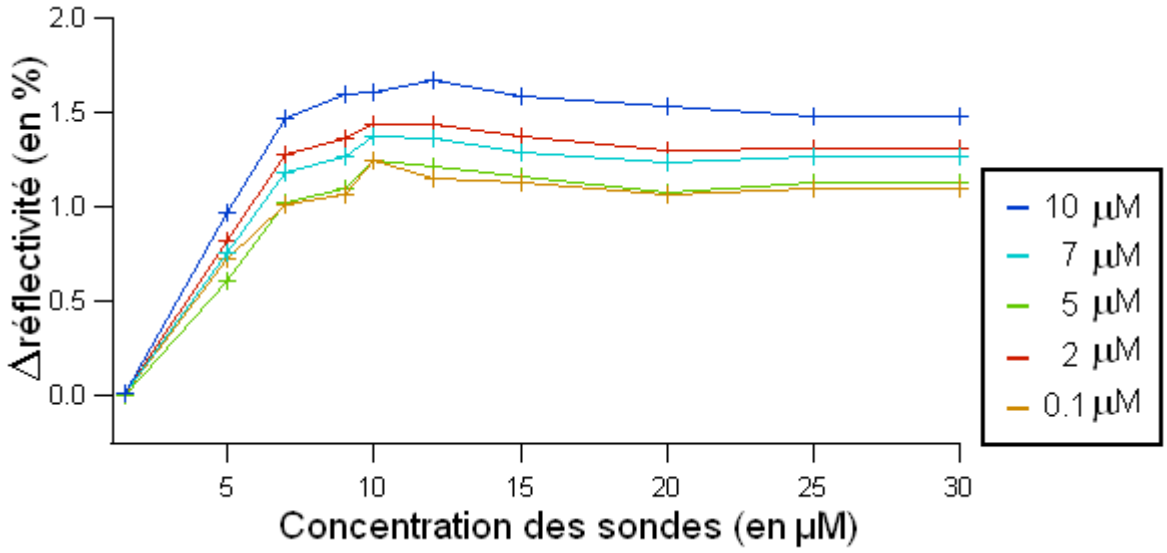


Figure 97 : Variation de réflectivité en fonction de la concentration des sondes. Chaque courbe correspond à une concentration de cible précise dont la valeur est indiquée dans la légende à droite.

La concentration des solutions filles dans lesquelles sont prélevées les sondes par la pointe de l'arrayer avait été fixée à 7µM lors de l'utilisation de la chimie de surface MUA-PEI. L'étude précédente semble montrer que cette concentration doit être augmentée sur une chimie de surface basée sur du Dextran. Afin de s'affranchir des fluctuations importantes dans la concentration des produits livrés par Eurogentech, nous avons fixé la concentration en sondes à 15 µM. En se plaçant sur le plateau, nous maximisons le signal de variation de réflectivité d'un spot et la concentration peut varier sans avoir d'effet majeur sur le signal.

3.2.3. Concentration des cibles

Les interactions entre les cibles et les sondes dépendent également de la concentration du produit injecté. La variation de concentration modifie la rapidité de la cinétique d'interaction. Comme le montre la Figure 98, plus la concentration en cible est élevée, pour une même concentration de sondes et dans les mêmes conditions de tampon et de température, plus la cinétique est rapide pour atteindre le point d'équilibre. Chacune de ces courbes de cinétique peut être modélisée par une mono-exponentielle dont l'asymptote est identique.

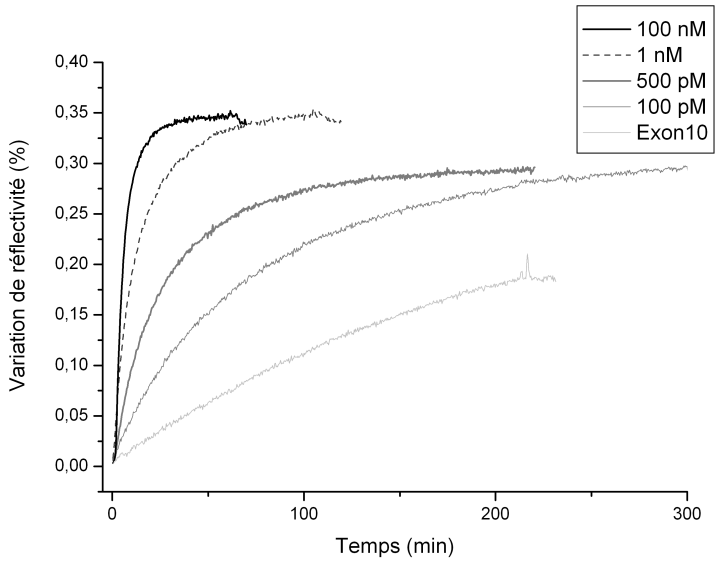


Figure 98 : Courbes de variation de réflectivité en fonction du temps pour différentes concentrations de cibles injectées (100 pM à 100 nM) et pour un produit PCR (Exon 10)

Cette étude est primordiale car la concentration des produits doit toujours être contrôlée avant une expérimentation. Nous avons vu dans le chapitre précédent combien la concentration des produits livrés par Eurogentech était inhomogène. Or, si une injection de

cible commune à toutes les sondes permet d'en déterminer la quantité dans les spots, il est difficile d'évaluer la quantité et la qualité des cibles. Un dosage au Nanodrop, comme l'exemple de la Figure 98, ne permet pas réellement d'obtenir une quantité de cible correspondant à la commande. En effet, le Nanodrop nous fournit une quantité de matière, mais l'ADN contenu dans la solution peut être fractionné ou ne pas avoir la bonne séquence. Afin de pouvoir établir un diagnostic robuste, il faut que la concentration des cibles saines et mutées soit identique pour chacune des mutations.

3.3. Autocalibration

Notre système de détection optique se base sur la SPR pour observer une interaction entre une molécule cible et une molécule sonde en surface du détecteur. Comme décrit dans le chapitre 1.3, la résonance de plasmon de surface est sensible à l'ensemble des caractéristiques du système. À angle fixé, l'intensité du faisceau réfléchi, R, dépend, entre autres, de l'homogénéité de la biopuce elle-même. Nous introduisons alors la notion d'une réflectivité spatiale R(x,y) qui va dépendre de l'état de l'interface où a lieu le couplage entre le faisceau lumineux et le plasmon. En effet, le transfert d'énergie entre l'onde incidente et l'onde de surface dépend de l'indice du métal et du diélectrique. La couche de métal déposée sur le support de verre, la couche chimique de fonctionnalisation déposée sur la surface, la densité des sondes spotées, sont des facteurs dont l'homogénéité est difficilement maîtrisée. Afin de pouvoir s'affranchir d'inévitables défauts de conception des biopuces, nous avons mis en place une succession d'étapes dites « d'autocalibration » de la puce. Ces étapes nous permettent d'obtenir des données beaucoup plus précises et dont les valeurs correspondent principalement aux hybridations étudiées.

3.3.1. Inhomogénéité du transducteur

L'architecture d'une biopuce repose sur une base de verre sur laquelle est déposée par évaporation une couche de chrome qui fait jonction avec la couche d'or. Les propriétés de ce dernier métal nous permettent d'ériger une structure chimique basée sur des thiols et utilisant le Dextran. La fonctionnalisation de la surface avec ce procédé passe par de nombreuses étapes. Il apparaît évident que le contrôle de l'homogénéité de ces étapes n'est pas réalisable

si nous voulons conserver une conception simple de nos biopuces. Si chacune de ces étapes devait être validée par un contrôle de la surface et de l'homogénéité, la fonctionnalisation, déjà lourde, prendrait des proportions qui ne correspondraient pas aux besoins (biopuce destinée au milieu médical, rapide et simple d'utilisation) ni aux moyens de notre équipe. La réalisation du transducteur (verre + métal + fonctionnalisation) a soulevé plusieurs problèmes qui ne sont pas tous résolus actuellement.

a) Le dépôt de la couche métallique et la fonctionnalisation

Durant les premiers mois de ma thèse, nous ne nous occupions que de nous procurer des lames de microscope en BK7 que nous envoyions à l'entreprise Schott. Cette entreprise s'occupait du dépôt métallique et nous renvoyait les lames recouvertes de métal. Depuis l'été 2006, des problèmes de résistance de la couche chimique sont apparus. Certaines étapes de la fonctionnalisation décrochaient la couche d'or, ou encore les sondes biotinylées ne s'accrochaient plus à la surface. Ces problèmes avaient pour origine la rugosité des dépôts de métal sur la lame de verre. Afin de trouver une alternative à l'entreprise Schott, ces dépôts ont ensuite été réalisés en parallèle à l'IEF (Institut d'Electronique Fondamentale – Université Paris sud XI – Orsay) et dans notre équipe. Les substrats de BK7 ont aussi été la source de problèmes dus à l'adaptation d'indice entre la lame et le prisme. Les dépôts ont alors aussi été effectués sur des lames de SF10 découpées et polies à l'Institut d'Optique. Tous ces substrats et ces dépôts obtenus par des techniques différentes augmentent les possibilités d'avoir des problèmes d'inhomogénéité sur la surface de la biopuce mais aussi entre les différentes biopuces réalisées. Ici, l'inhomogénéité de l'épaisseur du dépôt métallique et de sa densité entraîne une dispersion du profil de couplage sur la surface de la biopuce. L'irrégularité de la surface métallique est répercutée par les multiples étapes de fonctionnalisation sur la surface en contacte avec les solutions cibles. Par exemple, la création de la mono couche auto-assemblée de 11-mercapo-1-undécanol ne donnera pas de couche homogène. Les aspérités de la surface d'or ne permettront pas un assemblage régulier (Figure 99).

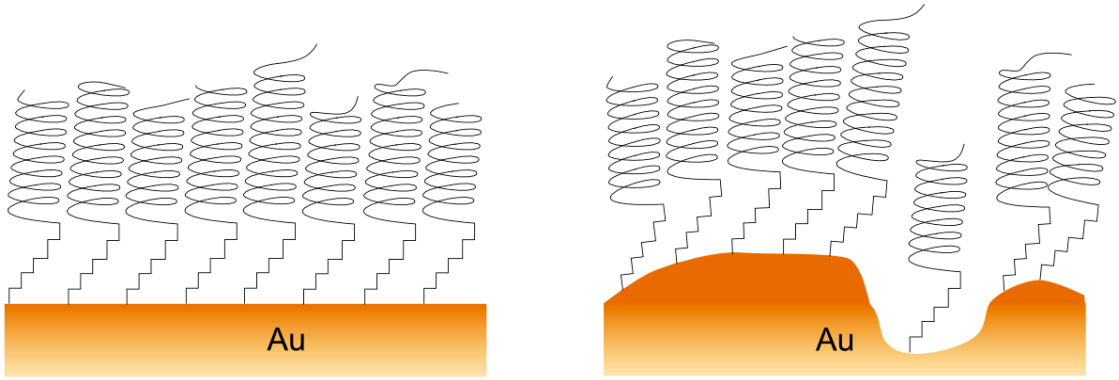


Figure 99 : La rugosité de l'or perturbe l'assemblage de la monocouche auto assemblée.

b) Compensation de l'inhomogénéité du transducteur

Afin de s'affranchir de la dispersion due à la conception de la biopuce, nous normalisons chaque signal en fonction de la réaction du spot dont il est issu à l'injection d'une solution d'indice connue. Cette étape dite de « saut d'indice » est réalisée par injection successive d'une solution de PBS 1x (n=1.334), puis de PBS 1.25x (n=1.335) et enfin de PBS 1x. La solution de PBS 1.25x est mise en circulation pendant 5 minutes dans la cuve afin d'obtenir un plateau de réflectivité pour chacun des spots analysés. Si la puce était totalement homogène, la valeur de ce plateau soustraite au plateau de référence du PBS 1x serait la même pour tous les spots analysés. Mais comme la structure sous chacun des spots varie d'une zone de la puce à l'autre, ce signal est dispersé (Figure 100). Cette dispersion est visible directement sur une image de différence entre le moment où le PBS 1.25x circule et le plateau de PBS 1x qui précède l'injection du saut d'indice.

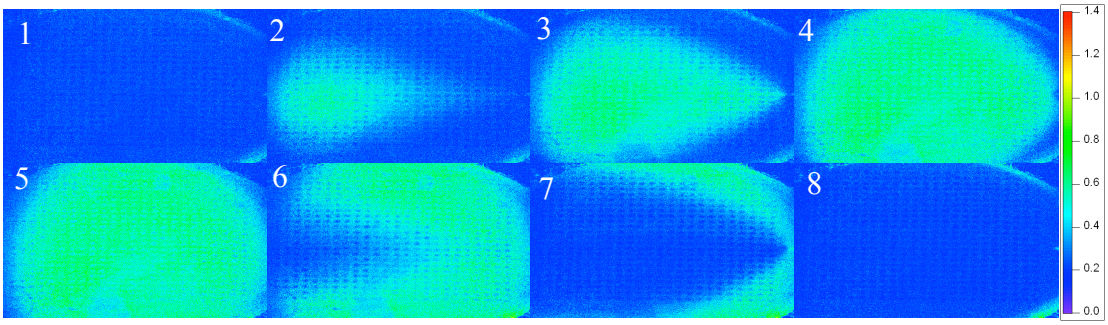


Figure 100 : Séquence de la phase d'injection et de rinçage du saut d'indice dans la cuve. Les images sont en fausses couleurs : bleu pour aucune différence de réflectivité et vert pour une grande différence de réflectivité. L'image 1 correspond à la phase de circulation

du PBS 1x, les images 2-3 et 4 correspondent à la phase d'injection du PBS 1.25x (20 secondes se sont écoulées entre l'image 1 et l'image 4), l'image 5 correspond au plateau de réflectivité du saut d'indice, les images 6 et 7 correspondent à l'injection du PBS 1x et l'image 8 correspond au plateau de PBS 1x après le saut d'indice (20 secondes se sont écoulées entre les images 6 et 8).

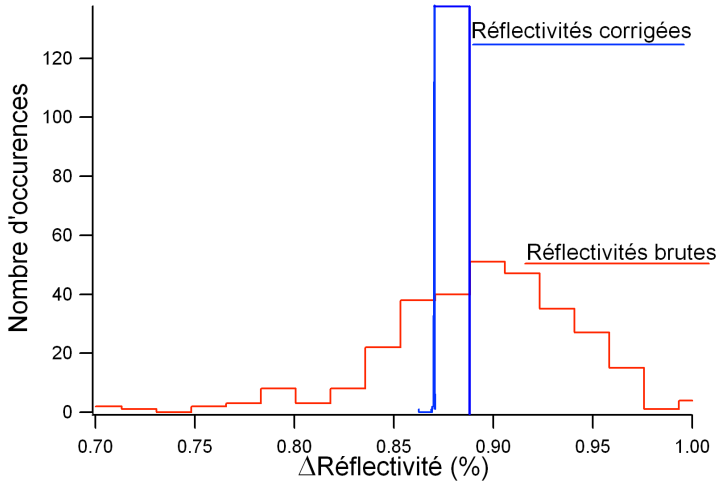


Figure 101 : Histogramme des valeurs de la moyenne des plateaux de variation de réflectivité pour les réflectivités brutes (histogramme rouge) et les réflectivités corrigées (histogramme bleu).

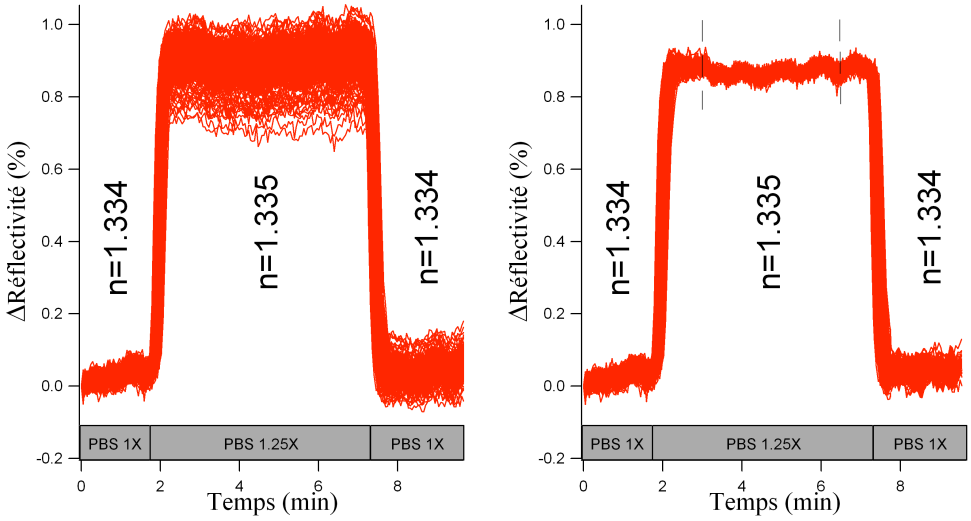


Figure 102 : Etape du saut d'indice. À gauche, les réflectivités brutes. À droite, les réflectivités corrigées par le facteur de saut d'indice (les trais pointillés délimitent le plateau sur lequel est calculé la moyenne du saut d'indice). Chaque plateau est ramené à la valeur moyenne corrigeant ainsi l'ensemble des signaux des inhomogénéités du transducteur.

Dans notre système de correction des inhomogénéités de surface, nous effectuons la moyenne des valeurs des plateaux de saut d'indice. Chacun des signaux est ensuite multiplié par le facteur suivant : C_M/C_i où C_M est la valeur de la moyenne des plateaux et C_i est la valeur du plateau du signal normalisé (Figure 101). La valeur de chacun des plateaux des courbes des spots est ramenée au niveau de la moyenne C_M à un facteur de bruit près (Figure 102).
Grâce à cette étape de correction, nous arrivons à diminuer la dispersion des signaux de réflectivité lors de l'injection d'une cible d'intérêt suivant ce saut d'indice (Figure 103). L'écart entre la valeur maximum et la valeur minimum du plateau de réflectivité à la fin du rinçage passe de 1 % à 0.8 % pour la sonde parfaitement complémentaire et de 0.3 % à 0.25 % pour la sonde quasiment complémentaire.

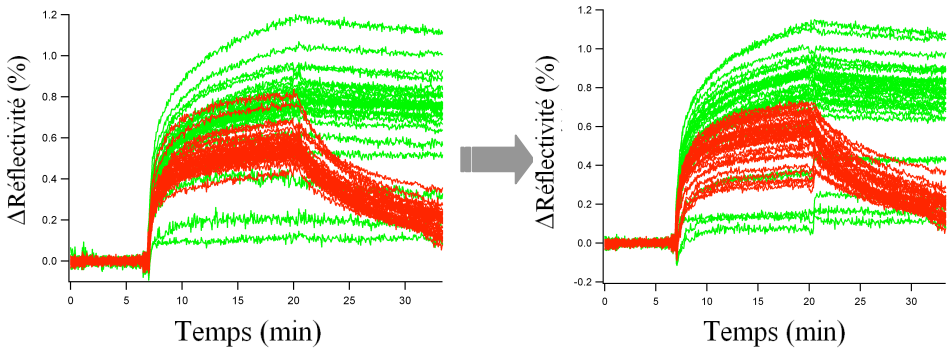


Figure 103 : Correction de la dispersion du signal d'intérêt par saut d'indice. À gauche, les signaux bruts, à droite, les signaux corrigés par le facteur issu du saut d'indice. En vert, les courbes correspondant aux spots parfaitement complémentaires, en rouge, les courbes correspondant aux spots quasiment complémentaires lors de l'injection d'une cible. On constate que la correction par saut d'indice n'est pas suffisante pour s'affranchir de toute la dispersion des signaux.

Malgré la correction par saut d'indice, il reste encore beaucoup de dispersion dans le signal d'intérêt. Cette correction seule ne suffit pas. Pour compléter notre méthode d'autocalibration, nous avons ajouté un élément de correction des artéfacts temporels.

3.3.2. Artéfacts temporels

Dans la mesure du possible, une étude sur une biopuce dont le capteur repose sur la SPR doit être isolée des contraintes externes (température, lumière environnante, …). En effet, nous avons vu que le couplage entre l'onde incidente et l'onde de surface était très sensible à

toute modification des caractéristiques du système. Mais cet isolement total n'est pas réalisable. C'est pourquoi, dans le but de s'affranchir des artéfacts temporels sur les signaux d'intérêt, nous avons créé une méthode de correction autour d'une balance de référence. Cette balance est positionnée au centre de chaque maille élémentaire. Une maille élémentaire est une matrice de 6 spots par 6 spots (voir 3.3.1) comprenant 8 balances d'intérêt et une balance de référence au centre. Cette balance de référence était constituée à l'origine de 2 spots de sondes non-relevantes calibrées et 2 spots laissés vides. Comme les interactions dans la cuve sont extrêmement spécifiques, en choisissant des séquences zip pour les sondes non-relevantes ces dernières ne réagiront pas à l'injection d'une cible dont la séquence correspond à un fragment du gène de la CFTR. Les signaux issus de la balance de référence ne seront dus qu'aux variations intrinsèques du système (perturbation lumineuse, dérive temporelle due à l'absorption du Na^+ par la surface, perturbation des alimentations électriques et autres artéfacts). Toutes ces perturbations entraînent des variations de réflectivités sur l'ensemble de la puce. Ces variations peuvent être homogènes comme pour le cas d'une perturbation lumineuse, ou à tendance locale, dépôt du Na^+ sur la surface. C'est pour la deuxième tendance que les balances de référence sont dupliquées dans chacune des mailles élémentaires de manière à ce que chaque balance d'intérêt soit adjacente à une balance de référence.

La méthode de correction des artéfacts temporels est simple. À chaque signal est soustrait la moyenne des signaux de la balance de référence la plus proche. Dans certains cas, les perturbations sont telles que, dans le signal brut, l'interaction ADN-ADN n'est pas identifiable (Figure 104)

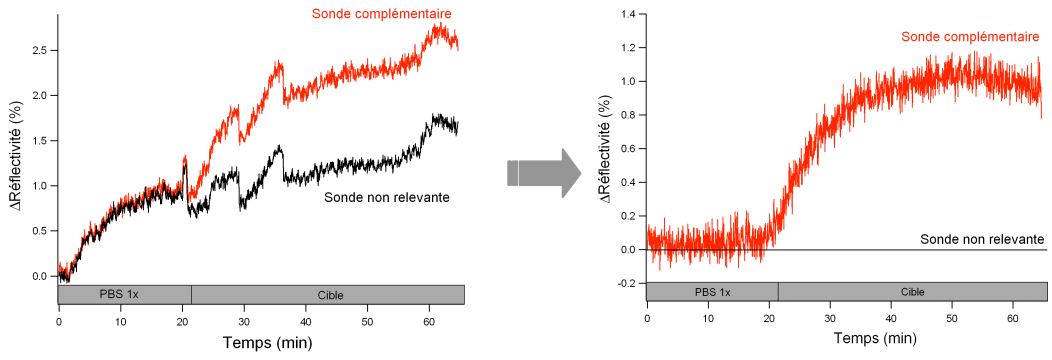


Figure 104 : Correction des artéfacts temporels par balance de référence. À gauche, les signaux bruts d'une sonde parfaitement complémentaire et d'une sonde non-relevante. À droite, les deux mêmes signaux dont on a soustrait le signal de la sonde non-relevante. La dynamique de l'hybridation est de nouveau bien visible même dans le cas d'un signal brut très perturbé.

Grâce à l'association de la correction du signal par saut d'indice et de la correction par les balances de référence, tous les artéfacts temporels qui perturbent l'analyse du signal d'intérêt sont retirés des données, même dans le cas des études les plus perturbées (Figure 104).

Mais, même après cette correction, le signal reste dispersé. Durant notre étude sur l'influence de la concentration sur le signal de réflectivité nous avons pu observer une grande dispersion de ces valeurs de variation de réflectivité pour des spots contenant la même sonde (Figure 94). Le signal étant corrigé des inhomogénéités de surface et des effets temporels, nous avons émis l'hypothèse d'une dispersion résiduelle induite principalement par l'inhomogénéité du dépôt des sondes.

3.3.3. Inhomogénéité de la concentration des sondes

Comme nous l'avons montré dans le paragraphe 3.2.2, la concentration des sondes dans un spot a un fort impact sur sa réponse à l'injection d'une cible parfaitement complémentaire ou quasiment complémentaire dans la cuve. Cette influence est amplifiée par les conditions de dépôt (fluctuation de température, d'hygrométrie dans l'arrayer) et par la méthode d'analyse des données via le masque matriciel. En effet, un dépôt de matrice de sondes sur la puce prend beaucoup de temps, 1h45 pour une matrice 18x18. Durant cette période, l'arrayer chauffe et, malgré le régulateur d'humidité, la quantité de produit prélevée par la pointe ne peut être identique à chaque fois. Le spot créé sera alors de tailles diverses. La taille du spot variant, le masque intégrera plus ou moins de pixel pour la zone dont le signal sera utilisé en tant que signal utile. En fonction du nombre de pixels de faible réponse intégrée dans le moyennage de la réponse d'un spot, la valeur du signal de réflectivité calculée sera variable. Comme la forme des spots issus d'une même sonde varie fortement sur une même puce, il existe une disparité des valeurs de réflectivité à l'injection d'une cible. Ces variations peuvent être importantes entre deux spots issus d'une même solution de sonde et donc sensés répondre de manière identique.

