



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :
Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA Toulouse)

Discipline ou spécialité :
Biotechnologies

Présentée et soutenue par :
Flavien PILLET

le : mercredi 15 décembre 2010

Titre :
Développement d'un outil d'analyse d'interactions moléculaires basé sur la
résonance plasmonique de surface (SPRi)

JURY

Sophie BELLON
Jean-Marie FRANÇOIS
Thierry LIVACHE
Martine PUGNIÈRE

Alain BRISSON
Véronique LE BERRE
Jean-Louis MARTY
Christophe VIEU

Ecole doctorale :
Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :
UMR INSA/CNRS 5504/INRA 792

Directeur(s) de Thèse :
Véronique LE BERRE et Jean-Marie FRANÇOIS

Rapporteurs :
Martine PUGNIÈRE et Alain BRISSON

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, Thierry Livache, Jean-Louis Marty et Christophe Vieu pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mon travail, ainsi que Martine Pugnière et Alain Brisson qui ont également accepté d'être rapporteurs et cela malgré les contraintes temporelles.

Je remercie ensuite, Véronique Le Berre et Jean-Marie François qui m'ont accueilli et encadré au sein de la plateforme Biopuces et qui m'ont témoigné leur confiance durant ces trois années. Véronique a toujours été disponible pour m'aiguiller au cours de la thèse, tout en favorisant mon autonomie et en m'encourageant à m'ouvrir à de nouvelles thématiques de recherche enrichissantes pour mon travail de thèse. Jean-Marie m'a toujours donné des recommandations très pertinentes qui m'ont permis d'avancer sur le sujet. Je pense également à Emmanuelle Trévisiol qui a fait preuve d'une grande patience pour me guider dans les méandres de la chimie de greffage des biomolécules sur l'or. Je remercie ensuite très sincèrement Lidwine Trouilh, Nathalie Marsaud et Delphine Labourdette pour leurs bons conseils, les petites sorties en soirée et pour leurs blagues qui n'ont pas manqué d'alléger le stress emmagasiné au cours de la thèse. Je n'oublie pas non plus, toutes les personnes qui sont passées sur la plateforme biopuces, que ce soit «les filles de Cepheid» Caroline Catherine, Nathalie Seret, Sandrine Razafimahatratra, mais aussi les informaticiens, les thésards et les stagiaires.

Je tiens à exprimer ma gratitude à la société Genoptics Horiba-Scientific et à son directeur Didier-Luc Brunet pour avoir financé mon travail de thèse. J'ai été très heureux d'avoir été suivi par Sophie Bellon qui malgré la distance a toujours été disponible et qui a eu la gentillesse de me montrer un aperçu de la vie parisienne lorsque je suis monté. Je remercie aussi Karen Mercier, Emmanuel Maillart ainsi que l'ensemble de l'équipe pour leurs recommandations sur la technologie SPRI.

Je remercie également l'équipe NBS du LAAS pour m'avoir ouvert au monde de la physique, ce qui en tant que biochimiste a été pour moi particulièrement nouveau et captivant. Je pense à Christophe Vieu et Aline Cerf pour les travaux commencés sur l'effet SERS et à Christophe Thibault pour les expériences d'AFM.

Je n'oublie pas non plus toutes les collaborations, que ce soit avec Geneviève Pratviel et Carmen Romera du LCC, Jean-Yves Bouet du LMGM, François Boudsoq du LBME, Jean-Louis Marty de l'université Via Domitia à Perpignan et Muriel Mercier-Bonin et Lam Le du LISBP.

Enfin, je remercie ma famille, mes amis qui m'ont toujours soutenu et cela, quelques soient les situations dans lesquelles je me suis trouvé. Je n'oublie pas bien sûr Aurélie pour son indéfectible soutien au cours de ces années et pour les raisons qu'elle connaît.

Sommaire

Liste des abréviations.....	9
Introduction.....	11
I. Les méthodes de détection avec marquage.....	12
I.1 La radioactivité	12
I.2 La fluorescence	14
I.2.1 Le FRET	15
I.2.2 Les biopuces à fluorescence	16
I.3. La bioluminescence.....	17
II. Les méthodes de détection sans marquage (autres que la SPR).....	19
II.1 La microbalance à quartz.....	19
II.2 Les micro-résonateurs	21
II.3 La diffusion Raman exaltée en surface.....	23
III. La résonance plasmonique de surface	24
III.1 Théorie	25
III.2 Le dispositif.....	27
III.3 Les développements récents	28
III.3.1 La miniaturisation	28
III.3.2 La sensibilité	30
III.3.3 Du multiplexage à la SPRi.	32
III.3.4 Le couplage SPRi et spectrométrie de masse.	34
III.3.5 Les applications en SPR et SPRi.....	36

IV. Bilan	39
V. Introduction au travail de thèse	41
Chapitre I. Recherche d'une chimie de greffage d'oligonucléotides sur l'or	42
I. Introduction	42
I.1 L'électro-dépôt	43
I.2 Le dépôt par contact	45
I.3 Bilan.....	47
II. Validation de chimies de greffage par fluorescence.....	48
II.1 Principe.....	48
II.2 Comparaison de chimie de greffage par fluorescence	50
III. Validation de chimies de greffage en SPRI	53
III.1 Expériences préliminaires	53
III.2 Études comparatives de chimies avec ou sans électro-dépôt	57
IV. Stabilité des oligonucléotides modifiés par un thiol	60
IV.1 Stabilité au cours du dépôt	60
IV.2 Stabilité au cours de l'expérience SPRI.....	61
IV. 3 Stabilité à haute température.	62
IV.4 Stabilité au cours du temps.....	64
IV.5 Conclusion	65
V. Augmentation de la densité de dépôt	66

Chapitre II. Amélioration de la détection	68
I. Introduction	68
II. Surfaces dendrimères.....	69
III. Surfaces de nanoparticules d'or	72
III.1 Greffage des nanoparticules d'or.....	72
III.2 Influence de la taille des nanoparticules d'or sur la détection	74
IV. Conclusion	75
Chapitre III.1 Recherche de ligands spécifiques des G-quadruplex .	76
I. Contexte	76
II. Méthode de calcul des constantes d'affinité	80
III. Formation des G-quadruplex.....	82
IV. Identification des cibles G-quadruplex	84
V. Conclusion	86
Chapitre III.2 Étude d'un complexe de partition bactérien.....	88
I. Contexte	88
II. Validation de l'étude d'interaction SopB/sopC en SPRI.....	91
III. Étude de l'interaction SopB/sopC.	95
III.1 Site de fixation de SopB.....	95
III.2 Interactions de SopB sur la séquence centrale.	97
III.3 Détermination des bases impliquées dans l'interaction	99
IV. Conclusion	101

Conclusion générale	102
Perspectives.....	104
Matériel et Méthodes	106
Références.....	121
Publications réalisées au cours de la thèse.....	132

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique.
ADNc	ADN complémentaire.
AFM	Microscopie à Force Atomique.
ANR	Agence Nationale de la Recherche.
ARN	Acide RiboNucléique.
ARNm	ARN messenger.
ARNmi	ARN micro.
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer.
BSA	Bovine Serum Albumin.
CCD	Charge Coupled Device.
Cy3	Cyanine 3.
Cy5	Cyanine 5.
DTT	Dithiothreitol.
<i>E.coli</i>	Escherichia coli.
EDC	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide.
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer.
GFP	Green Fluorescent Protein.
GNP	Gold NanoParticules.
HEPES	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique.
IL-2	Interleukine-2.
LAAS	Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes.
LCC	Laboratoire de Chimie de Coordination.
LED	Light-Emitting Diode.
LISBP	Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés.
LMGE	Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote.
LMGM	Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires.
LSRP	Long-Range Surface Plasmon.
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization.
MS	Mass Spectrometry.
MUA	11-mercaptoundecanoic acid.

NHS	N-hydroxysuccinimide.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PEI	poly(ethylenimine).
PL	poly-L-lysine.
PMF	Peptide Mass Fingerprint.
PTV	Peak To Valley.
QCM	Quartz Crytal Microbalance.
QCM-D	Quartz Crytal Microbalance with Dissipation monitoring.
RIU	Refractive Index Unit.
SAM	Self-assembled monolayers.
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering.
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms.
SPR	Résonance Plasmonique de Surface.
SPRi	Résonance Plasmonique de Surface par imagerie.
SRSP	Short-Range Surface Plasmon.
THF	TétraHydroFurane.
TOF	Time Of Flight.
YFP	Yellow Fluorescent Protein.

Introduction

Le terme molécule provient du latin scientifique *molecula* et dérive du diminutif du nom *moles* qui signifie «masse». La plus ancienne théorie de la connectivité des atomes préalable à la conception des molécules a été envisagée pour la première fois par le philosophe grec Leucippe aux alentours de 430 avant notre ère. Il faudra attendre la première moitié du XIX^{ème} siècle pour que le concept de molécule se précise. C'est notamment John Dalton (1803-1808) mais surtout Amadeo Avogadro [1] qui seront les premiers à en donner une signification moderne qui surmonte la confusion faite à cette époque entre atomes et molécules. La définition actuelle donnée dans le dictionnaire Larousse décrit ainsi une molécule comme «particule formée d'atomes et qui représente, pour un corps pur qui en est constitué, la plus petite quantité de matière pouvant exister à l'état libre».

Le concept de biomolécules est plus récent et englobe toutes les molécules impliquées dans les processus biologiques des êtres vivants. Il peut s'agir entre autres, des glucides, des protéines, des acides nucléiques...etc. La caractérisation toujours croissante d'un grand nombre de biomolécules s'est accompagnée d'une diversification et d'une amélioration des techniques d'analyse et de détection. Toutes ces avancées ont ainsi ouvert la voie à la compréhension de phénomènes de plus en plus complexes et ces dernières décennies, un intérêt grandissant a été porté à l'étude des interactions entre biomolécules.

Parmi le nombre toujours croissant de technologies et de concepts permettant l'étude des interactions entre biomolécules, nous nous intéresserons principalement à celles liées aux technologies sur support et à leurs applications, bien qu'il existe un grand nombre de techniques de caractérisation en solution (FRET, BRET, Chip, etc.) pas ou peu détaillées ici. L'introduction de ce manuscrit portera, dans un premier temps, sur la liste non exhaustive des différentes techniques qui permettent avec ou sans marquage de suivre des interactions entre biomolécules. Nous traiterons ensuite des différentes techniques de

détections basées sur la résonance plasmonique de surface, conduisant ainsi au principe de la résonance plasmonique par imagerie (Surface Plasmon Resonance imaging ou SPRi).

I. Les méthodes de détection avec marquage

I.1 La radioactivité

L'utilisation d'isotopes radioactifs pour la détection d'interactions entre biomolécules a été envisagée pour la première fois dans les années 1950. Cette méthode très sensible consiste à incorporer dans des molécules cibles d'intérêt des isotopes radioactifs (^{125}I , ^{32}P , ^3H ...etc) qui en se désintégrant émettent des rayons gamma et/ou beta, détectés à l'aide d'un compteur.

La première application de cette technique a été le dosage par radio-immunologie de l'insuline [2]. Cette méthode consiste dans un premier temps à incorporer de l'iode radioactif ^{131}I dans un échantillon de plasma sanguin. L'insuline marquée sera ensuite reconnue par un anticorps spécifique. La détection par cette technique de dérivés allergènes a amélioré la purification de l'insuline sous sa forme native. L'ensemble des travaux sur les dosages par radio-immunologie a ainsi permis à Yalow d'obtenir le prix Nobel en 1977.

A la fin des années 1960, le marquage d'anticorps (^{125}I) a été envisagé pour la détection d'allergènes [3]. Cette méthode a l'avantage d'être très sensible mais dans certains cas, des interactions non spécifiques sur d'autres protéines que celles d'intérêt peuvent être observées lorsque la concentration en anticorps augmente. Cependant cette spécificité peut être améliorée en utilisant deux anticorps marqués qui reconnaissent deux épitopes différents sur la même molécule. Une grande avancée a ensuite été l'incorporation *in vivo* d'acides aminés radio-marqués, généralement la ^{35}S -Méthionine. Cette technique de marquage des protéines peut être couplée entre autres à l'analyse sur gels 2D pour quantifier et comparer de manière très précise la synthèse de différentes protéines [4].

Le véritable bond en avant de ces dernières décennies a été le développement dans les années 1980 de la détection multiplexée et des technologies sur puces. Ces systèmes hautement miniaturisés ont coïncidé avec l'arrivée des technologies de dépôt par aiguille sur des membranes (généralement en nitrocellulose ou en nylon) et ont permis d'étudier

simultanément un grand nombre de molécules. Par exemple, pour l'analyse transcriptomique, les ARNm, après avoir été extraits et purifiés, peuvent être rétro-transcrits en présence de nucléotides marqués au ^{32}P ou ^{33}P . Les ADNc marqués s'hybrident ou non sur des sondes nucléotidiques complémentaires déposées sur membrane de nylon et un scanner de radioactivité permettra d'analyser de manière semi-quantitative les ARNm initialement présents dans l'échantillon [5]. Le principe est illustré figure 1.

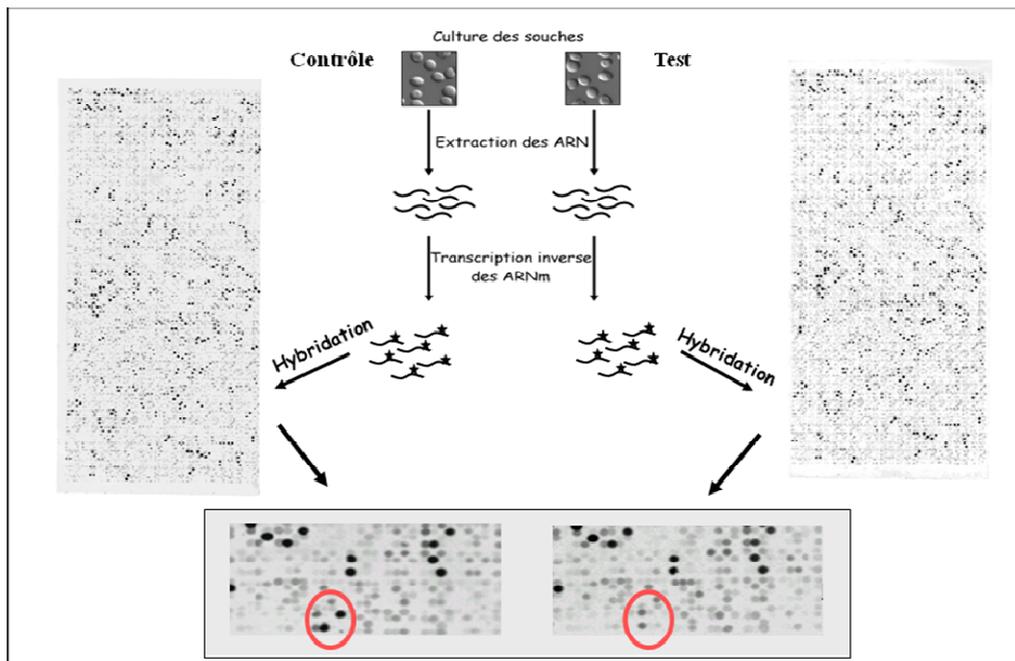


Figure 1. Analyse transcriptomique après marquage radioactif et hybridation d'ADNc.

Les ARN, sont extraits à partir de deux cultures indépendantes, puis retro-transcrits en présence de nucléotides marqués. Les ADNc marqués sont ensuite hybridés sur des membranes de nylon contenant des oligonucléotides sondes complémentaires. La quantité d'ARN de départ est proportionnelle à la radioactivité émise.

En conclusion, le radio-marquage des molécules est une méthode précurseur qui reste une des plus sensibles pour étudier les interactions entre biomolécules. Cependant, le travail avec des radioéléments nécessite des précautions particulières, notamment dans l'emploi et dans le retraitement des déchets occasionnés. Par ailleurs, la demi-vie trop courte de certains radioéléments (14 jours pour le ^{32}P) ne permet pas une longue conservation. De plus, les contraintes physiques liées à la diffusion du signal radioactif limitent les densités possibles pour ce genre de support à quelques centaines de cibles par cm^2 . De ce fait, l'analyse d'un grand nombre d'échantillons conduit à l'utilisation de filtres de

taille importante (plusieurs dizaines de cm^2). Ces différentes limites rendent les technologies utilisant la fluorescence plus compétitives.

I.2 La fluorescence

Une molécule fluorescente a la capacité d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer immédiatement sous forme de photons. L'absorption de photons par une molécule fluorescente va entraîner les électrons d'un état fondamental vers un état énergétique supérieur plus instable. Le retour des électrons à l'état fondamental va s'accompagner d'une émission de photons (diagramme de Jablonsky, figure 2). L'énergie d'un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Dans la plupart des cas, le phénomène de fluorescence se traduit par une perte d'énergie du photon émis par rapport à celui qui est absorbé. La longueur d'onde d'émission est ainsi presque toujours supérieure à celle de l'excitation.

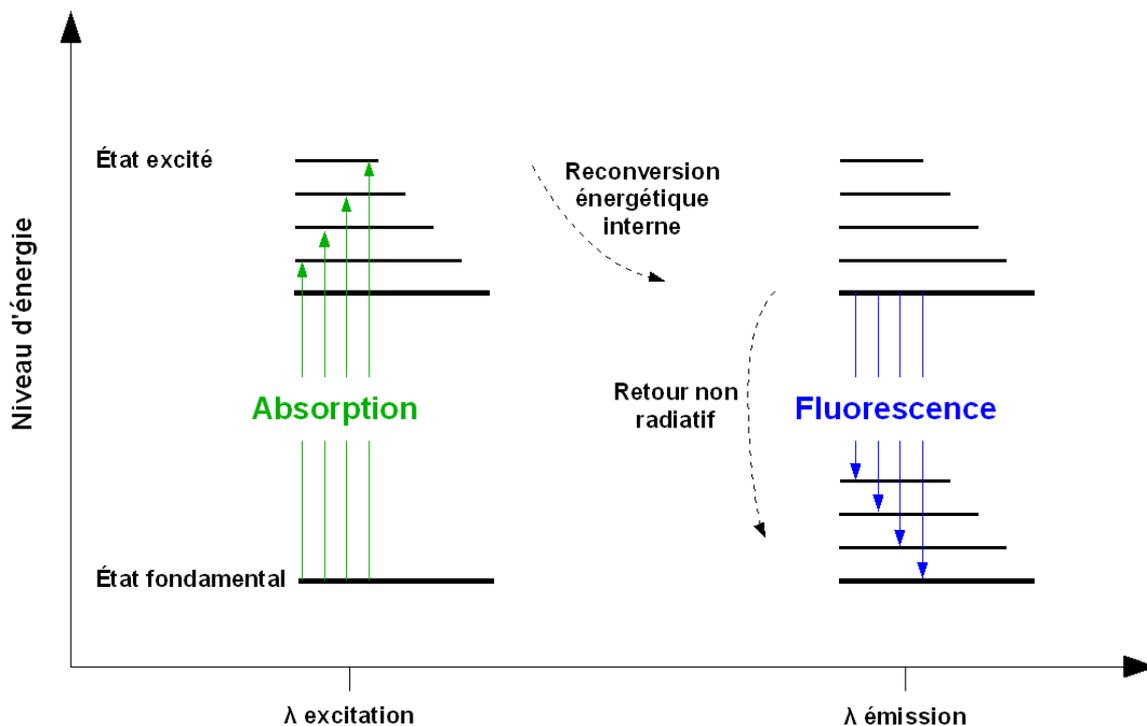


Figure 2. Diagramme de Jablonski

Suite à l'absorption de photons, une molécule fluorescente se trouve à un état électroniquement excité. Le retour des électrons à l'état fondamental se traduit soit par retour non radiatif soit par émission de lumière (fluorescence).