Pour savoir si la correction de la dispersion résiduelle pouvait être corrigée de la même manière que l'inhomogénéité du transducteur (saut d'indice), nous avons tout d'abord étudié le comportement temporel de cette dispersion.

En se basant sur l'hypothèse d'une réponse constante de chacun des spots dans le temps, nous supposons que la variation de la réponse particulière d'un spot reste alors très faible devant la dispersion entre différents spots de la puce. Lors d'une étude, toutes les valeurs extraites sont interprétées de manière relative, c'est-à-dire qu'après normalisation par autocalibration, les signaux sont comparés les uns avec les autres sur la puce. Donc si un signal qui a une réponse faible lors d'une première injection reste constant pour toutes les autres injections suivantes, il est possible de comparer sa variation à un autre signal conservant aussi sa sensibilité sur le temps. C'est-à-dire qu'un spot ayant un fort signal est un spot dont la concentration en sonde est supérieure à 15 µM (). Si les sondes restent accrochées à la surface au fil des injections, ce spot aura donc une tendance plus importante à interagir avec les cibles qu'un spot qui a une concentration en sonde moins élevée. Si cette différence de signal entre deux spots dont la concentration est différente est conservée dans le temps, la dispersion pourra être corrigée.

Nous avons donc injecté sur une même puce le même produit six fois de suite. Ce produit cible est un oligonucléotide de 20 bases dont la séquence est parfaitement complémentaire à toutes les sondes déposées sur la puce. Entre chaque injection de cette cible, nous avons dénaturé les duplexes formés par 1 minute de circulation d'HCl (11 mM). Les valeurs que nous avons conservées sont les moyennes des plateaux de réflectivité entre la 9ème et la 10ème minute de circulation de ces cibles à forte concentration (5 µM). Pour vérifier que la dispersion du signal d'un spot sur le temps était bien plus faible que la dispersion des signaux sur l'ensemble de la puce, nous avons étudié le comportement des signaux de moyennes de plateaux des injections numéros 2 à 6 en fonction de ceux de la première injection par spot (Figure 105). Nous voyons sur cette figure que la dispersion des valeurs observées sur un même spot lors d'injections successives de cible de calibration reste très faible. Cette caractéristique permet de valider les calculs effectués sur les signaux après normalisation.

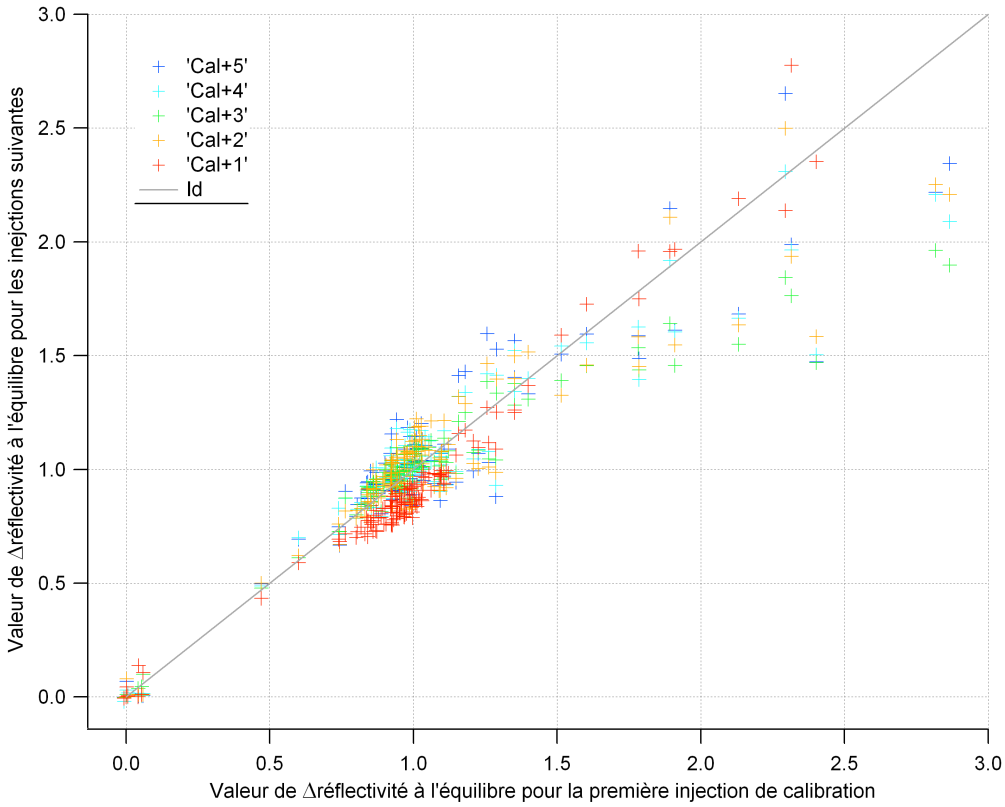


Figure 105 : Graphique des valeurs de coefficients de calibration successifs en fonction du coefficient de la première injection de cible de calibration.

Afin de s'affranchir de cette dispersion intra-puce, chacune des sondes déposées contiendra une séquence dite 'séquence de calibration' en plus de sa séquence d'intérêt. Cette séquence est commune à toutes les sondes excepté les sondes non-relevantes-non-calibrées de la balance de référence. Elle permet de donner une information sur la concentration relative de chacun des spots lors de son hybridation avec une cible parfaitement complémentaire dite 'cible de calibration'. Avant chaque injection d'une cible à étudier, nous injectons un fragment d'ADN de 20 bases (oligonucléotide de synthèse) dont la séquence est la suivante : 5' CGCGCGCATACCGGTCAAAA 3'. Le but de cette injection est de rapidement atteindre le plateau d'équilibre de l'interaction cible/sonde. La concentration en cible de calibration de la solution injectée est donc importante : 5 µM. Si nous n'observons qu'un seul spot sur la puce, nous n'obtenons qu'une seule valeur de réflectivité pour l'hybridation particulière entre la cible circulant et la sonde observée. Mais dés que nous dupliquons ce spot sur la puce, le signal est dispersé (Figure 106).

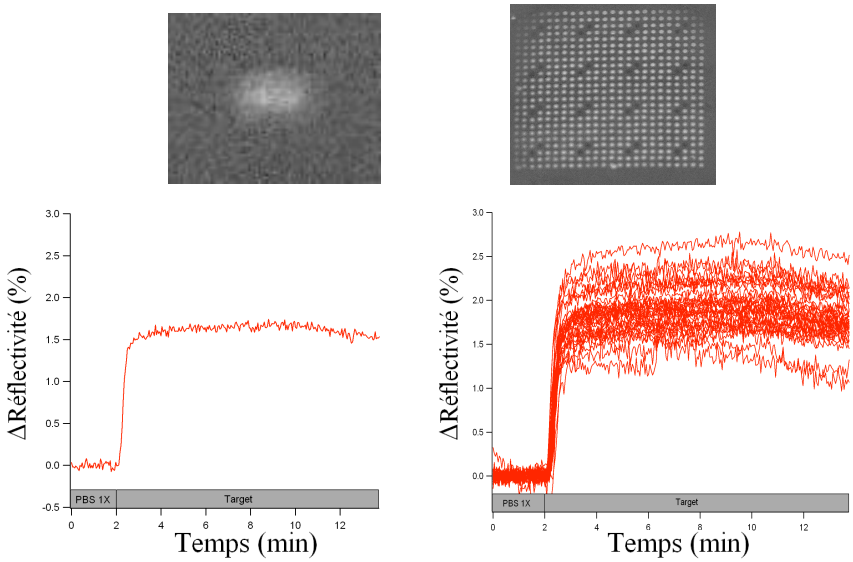


Figure 106 : Réflectivité en fonction du temps pour un spot (gauche) et pour une matrice de spots (droite)

Comme chacun des spots est sensé réagir de manière identique à l'injection de la solution cible, chacune des valeurs de réflectivité obtenue reflète la structure particulière de chacun des spots (concentration des sondes, inhomogénéité de la fonctionnalisation et du dépôt métallique sous le spot). Pour corriger cette dispersion, nous prenons la moyenne de toutes les valeurs des plateaux d'hybridation pour créer un coefficient central de calibration : C_{cal}. De la même manière que pour le saut d'indice, chacun des signaux est multiplié au coefficient suivant : C_{cal}/C_i, où C_{cal} est le coefficient central de calibration et C_i est la valeur du plateau d'hybridation du signal lui-même. Grâce à cette correction, l'écart entre le signal maximum et le signal minimum passe de 1 % à 0.2 % pour les sondes parfaitement complémentaires et de 0.3 % à 0.2 % pour les sondes quasiment complémentaires (Figure 107).

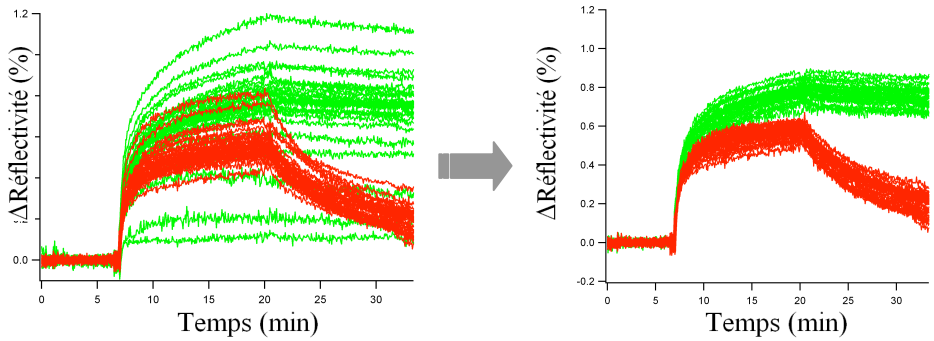


Figure 107 : Courbes de réflectivité en fonction du temps pour les signaux bruts (à gauche) et pour les signaux corrigés (à droite). Les courbes vertes correspondent aux spots des sondes parfaitement complémentaires et les courbes rouges correspondent aux spots des sondes quasiment complémentaires.

Chacune de ces techniques de correction sont inclues dans le protocole d'expérimentation et dans le protocole d'analyse des données.

3.3.4. Cycle de correction

Lors d'une étude sur un produit de patient ou un produit test de synthèse, nous effectuons un « cycle » d'injections nous permettant d'obtenir les coefficients de correction pour le saut d'indice et pour la calibration. Ce cycle d'injection repose sur une ligne de base correspondant à la valeur de réflectivité de la circulation de la solution tampon de PBS 1x. Cette ligne de base est utilisée comme référence pour le niveau de réflectivité de chacun des spots. Une fois cette ligne de base stabilisée, nous injectons pendant 5 minutes la solution de PBS 1.25x servant de saut d'indice. Nous injectons ensuite la solution tampon de base de PBS 1x. Cette première étape sert pour le calcul des inhomogénéités de surface et la correction de leurs effets sur chacun des spots. Sans arrêter le système, nous injectons une solution de cibles de calibration (cibles de synthèse de 20 bases) à une forte concentration : 5 µM. Nous mettons cette solution de 500 µL en circuit fermé, c'est-à-dire que le tuyau de sortie de la cuve est replacé dans le tube contenant la solution où puise déjà le tuyau d'entrée de la cuve. Nous gardons ce circuit fermé jusqu'à atteindre un équilibre d'interaction sur la puce. Cet équilibre est représenté par un plateau horizontal de réflectivité sur le signal. Le plateau est atteint de manière générale en une dizaine de minutes dépendamment de la taille de la cuve, de la vitesse de rotation de la pompe et de l'état des tuyaux. Comme la solution tampon et la solution de cibles de calibration n'ont pas exactement le même indice de réfraction, afin de garder des valeurs de réflectivité comparables, nous injectons à nouveau la solution tampon pendant 5 à 10 minutes. C'est l'étape de rinçage. Durant cette étape, nous obtenons exactement la valeur de réflectivité correspondant aux interactions de surface seules et non ajoutées à un changement d'indice de la solution circulante elle-même. Après 10 minutes de circulation de la solution tampon, nous injectons une solution de HCl (à 5 mM) pendant 1 minute afin de dénaturer la puce. Cette solution va diminuer le pH à l'intérieur de la cuve et les brins d'ADN vont se dissocier. Seules vont rester les sondes accrochées à la surface. Nous réinjectons la solution tampon pendant 5 minutes de manière à réobtenir le plateau stable de référence de réflectivité. La solution de cible d'intérêt est injectée et mise en circuit fermé

jusqu'à atteindre un plateau d'équilibre pour les cibles en forte concentration ou pendant 15 minutes pour les cibles en faible concentration (Figure 108).

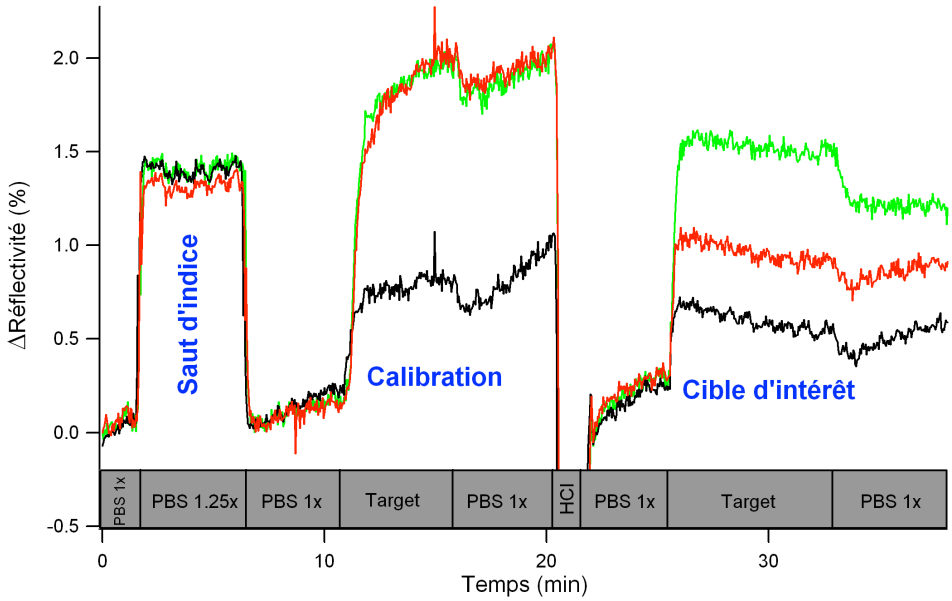


Figure 108 : Exemple d'un cycle d'injection pour l'analyse d'une cible. Les courbes représentent la variation de réflectivité en fonction du temps pour 3 spots différents : en rouge, un spot parfaitement complémentaire, en bleu un spot quasiment complémentaire, en noir un spot de référence. Chacune des étapes du cycle est observable. En premier, le saut d'indice, suivi de l'injection de la calibration et, enfin, de l'injection de la cible d'intérêt.

Tous les signaux sont enregistrés sans correction pendant l'expérience, même si l'utilisateur, pour des raisons pratiques, peut y soustraire les signaux de référence pour s'affranchir des dérives et artéfacts temporels. Nous avons développé un programme de post traitement qui analyse les données, extrait les signaux d'intérêt des autres informations, comme les inhomogénéités de surface ou les artefacts temporels, les classe et les met en forme. Ce programme est développé sous Igor et nous permet, outre le fait de localiser les zones d'interaction (paragraphe 2.5), de corriger la dispersion des données. L'ensemble des sauts d'indice est analysé, les coefficients calculés et les signaux modifiés en conséquence. Cette première correction peut paraître superflue du fait que l'information de dispersion due aux inhomogénéités du transducteur est aussi contenue dans la donnée de calibration. Mais elle est indispensable en vue de la correction par les balances de référence. Chaque signal, y compris les signaux issus des balances de référence, est nettoyé de l'influence du transducteur

et ramené à une valeur centrale. Grâce à cette première étape, il devient possible de soustraire les signaux de référence aux signaux d'intérêt. Comme nous l'avons mentionné, les différentes solutions injectées n'ont pas le même indice de réfraction et l'influence qu'ont les sauts d'indice sur leurs variations varie d'un endroit à l'autre de la puce. En normalisant toutes les données par le coefficient central du saut d'indice, les signaux de référence deviennent utilisables (Figure 109).

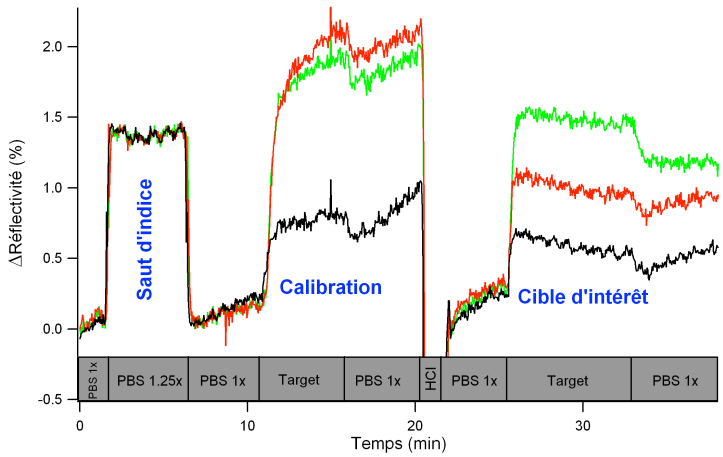


Figure 109 : Cycle d'injection corrigé par le saut d'indice. Les variations de réflectivité en fonction du temps pour les spots parfaitement complémentaires, quasiment complémentaires et de référence sont corrigées de la dispersion du transducteur.

L'étape suivante est l'étape de soustraction des signaux de référence dont les balances sont centrées sur les mailles élémentaires (Figure 110).

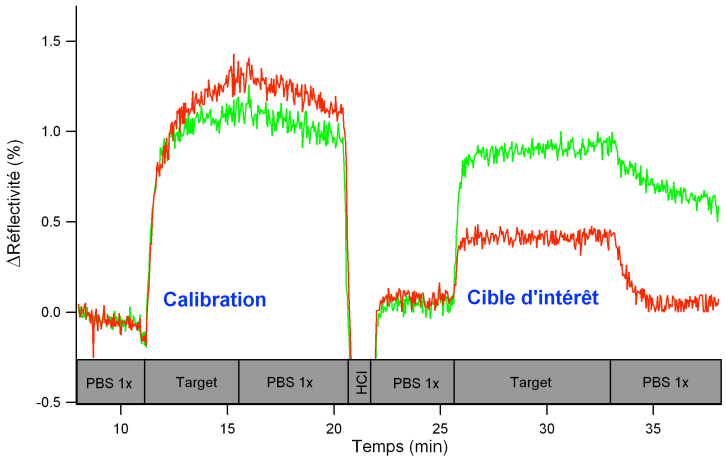


Figure 110 : Cycle d'injection corrigé par les spots de référence. Les artéfacts temporels sont retirés des signaux de calibration et d'intérêt.

La dernière étape consiste à calculer le coefficient de calibration et à retirer des signaux la dispersion due aux hétérogénéités de concentrations des sondes (Figure 111).

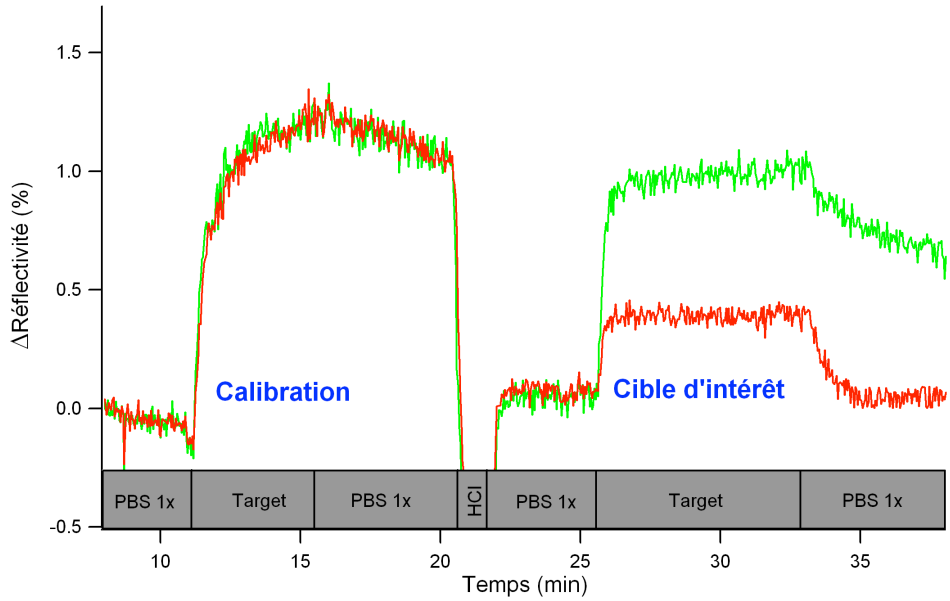


Figure 111 : Cycle d'injection corrigé par la calibration. Les signaux ne correspondent plus qu'aux réelles interactions entre les cibles et les sondes. Ici, la cible d'intérêt était une cible WT. Le spot WS a donc un plus fort signal que le spot MS. Lors de l'injection du PBS 1x directement après la circulation de la cible, nous observons un décrochement plus important sur le spot quasiment complémentaire que sur le spot parfaitement complémentaire.

Grâce à cette méthode de correction, des données la détermination de certains diagnostics est rendue possible.

3.3.5. Application au diagnostic génétique

Afin de valider la nécessité d'utiliser une méthode de correction de la dispersion des données, nous nous sommes placés dans les conditions correspondant au cas d'un diagnostic génétique difficile de produit de patient. Les oligonucléotides de synthèse utilisés sont des cibles de 25 bases en faible concentration : 0.05 µM. Cette faible concentration nous permet de nous placer dans des conditions similaires à l'envoi d'une cible issue de patient qui, pour une longueur de 400 bases, est injectée à une concentration de 0.06 µM. L'expérience suit une séquence simple. Sur une même puce composée d'un damier de spots WS et MS pour la mutation M470V, qui est une SNP, nous injectons séquentiellement une cible WT, une cible

MT et une solution cible HT. Pour chaque injection, nous effectuons un cycle complet comprenant un saut d'indice et une injection de cible de calibration. Chaque cible d'intérêt circule pendant 15 minutes. De chacune des balances est extrait un signal de différence entre les spots WS et les spots MS. En théorie, la pente du signal résultant indiquera le type de la cible injectée. Si la pente est positive, la cible est saine, si la pente est négative, la cible est mutée, si la pente est nulle, la cible est hétérozygote. Sans aucune correction, seule la redondance des spots sur la puce permet de déterminer le type de cible qui circule (Figure 112). Mais cette détermination ne peut être optimisée car elle n'est possible que suite à l'analyse d'une personne observant l'évolution de l'ensemble des signaux différentiels issus des balances répétées sur la puce.