Le phénomène de fluorescence a été décrit la première fois à la fin du 16^{ème} siècle mais il faudra attendre Göppelsröder en 1868 pour que la fluorescence soit véritablement

utilisée comme une technique d'analyse [6]. Il a été le premier à mettre au point une technique de détection de l'aluminium qui en se complexant avec la morine, rend celle-ci fluorescente. Depuis le début du 20^{ème} siècle, les techniques utilisant la fluorescence se sont considérablement diversifiées. On peut citer par exemple l'ELISA, acronyme de l'anglais «Enzyme-linked immuno Sorbent Assay». Cette technique est très employée pour détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène en solution [7]. On peut également s'intéresser à d'autres techniques, telles que le FRET et les biopuces détaillées ci-après.

1.2.1 Le FRET

Le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [8] est une des technologies qui permet de suivre des interactions intermoléculaires (figure 3). Pour cela deux fluorophores sont utilisés, le donneur est excité à une longueur d'onde spécifique et peut ensuite transmettre son énergie à un fluorophore accepteur qui émettra à son tour de la fluorescence. Ce phénomène n'est possible que lorsque les deux fluorophores sont situés à moins de 100 Å. Ainsi, le donneur et l'accepteur sont greffés sur deux molécules différentes et lorsque celles-ci interagissent, l'accepteur émet de la fluorescence [9],[10].

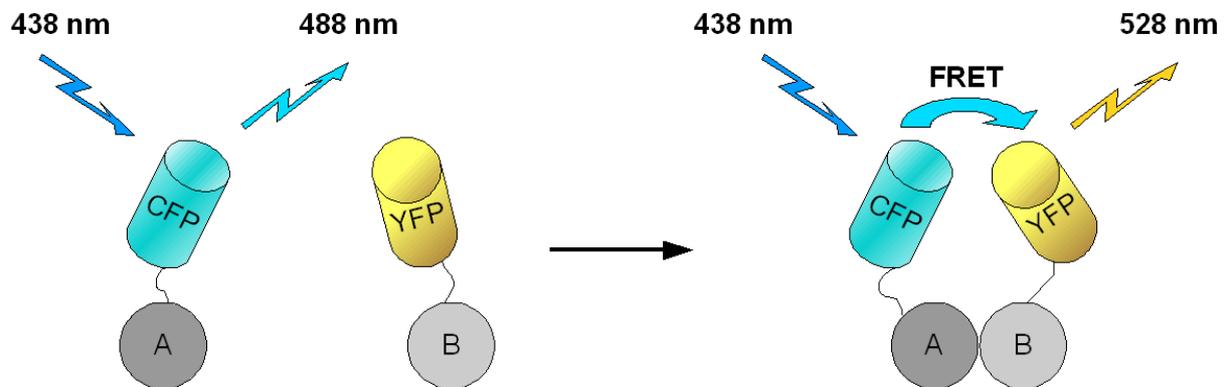


Figure 3. Exemple de FRET

Si les protéines A et B n'interagissent pas, avec une excitation à 438 nm, la CFP (Cyan Fluorescent Protein) émet des photons à 488nm. Si en revanche, les protéines A et B interagissent, la lumière émise par la CFP va permettre l'excitation de l'YFP (Yellow Fluorescent Protein) et l'émission de lumière induite sera détectée à 528nm.

I.2.2 Les biopuces à fluorescence

Les biopuces appelées aussi «Biochips» en anglais, sont des outils très puissants pour suivre simultanément un grand nombre d'interactions entre biomolécules et cela sur une surface minimale (figure 4). Cette technologie consiste à déposer sur un support (nylon, verre, or...etc.) une biomolécule appelée sonde qui va ensuite interagir avec une molécule cible marquée par fluorescence. Au début des années 1990, les sondes ADN ont été les premières molécules à être déposées sur puce [11]. De nombreuses applications ont ainsi été envisagées, que ce soit tout d'abord pour suivre l'expression des gènes [12], pour la détection de maladies génétiques et la détection de polymorphismes [13], pour le criblage de micro ARN impliqué dans un grand nombre de processus de régulation [14,15], ou encore la détection de pathogènes dans l'alimentation et le diagnostic [16,17]. Depuis, même si les puces à ADN restent majoritaires, d'autres biomolécules peuvent être déposées sur puces telles que les sucres [18,19] ou les protéines [20].

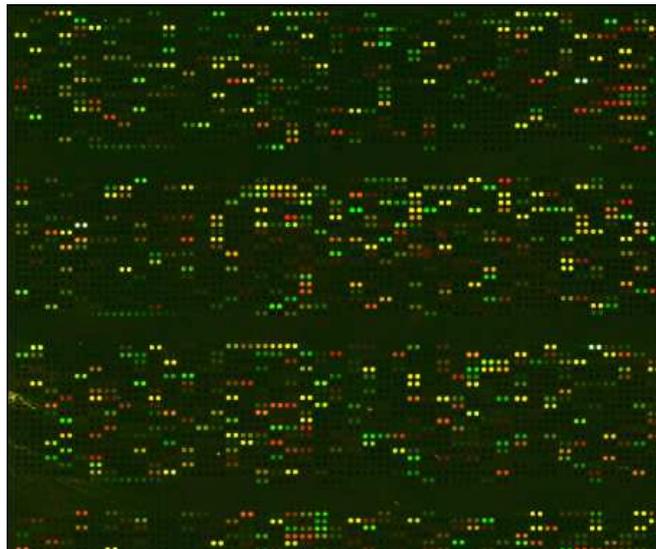


Figure 4. Exemple de biopuce avec détection par fluorescence

Cette image a été obtenue après dépôt de sondes nucléotidiques sur lame de verre et hybridation de cibles complémentaires marquées par fluorescence (Plateforme biopuces, Toulouse).

L'un des avantages majeurs de la détection par fluorescence est la possibilité de comparer deux échantillons biologiques différents (en général un échantillon expérimental et un échantillon contrôle), dont les interactions respectives sont détectées avec des

fluorochromes émettant à des longueurs d'onde différentes. Le marquage des molécules cibles par fluorescence est donc une étape primordiale. Différents marqueurs sont couramment utilisés, comme les cyanines (Cy3 et Cy5), les Alexa (555 et 647), le Bodipy TMR..., etc [21]. Les cibles nucléotidiques peuvent ainsi être marquées directement au cours d'une PCR (Polymerase Chain reaction) ou d'une RT (Retrotranscription) par l'incorporation de nucléotides fluorescents ou indirectement, par l'incorporation de nucléotides modifiés, qui interagissent ensuite avec des composés fluorescents. Le marquage des protéines peut lui se faire par l'utilisation des Cyanines ou d'Alexa modifiées qui réagissent avec les fonctions NH₂ des protéines, mais également par la co-expression de la protéine cible avec la GFP [22] ou encore en utilisant des anticorps fluorescents.

En conclusion, la fluorescence a participé au développement des biopuces et reste une technique très employée pour suivre les interactions entre biomolécules, qui contrairement à la radioactivité ne nécessite pas de précautions particulières d'emploi.

I.3. La bioluminescence

La bioluminescence est un phénomène naturel qui a été décrit la première fois par le physiologiste français Raphaël Dubois en 1887. Certains organismes vivants ont ainsi la capacité d'émettre de la lumière par l'action d'une enzyme, la Luciférase. En présence d'oxygène, cette enzyme va oxyder la Renilla luciférine, qui émettra ensuite des photons. Depuis une dizaine d'années, une technique analogue au FRET s'est développée et utilise la bioluminescence pour étudier les interactions entre biomolécules. La différence avec le BRET pour (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) est que l'énergie du donneur provient d'une molécule luminescente, la luciférase, qui n'est pas excitée par une source lumineuse mais lorsqu'elle est en présence de son substrat, la luciférine. Les photons émis exciteront ensuite une molécule fluorescente [23]. Cette réaction nécessite que l'enzyme Luciférase se trouve à moins de 100 Å de la protéine fluorescente et la longueur d'onde d'émission de la luciférine doit correspondre à la longueur d'excitation de la protéine fluorescente. La protéine fluorescente YFP pour «Yellow Fluorescent Protein» est ainsi couramment utilisée. En co-exprimant deux protéines d'intérêt, l'une en fusion avec la Luciférase et l'autre avec l'YFP, on peut déterminer si elles interagissent entre elles [24,25].

Le BRET est donc très précis pour suivre les interactions entre protéines et s'affranchit d'un certain nombre de problèmes liés à la fluorescence, comme par exemple, l'auto-fluorescence qu'il peut y avoir lors de l'excitation. Cependant, il nécessite une bonne maîtrise d'un certain nombre de techniques de biologie moléculaire (clonage, expression de protéines recombinantes) et il est principalement utilisé pour des études *in vivo*.

II. Les méthodes de détection sans marquage (autres que la SPR)

L'absence de marquage est une grande avancée dans le suivi et la caractérisation des interactions intermoléculaires. Les techniques de détection par marquage nécessitent l'emploi de marqueurs parfois nocifs, d'une faible ou d'une longue durée de vie (marqueurs radioactifs) et souvent coûteux (molécules fluorescentes). L'emploi de fluorophores peut également gêner l'interaction des molécules étudiées en altérant la reconnaissance et la réactivité de celles-ci [26]. L'intérêt d'utiliser des techniques de détection sans marquage est donc double : 1/ assurer une plus grande intégrité des molécules étudiées et 2/ limiter les problèmes inhérents à l'utilisation des marqueurs.

Au cours de cette introduction bibliographique vont être évoqués différents systèmes de détection d'interactions alternatifs aux systèmes de marquage.

II.1 La microbalance à quartz

La microbalance à quartz appelée en anglais «Quartz Crystal Microbalance» (QCM) est une technique d'analyse permettant de mesurer de faibles variations de masse (de l'ordre du ng par cm²) sur une surface. Cette technique est basée sur la capacité que présente un quartz à osciller en raison de ses propriétés piézoélectriques. Une polarisation électrique alternative des électrodes produit l'oscillation mécanique. Le système électronique associé permet de suivre la fréquence de résonance de cette oscillation. La mesure se fait par l'intermédiaire de deux électrodes métalliques enchâssant le plus fréquemment un quartz circulaire (figure 5).

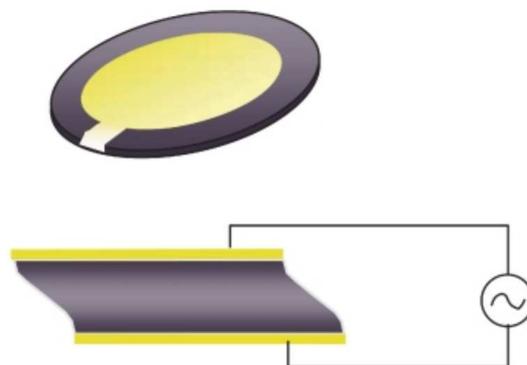


Figure 5. Représentation schématique d'un système QCM classique

Le quartz circulaire est enchâssé entre deux électrodes d'or où les mesures sur courant alternatif sont effectuées [27].

La fréquence de résonance du quartz est proportionnelle en sens inverse à la masse déposée sur la surface [28]. L'équation est la suivante :

$$\Delta f = -nC_f f_0^2 \left(\frac{\Delta m}{A} \right)$$

Δf est le décalage de la fréquence de résonance consécutif à un ajout de masse Δm , n est l'ordre de l'harmonique, C_f est la constante de Sauerbrey appelée aussi constante de sensibilité de masse, f_0 est la fréquence de résonance fondamentale du quartz et A est la surface active du quartz. Les mesures de fréquence de résonance pouvant se faire en milieu liquide, la microbalance est parfaitement compatible pour l'usage d'un biocapteur et la reconnaissance biologique se traduira par une diminution de la fréquence de résonance, consécutive à un ajout de masse. Une amélioration de ce système a été apportée par les systèmes QCM-D (D pour dissipation) qui permettent aussi de déduire les propriétés viscoélastiques de la couche de biomolécules à la surface [27]. Les applications à l'utilisation des systèmes QCM-D sont ainsi très nombreuses et quelques exemples vont être présentés ci-dessous.

La microbalance à quartz est plus couramment utilisée pour étudier les interactions avec les protéines. La technologie est notamment bien adaptée à des études d'interaction de protéines sur la surface modifiée du quartz. L'adsorption des protéines sur différentes surfaces est en effet primordiale dans un grand nombre de domaines, que ce soit pour les mécanismes impliqués dans l'adhésion cellulaire mais également pour déterminer la biocompatibilité de certains matériaux utilisés en médecine [27].

Les acides nucléiques ne sont pas les biomolécules les plus étudiées en QCM-D, mais on trouve cependant quelques exemples intéressants. Les propriétés d'adhésion et de rigidité de l'ADN plasmique super-enroulé ont par exemple été évaluées en présence de Ca^{2+} [29]. Des interactions ADN protéines peuvent également être observées en QCM-D [30].

Une autre grande application de la QCM-D est la reconstitution de membranes lipidiques modèles qui permettent de caractériser un grand nombre de phénomènes inhérents aux membranes [31,32]. On peut également citer une autre expérience très

intéressante de mesure de l'adhésion cellulaire et de formations de biofilms en flux continu [33].

En conclusion, la microbalance à quartz constitue une technologie très complète qui permet d'étudier une très grande diversité de biomolécules (protéines, lipides, ADN, ...etc.) et différents paramètres physiques, tels que la masse et la viscosité. Cependant, elle n'est pas encore adaptée au criblage haut débit et reste relativement moins sensible que d'autres techniques de détection sans marquage.

II.2 Les micro-résonateurs

Les micro-résonateurs sont des systèmes hautement miniaturisés pour l'analyse sans marquage des biomolécules. Intégrés à un système fluide, ils peuvent être subdivisés en trois catégories, les résonateurs mécaniques, optiques et nanophotoniques [34].

Les micro-résonateurs mécaniques sont assez proches dans le principe des microbalances à quartz mais sont beaucoup plus sensibles. En QCM-D, la limite de sensibilité est de l'ordre du ng par cm² alors qu'elle est 10 pg par cm² pour les micro-résonateurs optiques [35]. Le gain de sensibilité est apporté par l'utilisation d'un canal micro-fluide suspendu, appelé «cantilever» en anglais, qui permet de mesurer la masse en fonction de la fréquence de résonance selon la relation suivante :

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^* + \alpha \Delta m}}$$

f correspond à la fréquence de résonance observée, la constante du résonateur est notée k , m^* est la masse effective et α est la constante numérique (souvent égale à 1) qui dépend de la localisation de la masse ajoutée Δm . L'adsorption d'une molécule se traduit par une augmentation de la masse dans le micro-canal, ce qui entraîne une diminution de la fréquence de résonance. Ce système est particulièrement adapté à l'étude des interactions entre biomolécules. Par exemple, après fonctionnalisation dans le micro-canal d'anticorps anti immunoglobuline, de l'IgG a été détectée à 0,7 nM [35]. Les auteurs sont également capables de déterminer individuellement la masse d'une seule bactérie.

Les micro-résonateurs optiques sont parmi les systèmes de détection les plus sensibles qui existent. Leur principe est basé sur l'utilisation de structures micro-toroïdale [36], qui sont des anneaux de silicium de moins de 100 μm de diamètre et de seulement quelques μm d'épaisseur (figure 6).

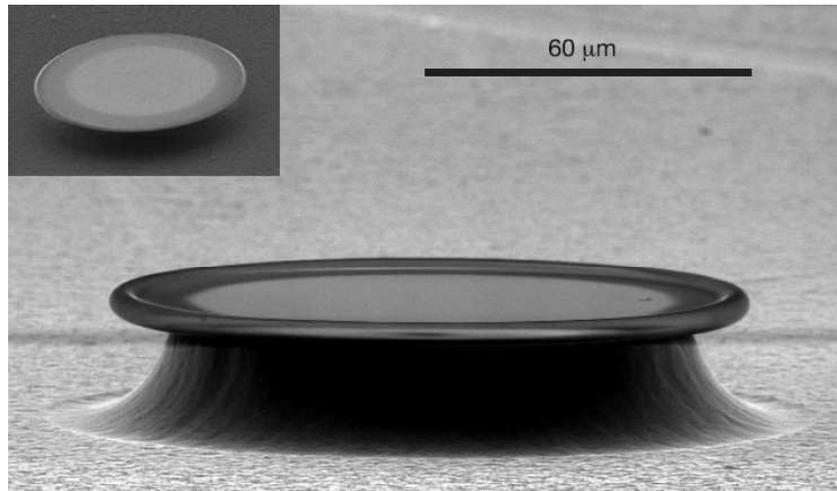


Figure 6. Image obtenue par microscopie électronique d'un micro-résonateur de forme toroïdale [36].

Les interactions entre biomolécules sont déduites par la variation de la longueur d'onde de résonance. Une application très prometteuse de cette technique est la détection de molécules à des concentrations de l'ordre de la centaine d'attomolaire (10^{-18} M^{-1}), résultat obtenu pour le dosage de l'interleukine-2 (IL-2) après fonctionnalisation de micro-toroïdes par des anticorps polyclonaux anti IL-2 [37].

Les résonateurs à cristaux photoniques sont basés sur l'utilisation de cristaux 1D ou 2D de pores de silicium. L'interaction entre biomolécules se fait sur les parois internes des pores en suivant les variations de l'indice de réfraction. Les avantages de cette technique sont nombreux. D'une part, les pores permettent un haut confinement de la lumière et une limite de détection de l'ordre de 2,5 fg est obtenue [38]. D'autre part, le greffage de sondes différentes dans chaque pore rend cette technologie adaptée au multiplexage [39].

II.3 La diffusion Raman exaltée en surface

Le SERS, acronyme de l'Anglais «Surface Enhanced Raman Scattering» est une technique spectroscopique ultra sensible qui combine l'emploi d'une microsonde Raman avec l'analyse de composés déposés sur des surfaces nanostructurées de métaux nobles tels que l'or ou l'argent qui provoquent une exaltation très intense du signal [40]. Le plus grand potentiel de cette technique reste la sensibilité qui est primordiale pour détecter des interactions à de faibles concentrations. L'ajout d'un système fluidique ainsi que l'enregistrement du signal en un minimum de temps est alors indispensable [41]. Ainsi, le SERS a été utilisé pour suivre la détection d'oligonucléotides cibles à de très faibles concentrations (20 fM) [42]. Par ailleurs, les applications du SERS pour la détection des protéines sont courantes [43].

L'obtention de nanostructures, indispensables au SERS, est possible soit par la nanostructuration directe sur la surface [44] soit par l'utilisation de colloïdes greffés sur les cibles. Ce dernier cas représente la majeure partie des applications en SERS pour détecter des biomolécules mais ne correspond pas à ce que l'on peut appeler un système « sans marquage » où les cibles ne sont pas modifiées.

III. La résonance plasmonique de surface

La résonance des plasmons de surface est un phénomène physique principalement utilisé comme méthode de mesure d'interaction d'un « ligand » sur un « récepteur » adsorbé à la surface d'une couche métallique (or ou argent). A l'origine, le phénomène de diffraction anormale de la lumière a été observé par Wood au début du 20^{ème} siècle. Ce phénomène resta inexpliqué jusqu'aux travaux de Hessel et Onliner en 1965 qui ont identifié les anomalies décrites par Wood comme étant entre autres des phénomènes de résonance plasmonique de surface (SPR). Quelques années plus tard, en 1968, Kretschmann et Raether montreront qu'il est possible d'observer ces phénomènes sur un prisme recouvert d'une fine couche de métal, il s'agit de la configuration dite de Kretschmann [45]. Il faudra cependant attendre le début des années 1980 pour trouver un exemple dans la littérature d'une application de la SPR comme biosenseur [46]. En 1990, avec l'arrivée de l'appareil commercial Biacore, l'utilisation de la SPR s'est considérablement développée. En effectuant une recherche sur le site PubMed avec les mots «Surface plasmon resonance», on trouve 9530 références de 1983 à mi-2010 (figure 7).