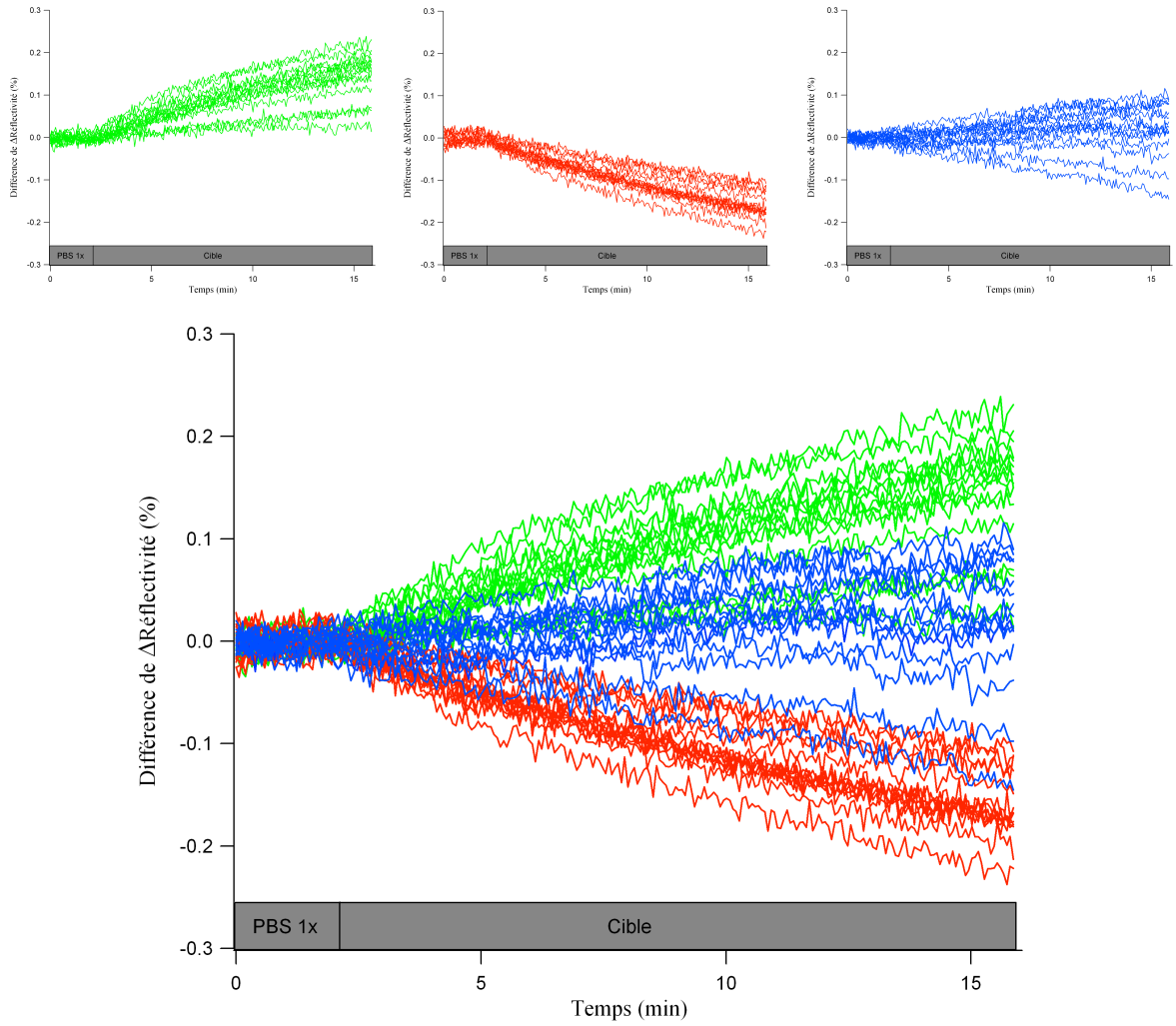


Figure 112 : Différence de variation de réflectivité en fonction du temps pour chacune des injections de cibles WT, MT et HT. Lorsque nous superposons les trois injections sur le même graphique, il devient difficile de différencier certains signaux WT et HT ainsi que certains MT et HT. Pour un diagnostic ne se basant que sur une ou deux balances, l'information ne peut être significative d'un type de cible particulier.

La correction par saut d'indice permet de disjoindre les signaux HT des deux autres types de signaux mais l'écart entre chacune des zones de confinement des signaux est trop faible pour qu'un diagnostic puisse être clair (Figure 113).

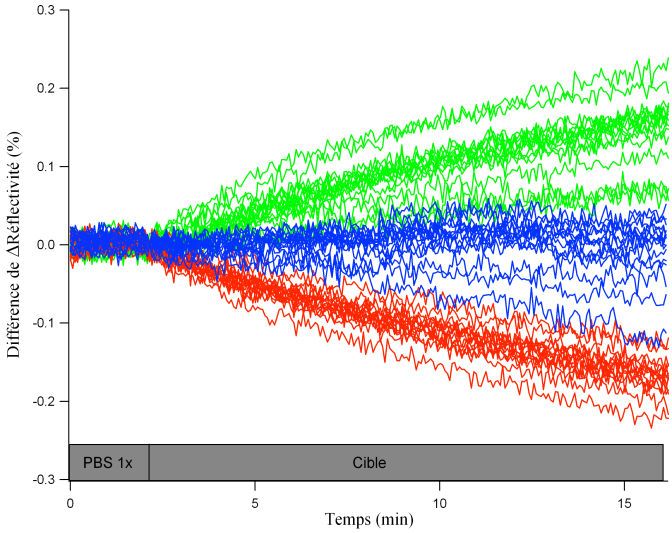


Figure 113 : Signaux de différence d'évolution de réflectivité des balances pour les trois types d'injections superposées et corrigés par le saut d'indice. Les signaux commencent à se différencier les uns des autres.

C'est grâce à la dernière correction par calibration que les signaux de différence suivent une direction particulière et identifiable pour chacune des injections (Figure 114).

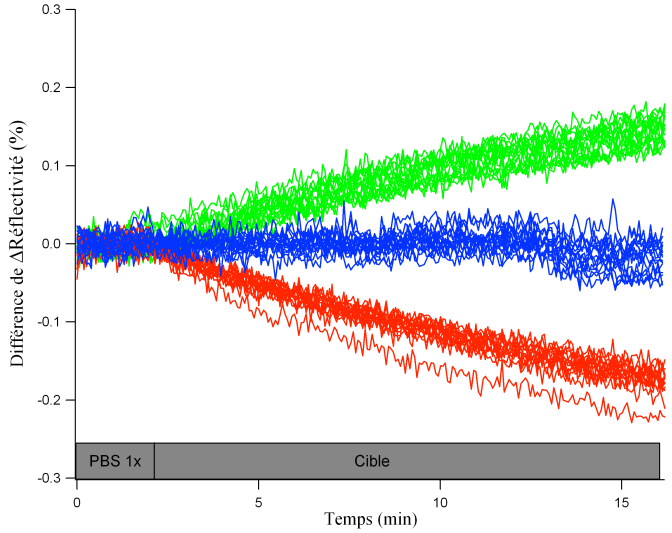


Figure 114 : Signaux de différence de l'évolution de réflectivité des balances pour les trois types d'injections superposées et corrigées par la méthode d'autocalibration. Au bout de 5 minutes de circulation des cibles, l'information du diagnostic commence à émerger, à partir de 10 minutes de circulation des cibles, le diagnostic peut être clairement établi sans ambiguïté.

Afin de valider la possibilité d'obtenir un diagnostic génétique par notre système de détection reposant sur la méthode d'autocalibration, il faut que les zones d'identification du type du patient (zone WT, zone MT et zone HT) soient bien différenciées. Dans le cas de notre expérimentation, il faut que l'ensemble des valeurs de réflectivité des trois injections se trouvent dans des zones disjointes les unes des autres. Afin d'observer l'écart des moyennes des réflectivités entre les trois injections, nous utilisons l'écart type :

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{\sum x_i - 1} \sum \left(y_i - \overline{m}_R\right)^2}$$

où $\sum x_i$ est le nombre de valeurs, y_i, la valeur de réflectivité du spot « i » et $\overline{m}_R$, la moyenne de la réflectivité sur l'ensemble des spots. Sans aucune correction, les moyennes de réflectivité des zones d'identification ne sont séparées que de 1σ maximum. 68% des valeurs seront alors contenues dans les bons cônes d'identification alors que les 32% restant donneront de faux diagnostics. La correction par saut d'indice, même si elle est indispensable à l'autocalibration, n'améliore pas beaucoup cette statistique. Ce n'est qu'avec l'autocalibration totale que la discrimination du type du patient peut se faire sans équivoque. En effet, dés la 10ème minute de circulation du produit cible dans la cuve, les moyennes de réflectivités des trois zones d'identifications sont séparées de plus de 2σ, soit plus de 95% des valeurs contenues dans le bon cône d'identification. Au bout de 13 minutes de circulation, la séparation excède les 3σ, soit plus de 99.6% des valeurs contenues dans le bon cône d'identification (Figure 115).

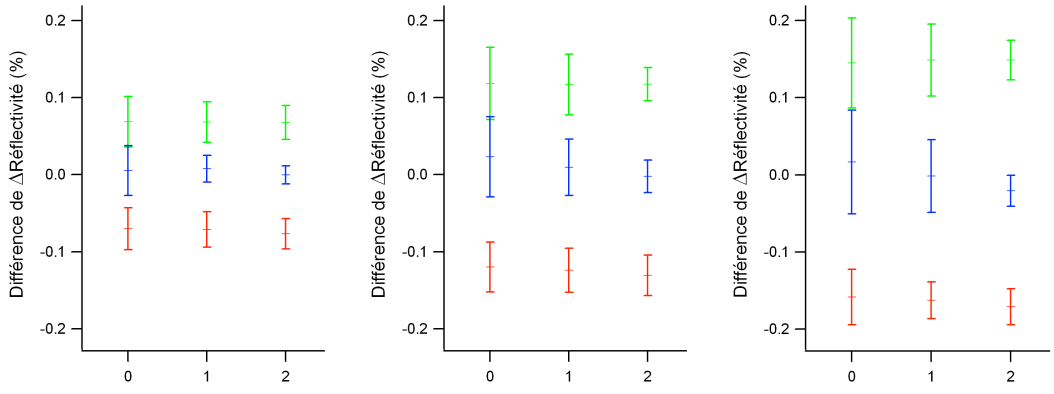


Figure 115 : Moyenne des valeurs de réflectivité et écart type des données brutes (0), corrigées par saut d'indice (1) et corrigées par autocalibration (2) pour une circulation de 5minutes (gauche), 10 minutes (centre) et 13 minutes (droite) de la solution cible dans la cuve. En vert, sont représentées les données correspondant à l'injection d'une cible WT, en rouge celles d'une cible MT et en bleu, celles d'une solution HT.

Si nous représentons ces variances en fonction du temps pour les données brutes et les données corrigées, nous constatons qu'il devient très facile d'identifier le type de sonde après correction alors qu'il subsiste toujours une incertitude pour les données brutes (Figure 116).

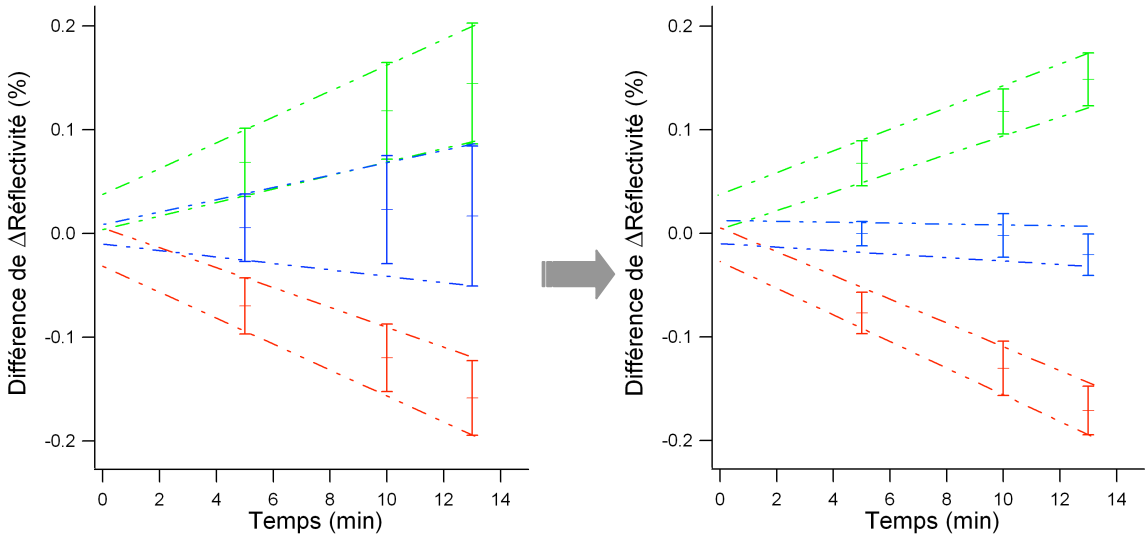


Figure 116 : Graphiques de l'évolution de la moyenne de la différence de réflectivité en fonction du temps pour la version brute des données (gauche) et corrigée (droite). En vert, l'injection d'une cible WT, en rouge, d'une cible MT et en bleu d'une cible HT.

3.3.6. Conclusion

Grâce à notre méthode de correction des données par autocalibration, nous arrivons à nous affranchir de la dispersion des données due à l'inhomogénéité de la surface (dépôt métallique, fonctionnalisation,..), due aux artéfacts temporels et due à l'inhomogénéité de la concentration des sondes déposées sur la puce. Cette correction nous permet d'obtenir un diagnostic génétique pour une SNP (la M470V) avec une précision excédant les 99,6%. Il faut toutefois considérer que la loi statistique de l'écart type n'est pas bornée et le pourcentage inclue les ailes de la distribution des valeurs (Figure 117).

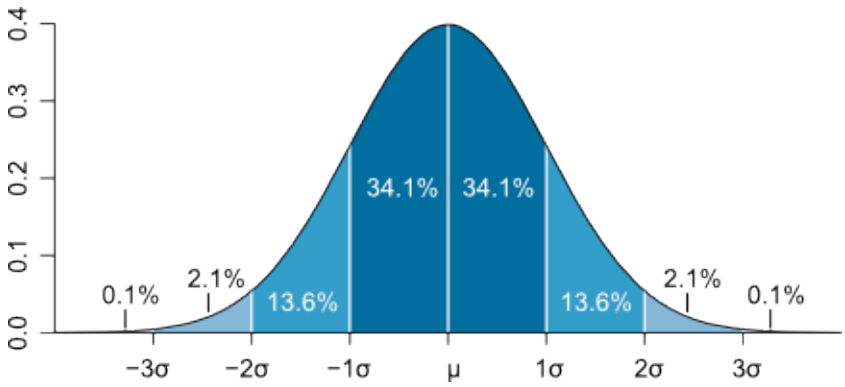


Figure 117 : Diagramme de répartition des valeurs suivant une loi d'écart type.

Dans notre cas, le nombre de valeurs correspond au nombre de réplicats des spots sur la puce car le signal utilisé est une moyenne des signaux de chacun des pixels composant le spot. Nous avons donc un maximum et un minimum de différence de réflectivité. Cette notion de bornes diminue considérablement la probabilité d'erreur compte tenu du fait que la méthode d'autocalibration inclut une élimination des spots défectueux. C'est-à-dire que, lors de l'injection de la cible de calibration, les spots n'ayant pas une réponse suffisamment importante par rapport à la moyenne des réponses sont éliminés. Ce seuil est actuellement réglé à 50% du signal moyen de calibration et est modifiable manuellement. De ce fait, la soustraction entre les réponses des spots WS et les spots MS ne dépasseront pas un écart de 2σ par rapport à la moyenne.

3.4. Température

Pour pouvoir comparer qualitativement et quantitativement des interactions ADN : ADN, il faut que les expériences réalisées soient reproductibles. Or ces interactions, outre la nature des produits utilisés, dépendent fortement de la température ambiante lors des expériences, comme le montre le calcul du T_M. En effet, plus la température de manipulation est élevée, plus l'agitation thermique va favoriser l'état simple brin à l'état double brin dans la cuve. Il apparaît alors nécessaire de maîtriser la température afin de fixer ce paramètre important pour l'hybridation sur la puce. Par le biais du système décrit dans le chapitre 2.1.3.La régulation de température, la température de la cuve est stabilisée à +/- 0.05°C. Cette régulation contrôlée nous permet de changer la température de la cuve sur des gammes qui ont évolué au fil des améliorations du système.

Outre le fait de pouvoir obtenir des résultats plus reproductibles, le système de régulation de température nous permet d'étudier les conditions thermiques pour lesquelles la détection d'une mutation par discrimination sur une balance est la plus évidente. Comme nous l'avons dit, toutes les valeurs de T_M obtenues par le biais de la méthode du 'next nearest neighbour' de John SantaLucia Jr. concernent une hybridation en solution. Dans notre cas, la valeur réelle du T_M est différente. Elle doit tenir compte de la réduction des degrés de liberté des sondes qui sont fixées à la surface. Nous avons donc essayé de connaître le T_M exacte de chacune des interactions.

Dans un premier temps, notre système de régulation ayant une évacuation thermique trop faible, il n'était pas possible d'évacuer les calories du radiateur (voir chapitre 2.1.3.La régulation de température) de manière efficace. Un refroidissement intensif n'était alors pas possible. Les premières expérimentations portaient sur une gamme allant de 23°C à 40°C maximum. Au-delà, des bulles de dégazage apparaissaient dans la solution circulante et se bloquaient dans la cuve rendant les spots situés dessous inutilisables. En deçà, le radiateur n'arrivant pas à évacuer les calories, le système de régulation divergeait et la température se mettait à augmenter à nouveau jusqu'à des valeurs pouvant atteindre les 80°C pour des commandes à 10°C.

Lors de précédentes études, et notamment durant la thèse de Nathalie Bassil, l'équipe a défini une relation de manière expérimentale entre la variation de réflectivité obtenue pour un spot (ΔR) et le T_M de l'interaction des sondes le composant. Cette relation est la suivante :

$$\Delta R(T_M) = \frac{\alpha}{1 + \exp[\beta \cdot (\frac{T_M - \gamma}{\gamma})]} \qquad \underline{Eq3.1}$$

où α, β et γ sont des constantes obtenues de manière expérimentale mais dépendantes des conditions initiales de système sur lequel on les calcule. Dans la thèse de Nathalie Bassil, α valait 0.037% par base, β valait 60 et γ était une température de correction des effets de surface et valait 32°C avant et 38°C après rinçage. Afin de valider cette relation empirique, nous avons déposé la même matrice que pour le chapitre 3.2.2.Concentration des sondes. Les sondes utilisées sont celles regroupées dans le tableau récapitulatif de la Figure 88 et la matrice s'architecture autour des mêmes mailles élémentaires (Figure 95) en une matrice 18 par 18 spots. En premier lieu, nous avons fait varier la température sur 3 paliers : 25, 29 et

33°C. Pour chacune des sondes déposées sur la puce, nous tirons trois valeurs de réflectivité, une pour chaque température. Si nous prenons l'exemple d'une injection d'une cible oligonucléotide de 25 bases WT pour la mutation Q493X (5' TCCAGGAAAACTGAGAACAGAATGA 3'), nous aurons 3 valeurs de réflectivité pour son interaction avec la sonde WS, 3 autres pour son interaction avec la sonde MS, encore 3 valeurs pour son interaction avec la sonde WS+m et 3 dernières pour son interaction avec la sonde MS+m (Figure 88). Les quatre valeurs de T_M correspondantes sont :

WT/WS : 42.1°C

WT/MS : 32.2°C

WT/WS+m : 31.4°C

WT/MS+m : 12.9°C

Pour chacune de ces interactions, il existe alors une relation liant le taux de duplexes à la température de la solution, ce taux valant 50% à la valeur du T_M de l'interaction (Figure 21). Ca taux est alors représenté, dans notre système, par une variation de réflectivité en fonction de la température (Figure 118).

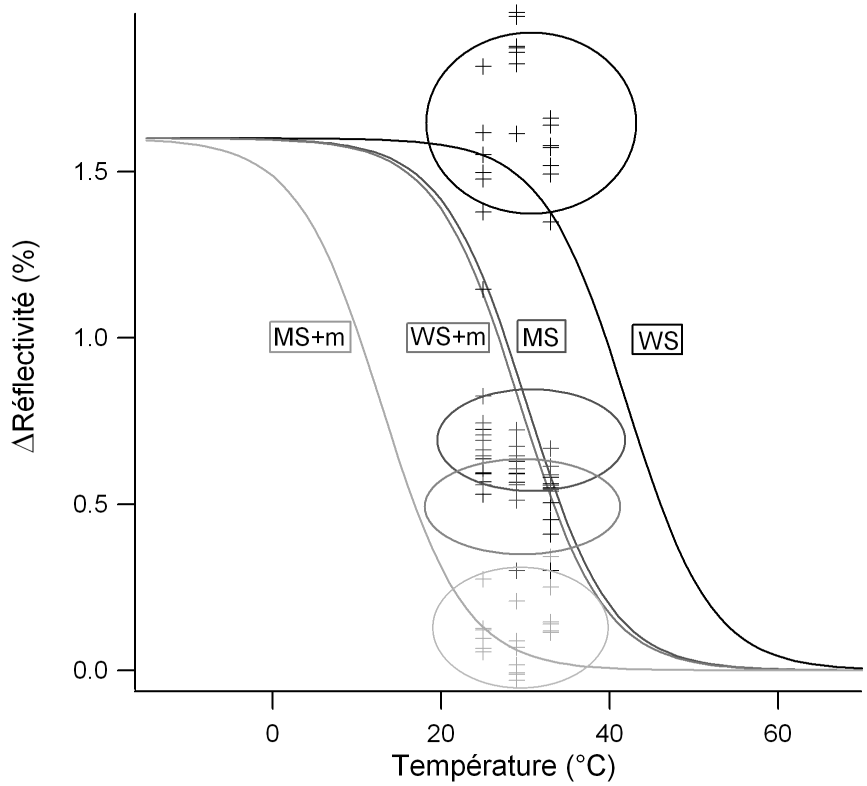


Figure 118 : Courbes théoriques de la réflectivité en fonction de la température pour les balances ciblant la mutation Q493X à l'injection d'une cible WT. Les ensembles de points correspondent aux réponses des spots d'un même type de balance. Il y a trois balances : MS+m, WS+m, MS et WS. Pour chacune des interactions, nous avons une courbe théorique de la variation de réflectivité en fonction de la température.

Afin d'observer ce signal de réflectivité de manière globale, nous pouvons représenter son évolution en fonction de la température soustraite du T_M de chacune des interactions. Cette représentation permet de superposer chacune des courbes obtenues lors d'une même injection et de recouvrir une plus grande partie de la courbe théorique (Figure 1197).

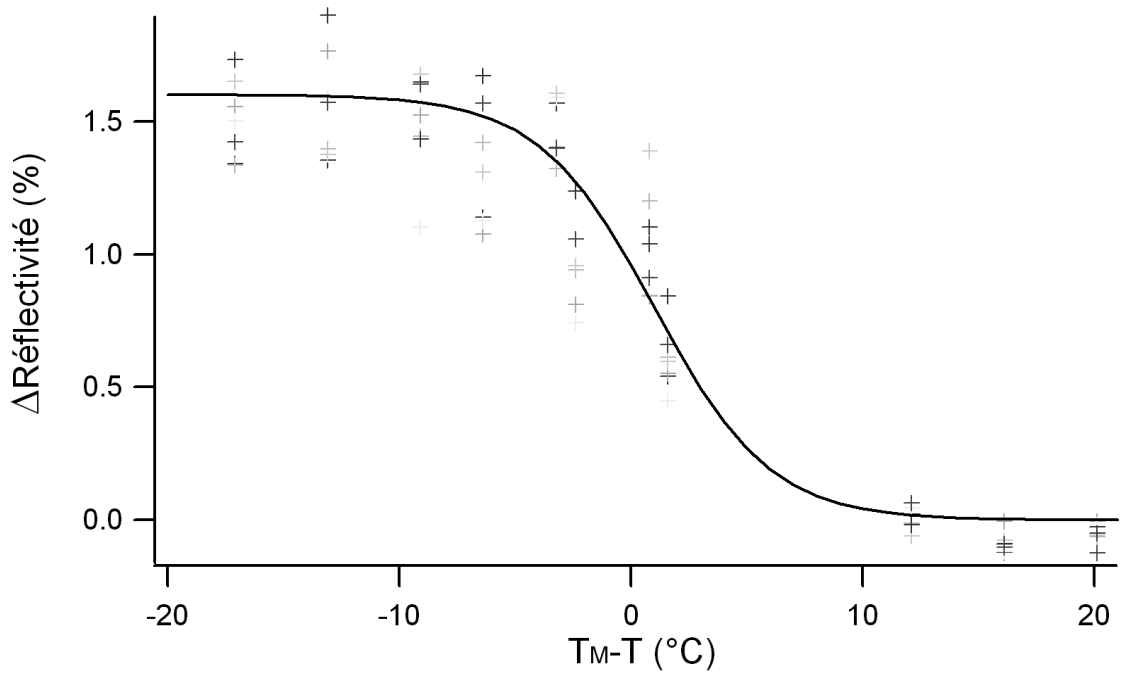


Figure 119 : Courbes de réflectivité en fonction de T-TM pour un ensemble de balances ciblant la mutation Q493X lors d'une injection d'une cible WT. La courbe noire représente la courbe théorique pour ces interactions.