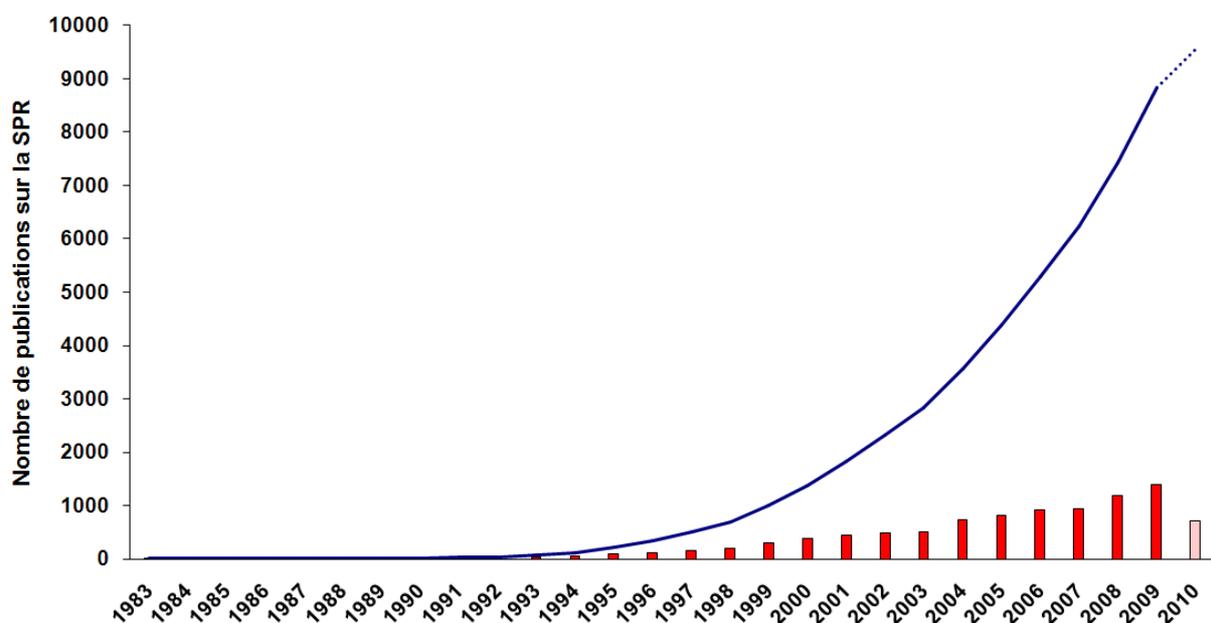


Figure 7. Graphique représentant le nombre de publications en SPR

La courbe en bleu représente le nombre de publications référencées cumulées depuis 1983 dans PubMed. Les barres rouges indiquent leur nombre par an.

La présentation de la SPR va s'articuler en trois grandes parties. Tout d'abord, nous aborderons la théorie et le dispositif. Ensuite, les avancées récentes sur la miniaturisation, la sensibilité, la visualisation en temps réel et le couplage à d'autres technologies seront abordés. Enfin, quelques exemples d'applications seront présentés.

III.1 Théorie

Avant d'aborder le principe de la résonance plasmonique en tant que tel, il est nécessaire d'évoquer quelques notions d'optique de base. Une onde électromagnétique (la lumière dans notre cas) se définit par quatre paramètres, la fréquence f , la longueur d'onde λ , l'amplitude A et sa polarisation. La propagation de la lumière est très différente selon le milieu traversé. Dans le vide, rien n'empêche la propagation de la lumière et l'onde n'est pas perturbée. En revanche, lorsque la lumière traverse une matière diélectrique (isolant électrique) tel que le verre ou l'air, le milieu devient polarisé. Ce phénomène se caractérise entre autres par une diminution de la vitesse de propagation de la lumière appelée réfraction. L'indice de réfraction d'un milieu se définit ainsi par la vitesse de l'onde électromagnétique observée dans le vide par rapport à celle observée dans le milieu. Sur une interface entre deux milieux, comme par exemple entre l'air et l'eau, la lumière en plus d'être réfractée, se réfléchit et une partie des rayons lumineux émerge de l'interface du même côté que leur origine.

Lorsque la lumière incidente est dirigée à un certain angle (angle de résonance) sur un métal riche en électrons libres tel que l'or ou l'argent, les photons provoquent une oscillation des électrons libres appelée Résonance Plasmonique de Surface (SPR). Ces oscillations se caractérisent par une onde évanescente dont l'amplitude diminue exponentiellement depuis la surface sur une distance maximale de 200 nm (figure 8).

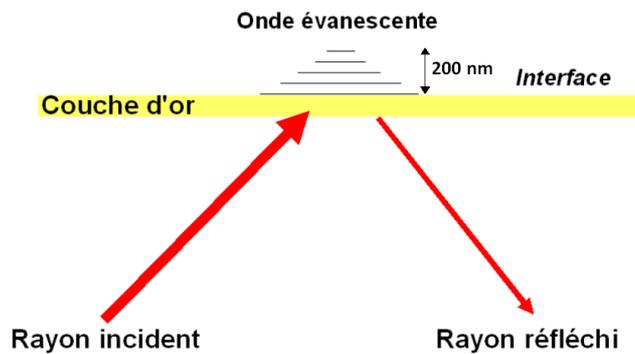


Figure 8. La formation de l'onde évanescente

La formation de l'onde évanescente sera consécutive à l'oscillation des électrons libres de l'or au passage du rayon incident. Le reste de la lumière est réfléchi.

L'onde évanescente est le point central des mesures d'interactions. En effet, une perturbation de l'onde évanescente, consécutive à l'interaction de biomolécules sur la surface va induire une diminution de l'angle de résonance directement mesurable. Deux stratégies sont alors envisageables (figure 9). La première est de suivre les variations d'angle de résonance au cours du temps, il s'agit des systèmes basés sur la Résonance Plasmonique de Surface (SPR) dite «classique». La seconde approche est de travailler à angle fixe et de mesurer les variations de réflectivité induites par la variation d'angle au cours du temps, on parle alors de Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi).

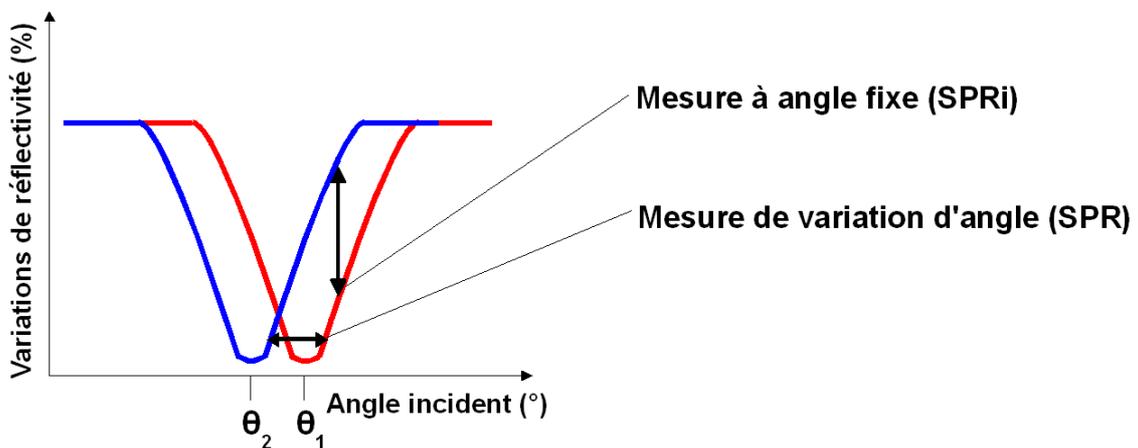


Figure 9. Relation entre angle de résonance et mesure du signal en SPR et SPRi

La réflectivité varie en fonction de l'angle d'incidence de la lumière. L'angle de résonance (θ) coïncide avec une faible réflectivité et une onde évanescente maximale. L'interaction de biomolécules sur la surface perturbe l'onde évanescente et induit une diminution de l'angle de résonance de θ_1 à θ_2 . La mesure se fait soit à angle fixe et des variations de réflectivité sont observées (SPRi) ou les variations d'angle sont observées et on mesure les RU en fonction du temps (SPR).

La variation d'angle de résonance est ainsi directement proportionnelle à la masse des biomolécules interagissant sur la surface du prisme. En SPR, 1.10^{-4} degré de variation d'angle correspond à 1 RU et à 1 pg/mm^2 [47]. En SPRi, la masse de l'ensemble des biomolécules interagissant sur la surface va pouvoir être déduite par la relation suivante [48]:

$$\Gamma = \frac{\Delta R \cdot L_{zc}}{S_{P,R} \cdot \frac{\partial n}{\partial C}}$$

Cette relation permet de déduire le taux de recouvrement surfacique Γ (pg/mm^2) à partir de la variation de réflectivité ΔR (%) via trois paramètres. L_{zc} est la pénétration en mm de l'onde évanescente dans le milieu, elle dépend du métal traversé et de la longueur d'onde utilisée. $S_{P,R}$ est la sensibilité, elle est obtenue par mesure de calibration de l'appareil et s'exprime en variation de réflectivité en fonction de l'indice de réfraction (RIU). Enfin, le paramètre $\frac{\partial n}{\partial C}$ représente l'incrément d'indice qui dépend des molécules étudiées, il est donné en RIU/pg/mm^3 et il est de $1,9.10^{-10} \text{ RIU/pg/mm}^3$ pour les protéines et les oligonucléotides. On déduit ainsi que pour le système SPRi développé par Genoptics Horiba-Scientific (SPRi-Plex), 1 % de variation de réflectivité correspond à 180 pg/mm^2 .

III.2 Le dispositif

Un dispositif classique de SPR se compose d'un capteur, d'un système optique et d'un système fluide (figure 10).

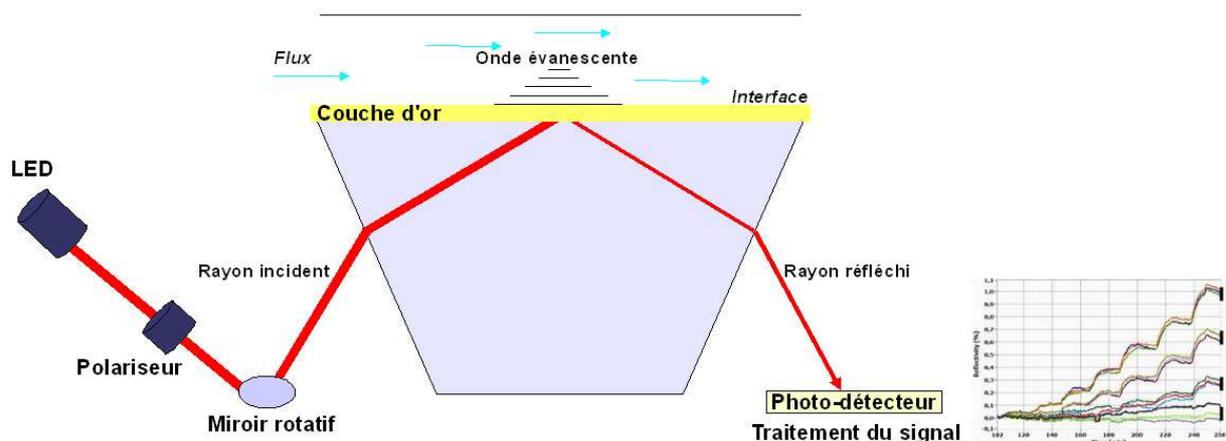


Figure 10. Représentation schématique d'un dispositif SPR, exemple avec le SPRi-Plex (Genoptics Horiba-Scientific).

L'optique se compose d'une LED émettrice de la lumière incidente, d'un polariseur, d'un miroir rotatif pour ajuster l'angle du rayon incident et d'un photo-détecteur. Le senseur utilisé est un prisme en verre recouvert d'une couche d'or de 50 nm. La fluidique du dispositif permet d'injecter et de rincer les biomolécules interagissant sur la surface d'or et sur laquelle des molécules sondes ont été immobilisées.

La lumière incidente monochromatique est émise le plus souvent par une diode électroluminescente appelée aussi LED pour «Light-Emitting Diode» en anglais. Les LED ont ainsi remplacé les lampes halogènes utilisées préalablement en SPR [49]. La lumière est ensuite polarisée et un miroir permet le positionnement du rayon incident à l'angle choisi. Lorsque la lumière arrive sur la couche métallique du senseur, elle permet la formation de l'onde évanescente tandis qu'une autre partie sera réfléchi. Un système fluidique est également indispensable pour introduire les molécules cibles potentielles et pour suivre leur interaction avec les sondes fixées à la surface du senseur. La réflectivité sera ensuite détectée à l'aide d'un photo-détecteur, une barrette de diodes en SPR ou une caméra CCD en SPRi.

III.3 Les développements récents

III.3.1 La miniaturisation

La miniaturisation des systèmes SPR reste un pré-requis indispensable pour le développement d'un système portatif. Pour cela, elle doit s'opérer sur tous les organes de l'appareil et en particulier sur le cœur du système, le senseur. Le prisme reste celui le plus utilisé en SPR. Basé sur la configuration de Kretschmann, la lumière passe à travers un prisme de verre à haut indice de réfraction et va exciter une fine couche d'or ou d'argent. La perturbation de l'onde évanescente sera effective sur une distance de 200 nm au dessus de la surface [46,50]. La variation de réflectivité qui en résulte sera détectée sur capteur optique [51]. L'utilisation des prismes en SPR présente de nombreux avantages, ils sont simples de conception, robustes, sensibles et les applications qui en découlent sont nombreuses. Cependant, ils restent relativement encombrants et ils conditionnent la taille de l'ensemble du système.

Le développement des fibres optiques pour la SPR a été une avancée fondamentale pour envisager la miniaturisation des senseurs et éventuellement imaginer des systèmes portatifs. Une fibre optique est un fil de verre de quelques micromètres d'épaisseur dans lequel se propage la lumière. Sur la paroi interne, un enrobage d'or ou d'argent peut être déposé et la fibre va permettre une excellente propagation de la lumière incidente et réfléchi. Ce dispositif est ainsi parfaitement adaptable à la SPR. Les premiers systèmes à avoir été mis en place sont basés sur des fibres optiques multimodes [52]. Ces systèmes sont relativement peu sensibles car la lumière emprunte plusieurs trajets optiques, ce qui entraîne une perte de signal. L'apparition des fibres optiques monomodes (trajet direct de la lumière) ont en revanche augmenté la sensibilité [53]. Un autre moyen pour améliorer la sensibilité consiste à modifier la structure de la surface métallique. Par exemple, l'utilisation d'un cône d'or de 3 μm de diamètre disposé au bout de la fibre optique a légèrement augmenté le signal SPR ([54], figure 11).

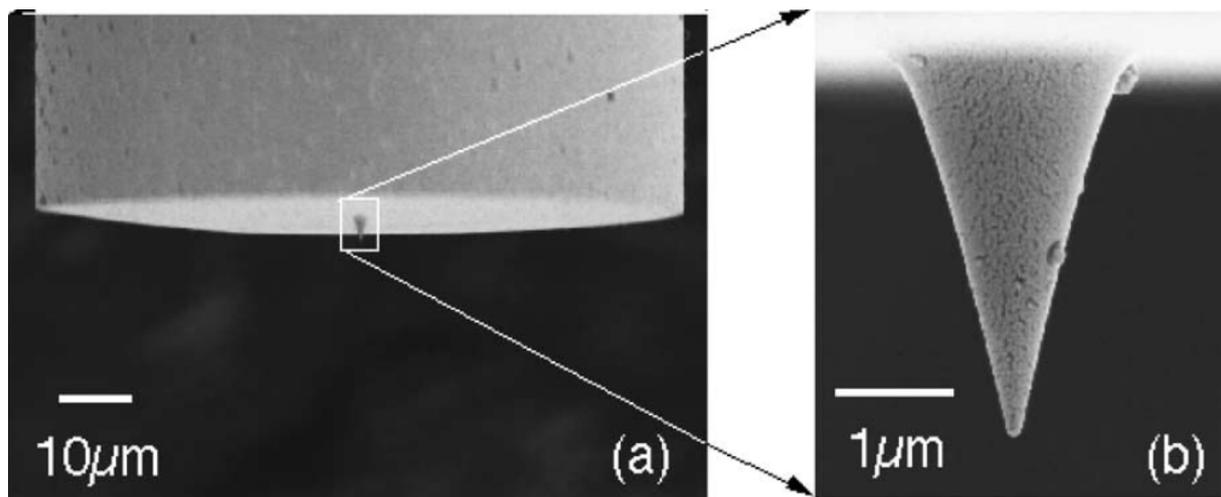


Figure 11. Image obtenue par microscopie électronique de l'extrémité de la fibre optique (a) et du cône d'or utilisé (b) pour exalter le signal SPR [54].

Un autre procédé est l'utilisation d'une fibre optique incurvée en contact avec un film d'or (dans ce cas, la surface métallique n'est pas à l'intérieur de la fibre optique). La courbure de la fibre induit alors un gain du signal SPR. Avec cette méthode, de l'immunoglobuline humaine IgG a été détectée à 40 ng/ml [55].

L'utilisation de fibres optiques reste très prometteuse pour le suivi d'interactions par SPR et ne demande qu'à se développer. Néanmoins, ces systèmes ne sont pas encore accessibles en routine et les prismes restent un bon compromis entre la faisabilité et la miniaturisation.

III.3.2 La sensibilité

La SPR bien que relativement sensible pour une détection sans marquage, est loin de ce que l'on observe pour des techniques utilisant la fluorescence ou la radioactivité. Au travers d'exemples, trois stratégies visant à améliorer la détection de biomolécules sont ici abordées.

La première stratégie présentée est d'éliminer une partie du bruit de fond qui peut masquer en partie ou en totalité un signal faible. On peut ainsi évoquer la détection par LRSP «Long-Range Surface Plasmon» et SRSP «Short-Range Surface Plasmon» qui consiste à exciter simultanément à deux longueurs d'onde différentes et à combiner les informations obtenues à partir des deux résonances différentes (LSRP et SRSP). Cette technique élimine une grande partie du bruit de fond et améliore la détection [56,57]. Ce procédé astucieux est particulièrement adapté à la détection de faibles concentrations de composés lorsqu'ils se trouvent dans un milieu complexe.

La seconde stratégie vise à augmenter l'intensité de l'onde évanescente par nano-structuration de la surface métallique. Après avoir été imaginé de manière empirique, ce concept est couramment utilisé en SPR. Les nanoparticules d'or peuvent faciliter les interactions entre biomolécules par l'accroissement de la surface de contact, mais surtout favoriser l'oscillation des électrons libres sur l'or [58]. Une étude théorique a également montré que le gain de signal peut être significativement augmenté en disposant les nanoparticules d'or en réseau [59]. La structuration de la surface peut aussi s'effectuer sur l'argent. Ce métal est considéré comme plus sensible pour suivre des interactions en SPR. Cependant, dans la littérature, les exemples concernant l'amélioration du signal par sa structuration sont contradictoires. On trouve par exemple une étude qui démontre qu'une structure périodique en forme de vagues (ou sinusoïdes) multiplie le signal SPR par six [60]. En revanche, une autre étude suggère que la réduction de la rugosité de la surface d'argent

aux alentours du nanomètre augmente la sensibilité [61]. Par ailleurs, l'utilisation de bicouches métalliques d'or et d'argent permet de limiter l'oxydation de ce dernier. L'idée consiste à recouvrir la couche d'argent par une fine couche d'or où seraient déposées les biomolécules sondes [53].