Dans la Figure 119, chaque ensemble vertical de point correspond à l'ensemble des réflectivités obtenues pour un type de spot répliqué sur la puce. La dispersion est importante compte tenu du fait que les données ne sont pas corrigées par calibration, ces sondes n'ayant pas de séquence de calibration à cette période de ma thèse. En regroupant les valeurs de réflectivité sur un même graphique en fonction de T_M-T, nous pouvons nous contenter d'effectuer une étude sur une échelle plus réduite de température. Chacune des quatre interactions avec la cible WT décrira une portion de l'évolution de la réflectivité en fonction de T_M-T. Dans l'expérience, nous avons injecté plusieurs cibles WT et nous avons pu observer plusieurs comportements. Les balances ciblant les mutations 1716-1 et V520F (voir tableau de la Figure 88) décrivent une courbe décentrée. C'est-à-dire que les T_M calculés sur le site de Michael Zuker ne correspondent pas réellement aux interactions qui ont lieu sur notre puce (Figure 120).

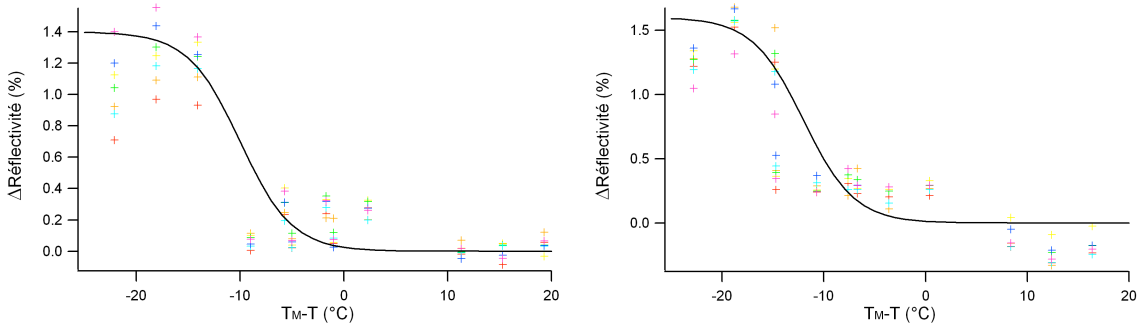


Figure 120 : Courbes de réflectivité en fonction de T-TM pour un ensemble de balances ciblant la mutation 1716-1 (gauche) et V520F (droite) lors d'une injection d'une cible WT. La courbe noire représente la courbe théorique pour ces interactions.

Nous en avons conclu qu'il était possible d'obtenir expérimentalement la sigmoïde théorique pour chacune des interactions que nous étudions en faisant varier la température dans la cuve sur une gamme plus importante. Le régulateur de température a été amélioré de manière à permettre un refroidissement de la cuve jusqu' 'à 7°C. Sur la base des expérimentations précédentes nous avons étendu les séquences ciblées aux exons 3 et 9 de la CFTR. Pour causes de problèmes de fonctionnalisation et de dépôt matriciel, ces dernières expérimentations n'ont pas pu être réalisées dans des conditions permettant une bonne extraction des données. Cependant, nous avons pu en retirer une relation concernant l'évolution de la vitesse d'hybridation en fonction de la température. Dans une gamme allant de 7°C à 27 °C de commande (par pas de 2°C en commande), nous avons injecté une solution de cibles WT de synthèse en forte concentration (5µM). La Figure 121 montre une cinétique d'interaction pour trois balances différentes à une température réelle de cuve de 14.2°C (soit une commande de 11°C). La balance ciblant la mutation Q493X de l'exon 10, celle ciblant la mutation D443Y de l'exon 9 et celle ciblant la mutation 394delTT de l'exon 3. Les deux premières mutations étant des SNP, les réponses des sondes WT et MT sont quasiment identiques. La dernière est une délétion et la différence ente les signaux WT et MT est déjà grande pour une température faible. Les séquences des simples brins d'ADN de la Figure 121 sont :

Sonde Q493X WS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGTGTTCTCAGTTT 3'

Sonde Q493X MS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGTGTTCTTAGTTT 3'

Cible Q493x WT : 5' TCCAGGAAAACTGAGAACAGAATGA 3'

Sonde D443Y WS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGTCCTGAAAGATATTA 3'

Sonde D443Y WS : 5' TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGTCCTGAAATATATTA 3'

Cible D443Y WT : 5' TCCAGGAAAACTGAGAACAGAATGA 3'

Sonde 394delTT WS : 5’ TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGATCTTTTTATATTT 3’

Sonde 394delTT MS : 5’ TTTTTTTTTTGACCGGTATGCGAATCTTTATATTTA 3’

Cible 394delTT WT : 5’ CCCCTAAATATAAAAAGATTCCATA 3’

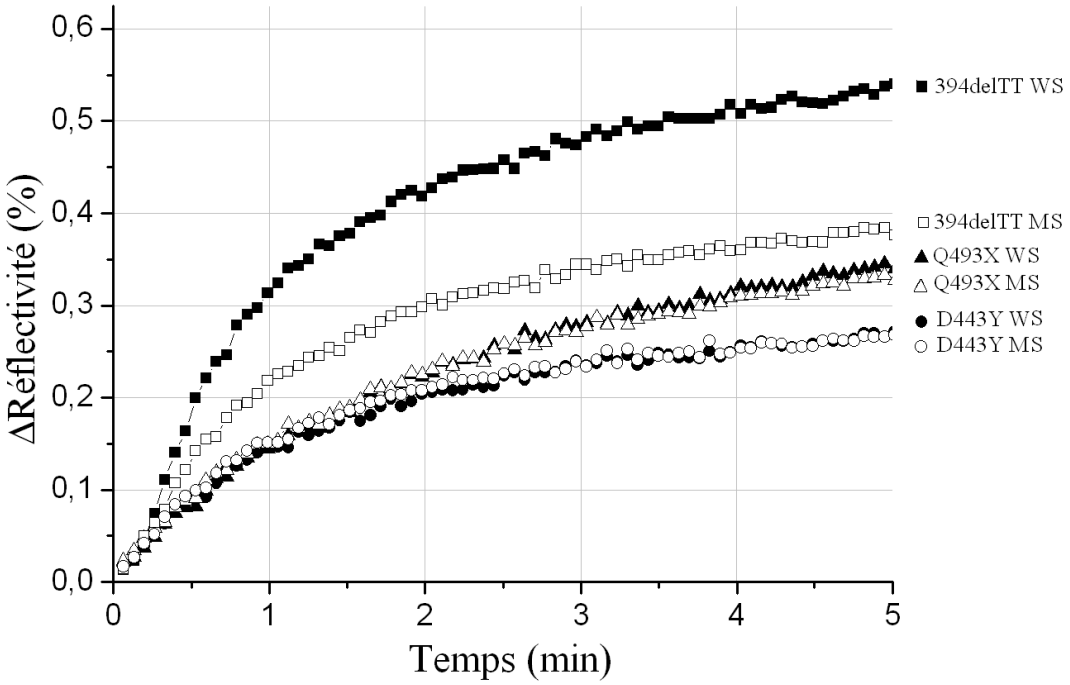


Figure 121 : Cinétiques d’hybridation pour trois balances différentes : Q493X, D443Y et 394delTT. Les courbes montrent les réponses des spots WS et MS pour chacune des trois mutations à l’injection des cibles WT correspondantes à une température de cuve de 14°C.

Chacune des cinétiques est comparée à une loi de Langmuir en mono-exponentielle. Ce modèle prend en compte une sonde fixée à une surface interagissant avec une cible en solution [cvi]. L’hybridation des sondes est une fonction du temps, elle est directement proportionnelle à la mesure de variation de réflectivité ΔR(t) et s’écrit comme suit :

$$\Delta R(t) = \Delta R_{eq}\left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}\right) \qquad \underline{Eq.3.1}$$

où ΔR_{eq} est la valeur de réflectivité atteinte à l’équilibre et τ est la constante de temps de la cinétique d’hybridation. Cette constante de temps est directement liée à la constante d’interaction des molécules mises en contact.

La Figure 122 montre un exemple de courbes obtenues par ajustement des données suivant une loi de Langmuir de la cinétique normalisée du spot WS de la mutation 394delTT.

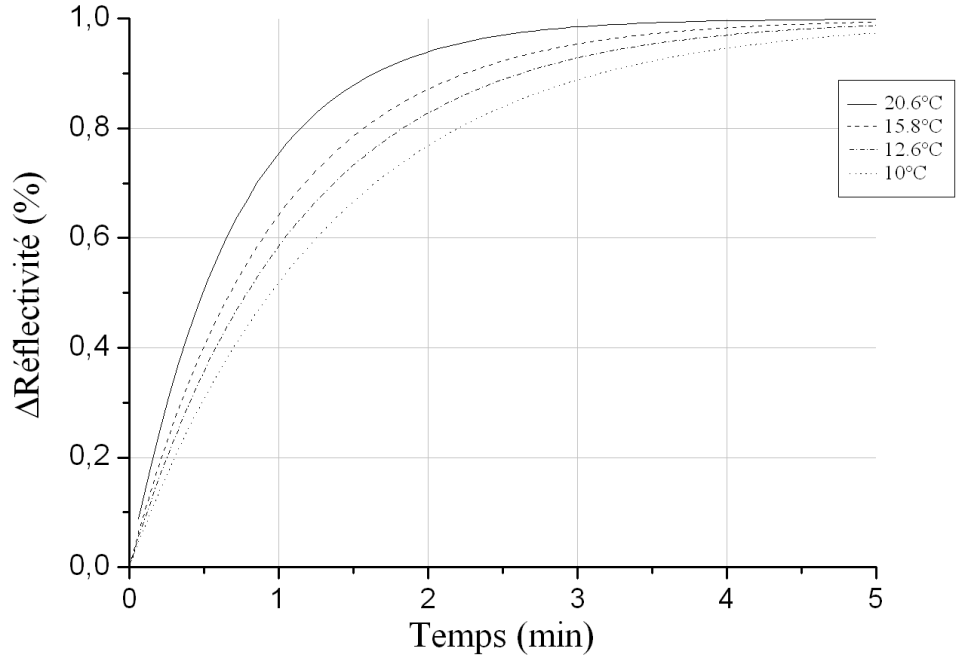


Figure 122 : Ajustements de Langmuir de cinétiques d'interaction normalisées pour la sonde 394delTT lors d'une injection d'une cible WT pour trois températures : 10, 12.6, 15.8 et 20.6 °C. Plus la température d'expérimentation est basse, plus la constante de temps de l'ajustement exponentiel est grande.

Pour chacun de ces ajustements, plus la constante de temps de la courbe est important, moins la réaction est rapide. Et moins la réaction est rapide moins le taux de d'association est important devant le taux de dissociation. Nous pouvons définir la fraction de sondes hybridées (ζ) sur un spot par la relation suivante :

$$\frac{d\zeta}{\mathrm{dt}} = k_{ass} \cdot c(1-\zeta) - k_{dis} \cdot \zeta$$

où k_{ass} et k_{dis} sont les constante d'association et de dissociation et c est la concentration en cibles. Nous en déduisons la cinétique d'interaction K :

$$K = \frac{k_{ass}}{k_{diss}}$$

Pour qu'un duplexe puisse se former de manière stable il faut que k_{ass} soit supérieur à k_{dis}.

Les lois thermodynamiques mènent à la relation dépendante de la température suivante :

$$-R.T.\ln(K) = \Delta H - T.\Delta S \qquad \underline{Eq.3.2}$$

où R est la constante des gaz parfaits, ΔH la variation de l'enthalpie de la réaction d'hybridation et ΔS la variation de son entropie. La variation de l'enthalpie d'un système exprime la quantité de chaleur mise en jeu pendant la transformation d'un système thermodynamique à pression constante. L'entropie mesure la quantité de désordre d'un système au niveau microscopique. Nous considérons ces valeurs indépendantes de la température dans la petite gamme décrite par notre système de régulation. En émettant l'hypothèse que la constante de temps issue de l'équation 3.1 est inversement proportionnelle à la constante de réaction, nous obtenons :

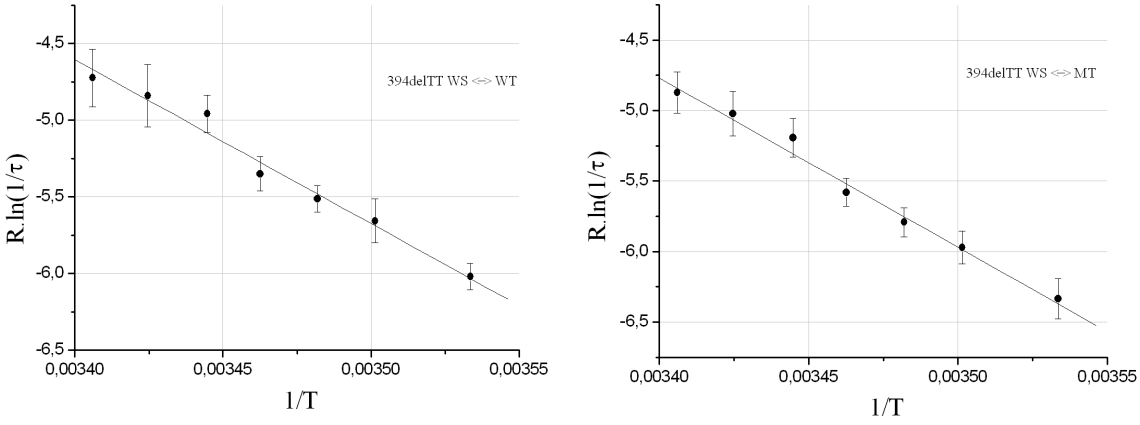
$$-R.\ln\left(\alpha \cdot \frac{1}{\tau}\right) = \frac{\Delta H}{T} - \Delta S$$

Qui devient :

$$R.\ln\left(\frac{1}{\tau}\right) = E_0 - \frac{\Delta H}{T} \qquad \textit{Eq.3.3}$$

où E_0 est un terme indépendant de la température.

La Figure 123 montre la relation entre la constante de temps et la température pour la sonde 394delTT WS et la sonde Q493X WS à l'injection de leur cible WT et MT.



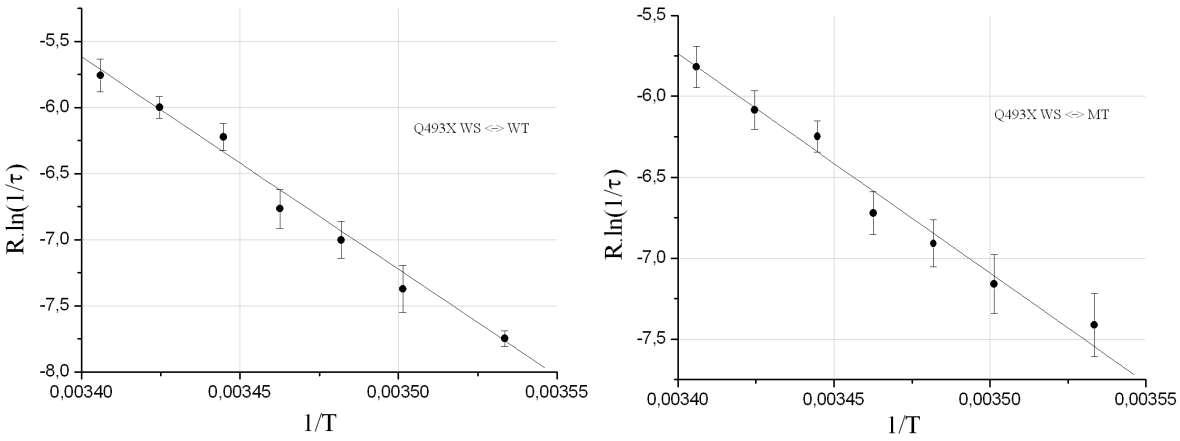


Figure 123 : Représentation de la constante de temps de la réaction en fonction de la température pour deux type de sondes : 394delTT WS et Q493X WS à l'injection de leur cible WT et MT respectives. Les valeurs expérimentales valident la relation linéaire prévue par l'équation 3.3.

Les valeurs de ΔH peuvent être extraites en calculant la pente des ajustements linéaires. Nous obtenons, par exemple, les valeurs suivantes :

Sonde Q493X WS – Cible WT : $\Delta H = -16.1$ kcal.mol^{-1} (+/-0.8)

Sonde Q493X WS – Cible MT : $\Delta H = -13.6$ kcal.mol^{-1} (+/-1.4)

Sonde 394delTT WS – Cible WT : $\Delta H = -10.7$ kcal.mol^{-1} (+/-1.1)

Sonde 394delTT WS – Cible MT : $\Delta H = -12$ kcal.mol^{-1} (+/-1.3)

Malgré le comportement linéaire de la relation entre la constante de temps de la réaction et la température, les valeurs de la pente ne sont pas en adéquation avec la théorie. En effet, ces valeurs semblent très en deçà des prévisions de John SantaLucia Jr. qui peuvent être obtenues sur le site de Michael Zuker :

Sonde Q493X WS – Cible WT : $\Delta H = -89.2$ kcal.mol^{-1}

Sonde Q493X WS – Cible MT : $\Delta H = -73.9$ kcal.mol^{-1}

Sonde 394delTT WS – Cible WT : $\Delta H = -126.3$ kcal.mol^{-1}

Sonde 394delTT WS – Cible MT : $\Delta H = -122.4$ kcal.mol^{-1}

Une étude plus approfondie de ces effets par l'équipe de T. Livache [cvii] arrive à une conclusion similaire.

Les valeurs obtenues montrent clairement soit une limitation de nos expérimentations soit du calcul théorique. Deux hypothèses ont été émises quant à la nature d'une limitation de nos résultats expérimentaux. La première repose sur le problème de l'ajustement lui-même. Les constantes de temps des cinétiques d'interactions étant trop importantes et les points de mesure trop espacés, il est difficile d'obtenir une corrélation exacte entre le modèle mono-

exponentielle et les données brutes. Pour résoudre ce problème, nous avons prévu des expérimentations durant lesquelles les cibles injectées seront en concentration faibles, de l'ordre de 0.5 µM. Cette modification du produit injecté permettrait d'obtenir des cinétiques d'interaction plus lentes afin de multiplier le nombre de relevés expérimentaux sur la partie initiale de ces cinétiques et, ainsi, obtenir un ajustement plus efficient.

La deuxième hypothèse tient compte de la capacité des simple brins d'ADN à s'auto-hybrider (voir chapitre 1.2.1.Qu'est-ce que l'ADN ? et le chapitre 3.5.Structures secondaires). En effet, les sondes, tout comme les cibles, du fait de leur faible longueur de persistance (Figure 20), peuvent former des structures secondaires et ainsi rendre moins accessible une partie de leur séquence. Une description plus approfondie du phénomène des structures secondaires est développée dans la partie suivante. Ces structures deviennent moins stables à mesure que la température augmente. Il pourrait être envisageable de renouveler les expérimentations à des températures plus élevées afin de favoriser les interactions des sondes avec les cibles plutôt qu'avec elles-mêmes. A l'heure actuelle, ces expérimentations n'ont pas encore pu être réalisées pleinement compte tenu de problèmes de fonctionnalisation et de dépôt des sondes.

3.5. Structures secondaires

L'utilisation d'un matériel génétique simple brin en solution permet l'hybridation de ce brin sur lui-même du fait de sa courte longueur de persistance (Figure 20). Ces structures secondaires modifient l'accessibilité des séquences ciblées par les sondes. En effet, si une mutation potentielle se situe sur un fragment d'exon auto-hybridé, la sonde permettant la détection de cette mutation ne pourra pas s'hybrider facilement avec sa séquence cible, déjà en duplexe. De plus, les sondes elles-mêmes peuvent former ces structures secondaires empêchant une cible d'interagir avec elle. La formation de chacune des structures secondaires dépend des caractéristiques du milieu ambiant. La température, la concentration en Na^+, de manière générale la stringence de la solution, vont influer sur la stabilité d'une structure secondaire et sur sa probabilité d'exister. De la même manière que les valeurs de T_M théorique, les formes de structures secondaires probables pour un simple brin d'ADN ont été calculées sur le site de Michael Zucker : http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi qui fournit pour une séquence, une température, une concentration en Na^+ et Mg^{2+} données les structures secondaires les plus probables que pourra prendre le brin d'ADN. Si nous prenons

l'exemple de l'exon 10 dont la séquence est la suivante : 5' CATTCACAGTAGCTTACCCATAGAGGAAACATAAATATATGTAGACTAACCGA TTGAATATGGAGCCAAATATATAATTTGGGTAGTGTGAAGGGTTCATATGCATAA TCAAAAAGTTTTCACATAGTTTCTTACCTCTTCTAGTTGGCATGCTTTGATGACGC TTCTGTATCTATATTCATCATAGGAAACACCAAAGATGATATTTTCTTTAATGGTG CCAGGCATAATCCAGGAAAACTGAGAACAGAATGAAATTCTTCCACTGTGCTTAA TTTTACCCTCTGAAGGCTCACGTTCTCCCATAATCATCATTAGAAGTGAGATCTGG AAATAAAACCCATCATTATTAGGTCATTATCAAATCACGCTCAGGA 3' à une température de 22 °C, une concentration de Na^+ = 0.138 M et une concentration de Mg^{2+} = 0, nous obtenons 3 structures possibles (Figure 124, Figure 125 et Figure 126).

Dans un premier temps, nous avons étudié l'accessibilité des séquences ciblées par les sondes en fonction du pourcentage de bases libres de structures secondaires pour différentes valeurs de température (Figure 127, Figure 128 et Figure 129). Cette valeur donne une première approche d'un coefficient d'accessibilité réel qui régule les interactions au sein de la cuve. Plus le coefficient d'accessibilité est élevé, plus l'hybridation entre la cible et la sonde sera favorisée. Basé sur cette première méthode de prédiction de l'accessibilité des séquences cibles, nous projetons d'en complexifier le calcul en prenant en compte par exemple le nombre de bases C et G occupées et libres. En effet, plus il y aura de bases C et G libres par rapport au nombre de bases occupées total, plus il sera facile au brin sonde de briser la structure secondaire pour s'hybrider sur la cible, le lien C-G étant plus fort que le lien T-A.

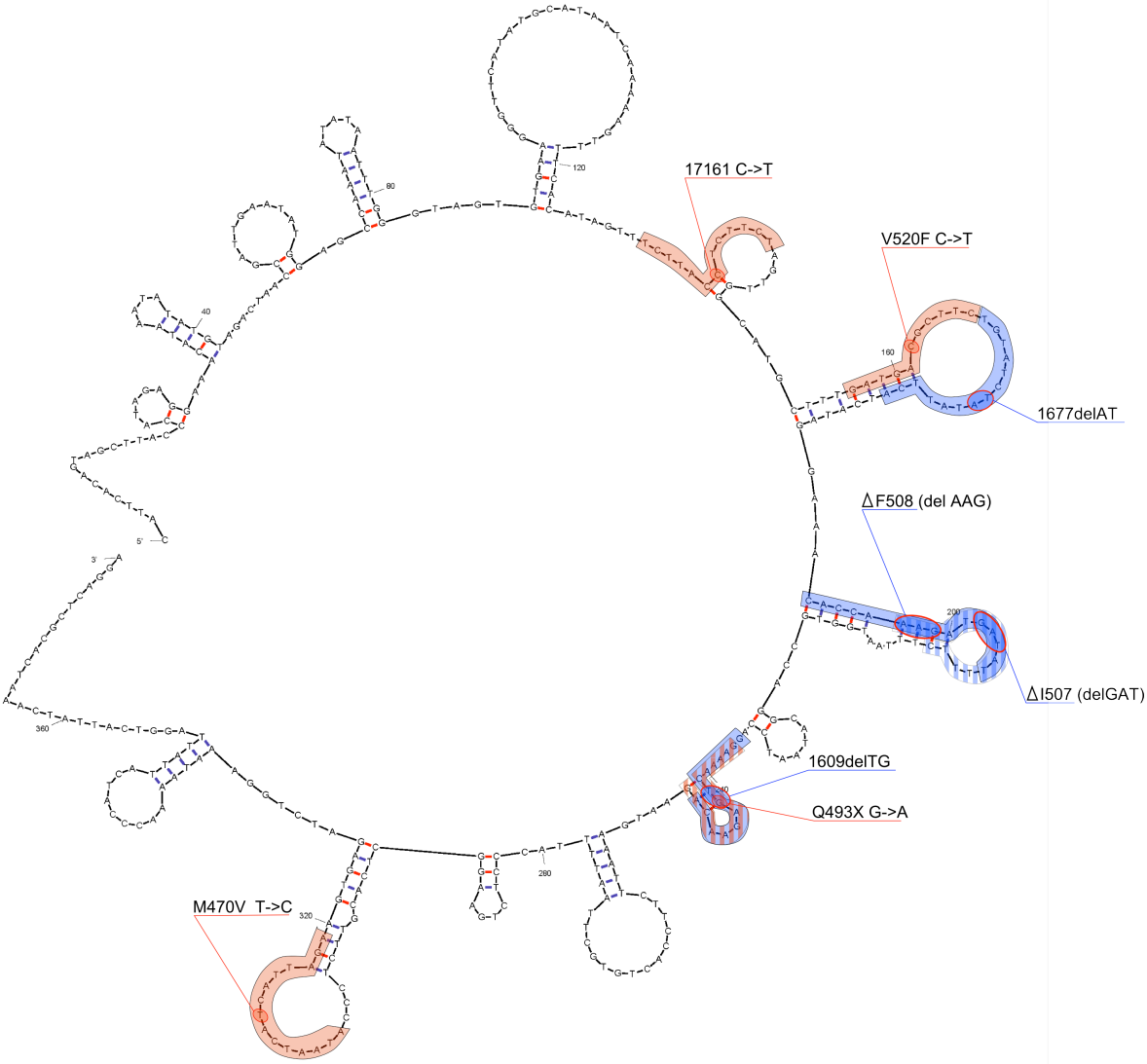


Figure 124 : Structure secondaire numéro 1 de l'exon 10 à une température de 22°C et une concentration en Na^+ de 0.138 M avec un ΔG de -33 $kcal.mol^{-1}$. Les SNP sont surlignées en rouge, les délétions, en bleu. Certaines séquences ciblées par les sondes se recouvrent comme entre la Q493X et la 1609delTG ou la ΔF508 et la ΔI507.

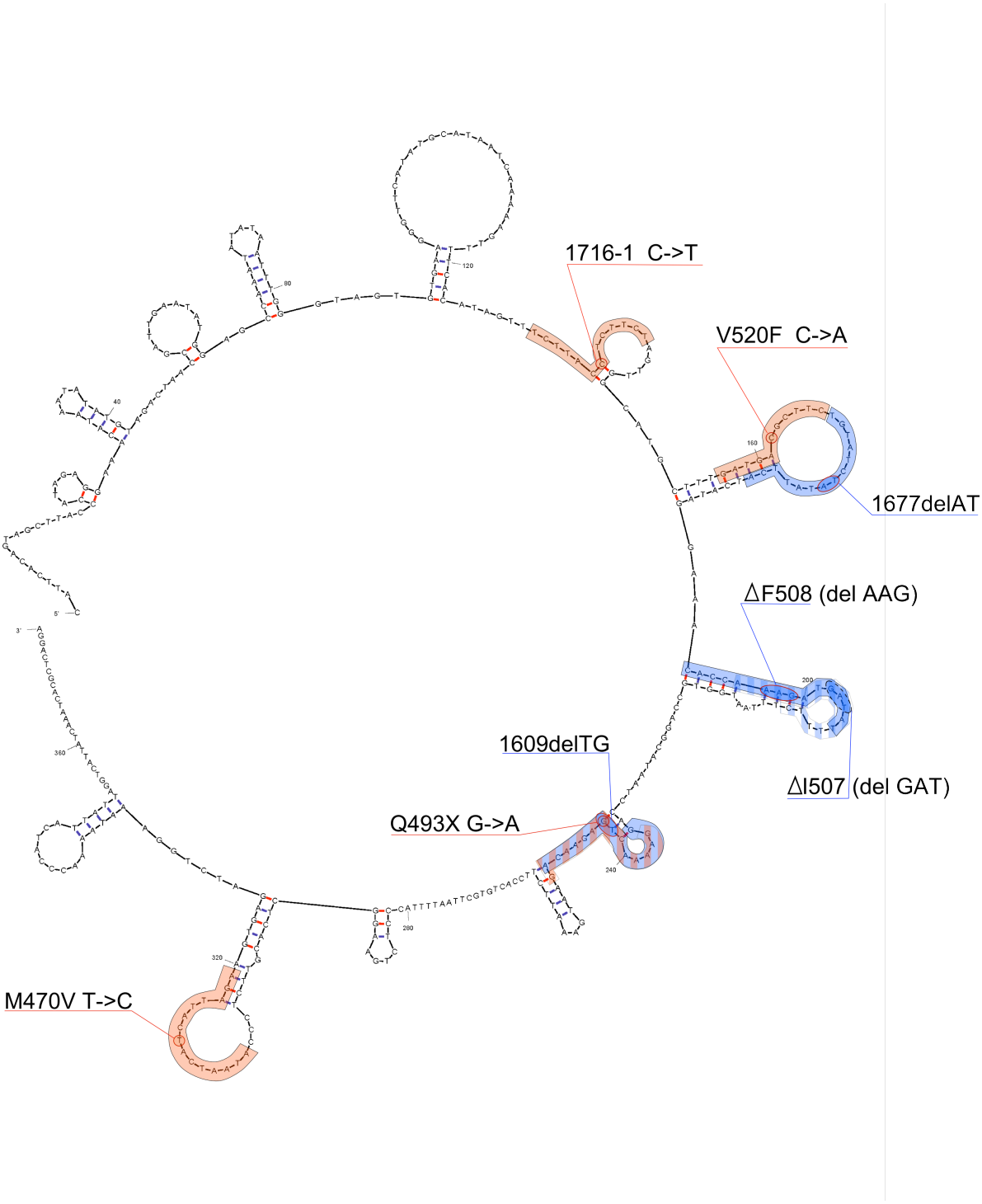


Figure 125 : Structure secondaire numéro 2 de l'exon 10 à une température de 22°C et une concentration en Na^+ de 0.138 M avec un ΔG de -32.36 kcal.mol^{-1}. Les SNP sont surlignées en rouge, les délétions, en bleu. Certaines séquences ciblées par les sondes se recouvrent comme entre la Q493X et la 1609delTG ou la ΔF508 et la ΔI507.

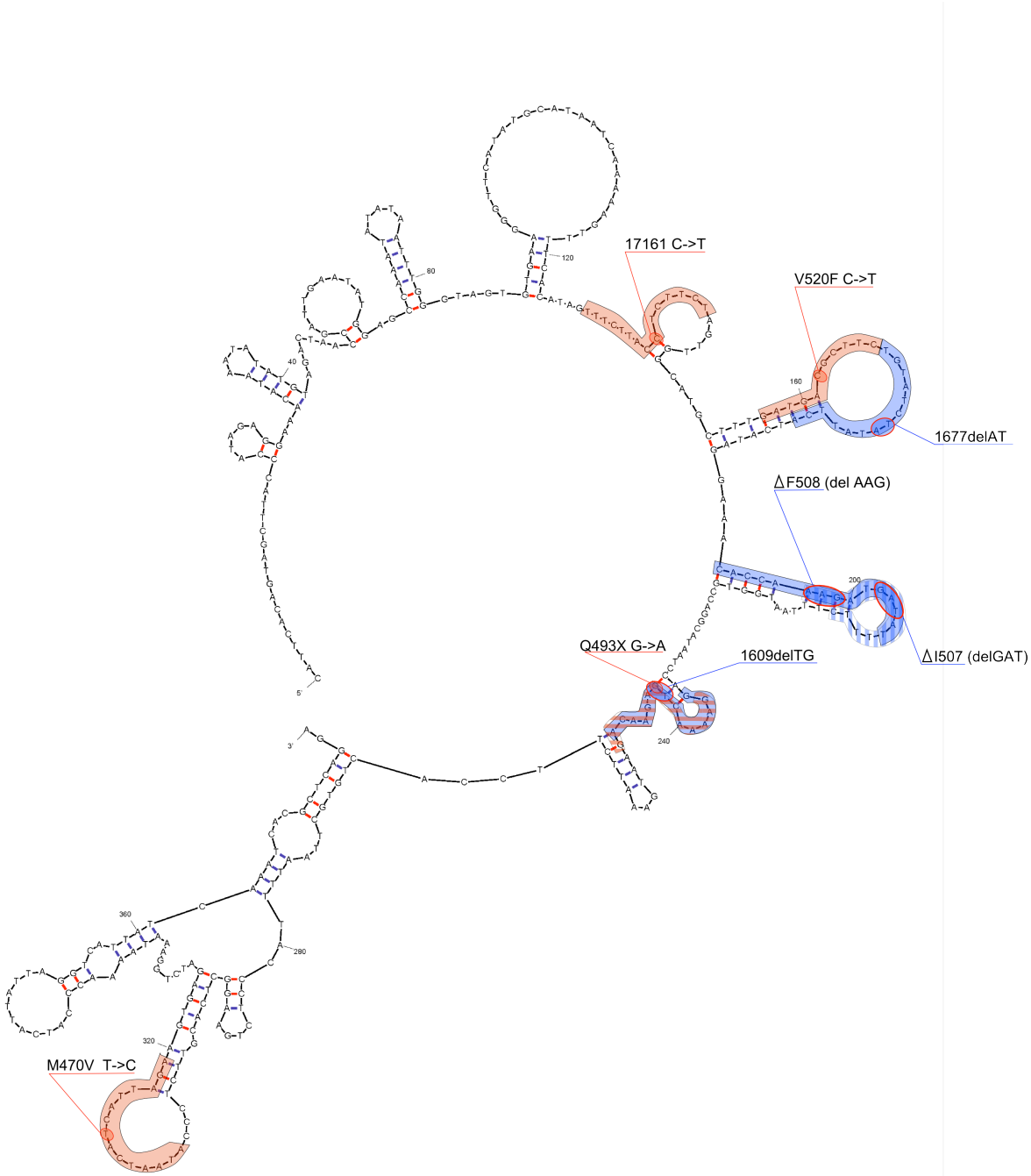


Figure 126 : Structure secondaire numéro 3 de l'exon 10 à une température de 22°C et une concentration en Na^+ de 0.138 M avec un ΔG de -31.65 kcal.mol^{-1}. Les SNP sont surlignées en rouge, les délétions, en bleu. Certaines séquences ciblées par les sondes se recouvrent comme entre la Q493X et la 1609delTG ou la ΔF508 et la ΔI507.

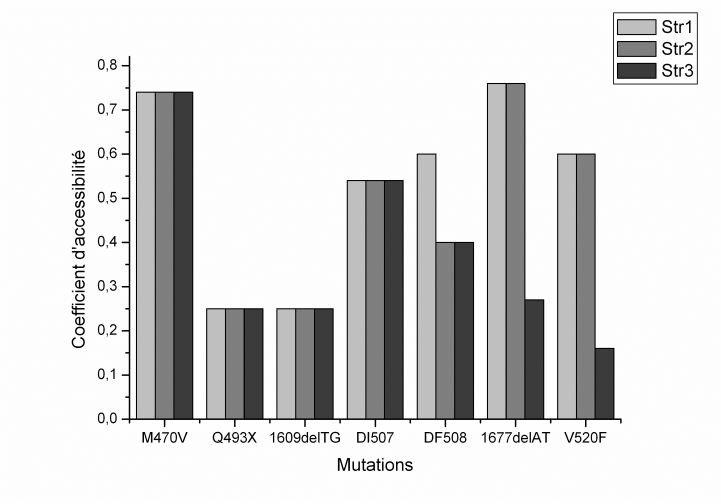


Figure 127 : Coefficients d'accessibilité pour les mutations de l'exon 10 à 20°C pour les 3 structures secondaires les plus probables.

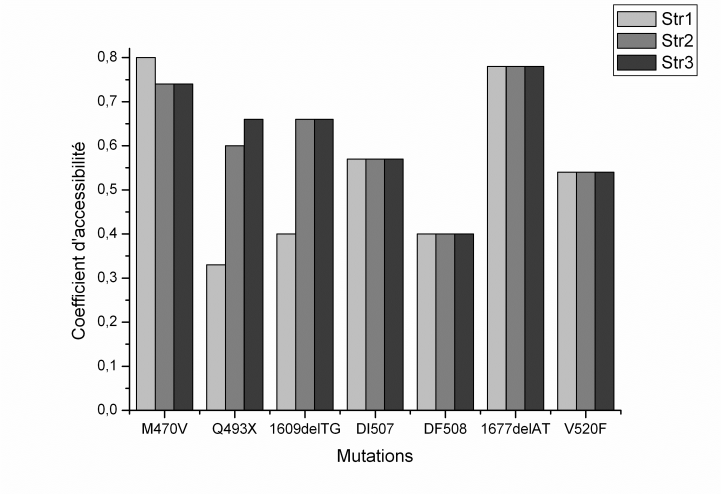


Figure 128 : Coefficients d'accessibilité pour les mutations de l'exon 10 à 22°C pour les 3 structures secondaires les plus probables.

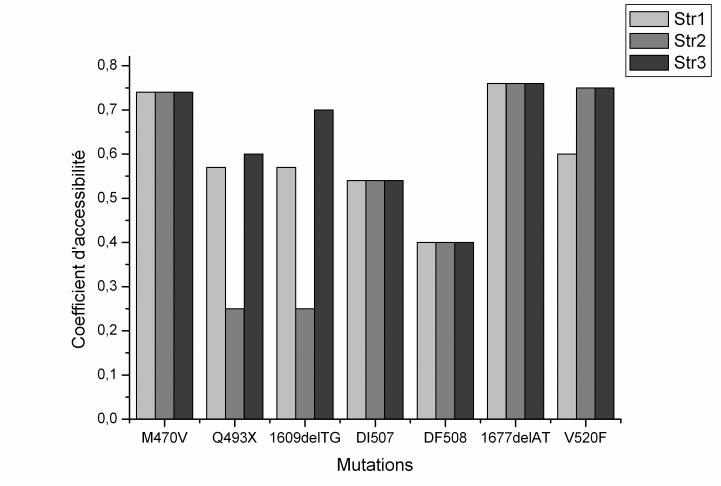


Figure 129 : Coefficients d'accessibilité pour les mutations de l'exon 10 à 25°C pour les 3 structures secondaires les plus probables.

Nous constatons que plus la température est élevée, plus les séquences ciblées sont accessibles. Mais nous savons que plus la température est élevée, moins le signal est important, car moins les duplexes sont stables. L'étude a aussi porté sur l'influence de la concentration en Na^+ sur l'accessibilité des cibles. L'optimum de discrimination étant atteint pour une concentration de 0.3M, nous avons fait la comparaison à 25°C entre une solution de PBS 1x et une solution de concentration en Na^+ = 0.3M (Figure 130).

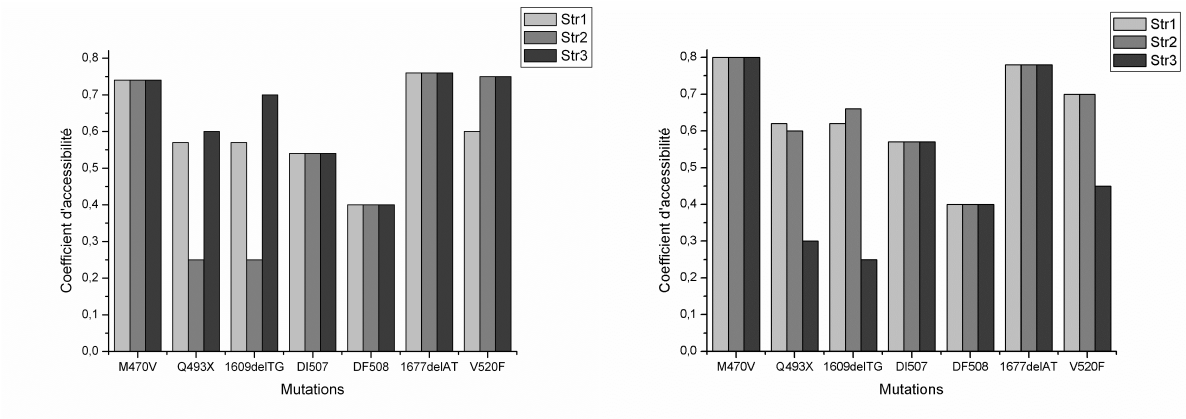


Figure 130 : Coefficients d'accessibilité pour les mutations de l'exon 10 à 25°C pour les 3 structures secondaires les plus probables pour une concentration en Na^+ de 0.138 M (gauche) et 0.3 M (droite).

De manière à observer expérimentalement les coefficients d'accessibilité réels, nous avons découpé l'exon 10 en fragments dont le T_M était centré sur 50°C de manière à pouvoir réaliser une expérimentation à haute température. Le but de cette expérimentation était d'injecter une solution d'exon 10 dans la cuve sur une matrice dont les sondes auraient initialement la même affinité avec la cible en circulation. La différence de signal observé ne serait alors due qu'à l'existence de structures secondaires sur les simples brins d'ADN. Du signal enregistré, nous pouvons alors remonter à un coefficient d'accessibilité réel nous permettant de corroborer les résultats théoriques obtenus sur le site de Michael Zuker et basés sur les calculs de John SantaLucia Jr. Les sondes calculées sont regroupées dans le tableau suivant :

N°	Séquence	T_M (°C)
S01	AGCTACTGTGAATG	49.9
S02	TCCTCTATGGGTAAG	51.1
S03	CTACATATATTTATGTTTCC	50
S04	ATATGTAGACTAACCG	50.8
S05	CCATATTCAATCGGT	50.2
S06	TTATATATTTGGCTCCA	49.9
S07	CACTACCCAAATTATA	50.1
S08	ACCCTTCACACT	50.6

S09	TTTTGATTATGCATATGA	50.1
S10	TGTGAAAACTTTTTGA	50.2
S11	GGTAAGAAACTATGTG	51.3
S12	CAACTAGAAGAGGTA	49.9
S13	AAAGCATGCCAA	49
S14	AGAAGCGTCATC	49.8
S15	CCTATGATGAATATAGATAC	51.4
S16	GGTGTTTCCTATGAT	51.1
S17	AAAATATCATCTTTGGT	50.4
S18	GCACCATTAAAGAAAAT	52.4
S19	GCCTGGCACC	53.6
S20	AGTTTTCCTGGATT	49.7
S21	TCATTCTGTTCTCAG	50
S22	AGTGGAAGAATTTCA	49.3
S23	TAAAATTAAGCACAGT	50.2
S24	CCTTCAGAGGGTAAA	52.6
S25	AACTGGAGCCT	49.5
S26	AATGATGATTATGGGA	50.6
S27	ACTTCACTTCTAATG	49.8
S28	GTTTTATTTCCAGACT	49.7
S29	CTAATAATGATGGGTTT	50
S30	ATTTGATAATGACCTAAT	50.3
S31	GAGCGTGATTTGA	50.9
S32	TCCTGAGCGTG	52.3

Figure 131 : Tableau des fragments sonde de l'exon 10 avec leur T_M en °C

Faute de temps et du fait de multiples problèmes de fonctionnalisation et de dépôt matriciel des sondes, nous n'avons pas pu réaliser ces expérimentations. Toutefois, au fil des essais expérimentaux sur l'étude de ces structures secondaires, nous avons pu établir que le modèle sur lequel se base nos hypothèses théoriques ne semble pas assez complet. En effet, le calcul du T_M et des paramètres thermodynamiques des interactions ADN-ADN obtenus sur le site de Michael Zuker ne tient compte que d'un nombre limité de paramètres du système. La température d'expérimentation, la concentration en Na^+ et en Mg^{2+} et la concentration en produit ne suffisent pas à rendre compte des phénomènes observés. De manière expérimentale, en changeant seulement la composition de la solution tampon mais en gardant sa concentration en Na^+ et en Mg^{2+} constante, nous observons des résultats différents pour un même comportement théorique présumé (Figure 132).

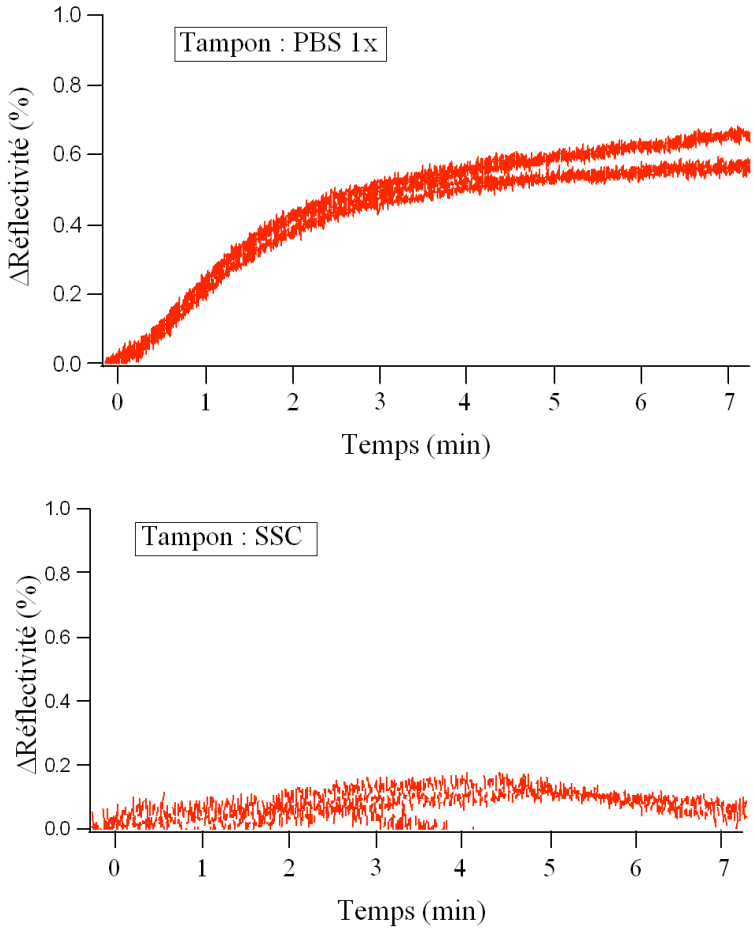


Figure 132 : Cinétique d'interaction d'une cible exon10 sur une sonde F508 WS dans un tampon de PBS 1x ([Na+] = 0.138) en haut et dans un tampon de SSC (Solution Saline Citric, [Na+] = 0.138 M) en bas. Alors que les paramètres des interactions sont les mêmes sur l'outil de prédiction du site de Michael Zuker, ici, nous observons deux réponses différentes.

Sur la Figure 132, nous voyons clairement une réponse en solution de PBS 1x alors qu'aucune réponse n'est enregistrée en solution de SSC (Solution Saline Citric). Ces observations révèlent la complexité du système à savoir que l'accessibilité des séquences des cibles et des sondes dépend de plus de paramètres que les modèles théoriques ne nous permettent de manipuler. Il devient alors impossible de prédire avec précision les structures secondaires ou les valeurs de T_M qui optimiseraient notre discrimination entre séquences saines et séquences mutées. C'est pour ces différentes remarques que l'expérimentation basée sur les 32 fragments sondes de l'exon 10 (Figure 131) est nécessaire pour vérifier les hypothèses théoriques et les adapter à notre système.

CONCLUSION

A l'ère où la mondialisation devient une caractéristique dominante de la société, les échanges entre régions, entre pays, entre continents se font de plus en fréquents. Ces échanges, amplifiés par l'essor des médias et le développement des transports en commun long courrier, mélangent la société actuelle tant sur le point culturel qu'intellectuel. Cette nouvelle mobilité de plus en plus à portée de main permet aussi la migration très rapide de germes ou de virus, comme le montre la récente propagation du H_1N_1 responsable de la 'grippe porcine', mais élargit aussi les foyers de maladies génétiques. Ces dernières qui restaient très localisées se répartissent petit à petit sur l'ensemble de la planète en suivant les déplacements internationaux.

La médecine actuelle tend vers la prévention afin d'éviter des traitements trop lourds et coûteux et cette mobilité accrue de la population mondiale augmente l'éventail des maladies à tester. Mais avec les récentes évolutions technologiques des deux dernières décennies appuyées par l'ouverture à grande échelle des barrières entre les domaines de recherche, de nombreuses techniques de diagnostic se développent. C'est justement à la frontière entre la physique, la biologie, la chimie et l'informatique que se situe ma recherche de thèse. Durant ces trois années, sur la base des systèmes réalisés lors de thèses précédentes et notamment celles de E. Maillart et N. Bassil, j'ai développé un système optique de détection des interactions biomoléculaires de surface. Cette recherche avait pour but la création d'un appareil capable d'un diagnostic génétique rapide, fiable et peu coûteux appliqué dans un premier temps à la mucoviscidose.

Dans ce mémoire de thèse, j'ai commencé par présenter les différents systèmes actuels de détection d'interactions moléculaires. Le principal système utilisé étant basé sur la fluorescence et nécessite un marquage d'au moins une sorte des réactifs utilisés. Bien que leur production à grande échelle en ait diminué les coûts de fabrication, cette technique qui requiert une étape de rinçage et de scannage ne permet pas d'étude dynamique aisée sur les interactions s'y déroulant. D'un autre côté les systèmes permettant cette visualisation dynamique comme les systèmes électrochimiques ou acoustiques, bien que très sensibles, ont un nombre de réactions limitées de par leurs contraintes d'élaboration. C'est pourquoi le

choix de l'équipe s'est porté sur le développement d'un système de détection optique qui allie une capacité à l'observation en temps réel des interactions de surface à la possibilité d'obtenir de multiples réactions en parallèles sur le même support.