La dernière stratégie consiste à amplifier les variations de masse consécutives à l'interaction de biomolécules sur la surface. La masse des cibles injectées est ainsi augmentée par le greffage de nanoparticules d'or [62]. Cette technique, bien que très sensible, nécessite la modification des cibles et on perd ainsi un des avantages principaux de la SPR qui est de travailler sans marquage. De plus, cet ajout peut introduire un biais et fausser les calculs d'affinité entre biomolécules. Une méthode alternative pour contourner ces obstacles, consiste à amplifier le signal par réaction enzymatique. Un exemple intéressant est décrit dans la littérature par Goodrich *et al* (figure 12) [63].

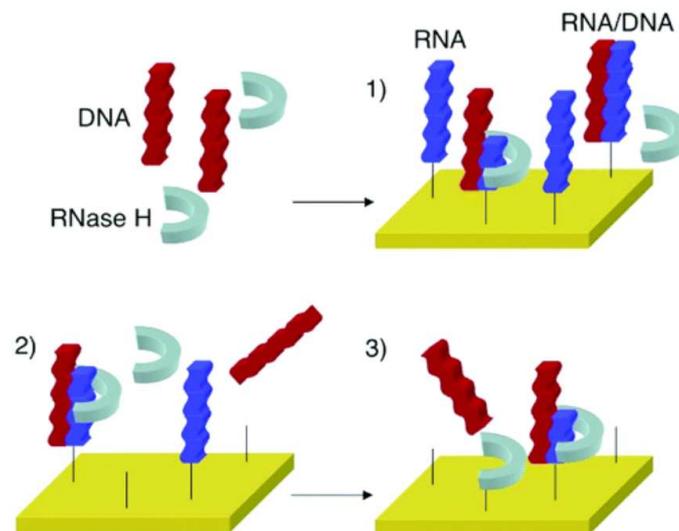


Figure 12. Représentation schématique de la réaction enzymatique provoquant l'amplification du signal par SPR sur puces à ARN [63].

Les auteurs ont étudié les interactions entre ARN sondes déposés sur la surface et ADN cibles complémentaires en présence de RNase H. Cette enzyme dégrade spécifiquement l'ARN lorsqu'il est hybridé avec l'ADN. À nouveau libre, l'ADN se fixe alors sur d'autres ARN qui seront à leur tour dégradés. La perte des sondes ARN est ainsi irréversible et se traduit par une amplification du signal en SPR. Avec ce procédé, de l'ADN à une concentration de

10 fM a été détecté. Le principal inconvénient de cette technique est que le support n'est pas réutilisable.

III.3.3 Du multiplexage à la SPRi.

Le multiplexage et la résonance plasmonique de surface par imagerie (SPRi) se sont développés de concert avec la conception et l'amélioration des appareils commerciaux. En 1990, la société Pharmacia Biosensor a conçu avec Biacore, le premier appareil commercial utilisant la technologie SPR. Ce système a combiné les avancées de l'époque en chimie, en optique, en micro-fluidique et en robotique. Il se compose de plusieurs canaux fluidiques séparés, où les injections de molécules se font indépendamment sur chaque canal (original Biacore instrument). La technologie a été améliorée en 1995 avec l'arrivée du Biacore 3000 et la possibilité de suivre simultanément, avec une seule injection, l'interaction d'une cible sur les quatre canaux en série. Il est alors envisageable de comparer les résultats d'un canal référence avec les trois autres canaux et ainsi d'analyser trois interactions en même temps. La conception des canaux a encore été optimisée avec le Biacore S51 (figure 13).

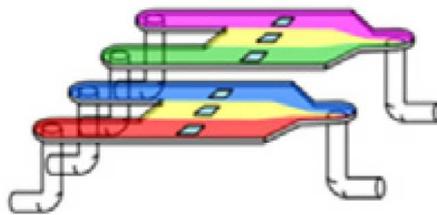


Figure 13. Représentation schématique de la fluidique du Biacore S51 [64].

Les canaux sont de forme Y avec des régions centrales non modifiées. Cette conformation permet un meilleur adressage hydrodynamique des molécules cibles et la région centrale est utilisée comme référence interne. La nouvelle stratégie de Biacore est maintenant orientée vers le multiplexage et le dernier modèle, le Biacore 4000, permet de suivre 16 interactions en même temps et cet appareil est prometteur pour l'analyse à moyen débit. Ces dernières années ont vu l'apparition de systèmes plus multiplexés. L'arrivée sur le marché du ProteOn XPR36 en est un bon exemple. Développé par la société Biorad, il permet de suivre 36 interactions en même temps. Le principe consiste à immobiliser les sondes sur six canaux fluidiques différents et exercer ensuite une rotation à 90°C permettant d'injecter les six échantillons (figure 14).

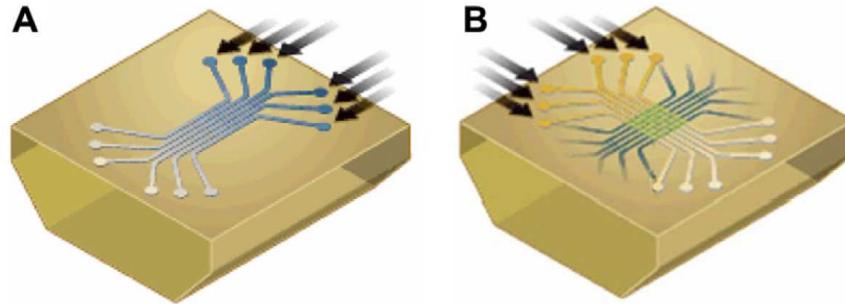


Figure 14. Représentation schématique de la fluidique du ProteOn XPR36.

(A) Les sondes sont tout d'abord immobilisées dans six canaux parallèles. (B) Après rotation du senseur à 90°, les cibles sont injectées dans six canaux perpendiculaires [64].

L'innovation apportée par le ProteOn XPR36 est cependant insuffisante pour réaliser des études par criblage. Bien que 36 interactions soient suivies en même temps, seulement six sondes différentes sont déposées sur la même puce. Ces différents systèmes, développés par Biacore et Biorad sont donc limités au niveau du multiplexage car basés sur l'emploi de canaux fluidiques.

La SPRi, acronyme en anglais de «Surface Plasmon Resonance imaging a été la technologie envisagée pour contourner ce problème. Basée sur un système de puce et sur une visualisation directe par une camera CCD, plusieurs centaines d'interactions peuvent être suivies en même temps. Il existe ainsi un grand nombre de systèmes utilisant la SPRi pour suivre des interactions entre biomolécules. On peut citer par exemple le Flexchip (Biacore) ou le SPRImager II (GWC) qui permettent respectivement de suivre jusqu'à 400 ou 500 interactions en même temps. Cependant, ces systèmes restent également limités au niveau du multiplexage car le nombre de spots est prédéfini. Un système alternatif moins contraignant a été développé au début des années 2000 par la société GenOptics avec la conception de l'appareil SPRi-Plex. Les biomolécules sondes sont alors déposées sur la surface d'or du prisme à l'extérieur du SPRi-Plex et avec l'aide d'un système de dépôt de gouttelettes (figure 15). Plusieurs centaines de sondes différentes peuvent être déposées sur une surface de moins d'un cm² et en utilisant seulement quelques nanolitres de matériel à chaque dépôt.

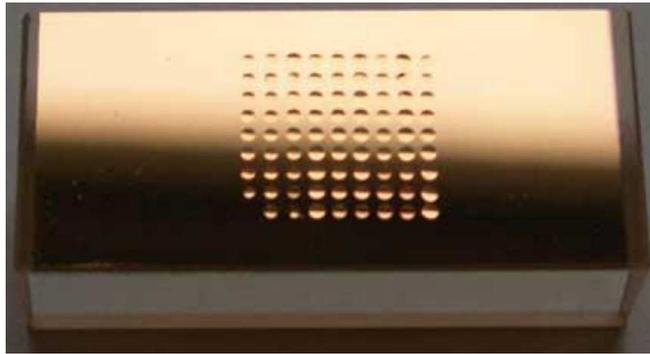


Figure 15. Image d'un prisme SPRi sur lequel ont été déposés 100 gouttelettes (image GenOptics).

Une fois que les dépôts sont réalisés, le prisme est placé dans le SPRi-Plex, les spots sont visualisés et définis à l'aide de la caméra CCD. Une interaction est ainsi traitée pour chaque spot défini. L'inconvénient principal de cette technologie est qu'il est difficile de quantifier les sondes déposées sur la surface, contrairement aux systèmes de dépôt sur flux chez Biacore et Biorad. Cependant, la SPRi présente de nombreux avantages. On peut suivre autant d'interactions que de spots sur la surface et la caméra CCD permet de contrôler en direct la viabilité des résultats observés.

III.3.4 Le couplage SPRi et spectrométrie de masse.

Le couplage de la SPRi avec la spectrométrie de masse est particulièrement adapté pour des études protéomiques. Comparé à un système SPRi classique, l'intérêt est d'identifier à partir d'une solution inconnue, les protéines interagissant spécifiquement avec les sondes déposées sur la surface. L'analyse en spectrométrie de masse des protéines cibles préalablement capturées en SPRi, peut s'effectuer de deux manières différentes, soit après élution et récupération de celles-ci [65,66] soit directement sur la surface de la biopuce [67,68]. La configuration microarray de la biopuce SPRi développée par GenOptics est ainsi parfaitement adaptée à cette dernière méthode. Des analyses en MALDI-TOF peuvent être réalisées sur la surface, MALDI acronyme de «Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization» et TOF pour «Time Of Flight».