De manière à introduire la description du système, j'ai ensuite détaillé les caractéristiques du matériel biologique cible de la recherche de ma thèse : l'ADN. Nous avons pu voir sa composition et sa structure, son rôle dans les organismes vivants et introduire les problèmes pouvant découler de ses mutations. L'introduction à la température de fusion qui a suivi permet d'approcher la complexité du problème des interactions de surface et de leur obtention de manière reproductible.

Ce premier chapitre se termine sur la description de la résonance de plasmon de surface et sur son utilisation dans notre système de détection.

J'ai, dans un deuxième temps, fait une description globale du système en détaillant les parties déjà existante (comme le bloc opto-mécanique ou la fluidique) ainsi que les parties qui se sont développées avec ma thèse (comme le bloc de contrôle de la température). J'ai fait une description des deux méthodes de fonctionnalisation de la surface, que j'ai utilisées pendant ces 3 années, puis de la nouvelle méthode de dépôt matriciel utilisée maintenant en routine, pour finir sur le programme d'acquisition et d'analyse des données pour lequel j'ai grandement participé à l'aboutissement.

Dans le chapitre final, j'ai regroupé les études réalisées durant ma thèse concernant la caractérisation des interactions ADN-ADN au sein de notre biopuce. L'importance d'une sonde de référence de même nature que les sondes d'intérêt y a été montrée ainsi que du choix de la concentration en Na^+ et en sonde afin d'obtenir des signaux utilisables lors d'un diagnostic génétique. Nous avons vu également qu'une bonne méthode de correction des inhomogénéités du système permettait d'obtenir des signaux propres et un diagnostic génétique sans équivoque. Ce chapitre termine aussi sur deux des thèmes principaux de ma recherche : les effets de la température et les structures secondaires. Mais, faute d'expérimentations réussies, je n'ai pas pu pousser toutes ces études jusqu'à leur terme. Toutefois, quelques conclusions importantes ont pu être tirées du travail déjà effectué. La conclusion principale concerne l'observation des résultats obtenus par voie théorique comparés aux résultats obtenus sur les systèmes expérimentaux. Le désaccord entre ces valeurs, corroboré par la littérature, atteste la nécessité de la détermination préalable d'un

abaque expérimental pour chacun des résultats possibles des interactions étudiées. C'est-à-dire, dans notre cas, la détermination des niveaux de réflectivité des spots à l'injection de chacun des types de cibles de patient dans la cuve. Cette détermination permet d'établir des limites entre lesquelles la valeur résultante du signal d'une balance rendra un diagnostic sans équivoque.

Pour pouvoir établir un diagnostic génétique correct, il faut que notre système soit capable de classer toutes les interactions qui s'y déroulent selon leur comportement temporel. Le succès de ce diagnostic réside dans le fait de maîtriser les conditions d'expérimentation et de connaitre l'impact de certains paramètres sur les interactions qui se déroulent sur la puce. Les améliorations apportées aux études expérimentales qui ont suivi mes travaux sont de plusieurs formes. La stabilisation de la température est une des principales caractéristiques apportées au système. J'ai aussi montré l'intérêt d'utiliser une solution tampon dont la concentration saline doit être optimisée pour améliorer la discrimination génétique du type des cibles. Mes études sur les structures secondaires nous ont montré à quel point la précision d'un diagnostic génétique dépendait des conditions d'expérimentation. Pour finir, la conclusion la plus importante à tirer et qui est en accord avec la phrase précédente est que la complexité de la dépendance des interactions au milieu où elles se déroulent n'en permet pas une prédiction théorique fiable. Trop de paramètres vont influer sur l'accessibilité des cibles et la stabilité des duplexes formés pour qu'un modèle complet soit, à l'heure actuelle, représentatif des expérimentations.

Malgré cette complexité importante, l'équipe a réussi à obtenir un certain nombre de résultats encourageants sur produit de patient révélant le type exact pour les mutations scannées. Un tel système a de grandes chances d'aboutir à un matériel utilisable en milieu médical pour une utilisation en routine sans avoir besoin de modifications majeures. Mais, de mon point de vue, le réel potentiel d'un système de détection basé sur la résonance de plasmon de surface réside dans sa capacité à observer des interactions en temps réel en laissant à l'utilisateur la possibilité de complexifier, d'appauvrir le milieu, d'en modifier les concentrations, la température, etc … de manière dynamique. Pour que ce type de système soit généralisable à toutes sortes d'études d'interactions biomoléculaires (criblage de médicament, détection d'OGM, …) un effort important doit être apporté à la constitution d'une fonctionnalisation de surface adaptée à chacune des interactions étudiées.

En effet, dans l'industrie pharmaceutique, les molécules pour lesquelles les chercheurs suspectent une utilité médicale, sont criblées et testées dans des conditions fixes et souvent ne correspondant pas exactement à l'organisme dans lequel elles évoluent. C'est, par exemple, pour ce genre d'expérimentations qu'un système comme celui développé dans mon équipe pourrait apporter une amélioration par rapport aux systèmes utilisés à l'heure actuelle.

ANNEXES

Annexe 1: Glossaire

ADN : L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une molécule, support de l'information génétique, retrouvée dans toutes les cellules vivantes, qui renferme l'ensemble des informations nécessaires au développement et au fonctionnement d'un organisme.

Amorce : Une amorce en PCR est un fragment simple brin d'ADN sur lequel va se fixer la protéine polymérase afin de dupliquer la séquence à amplifier. Ce fragment de synthèse a une taille de l'ordre de 20 à 25 nucléotides.

Oligonucléotide : Les oligonucléotides sont des courtes séquences de nucléotides (ARN ou ADN), simple-brin et longs de quelques dizaines de bases. Ils sont en général obtenus par synthèse chimique.

Biocapteur : Un biocapteur est, de manière générale, constitué d'un détecteur d'origine biologique: enzyme, anticorps, récepteur... et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique (qui par exemple sera la fixation de l'antigène à détecter sur l'anticorps) en un signal aisément exploitable (généralement électrique ou lumineux).

Biopuce : Une biopuce est un ensemble de molécules fixées en rangées ordonnées sur une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique et qui permet d'en mesurer les interactions avec une (ou des) autre(s) molécule(s) mise(s) en contact.

Cible : La cible est la molécule injectée sur la puce. Elle peut être synthétique ou issue d'un patient.

Enthalpie (H) : L'enthalpie est une fonction d'état extensive de la thermodynamique, dont la variation permet d'exprimer la quantité de chaleur mise en jeu pendant la transformation à pression constante (monobare) d'un système thermodynamique au cours de laquelle celui-ci reçoit ou fournit un travail mécanique.

Entropie (S) : L'entropie est une fonction d'état qui mesure le degré de désordre d'un système au niveau microscopique. Plus l'entropie du système est élevée, moins ses éléments sont ordonnés, liés entre eux, capables de produire des effets mécaniques, et plus grande est la part de l'énergie inutilisée pour l'obtention d'un travail ; c'est-à-dire gaspillée de façon incohérente.

Génome : Le génome est l'ensemble du matériel génétique d'un individu ou d'une espèce codé dans son ADN. Il contient en particulier toutes les séquences codantes (transcrites en ARN messagers, et traduites en protéines) et non-codantes (non transcrites, ou transcrites en ARN, mais non traduites).

Génomique : La génomique est une discipline de la biologie moderne qui a pour objet l'étude du fonctionnement d'un organisme à l'échelle de son génome, et non plus limité à un seul gène.

Longueur d'onde : La longueur d'onde est la distance séparant deux crêtes successives d'une onde périodique. On la dénote communément par la lettre grecque λ (lambda).

Mésappariement : Un mésappariement dans un duplexe d'ADN est une partie de séquence pour laquelle le brin sens et le brin anti-sens ne sont pas complémentaires. Un double brin contenant un mésappariement est un duplexe composé de deux simples brins quasiment complémentaires.

Mutated Sequence : Une séquence MS est une séquence correspondant au gène muté pour la mutation étudiée.

Mutated Type : Une cible MT est une cible qui ne contient que le type muté de la séquence du gène.

Non-relevante : Une sonde NR est une sonde dont la séquence est choisie pour ne correspondre à aucune séquence des cibles à injecter, qu'elles soient de synthèse ou issues d'un patient mais dont la séquence de calibration est la même que pour les sondes régulières. Elles servent de référence lors de l'injection de la cible d'intérêt.

Non-relevante-non-calibrée : Une sonde NRNC est une sonde dont la séquence spécifique et la séquence de calibration sont choisies pour ne correspondre à aucune séquence des cibles à injecter, qu'elles soient de synthèse, issues d'un patient ou correspondant à la séquence régulière de calibration. Elles servent de référence lors de l'injection de la cible de calibration.

PCR : La réaction en chaîne par polymérase (PCR pour Polymerase Chain Reaction), est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique in vitro, qui permet de copier en grand nombre (avec un facteur de multiplication de l'ordre du milliard) une séquence d'ADN ou d'ARN connue, à partir d'une faible quantité (de l'ordre de quelques picogrammes) d'acide nucléique.

Polarisation : La polarisation est une propriété des ondes vectorielles telles que la lumière. Une onde lumineuse est constituée d'un champ électrique et d'un champ magnétique tous deux perpendiculaires. Lorsque le vecteur champ magnétique est perpendiculaire au plan d'incidence défini par la direction du faisceau incident et la normale à l'interface, la polarisation est dite Transverse Magnétique (TM). Lorsque le vecteur champ électrique est perpendiculaire au plan d'incidence, la polarisation est dite Transverse Électrique (TE).

Protéomique : La protéomique désigne la science qui étudie les protéomes, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, organelle, tissu, organe ou organisme à un moment donné et sous des conditions données.

Séquençage : Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné.

Sonde : La sonde est la molécule fixée sur la puce dont on observe l'interaction avec la molécule circulante injectée dans la cuve.

Structure secondaire : La structure secondaire en biochimie et en biologie structurale, se rapporte uniquement à la description de la structure tridimensionnelle localement adoptée par certains segments de molécules biologiques (molécules définies comme étant des biopolymères, comme c'est le cas pour les protéines et les acides nucléiques (ADN/ARN)).

Dans les acides nucléiques, la structure secondaire est définie par les liaisons hydrogènes entre les bases azotées.

Wild Sequence : Une séquence WS est une séquence correspondant au gène sain pour la mutation étudiée.

Wild Type : Une cible WT est une cible qui ne contient que le type sain de la séquence du gène.

Heterozygote Type : Une cible HT est une cible contenant à la fois la séquence saine et la séquence mutée du gène. Les deux fragments des allèles codant pour la protéine CFTR sont donc différents.

Annexe 2 : Les mutations génétiques

Dans cette annexe, nous vous proposons d'apporter quelques notions complémentaires à la définition d'une mutation génétique et d'en montrer les différents types.

La mutation est un changement dans la séquence d'un gène d'un organisme. Ses causes sont diverses et une mutation peut être due à une erreur de réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, à une exposition aux ultraviolets ou à une radiation ionisante, à un mutagène chimique, un virus ou peut même être induit par l'organisme lui-même (hypermutation).

Il existe deux classes de mutations, les mutations à petite échelle et les mutations à grande échelle. Les mutations à petite échelle regroupent 3 types de mutations :

- Les mutations ponctuelles qui consistent en un changement d'un nucléotide par un autre dans la séquence du gène. Comme il faut 3 nucléotides pour coder un acide aminé (Tableau A1.1), composé élémentaire d'une protéine, l'influence de ces mutations ponctuelles ou SNP (Single Nucléotide Permutation) prendra 3 formes différentes :
  - Les mutations silencieuses : Le codon code pour le même acide aminé (redondances dans le code génétique. Exemple : CTG = TTA = Leucine)
  - Les mutations faux-sens : Le codon code pour un autre acide aminé (Exemple : CAA = Glutamine, CAC = Histidine, ici la mutation du A en C transforme l'acide aminé.)
  - Les mutations non-sens : Le codon est transformé en codon stop, la protéine est alors tronquée.
- Les délétions qui consiste en une suppression d'un ou de plusieurs nucléotides du gène. Lorsque le nombre de nucléotides supprimés est différent d'un multiple de 3, la 'tête de lecture' est alors décalée et la suite du gène ne correspondra plus à la protéine initiale. Exemple : ATT CG**T** CGT TGC AAA = Ile Arg Arg Cys Lys

  ATT CGC GTT GCA AA = Ile Arg Val Ala --

  Ici, le 'T' en 6ème position est supprimé dans le gène muté, changeant la succession des acides aminés dans la chaîne de la protéine.
- Les insertions qui consistent en l'ajout d'un ou de plusieurs nucléotides dans la séquence du gène. Comme les délétions, les insertions peuvent causer un décalage de la tête de lecture et fausser toute la transduction.

1ère position	2ème position								3ème position
	A		C		G		T		
A	AAA	Lysine	ACA	Thréonine	AGA	Arginine	ATA	Isoleucine	A
	AAC	Asparagine	ACC		AGC	Sérine	ATC		C
	AAG	Lysine	ACG		AGG	Arginine	ATG	Méthionine/ Start	G
	AAT	Asparagine	ACT		AGT	Sérine	ATT	Isoleucine	T
C	CAA	Glutamine	CCA	Proline	CGA	Arginine	CTA	Leucine	A
	CAC	Histidine	CCC		CGC		CTC		C
	CAG	Glutamine	CCG		CGG		CTG		G
	CAT	Histidine	CCT		CGT		CTT		T
G	GAA	Acide Glutamique	GCA	Alanine	GGA	Glycine	GTA	Valine	A
	GAC	Acide Aspartique	GCC		GGC		GTC		C
	GAG	Acide Glutamique	GCG		GGG		GTG		G
	GAT	Acide Aspartique	GCT		GGT		GTT		T
T	TAA	Stop	TCA	Sérine	TGA	Stop	TTA	Leucine	A
	TAC	Tyrosine	TCC		TGC	Cystéine	TTC	Phénylalanine	C
	TAG	Stop	TCG		TGG	Tryptophane	TTG	Leucine	G
	TAT	Tyrosine	TCT		TGT	Cystéine	TTT	Phénylalanine	T

Tableau A1.1 : Tableau du code génétique traduisant un codon (triplet de nucléotides) en acide aminé.

Les mutations à grande échelle sont les suivantes :

- Les amplifications qui consistent en la duplication importante d'un gène sur le chromosome augmentant ainsi la production de la protéine.
- Les délétions de grande région du chromosome qui entraînent la perte d'information génétique
- Les translocations chromosomiques qui sont des échanges de matériel génétique entre deux chromosomes.
- Les inversions chromosomiques qui inversent le sens d'une partie du chromosome.

Les effets de ces mutations sont divers, la mutation peut être transparente, c'est-à-dire qu'elle n'agit pas sur le comportement de la protéine. Cela arrive quand la mutation se situe sur une séquence ne codant pas pour une partie fonctionnelle de la séquence et n'ayant pas d'importance pour la conformation 3D de la protéine. La mutation peut engendrer une diminution ou une perte de la fonction de la protéine (c'est le cas de la plupart des mutations de la mucoviscidose). Elle peut rajouter une fonction à cette protéine ou peut aussi rendre la séquence originale au gène (réversion) sur une séquence déjà modifiée auparavant.

Annexe 3 : Séquences spécifiques des sondes ciblant les mutations de la CFTR :

Le tableau suivant regroupe les séquences spécifiques des sondes calculées par Virginie Courtois et al à l'INSERM. Ces séquences ciblent les 66 mutations les plus répandues dans le type caucasien pour la mucoviscidose. Elles regroupent 90 % des cas de la maladie génétique. La première colonne du tableau correspond au numéro de la mutation donné arbitrairement. La deuxième colonne correspond au fragment du gène de la CFTR (exon ou intron) auquel la mutation appartient. La troisième colonne indique le nom de la mutation. La quatrième colonne indique type de la séquence : WT pour Wild Type ou type sain, MT pour Mutated Type ou type muté. Les deux autres types de séquence (WT+m et MT+m) correspondent à une modification de la séquence de la cible permettant d'augmenter la capacité de discrimination des balances ciblant cette mutation (voir chapitre 3.2.2.Concentration des sondes). La cinquième colonne correspond au T_M de la cible avec la sonde de séquence saine. La sixième colonne correspond au T_M de la cible avec la sonde de séquence mutée. La dernière colonne indique la séquence de la cible.

N°	Exon	Nom de la mutation	Type	Tm par rapport à la WS	Tm par rapport à la MS	Séquence spécifique
1	3	**E60X**	WT	**46,6**	35,4	GATAGAGAGCTG
			WT+m	30,1	**13,3**	GATAtAGAGCTG
			MT	30,1	**39,7**	GATAGATAGCTG
			MT+m	**7,5**	25,3	GATAtATAGCTG
2	3	**G85E**	WT	**45**	31,4	TCTATGGAATCTT
			WT+m	32,3	**12,8**	TCTAaGGAATCTT
			MT	22,2	**42**	TCTATGAAATCTT
			MT+m	**-2**	28,9	TCTAaGAAATCTT
3	3	**394delTT**	WT	**38,1**	-58,3	ATCTTTTTATATTT
			M	-48,4	**36,7**	AATCTTTATATTTA
4	4	**R117H**	WT	**45,3**	31,5	GAACGCTCTAT
			WT+m	32	**5,2**	GAAtGCTCTAT

			MT	19,5	**39,3**	GAACACTCTAT
			MT+m	**7,5**	23,7	GAAtACTCTAT
5	4	**Y122X**	WT	38,4	25,2	GATTTATCTAGG
			WT+m	23	10,3	GATTTATtTAGG
			MT	26,1	39,4	GATTTAACTAGG
			MT+m	10,7	25	GATTTAAtTAGG
6	4	**I148T**	WT	**46**	35,7	ATCACATTGGAA
			WT+m	30,4	**14,1**	ATCAAATTGGAA
			MT	31,2	**49,1**	ATCACACTGGAA
			MT+m	**-4,12**	34,3	ATCAACTGGAA
7	INTRON 4	**621+1G>T**	WT	**43,3**	32,7	AAGAAGGTAATAC
			WT+m	24,2	**15,8**	AAGAAcGTAATAC
			MT	23,8	**40,4**	AAGAAGTTAATAC
			MT+m	**15,1**	19,9	AAGAAcTTAATAC
8	5	**G178R**	WT	**48,3**	43,4	AGTATT**G**GACAAC
			WT+m	32,5	**14,4**	AGTATT**G**GcCAAC
			MT	30	**36,7**	AGTATT**A**GACAAC
			MT+m	**3,3**	26,2	AGTATT**A**GcCAAC
9	INTRON 5	**711+1G>T**	WT	**43,1**	32,7	GATGAAGTATGTA
			WT+m	33,2	**18,3**	GATGgAGTATGTA
			MT	28	**40,3**	GATGAATTATGTA
			MT+m	**12,5**	29,7	GATGgATTATGTA
9	INTRON 5	**711+5 G>A**	WT	**43,9**	31,2	AAGTATGTACCTA
			WT+m	33	**15,4**	AAGaATGTACCTA
			MT	24,7	**38,9**	AAGTATATACCTA
			MT+m	**4,1**	26,8	AAGaATATACCTA
10	6a	**L206W**	WT	**50,7**	36,2	TCCTT**T**GCAAGT
			WT+m	34,5	**11,6**	TCCTT**T**GaAAGT
			MT	39	**54**	TCCTT**G**GCAAGT
			MT+m	**13,9**	38,5	TCCTT**G**GaAAGT
11	6a	**L227R**	WT	**50**	37,4	TGGAC**T**TGGTTT
			WT+m	29,5	**9**	TGGAC**T**TaGTTT
			MT	40,7	**54,6**	TGGAC**G**TGGTTT

			MT+m	**14,7**	35,8	TGGACGTaGTTT
12	7	**1078delT**	WT	**44,3**	21,7	GGTTCTTTGTG
			WT+m	31,7	**-8,6**	GGTTaTTTGTG
			MT	22,9	**47,7**	GGTTCTTGTGG
			MT+m	**-7,2**	35,6	GGTTaTTGTGG
13	7	**R334W**	WT	**50,9**	25,2	ATCCTCCGGAA
			WT+m	25,2	**14,9**	ATCCTCCaGAA
			MT	37,5	**45,7**	ATCCTCTGGAA
			MT+m	**13,1**	21,1	ATCCTCTaGAA
14	7	R347P	WT	**52,8**	40,8	TTCTGCGCATG
			WT+m	32,2	**14,7**	TTCTaCGCATG
			MT	28,2	**50,6**	TTCTGCCCATG
			MT+m	**-7,7**	28,2	TTCTaCCCATG
15	7	**R347H et R347P**	WT	**52,8**	40,8	
			WT+m	32,2	**14,7**	
			MT	29,6	37,8	TTCTGCACATG
			MT+m	**-5,4**	**5,3**	TTCTaCACATG
16	INTRON 8	**1342-6(5T/7T/9T)**	M5T	**49,3**	-8,9	gttttttttaaca
			M7T	-10,3	**45,3**	gttttttttaaca
			M9T	-7,2	12,6	gttttttttaaca
17	9	**D443Y**	WT	**47,5**	38,4	TCCTGAAAGATATTA
			WT+m	30,7	**15,2**	TCCTaAAAGATATTA
			MT	34	**44,1**	TCCTGAAATATATTA
			MT+m	**9,7**	26,2	TCCTaAAATATATTA
18	9	**A455E**	WT	**54,4**	32,8	GTTGGCGGTTG
			WT+m	36,5	**4,8**	GTTTGCGGTTG
			MT	38,2	**47,7**	GTTGGAGGTTG
			MT+m	**13,4**	28	GTTTGAGGTTG
19	10	**Q493X**	WT	**45,7**	23,1	TGTTCTCAGTTT
			WT+m	33,8	**-0,7**	TGTTaTCAGTTT
			MT	31,7	**41,3**	TGTTCTAAGTTT
			MT+m	**14,3**	28,6	TGTTaTAAGTTT
20	10	**1609delCA**	WT	**45,7**	-15,3	idem WT Q493X

			M	-5,3	**45,7**	TCTGTTCTGTTT
21	10	**DI507**	WT	**44,9**	27	GAAAAT**ATCATC**TTT
			M	26,6	**48,2**	GAAAAT**ATC**TTTGGT
22	10	**DF508**	WT	**50,5**	-76,9	ATATC**ATCTTT**GGTG
			M	-81	**50,2**	AATATC**ATT**GGTGTT
23	10	**1677delTA**	WT	**42,1**	-273	TGAATA**TA**GATACA
			M	-273	**44,4**	ATGAATAGATACAG
24	INTRON 10	**1717-1G>A**	WT	**44,5**	32,1	GTAATAGGACATC
			WT+m	34,8	**17,3**	GTAAaAGGACATC
			MT	26,8	**41,7**	GTAATAAGACATC
			MT+m	**9,6**	31,3	GTAAaAAGACATC
25	11	**G542X**	WT	**46,1**	29,7	TTCTTGGAGAAG
			WT+m	29,1	**4,9**	TTCTTGGAtAAG
			MT	27,4	**42,9**	TTCTTTGAGAAG
			MT+m	**3,2**	25,6	TTCTTTGAtAAG
26	11	**S549R**	WT	**47,9**	37,6	ACTGAG**T**GGAG
			WT+m	28,1	**-6**	ACT**t**AG**T**GGAG
			MT	38,4	**51,4**	ACTGAG**G**GGAG
			MT+m	**9,9**	31,9	ACT**t**AG**G**GGAG
27	11	**G551D**	WT	**49**	44,6	TGGA**GGT**CAAC
			WT+m	34,4	**12,8**	TGGA**GGT**TAAC
			MT	26,2	**34,7**	TGGAG**A**TCAAC
			MT+m	**-2,3**	29,1	TGGAG**A**T**T**AAC
28	11	**(Q552X)**	WT	**49,4**	26,7	GAG**GT**CAACGA
			WT+m	28,1	**-17,3**	GAG**TT**CAACGA
			MT	35,3	**44,8**	GAG**GT**TAACGA
			MT+m	**3,9**	22,1	GAG**TT**TAACGA
29	11	**R553X**	WT	**51,3**	29,5	GTCAA**CG**AGCA
			WT+m	31,7	**19,2**	GTCAA**CT**AGCA
			MT	39,1	**46,6**	GTCAA**TG**AGCA
			MT+m	**17,1**	27	GTCAA**TT**AGCA
30	11	**L558S**	WT	**43,7**	34,8	TTCTT**T**AGCAAG
			WT+m	23,7	**8,8**	TTCTT**T**A**t**CAAG

			MT	27	**48**	TTCTTCAGCAAG
			MT+m	**-7,1**	28,8	TTCTTCAtCAAG
31	11	**R560T**	WT	**48,8**	36,9	AGCAAGGTGAA
			WT+m	26,1	**16,6**	AGCAAGTTGAA
			MT	26,3	**50,3**	AGCAACGTGAA
			MT+m	**15,2**	30,7	AGCAACTTGAA
32	INTRON 11	**1811+1.6kbA>G**	WT	**39,5**	25,8	TGAGATATAAGTA
			WT+m	25,3	**3,1**	TGAGCTATAAGTA
			MT	32	**44,5**	TGAGATGTAAGTA
			MT+m	**14,1**	31,3	TGAGCTGTAAGTA
33	12	**G576X**	WT	**47,8**	33	CTTTTGGATACCT
			WT+m	31,9	**6,8**	CTTcTGGATACCT
			MT	30,7	**44,8**	CTTTTTGATACCT
			MT+m	**4,9**	28,2	CTTcTTGATACCT
34	12	**G576A**	WT	**47,8**	33	Idem G576X
			WT+m	31,9	**6,8**	Idem G576X
			MT	28,5	20,7	CTTTTGCATACCT
			MT+m	**-3,3**	**-9,9**	CTTcTGCATACCT
35	12	**E585X**	WT	**40,9**	30,4	GAAAAAGAAATATT
			WT+m	28,9	**14,2**	GAAAcAGAAATATT
			MT	25,9	**37,3**	GAAAAATAAATATT
			MT+m	**9,1**	24,7	GAAAcATAAATATT
36	INTRON 12	**1898+1G>A**	WT	**46,9**	34,5	TGAAAGGTATGTT
			WT+m	35	**17,7**	TGAAcGGTATGTT
			MT	27,5	**43**	TGAAAGATATGTT
			MT+m	**6,7**	30,6	TGAAcGATATGTT
36, 37 et 38	INTRON 12	**MA: 1898+1G>A MT: 1898+1G>T et M5G: 1898+5G>T**	WT	**46,3**	33,7	AAAGGTATGTTCT
			MA	26,6	**42,5**	AAAGATATGTTCT
			MT	27,1	30,2	AAAGTTATGTTCT
			M5G	30,1	**10,8**	AAAGGTATTTTCT
39	13	**2143delT**	WT	**43,4**	-8,5	TTCTCATTAGAAG
			M	-11,1	**43,4**	TTTCTCATAGAAG
40	13	**R668C**	WT	**44,8**	18,7	TTACACCGTTT

			WT+m	32,3	**9,5**	TTACAaCGTTT
			MT	31,2	**39,7**	TTACACTGTTT
			MT+m	**8,7**	26,2	TTACAaTGTTT
41	13	**G673X**	WT	**44,2**	31,5	TAGAAGGAGATG
			WT+m	26,6	**8,1**	TAGAAGGAtATG
			MT	26,1	**41,2**	TAGAATGAGATG
			MT+m	**2,5**	23,3	TAGAATGAtATG
42		**2183AA>G**	WT	**42,9**	4,9	CAAAAAAACAATC
			M	-0,8	**47,4**	CAAAAAGCAATCT
43		**2184insA**	WT	**42,9**	20,6	idem WT 2183AA
			WT+m	32,2	**-4**	CAAAAgAACAATC
			MT	21,6	**41,8**	CAAAAAAAACAAT
			MT+m	**-3,2**	30,7	CAAAAgAAACAAT
44		**2184delA**	WT	**42,9**	14,7	idem 2183AA
			M	13,5	**43,8**	CAAAAAACAATCT
45	13	**K710X**	WT	**43,6**	32,4	CTATACGAAAATTT
			WT+m	23	**0,7**	CTATACaAAAATTT
			MT	32,6	**42**	CTATACGATAATTT
			MT+m	**5,1**	20,6	CTATACaATAATTT
46	13	**R792X**	WT	**47,6**	24,1	CCACACGAAAA
			WT+m	27	**14,1**	CCACACtAAAA
			MT	34,8	**42,8**	CCACATGAAAA
			MT+m	**12**	22	CCACATtAAAA
47	14a	**W846X**	WT	**46,4**	33,3	CTACATGGAACA
			WT+m	25	**14,2**	CTACATGtAACA
			MT	25,8	**41,1**	CTACATAGAACA
			MT+m	**16,9**	23,3	CTACATAtAACA
48	INTRON 14b	**2789+5G>A**	WT	**47,3**	35	AAGTGAGTATTCC
			WT+m	31	**13,1**	AAGTTAGTATTCC
			MT	31	**44,5**	AAGTGAATATTCC
			MT+m	**4,8**	27,5	AAGTTAATATTCC
49	INTRON 16	**3120+1G>A**	WT	**46,5**	32,4	TCCAGgtatgta
			WT+m	28,2	**13,8**	TCCAtgtatgta

			MT	24,2	**42,2**	TCCAGatatgta
			MT+m	**15,8**	23,8	TCCAtatatgta
50	INTRON 17a	**3272-26A>G**	WT	**47,5**	35	TTTGCAATGTTTT
			WT+m	32,1	**11,3**	TTTGCAATTTTTT
			MT	38,6	**50,4**	TTTGCAGTGTTTT
			MT+m	**18,6**	35,5	TTTGCAGTTTTTT
51 et 52	17b	**L1065P: MP R1066C: MC**	WT	**44,7**	32,6	ACACTTCGTG
			MP	25,5	**48,4**	ACACCTCGTG
			MC	29,4	**11,5**	ACACTTTGTG
			MPMC	**1,4**	33,5	ACACCTTGTG
53	17b	**Y1092X**	WT	**44,4**	21,1	TTGTACCTGTC
			WT+m	30,8	**12,2**	TTGTACATGTC
			MT	31,9	**41**	TTGTAACTGTC
			MT+m	**13,1**	28,2	TTGTAAATGTC
54	18	**D1152H**	WT	**42,7**	29,5	AGCATAGATGT
			WT+m	26,1	**14,3**	AGCATAGcTGT
			MT	17,6	**43,9**	AGCATACATGT
			MT+m	**12,9**	27,4	AGCATACcTGT
55	19	**R1158X**	WT	**47,8**	21,7	agATGCGATCT
			WT+m	24,5	**9,8**	agATaCGATCT
			MT	33,8	**41,8**	agATGTGATCT
			MT+m	**8,9**	17	agATaTGATCT
56	19	**R1162X**	WT	**53,6**	30,5	TGAGCCGAGTC
			WT+m	33,9	**-1,8**	TGATCCGAGTC
			MT	41,4	**48,8**	TGAGCTGAGTC
			MT+m	**15,8**	27,7	TGATCTGAGTC
57	19	**3659delC**	WT	**48,4**	22,2	ACCTACCAAGTC
			M	23,4	**46,2**	AACCTACAAGTC
58	INTRON 19	**3849+10kbC>T**	WT	**48,2**	22,2	AATGGCGAGTA
			WT+m	21	**10,5**	AATGTCGAGTA
			MT	34,3	**42,2**	AATGGTGAGTA
			MT+m	**9,6**	17	AATGTTGAGTA
59	20	**G1244E**	WT	**44,8**	28,7	CTTGGGAAGAA

			WT+m	19,8	**9,5**	CTTGtGAAGAA
			MT	17	**41,4**	CTTGGAAAGAA
			MT+m	**11,9**	16	CTTGtAAAGAA
60	20	**S1251N**	WT	**47,2**	34,8	GGAAGAGTACTTT
			WT+m	31,7	**14,7**	GGAATAGTACTTT
			MT	30,8	**44,3**	GGAAGAATACTTT
			MT+m	**7**	28,4	GGAATAATACTTT
61	20	**W1282X**	WT	**48,4**	33,2	CAGTGGAGGAA
			WT+m	29,3	**5,9**	CAGTGGATGAA
			MT	22,4	**44,9**	CAGTGAAGGAA
			MT+m	**-13**	25,5	CAGTGAATGAA
62	20	**3905insT**	WT	**45,6**	13,4	CTTTTTTGAGACT
			M	12,3	**44,6**	CTTTTTTGAGACT
63	INTRON 20	**4005+1G>A**	WT	**44,8**	28,4	CACAGgtgag
			WT+m	23,9	**7,3**	CACAtgtgag
			MT	18,1	**40,1**	CACAGatgag
			MT+m	**9,5**	18,7	CACAtatgag
64	21	**N1303K**	WT	**45,2**	24,9	AAAAAACTTGGAT
			WT+m	25,5	**-3,6**	AAAAAACTTcGAT
			MT	36,6	**45,2**	AAAAAAGTTGGAT
			MT+m	**12,4**	25,5	AAAAAAGTTcGAT
65	21	**4016insT**	WT	**47,2**	26	TTTATTTTTTCTGGA
			WT+m	38,8	**6,5**	TTTATgTTTTCTGGA
			MT	24	**46,3**	TTTATTTTTTTCTGG
			MT+m	**3,5**	37,8	TTTATgTTTTTCTGG
66	21	**Q1313X**	WT	**46,9**	26,9	AGTGATCAAGAAA
			WT+m	27,4	**-14,4**	AGTcATCAAGAAA
			MT	34,3	**42,8**	AGTGATTAAGAAA
			MT+m	**4,8**	21,7	AGTcATTAAGAAA

Annexe 4 : Tableau des valeurs de T_M

Nous regroupons dans cette annexe les paramètres thermodynamiques calculés par J. SantaLucia Jr. [55, 56, 57] pour chaque doublet de bases de deux brins d'ADN interagissant l'un avec l'autre.

Liaison	dH	dS	dG
-A/AT	-0.7	-0.8	-0.48
-A/CT	4.4	14.9	-0.19
-A/GT	-1.6	-3.6	-0.5
A-/TG	-4.2	-15	0.48
AA/AT	0.3	0	0.43
AA/CT	0.3	0	0.53
AA/GT	0.3	0	0.43
AA/-T	0.2	2.3	-0.51
AA/TA	0.2	0	0.33
AA/TC	0.2	0	0.53
AA/TG	0.2	0	0.43
AA/TT	-5.55	0	0.03
AC/AG	-3.9	0	-0.12
AC/-G	-6.3	-17.1	-0.96
AC/GC	-3.9	0	-0.02
AC/GG	-3.9	0	-0.02
AC/T-	4.7	14.2	0.28
AC/TA	0.2	0	0.53
AC/TC	0.2	0	0.73
AC/TG	-6.1	0	-0.41
AC/TT	0.2	0	0.63
AG/AC	-3.9	0	-0.02
AG/-C	-3.7	-10	-0.58
AG/CC	-3.9	0	0.28
AG/GC	-3.9	0	0.08
AG/TA	0.2	0	0.43
AG/TC	-5.5	0	-0.25
AG/TG	0.2	0	0.43
AG/TT	3.2	0	1.03
AT	2.3	4.1	1.03
AT/-A	-2.9	-7.6	-0.5

Liaison	dH	dS	dG
GC/AG	-3.9	0	-0.02
GC/AG	-0.6	-1	-0.25
GC/CA	-0.7	-3.8	0.47
GC/CC	3.6	8.9	0.79
GC/CC	-3.9	0	0.38
GC/CG	-9.8	-24.4	-2.24
GC/CT	2.3	5.4	0.62
GC/CT	-3.9	0	0.28
GC/-G	-5.1	-14	-0.72
GC/GC	-9.7	0	-1.26
GC/GG	-3.9	0	-0.02
GC/GG	-6	-15.8	-1.11
GC/TG	-4.3	0	0.58
GC/TG	-4.4	-12.3	-0.59
GG/AC	-3.9	0	0.08
GG/AC	-0.7	-2.3	0.03
GG/-C	-3.9	-10.9	-0.56
GG/CA	0.5	3.2	-0.52
GG/CC	-7.9	0	-0.86
GG/CC	-8	-19.9	-1.84
GG/CG	-6	-15.8	-1.11
GG/CT	3.3	10.4	0.08
GG/CT	3.4	0	0.68
GG/GC	-3.9	0	0.08
GG/GC	-4.9	-15.3	-0.11
GG/TC	-2.7	0	0.58
GG/TC	-2.8	-8	-0.32
GG/TT	5.8	16.3	0.74
GT/-A	-4.2	-15	0.48
GT/AA	0.2	0	0.43
GT/AA	-0.6	-2.3	0.14

AT/AA	0.2	0	0.33
AT/CA	0.2	0	0.53
AT/GA	0.2	0	0.43
AT/TA	-5	0	0.15
AT/TA	-5	0	0.15
AT/TC	0.2	0	0.63
AT/TG	-0.3	0	1.03
AT/TT	0.2	0	0.43
-C/AG	-2.1	-3.9	-0.92
-C/CG	-0.2	-0.1	-0.23
-C/GG	-3.9	-11.2	-0.44
CA/AT	0.3	0	0.53
CA/CT	0.3	0	0.73
CA/GC	-3.9	0	0.28
CA/GG	-3.9	0	0.08
CA/GT	-8.4	0	-0.47
CA/-T	0.6	3.3	-0.42
CA/TT	0.3	0	0.63
CC/AG	-3.9	0	0.18
CC/-G	-4.4	-12.6	-0.52
CC/GA	-3.9	0	0.28
CC/GA	-3.9	0	0.48
CC/GC	-3.9	0	0.38
CC/GG	-7.9	0	-0.86
CC/GT	-3.9	0	0.28
CC/TG	-3.9	0	0.28
CG/AC	-3.9	0	0.28
CG/-C	-4	-11.9	-0.34
CG/CC	-3.9	0	0.48
CG/GA	-3.9	0	0.08
CG/GC	-10.5	0	-1.19
CG/GC	-10.6	-27.2	-2.17
CG/GG	-4.9	-15.3	-0.11
CG/GG	-3.9	0	0.08
CG/GT	-4.1	-11.7	-0.47
CG/GT	-4	0	0.48
CG/TC	-3.9	0	0.28
CG/TC	-1.5	-6.1	0.4
CT/-A	-4.1	-13	-0.02
GT/CA	-8.4	0	-0.46
GT/CA	-8.4	-22.4	-1.44
GT/CC	5.2	13.5	0.98
GT/CC	-3.9	0	0.28
GT/CG	-4.4	-12.3	-0.59
GT/CG	-4.3	0	0.58
GT/CT	-2.2	-8.4	0.45
GT/CT	-3.9	0	0.08
GT/GA	0.2	0	0.43
GT/GA	-3.1	-9.5	-0.13
GT/TA	-0.3	0	1.03
GT/TA	-2.5	-8.3	0.07
GT/TG	4.1	9.5	1.15
-T/AA	-0.5	-1.1	-0.12
-T/CA	4.7	14.2	0.28
TA/AA	4.7	12.9	0.69
TA/AA	0.3	0	0.43
TA/AC	3.4	8	0.92
TA/AC	0.3	0	0.53
TA/AG	0.7	0.7	0.42
TA/AG	0.3	0	0.43
TA/AT	-4.9	0	0.45
TA/AT	-7.2	-21.3	-0.58
TA/AT	-4.9	0	0.45
TA/CT	0.3	0	0.63
TA/CT	1.2	0.7	0.97
TA/GT	2.2	0	1.03
TA/GT	-0.1	-1.7	0.43
TA/-T	-6.9	-20	-0.71
TA/TT	0.3	0	0.43
TA/TT	0.2	-1.5	0.68
TC/AA	7.6	20.2	1.33
TC/AA	0.3	0	0.53
TC/AC	6.1	16.4	1.05
TC/AC	0.3	0	0.73
TC/AG	-5.9	0	-0.27
TC/AG	-8.2	-22.2	-1.3
TC/AT	1.2	0.7	0.97
TC/AT	0.3	0	0.63

CT/AA	0.2	0	0.53
CT/AA	2.3	4.6	0.88
CT/CA	0.2	0	0.73
CT/CA	0	-4.4	1.33
CT/GA	-7.8	0	-0.3
CT/GA	-7.8	-21	-1.28
CT/GC	-1.5	-6.1	0.4
CT/GC	-3.9	0	0.28
CT/GG	-2.8	-8	-0.32
CT/GG	-2.7	0	0.58
CT/GT	-5	-15.8	-0.12
CT/GT	-3.9	0	0.08
CT/TA	0.2	0	0.63
CT/TA	-1.2	-6.2	0.73
-G/AC	-5.9	-16.5	-0.82
-G/CC	-2.6	-7.4	-0.31
-G/GC	-3.2	-10.4	-0.01
GA/AT	0.3	0	0.43
GA/AT	0.7	0.7	0.42
GA/CA	-2.9	-9.8	0.17
GA/CC	5.2	14.2	0.81
GA/CC	-3.9	0	0.18
GA/CG	-0.6	-1	-0.25
GA/CT	-8.1	0	-0.32
GA/CT	-8.2	-22.2	-1.3
GA/GT	0.3	0	0.43
GA/GT	1.6	3.6	0.44
GA/-T	-1.1	-1.6	-0.62
GA/TT	1.8	0	0.93
GA/TT	-1.3	-5.3	0.34
GC	0.1	-2.8	0.98
TC/CG	2.3	5.4	0.62
TC/-G	-4	-10.9	-0.58
TC/GC	-3.9	0	0.28
TC/GG	3.4	0	0.68
TC/GG	3.3	10.4	0.08
TC/TG	-3.9	0	0.08
TC/TG	-2.2	-8.4	0.45
TG/AA	3	7.4	0.74
TG/AA	0.3	0	0.43
TG/AC	-6.2	0	-0.42
TG/AC	-8.5	-22.7	-1.45
TG/AG	1.6	3.6	0.44
TG/AG	0.3	0	0.43
TG/AT	-0.1	-1.7	0.43
TG/AT	2.2	0	1.03
TG/-C	-4.9	-13.8	-0.61
TG/CC	-3.9	0	0.28
TG/CC	-0.8	-4.5	0.62
TG/GC	-4	0	0.48
TG/GC	-4.1	-11.7	-0.47
TG/GT	-1.4	-6.2	0.52
TG/TC	-3.9	0	0.08
TG/TC	-5	-15.8	-0.12
TT/-A	-0.2	-0.5	-0.1
TT/AA	-5.65	0	0.03
TT/AC	0.3	0	0.63
TT/AG	1.8	0	0.93
TT/AT	0.3	0	0.43
TT/CA	0.2	0	0.63
TT/GA	3.2	0	1.03
TT/TA	0.2	0	0.43

Annexe 5 : Equations de Maxwell

Cette annexe reprend celle, très bien résumée, de la thèse de E. Maillart [] sur la nécessité d'un faisceau polarisé TM incident sur l'interface entre un milieu diélectrique et un milieu métallique pour que le plasmon de surface puisse se propager à partir d'un calcul formel fondé sur les équations de Maxwell de la constante de propagation des plasmons de surface.

Equations de Maxwell dans un milieu non magnétique ($\mu_r = 1$) :

$$\begin{cases} \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \\ \vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{E} = -\mu_0 \dfrac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\ \vec{\nabla} \wedge \vec{H} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \dfrac{\partial \vec{E}}{\partial t} \end{cases} \qquad \text{Eq.A3.1}$$

En combinant ces équations, nous pouvons en déduire l'équation de propagation du champ magnétique dans un matériau non magnétique :

$$\vec{\nabla}^2 \cdot \vec{H} - \frac{\varepsilon_r}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \qquad \text{Eq.A3.2}$$

avec $c = (\varepsilon_0 \cdot \mu_0)^{-1/2}$.

Dans le cas d'ondes planes, les champs peuvent s'écrire sous la forme suivante :

$$\begin{cases} \vec{H} = \vec{H}_0 \exp i(k_x x + k_z z - \omega t) \\ \vec{E} = \vec{E}_0 \end{cases} \qquad \text{Eq.A3.3}$$

Dans ces conditions, les équations de Maxwell (Eq.A3.1) deviennent :

$$\begin{cases} k_x E_x + k_z E_z = 0 & k_x H_x + k_z H_z = 0 \\ -k_z E_y = \mu_0 \omega H_x & k_z H_{yz} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_x \\ k_z E_x - k_x E_z = \mu_0 \omega H_y & k_x H_z - k_z H_x = \varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_y \\ k_x E_y = \mu_0 \omega H_z & k_x H_y = -\varepsilon_0 \varepsilon_r \omega E_z \end{cases} \qquad \text{Eq.A3.4}$$

De même, l'équation de propagation (Eq.A3.2) devient :

$$k_x{}^2 + k_z{}^2 - \frac{\varepsilon_r \omega^2}{c^2} = 0 \qquad \text{Eq.A3.5}$$

Nous allons maintenant étudier les conditions de propagation d'une onde évanescente des deux cotés d'une interface entre un milieu 1 de permittivité ε_1 et un milieu 2 de permittivité ε_2. Cette interface est représentée sur la figure suivante :

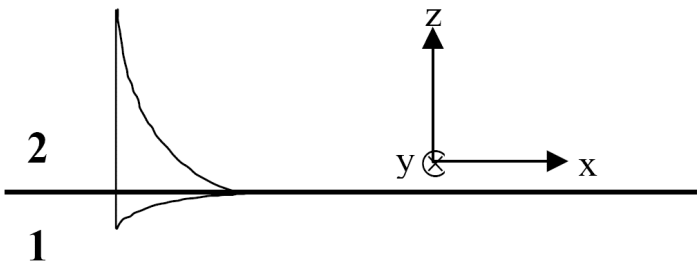


Figure A3.1 : Onde de surface à l'interface entre deux milieux.

Comme indiqué sur la Figure A3.1, l'onde se propage selon l'axe des x donc k_x est un réel positif et est évanescente selon l'axe des z donc k_z est un imaginaire pur ($k_z = i \cdot k_z'$). De plus, dans le milieu 1, z est négatif donc k_z' est négatif alors que, dans le milieu 2, z est positif donc k_z' est positif.

Sur l'interface (z = 0), d'après les équations de Maxwell, nous avons une continuité des composantes tangentielles des champs, d'où les relations suivantes :

$$\begin{cases} E^1_{x,0} \exp i(k^1_x x - \omega t) = E^2_{x,0} \exp i(k^2_x x - \omega t) \\ E^1_{y,0} \exp i(k^1_x x - \omega t) = E^2_{y,0} \exp i(k^2_x x - \omega t) \\ H^1_{x,0} \exp i(k^1_x x - \omega t) = H^2_{x,0} \exp i(k^2_x x - \omega t) \\ H^1_{y,0} \exp i(k^1_x x - \omega t) = H^2_{y,0} \exp i(k^2_x x - \omega t) \end{cases}$$

Ces conditions à l'interface nous donnent les relations suivantes :

$$\begin{cases} E^1_{x,0} = E^2_{x,0} = E_{x,0} \qquad E^1_{y,0} = E^2_{y,0} = E_{y,0} \\ H^1_{x,0} = H^2_{x,0} = H_{x,0} \qquad H^1_{y,0} = H^2_{y,0} = H_{y,0} \\ k^1_x = k^2_x = k_x \end{cases} \qquad \underline{Eq.A3.6}$$

En combinant l'équation (Eq.A3.4) avec l'équation (Eq.A3.6), nous obtenons :

$$k^1_z E^1_{z,0} = k^2_z E^2_{z,0} = -k_x E_{x,0} \qquad k^1_z H^1_{z,0} = k^2_z H^2_{z,0} = -k_x H_{x,0}$$

$$k^1_z E_{y,0} = k^2_z E_{y,0} = -\mu_0 \omega H_{x,0} \qquad (k^1_z / \varepsilon_1) H_{y,0} = (k^2_z / \varepsilon_2) H_{y,0} = \varepsilon_0 \omega E_{x,0}$$

$$k_z^1 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^2 = \mu_0 \omega H_{y,0}$$
$$(k_z H_{z,0}^1 - k_x^1 H_{x,0})/\varepsilon_1 = (k_z H_{z,0}^2 - k_z^2 H_{x,0})/\varepsilon_2 = \varepsilon_0 \omega E_{y,0}$$

$$H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = (k_x/\mu_0\omega)E_{y,0} \qquad \varepsilon_1 E_{z,0}^1 = \varepsilon_2 E_{z,0}^2 = -(k_x/\varepsilon_0\omega)H_{y,0}$$

Eq.A3.7

Supposons dans un premier temps que $E_{y,0}$ soit non nul. Nous déduisons les relations suivantes des 2 premières lignes de (Eq.A3.7) :

$$\begin{cases} k_z = k_z^1 = k_z^2 = -\dfrac{\mu_0 \omega H_{x,0}}{E_{y,0}} \\ E_{z,0} = E_{z,0}^1 = E_{z,0}^2 = -\dfrac{k_x}{k_z} E_{x,0} \\ H_{z,0} = H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = -\dfrac{k_x}{k_z} H_{x,0} \\ H_{y,0} = E_{x,0} = 0 \end{cases}$$

Eq.A3.8

L'autre relation contenant $E_{y,0}$ provenant de la 3ème ligne de (Eq.A3.7) devient :

$$(k_x H_{z,0} - k_z H_{x,0})/\varepsilon_1 = (k_x H_{z,0} - k_z H_{x,0})/\varepsilon_2 = \varepsilon_0 \omega E_{y,0}$$

Eq.A3.9

Or, sachant que $\varepsilon_1 \neq \varepsilon_2$ et que $E_{y,0} \neq 0$, cette équation devient sans solution. La propagation d'une onde de surface nécessite donc que $E_{y,0}$ soit nul. Une onde de surface ne peut donc pas être excitée par une polarisation TE. Cela explique le premier point : un plasmon de surface est excité par une polarisation TM.

Dorénavant, nous supposerons que $E_{y,0} = 0$. Les relations (Eq.A3.7) deviennent :

$$\begin{cases} k_z^1 E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{z,0}^2 = -k_x E_{x,0} \qquad 0 = 0 = 0 \\ H_{x,0} = 0 \qquad (k_z^1/\varepsilon_1)H_{y,0} = (k_z^2/\varepsilon_2)H_{y,0} = \varepsilon_0 \omega E_{x,0} \\ k_z^1 E_{x,0} - k_x E_{z,0}^1 = k_z^2 E_{z,0} - k_x E_{z,0}^2 = \mu_0 \omega H_{y,0} \qquad 0 = 0 = 0 \\ H_{z,0}^1 = H_{z,0}^2 = 0 \qquad \varepsilon_1 E_{z,0}^1 = \varepsilon_2 E_{z,0}^2 = -(k_x/\varepsilon_0\omega)H_{y,0} \end{cases}$$

Eq.A3.10

Cela nous conduit à l'équation caractéristique d'une onde de surface entre deux milieux :

$$\frac{k_z^1}{k_z^2} = \frac{\varepsilon_1}{\varepsilon_2}$$

Eq.A3.11

Comme expliqué précédemment, sachant que $k_z = i \cdot k'_z$ et que k'^1_z et k'^2_z sont de signes opposés, cela implique que les permittivités des deux milieux doivent elles aussi être de signe opposé. Cela explique le deuxième point : un plasmon de surface ne peut être excité qu'entre un milieu métallique et un milieu diélectrique.

Nous allons maintenant calculer la composante longitudinale k_x du vecteur d'onde de l'onde de surface à partir de l'équation (Eq.A3.5) et des conditions limites à l'interface (Eq.A3.6).

$$\begin{cases} k_x{}^2 = \varepsilon_1 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - \left(k_z^1\right)^2 \\ k_x{}^2 = \varepsilon_2 \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 - \left(k_z^2\right)^2 \end{cases} \qquad \underline{Eq.A3.12}$$

En combinant cette équation avec la relation (Eq.A3.11), nous obtenons la valeur de k_{SPR}.

$$k_{SPR}{}^2 = \left(\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}\right) \cdot \left(\frac{\omega}{c}\right)^2 \qquad \underline{Eq.A3.13}$$

avec $\varepsilon_m = \varepsilon_1$ la permittivité du milieu métallique et $\varepsilon_d = \varepsilon_2$ la permittivité du diélectrique.

Pour les métaux, la permittivité est complexe et peut s'écrire sous la forme $\varepsilon_m = \varepsilon_{mr} + \varepsilon_{mi}$. Dans le cas où $|\varepsilon_{mr}| >> \varepsilon_{mi}$, nous pouvons approximer k_{SPR} de la manière suivante :

$$k_{SPR} = \sqrt{\frac{\varepsilon_m \cdot \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}} \cdot \frac{\omega}{c}$$

BIBLIOGRAPHIE

[i] http://www.cosmosmagazine.com/news/1894/genetics-explosion-changing-face-medicine (consulté le 10 avril 2009)

[ii] http://www.dnavision.be (consulté le 10 avril 2009)

[iii] http://www.lgc.co.uk (consulté le 10 avril 2009)

[iv] http://www.cogenics.com (consulté le 10avril 2009)

[v] https://www.decodeme.com (consulté le 10 avril 2009)

[vi] https://www.23andme.com (consulté le 10 avril 2009)

[vii] http://www.premier-ministre.gouv.fr/chantiers/sante_1113/projet_revision_loi_bioethique_60642.html (consulté le 10 avril 2009)

[viii] http://www.invs.sante.fr/publications/2008/depistage_cancer_sein/depistage_cancer_sein.pdf (consulté le 10 avril 2009)

[ix] L.C. Clark Jr. – *« Monitor and control of blood tissue O2 tensions »* Transactions of the American Society for Artificial Internal Organs, **2**, 41–84 (1956)

[x] http://fr.wikipedia.org/wiki/Cycle_de_Krebs (consulté le18 décembre 2008)

[xi] http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Metabo/ck1.htm (consulté le18 décembre 2008)

[xii] RP. Guo, C. Zhong, M. Shi, CQ. Zhang, W. Wei, YQ. Zhang, JQ. Li – *« Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma »* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, **132**, n°9 : 547-555 (2006)

[xiii] DS. Goumenos, P. Kalliakmani, S. Tsakas, E. Papachristou, JG. Vlachojannis – *« Growth factors and apoptosis-related protein expression in human crescentic nephritis »* Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research, **14**, n°11 : 243-248 (2008)

[xiv] P. James – *«Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics »* Quarterly reviews of biophysics, **30**, n°4 : 279-331 (1997)

[xv] AI. Lamonda, M. Mann – *« Cell biology and the genome projects a concerted strategy for characterizing multiprotein complexes by using mass spectrometry »* Trends in Cell Biology, **7**, n°4 : 139-142 (1997)

[xvi] http://medgen.unige.ch/cytogenetics/chorio.html (consulté le 02 février 2009)

[xvii] P. Formichi, C. Battisti, E. Radi, A. Federico – *« Cerebrospinal Fluid Tau, Aß, and Phosphorylated Tau Protein for the Diagnosis of Al zheimer's Disease »* Journal of cellular physiology, **208** : 39-46 (2006)

[xviii] X, Wang, M. Zhao, DD. Nolte – *«Area-scaling of interferometric and fluorescent detection of protein on antibody microarrays »,* Biosensors & bioelectronics, **24**, n°4 : 987-993 (2008)

[xix] WGT. Willats, SE. Rasmussen, T. Kristensen, JD. Mikkelsen, JP. Knox – *«Sugar-coated microarrays: a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans»* Proteomics, **2,** n°12 : 1666-1671 (2002)

[xx] E. Maillart, K. Brengel-Pesce, D. Capela, A. Roget, T. Livache, M. Canva, Y. Levy, T. Soussi – *«Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction»* Oncogene, **23**, n°32 : 5543-5550 (2004)

[xxi] C. Corne, JB. Fiche, V. Cunin, A. Buhot, J. Fuchs, R. Calemczuk, A. Favier, T. Livache, D. Gasparutto – *«SPR-imaging based assays on an oligonucleotide-array to analyze DNA lesions recognition and excision by repair proteins»*, Nucleic acids symposium series, **52** : 249-250, (2008)

[xxii] J. Hottin, J. Moreau, G. Roger, J. Spadavecchia, MC.Millot, M. Goossens, M. Canva – *«Plasmonic DNA: Towards Genetic Diagnosis Chips»* Plasmonics, **2**, n°4 : 1557-1955 (2007)

[xxiii] Société Affymétrix, http://www.affymetrix.com (consulté le 18 décembre 2008)

[xxiv] Société Agilent, http://www.chem.agilent.com (consulté le 18 décembre 2008)

[xxv] Société Nanogen, http://www.nanogen.com (consulté le 18 décembre 2008)

[xxvi] GS. Gerhard, RL. Malek – *«Emerging Area of Aging Research:Long-lived Animals with "Negligible Senescence"»* http://www.agelessanimals.org/research1.htm (consulté le 18 décembre 2008)

[xxvii] PJ. Skinner, H. Abbassi, B. Chesebro, RE. Race, C. Reilly, AT. Haase – *«Gene expression alterations in brains of mice infected with three strains of scrapie »* BMC genomics, **7** : 114 (2006)

[xxviii] http://proteomics.stanford.edu/robinson/antigen.html (consulté le 18 décembre 2008)

[xxix] J. Fritz, EB. Cooper, S. Gaudet, PK. Sorger, SR. Manalis – *«Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge»* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **99**, n°22 : 14142-14146 (2002)

[xxx] M. Barbaro, A. Bonfiglio, L. Raffo, A. Alessandrini, P. Facci, I. Barak, – *«Fully electronic DNA hybridization detection by a standard CMOS biochip»* Sensors & Actuators: B. Chemical, **118**, 1 : 41-46, (2006)

[xxxi] PJ. O'Connell, C. Gormally, M. Pravda, GG. – *«Guilbault Development of an amperometric L-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis»* Anal. Chim. Acta, **431** : 239-247 (2001)

[xxxii] S. Brahim, AM. Wilson, D. Narinesingh, E. Iwuoha, A. Guiseppi-Elie – *«Chemical and biological sensors based on electrochemical detection using conducting electroactive polymers»* Microchemica Acta, Springer Wein, **0**, n°2 : 123-137 (2003)

[xxxiii] ZW. Chen, A. Balamurugan, SM. Chen – *«Detection of DNA by using bio-conducting polymer-Nile blue composite electrode; Nile blue as an indicator»* Bioelectrochemistry, **75**, 1 : 13-18 (2009)

[xxxiv] J. Wang, D. Xu, AN. Kawde, R. Polsky – *«Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization»* Analytical chemistry, **73**, n°22 : 5576-5581 (2001)

[xxxv] H. Cai, Y. Xu, N. Zhu, P. He, Y. Fang – *«An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label»* Analyst, **127** : 803 – 808 (2002)

[xxxvi] J. Wang, J. Lu, UA. Kirgoz, SB. Hocevar, B. Ogorevc – *«Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes»* Analytica Chimica Acta, **434**, 1 : 29-34 (2001)

[xxxvii] Y. Wang, Z. Liu, X. Hu, J. Cao, F. Wang, Q. Xu, C. Yang – *«On-line coupling of sequential injection lab-on-valve to differential pulse anodic stripping voltammetry for determination of Pb in water samples»* Talanta, **77**, 3 : 1203-1207 (2009)

[xxxviii] J.Wang – *«Nanoparticle-based electrochemical DNA detection»* Analytica chimica acta, **500** : 247-257 (2003)

[xxxix] J. Fritz, EB. Cooper, S. Gaudet, PK. Sorger, SR. Manalis – *«Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge»* PNAS, **99** n°22 : 14142-14146 (2002)

[xl] KR. Rogers – *«Principles of affinity-based biosensors»* Molecular biotechnology, **14**, n°2 : 109-129 (2000)

[xli] R. Cush, JM. Cronin, WJ. Stewart, CH. Maule, J. Molloy, NJ. Goddard – *«The resonant mirror: a novel optical biosensor for direct sensing of biomolecular interactions. Part I:*

Principle of operation and associated instrumentation» Biosensors and bioeletronics, **8** : 347-354 (1993)

[xlii] C. Stamm, W. Lukosz – *«Integrated optical difference interferomter as immunosensor»* Sensors and actuators B, **31** : 203-207 (1996)

[xliii] J. Homola, SS. Yee, G. Gauglitz – *«Surface plasmon resonance sensors: review»* Sensors and Actuators B: Chemical, **54**, 1 : 3-15 (1999)

[xliv] E. Maillart – *«Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel»* Thèse de l'Université Paris XI, Orsay (2004)

[xlv] http://www.biacore.com/lifesciences/index.html (consulté le 18 décembre 2008)

[xlvi] http://www.genoptics-spr.com/ (consulté le 23 mai 2009)

[xlvii] G. Mendel – *«Experiments in plant hybridization»* (1865) disponible sur : http://www.mendelweb.org/Mendel.html (consulté le 18 décembre 2008)

[xlviii] A. Weismann – *«Rejection of the inheritance of acquired traits»* (1883) présenté lors de la conférence "On inheritance" (*"Über die Vererbung"*) et résumé sur : http://en.wikipedia.org/wiki/August_Weismann (ou en français sur : http://fr.wikipedia.org/wiki/August_Weismann (consultés- le 18 décembre 2008))

[xlix] OT. Avery, CM. MacLeod, M. McCarty – *«Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types»* Journal of Experimental Medicine, **79** : 137-158 (1944)

[l] JD. Watson, FHC. Crick – *«Molecular structure of nucleic acid»* Nature, **171** : 737-738 (1953)

[li] RE. Franklin, RG. Gosling – *«Evidence for 2-Chain Helix in Crystalline Structure of Sodium Deoxyribonucleate»* Nature, **172** : 156-157 (1953)

[lii] E. Chargaff, R. Lipshitz, C. Green, ME. Hodes – *«The composition of the deoxyribonucleic acid of salmon sperm»* Journal of Biological Chemistry, **192** : 223-230 (1951)

[liii] MC. Murphy, I. Rasnik, W. Cheng, TM. Lohman, T. Ha – *«Probing Single-Stranded DNA Conformational Flexibility Using Fluorescence Spectroscopy»* Biophysical Journal, **86**, n°4 : 2530–2537 (2004)

[liv] JB. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache – *«Temperature effects on DNA chip experiments from surface plasmon resonance imaging: isotherms and melting curves»* Biophysical journal, **92**, n°3 - 935-946 (2007)

[lv] R. Owczarzy, Y. You, BG. Moreira, JA. Manthey, L. Huang, MA. Behlke, JA. Walder – *«Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures»* Biochemistry, **43**, n°12 - 3537-3554 (2004)

[lvi] T. Xia, JJr. SantaLucia,ME. Burkard, R. Kierzek, SJ. Schroeder, X. Jiao, C. Cox, DH. Turner, – *«Thermodynamic Parameters for an Expanded Nearest-Neighbor Model for Formation of RNA Duplexes with Watson-Crick Base Pairs»* Biochemistry, **37** : 14719-14735 (1998)

[lvii] N. Peyret, PA. Seneviratne, HT. Allawi, JJr. SantaLucia – *«Nearest-Neighbor Thermodynamics and NMR of DNA Sequences with Internal A-A, C-C, G-G, and T-T Mismatches»* Biochemistry, **38** : 3468-3477 (1999)

[lviii] S. Bommarito, N. Peyret, JJr. SantaLucia – *«Thermodynamic parameters for DNA sequences with dangling ends»* Nucleic Acids Res. **28** : 1929-1934 (2000)

[lix] JJr. SantaLucia, D. Hicks – *«The Thermodynamics of DNA Structural Motifs»*, Annual review of biophysics and biomolecular structure, 33 : 415-40 (2004)

[lx] N. Bassil – *«Système de biopuce optique en temps réel : Application au diagnostic génétique»*, Thèse de l'Université Paris XI, Orsay (2005)

[lxi] http://dinamelt.bioinfo.rpi.edu/twostate.php (consulté le 18 décembre 2008)

[lxii] A. Halperin, A. Buhot, EB. Zhulina – *«Brush effects on DNA chips : Thermodynamics, Kinetics, and Design Guidelines»,* Biophysical Journal, **89** : 796-811 (2005)

[lxiii] H. Eickhoff, J. Schuchhardt, I. Ivanov, S. Meier-Ewert, J.O'Brien, A. Malik, N. Tandon, EW. Wolski, E. Rohlfs, L. Nyarsik, R. Reinhardt, W.Nietfeld, H. Lehrach – *«Tissue Gene Expression Analysis Using Arrayed Normalized cDNA Libraries»* Genome Research, **10**, 8 : 1230 (2007)

[lxiv] I. Burbulis, K. Yamaguchi, A. Gordon, R. Carlson, R. Brent – *«Using protein-DNA chimeras to detect and count small numbers of molecules»* Nature Methods, **2**, 1 : 31-37 (2005)

[lxv] SW. Yeung, TMH. Lee, H. Cai, IM. Hsing – *«A DNA biochip for on-the-spot multiplexed pathogen identification»* Nucleic Acids Research, **34**, 18 : e118-e118 (2006)

[lxvi] RW. Wood – «*On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum*» Proceedings of the Physical Society of London, 18, n°1 : 269-275 (1902)

[lxvii] U A. Otto – «*The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves)* » Journal of Optical Society of America, **31** : 213–222 (1941)

[lxviii] A. Otto – «*Excitation of surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*» Physik, **216** : 398–410 (1968)

[lxix] E. Kretschmann, H. Raether – *«Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light»* Naturforsch **23A** : 2135–2136 (1968)

[lxx] VE. Kochergin, AA. Beloglazov, MV. Valeiko, PI. Nikitin – «*Phase properties of a surface-plasmon resonance from the view point of sensor applications»* Quantum electronics, **28** : 444-448 (1998)

[lxxi] S. Boussaad, J. Pean, NJ. Tao, – «*High-Resolution multiwavelenght surface plasmon resonance spectroscopy for probing conformational and electronic changes in Redox Proteins»* Analytical Chemistry, **72 :** 222-226 (2000)

[lxxii] B. Lamprecht, JR. Krenn, G. Schider, H. Ditlbacher, M. Salermo, N. Felidj, A. Leitner, FR. Aussenegg, JC. Weeber – «*Surface plasmon propagation in microscale metal stripes»* Applied physics letters, **79**, n°1 : 51-53 (2001)

[lxxiii] B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundström – *«Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing»* Sensor and Actuators, **4** : 299-304 (1983)

[lxxiv] AH. Sevars, RB. Schasfoort, MH. Salden – *«An immunosensor for syphilis screening based on surface plasmon resonance»* Biosensors & bioelectronics, **8**, 3-4 : 185-189 (1993)

[lxxv] K. Kurihara, K. Suzuki – «*Theoretical understanding of absorption-based surface plasmon resonance sensor based on Kretchmannn's theory»* Analytical Chemistry, **74 :** 696-701 (2002)

[lxxvi] C. David, H. Hervé, B. Sébille, M. Canva, M.C. Millot – «*The reversible binding of immunoglobulin G modified with adamantyl-end-capped poly(ethylene glycol)s to poly-b-cyclodextrin-coated gold surfaces and their interactions with specific target molecules: a surface plasmon resonance investigatio*n» Sensors and Actuators, B **114** : 869-880 (2006)

[lxxvii] G. Kovacs – «*Optical excitation of surface plasmon-polaritons in layered media»* Electromagnetic Surface, Boardman, New York : 143–200 (1982)

[lxxviii] J. Homola, SS. Yee, DM. Myszka – «*Surface Plasmon Resonance Biosensors*» Optical biosensors: Present and Future : 207-251 (2002)

[lxxix] P. Lecaruyer, E. Maillart, M. Canva, J. Rolland – «*Generalization of the Rouard method to an absorbing thin-film stack and application to surface plasmon resonance*» Applied optics, **45**, 33 : 8419-8423 (2006)

[lxxx] P. Lecaruyer, M. Canva, J. Rolland – *«Metallic film optimization in a surface plasmon resonance biosensor by the extended Rouard method»* Applied optics, **46**, 12 : 2361-2369 (2007)

[lxxxi] AG. Markelz, A. Roitberg, EJ. Heilweil – *«Pulsed terahertz spectroscopy of DNA, bovine serum albumin and collagen between 0.1 and 2.0 THz»* Chemical Physics Letters, **320**, n°1 : 42-48 (2000)

[lxxxii] JA. De Feijter, J. Benjamins, FA. Veer – *«Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface»*, Biopolymers, **17** : 1759–1772 (1978)

[lxxxiii] H. Dautzenberg, A. Zintchenko, C. Konak, T. Reschel, V. Subr, K. – *«Ulbrich Polycationic graft copolymers as carriers for oligonucleotide delivery. Complexes of oligonucleotides with polycationic graft copolymers»* Langmuir **17**, 10 : 3096–3102 (2001)

[lxxxiv] LK. Wolf, Y. Gao, RM. Georgiadis – *«Sequence-dependent DNA immobilization : Specific versus nonspecific contributions»* Langmuir, **20** : 3357-3361 (2004)

[lxxxv] http://www.photonlines.fr/physique/camera-ccd-sensible/pixelfly-qe-12-bit-tres-sensible.html (consulté le 18 décembre 2008)

[lxxxvi] http://www.gilson.com/products/product.asp?pID=79 (consulté le 18 décembre 2008)

[lxxxvii] http://www.ovenind.com/bv/Products/5C7-252-Sensing-Controller__5C7-252.aspx (consulté le 18 décembre 2008)

[lxxxviii] http://www.ovenind.com/bv/Products/TS67-170__TS67-170.aspx (consulté le 18 décembre 2008)

[lxxxix] N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M.C. Millot, S. Pissard, R. Narwa, M. Goossens – *«One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations»* Sensor and Actuator, B **94** : 313-323 (2003)

[xc] CE. Jordon, BL. Frey, S. Kornguth, RM. Corn – «*Characterization of poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation Fourrier transform infrared spectroscopy and surface plsamon resonance measurments»* Langmuir, **10** : 964-967 (1994)

[xci] J. Bergström, S. Löfas, B. Johnsson – «*Sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensors systems»* Patent Cooperation Treaty Application, patent n°WO90053 (1990)

[xcii] S. Tombelli, M. Mascini, APF. Turner – *«Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals»* Biosensors and Bioelectronics, **17,** n°11 : 929-936 (2002)

[xciii] I. Mannelli, L. Lecerf, M. Guerrouache, M. Goossens, M.C. Millot, M. Canva, – *«DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems»* Biosensors and Bioelectronics, **22,** 6 : 803-809 (2007)

[xciv] J. Spadavecchia, J. Moreau, J. Hottin, M. Canva – *«New cysteamine based functionalization for biochip application»* Sensors & Actuators: B. Chemical, in submission

[xcv] M. Srisa-Art, EC. Dyson, AJ. deMello, JB. Edel – *«Monitoring of real-time streptavidin-biotin binding kinetics using droplet microfluidics»* Analytical chemistry, **80**, n°18 : 7063-7067 (2008)

[xcvi] M. Bradley, L. Alexander, RM. Sanchez-Martin – *«Cellular uptake of fluorescent labelled biotin-streptavidin microspheres»* Journal of fluorescence, **18**, n°3-4 : 733-739 (2008)

[xcvii] T. Lu, X. Chen, Q. Shi, Y. Wang, P. Zhang, X. Jing – *«The immobilization of proteins on biodegradable fibers via biotin-streptavidin bridges»* Acta Biomaterialia, **4**, n°6 : 1770-1777 (2008)

[xcviii] RG. Sosnowski, E. Tu, WF. Butler, JP. O'Connell, MJ. Heller – *«Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control»* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **94**, n°4 : 1119-1123 (1997)

[xcix] F. Fixe, HM. Branz, N. Louro, V. Chu, DMF. Prazeres, JP. Conde – *«Immobilization and hybridization by single sub-millisecond electric field pulses, for pixel-addressed DNA microarrays»* Biosensors and Bioelectronics, **19**, n°12 : 1591-1597 (2004)

[c] RH. Austin, JP. Brody, EC. Cox, T. Duke, W. Volkmuth – *«Stretch Genes»* Physics Today, **50**, n° 37 (1997)

[ci] F. Antigny, C. Norez, A, Cantereau, F. Becq, C. Vandebrouck – «*Abnormal spatial diffusion of Ca2+ in F508del-CFTR airway epithelial cells»* Respiratory Research, **9**, n°1 : 70 (2008)

[cii] http://www.genet.sickkids.on.ca:80/cftr/ConsortiumDataPage1.html (consulté le 18 décembre 2008)

[ciii] http://www.biochipnet.com/node/2059 (consulté le 10 avril 2009)

[civ] NP. Gerry, NE. Witowski, J. Day, RP. Hammer, G. Barany, F. Barany – *«Universal DNA Microarray Method for Multiplex Detection of Low Abundance Point mutations»* Joural of Molecular Biology, **292** : 251–262 (1999)

[cv] P. Lecaruyer, I. Mannelli, V. Courtois, M. Goossens, M. Canva – «*Surface plasmon resonance imaging as a multidimensional surface characterization instrument – application to biochip genotyping»* Analytica Chemica Acta, **573-574** : 333-340 (2006)

[cvi] V. Chan, D.J. Graves, S. McKenzie – *«The biophysics of DNA hybridization with immobilized oligonucleotide probes»* Biophysical Journal, **69**, n°6 : 2243-2255 (1995)

[cvii] J.B. Fiche, A. Buhot, R. Calemczuk, T. Livache – *«Temperature effects on DNA chip experiments from surface Plasmon resonance imaging: Isotherms and melting curves»* Biophysical Journal, **92**, 935-946 (2007)