En bref, après digestion *in situ* des protéines capturées et cristallisation d'une matrice organique utilisée pour désorber les spots, un puissant laser est dirigé sur chaque spot pour décrocher et ioniser les molécules en surface. L'analyse en temps de vol consiste à mesurer le temps que met un ion accéléré sous une tension pour parcourir une distance donnée. Les

ions sont séparés en fonction de leur m/z , c'est-à-dire de leur masse sur leur charge. Plus le m/z sera faible et plus les ions arriveront au détecteur. Pour deux molécules de charge identique, la molécule de masse inférieure arrivera en premier au détecteur. Le spectre de masse obtenu indique la proportion des ions détectés en fonction de leur m/z . La masse des protéines interagissant sur les spots est ainsi déterminée. Afin d'identifier les protéines, une digestion à la trypsine peut être effectuée, cette enzyme digère en C-terminal après les lysines et les arginines. Pour chaque protéine, on obtient ce qu'on appelle l'empreinte peptidique massique de la protéine ou PMF (Peptide Mass Fingerprint). Ainsi, après analyse en MALDI-TOF, l'ensemble des m/z obtenus permettra à partir d'une banque PMF, d'identifier les protéines [69]. Pour identifier la séquence en acides aminés d'un fragment peptidique particulier, une analyse MS/MS peut également être réalisée.

Le couplage du MALDI-TOF avec la SPRi (figure 16) offre ainsi un apport considérable pour des études protéomiques.

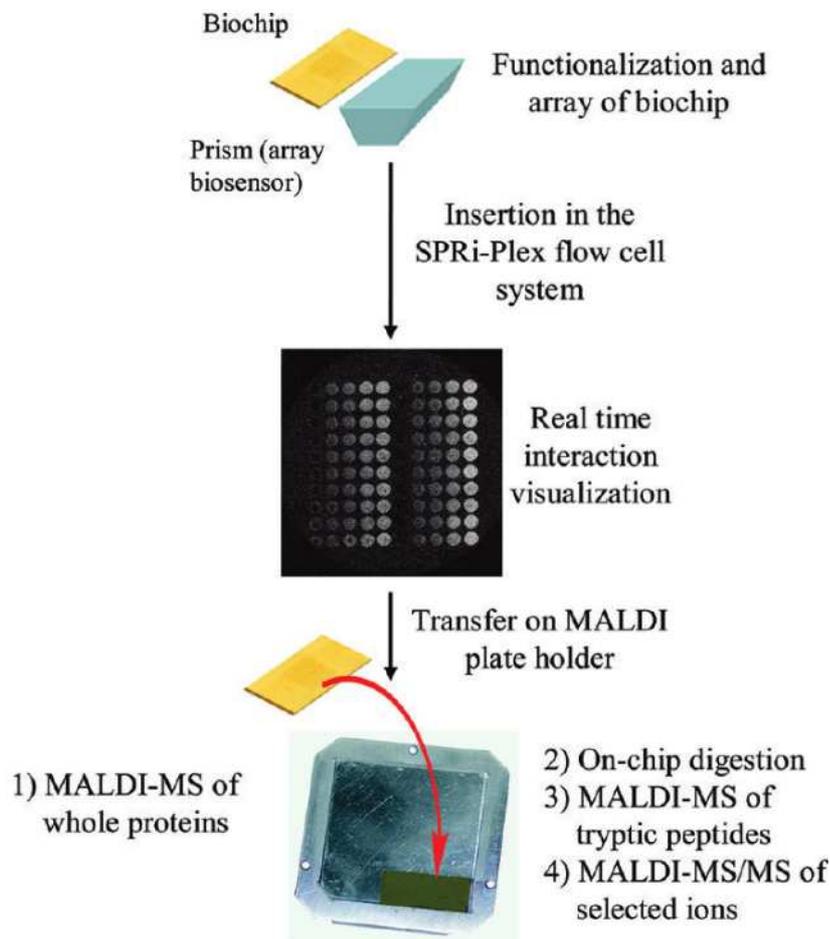


Figure 16. Schéma représentatif du couplage SPRi-MALDI-MS et MALDI-MS/MS [68].

III.3.5 Les applications en SPR et SPRi

Les avantages majeurs de la SPR et dans une plus grande mesure ceux de la SPRi (détection sans marquage, interactions en temps réel, multiplexage), ont ouvert la voie, en l'espace de quelques années, à un grand nombre de travaux sur les interactions intermoléculaires prenant en compte les calculs de constantes d'affinité, la visualisation directe et les études à hautes densités. De plus, un nombre pléthorique d'interactions sont observables, que ce soit avec des acides nucléiques, des protéines, des sucres ou des microorganismes entiers tels que des bactéries.

Le développement des puces à protéines en SPRi s'est donc effectué en parallèle des améliorations des méthodes de dépôt sur l'or. Les puces à anticorps en sont une bonne

illustration et on peut évoquer les travaux de Grosjean *et al* en 2005 [70]. L'étude de protéines autres que les anticorps est en revanche plus délicate. La structuration des protéines sur la surface est difficilement vérifiable et les interactions sont parfois biaisées. Cependant les études d'interaction protéines-protéines se développent car leurs implications dans un grand nombre des processus biologiques n'est plus à démontrer et on trouve quelques exemples intéressants de puces à protéines utilisées en SPR et SPRi [71,72,73].

L'utilisation de puces à sucres est relativement récente. Les sucres sont parmi les constituants les plus abondants des membranes cellulaires. Ils sont ainsi impliqués dans de nombreux mécanismes d'interactions entre cellules et pathogènes tels que des virus ou des bactéries. Par ailleurs, leur diversité considérable complique la compréhension des mécanismes de reconnaissance. La SPR peut, en combinant le criblage et le calcul de constantes cinétiques, répondre en partie à ce défi. On trouve ainsi quelques exemples de sucres fixés sur l'or et dont l'interaction avec une protéine est suivie en SPR [74,75].

Les puces à ARN sont beaucoup moins fréquentes, la stabilité des ARN et leur sensibilité aux RNAase en font des molécules peu adaptées à l'immobilisation. Il existe cependant quelques exemples. Ainsi, la recherche d'antibiotiques spécifiques ciblant des d'ARN bactériens a été caractérisée par SPR [76].

La prédominance des puces à ADN, provient en partie de l'importante stabilité de ces molécules et du grand nombre d'applications qui en découlent. On peut par exemple suivre les interactions ADN/ADN pour détecter des mutations ponctuelles sur le génome. Appelées SNP en anglais pour «Single Nucleotide Polymorphisms», la détection de ces mutations sur un seul nucléotide est primordiale pour le diagnostic de certaines maladies génétiques. Une méthode combinant la SPRi avec un procédé de contrôle et de réglage de la température d'hybridation a permis d'observer des différences d'hybridation entre des ADN synthétiques porteurs ou non de mutations ponctuelles [77,78]. Les puces à ADN peuvent être également utilisées pour suivre des interactions avec l'ARN. Les formations de structures secondaires de l'ARN sont très courantes et peuvent gêner l'hybridation avec des acides nucléiques complémentaires. Un exemple intéressant est la détermination des sites accessibles de l'ARN (non structurés), pour concevoir ultérieurement des ARN interférant qui en

s'hybridant, inhiberont la synthèse protéique [79]. On peut également citer la détection de miRNA en SPRi [80]. Ces ARN d'une vingtaine de bases peuvent être impliqués dans certains cancers et dans un grand nombre de processus de régulation [15]. Enfin, il existe de nombreux exemples de puces à ADN pouvant être employées en SPRi pour suivre des interactions avec des protéines, comme par exemple des facteurs de transcription [81].

IV. Bilan

Il existe une grande diversité de techniques pour suivre des interactions entre biomolécules. Il est donc nécessaire de les comparer avant d'entamer une étude donnée. Dans cet objectif, un bref éventail des caractéristiques des différentes techniques décrites précédemment est présenté ici (tableau 1). Le BRET utilisé principalement pour des études *in vivo* d'interactions entre protéines, n'est pas considéré ici.

Méthodes	Marqueur		Mesure		Parallélisation		Sensibilité
	Oui	Non	Cinétique	Point Final	Puce	Miniaturisation	
Radioactivité	X			X	X		++++
Fluorescence	X			X	X		+++
QCM		X	X			X	+
Micro-résonateurs		X	X			X	+++
SERS		X	X			X	+++
SPRi		X	X		X		++

Tableau 1. Récapitulatif des propriétés des différentes techniques de détection présentées.

La détection avec marquage (fluorescent ou radioactif) est traditionnellement plus sensible. En contrepartie, les techniques de détection sans marquage permettent d'observer les interactions en temps réel, de calculer les constantes d'affinité et l'absence de marqueur élimine une grande partie du biais lié au marquage des biomolécules. La QCM, les micro-résonateurs et la SPRi sont ainsi couramment utilisés. Dans le tableau 2, les avantages et les inconvénients de ces différentes techniques de détection sans marquage sont présentés.

Méthodes	Avantages	Inconvénients
Micro-résonateurs	- Sensibilité : 10 pg par cm ²	- Parallélisation : aucune - Non commercialisé
QCM	- Parallélisation : 4 cuves - Mesure de la viscosité	- Sensibilité : 1 ng par cm ²
SPRi	- Parallélisation : Plusieurs centaines de spots - Couplage à la spectrométrie de masse	- Sensibilité : 0,1 ng par cm ²

Tableau 2. Comparaison des techniques de détection sans marquage.

Les micro-résonateurs arrivent à concurrencer en sensibilité les techniques de détection avec marquage. Cependant, bien que prometteurs, ces systèmes ne sont pas commercialisés et ces technologies sont développées dans un nombre très restreint de laboratoires. La miniaturisation des puces (jusqu'à 100 μm) empêche à l'heure actuelle le développement du multiplexage. En comparaison, les systèmes de microbalance à quartz permettent de suivre quatre interactions en parallèle mais leur sensibilité est considérablement plus faible. La grande innovation de la SPRi a été de combiner une détection sans marquage avec l'observation directe et simultanée de centaines d'interactions sur puce. La principale limite reste la sensibilité qui est supérieure à la QCM mais reste trop faible par rapport à la détection avec marquage.

V. Introduction au travail de thèse

Le projet de thèse est né de l'initiative de trois laboratoires inspirés par une logique innovatrice et interdisciplinaire pour développer et améliorer la détection d'interactions intermoléculaires avec l'ADN par Résonance Plasmonique de Surface par imagerie (SPRi). La société GenOptics a financé une partie du travail de thèse et a développé l'instrumentation en SPRi où elle reste une pionnière. L'intérêt de participer au projet pour cette société (rachetée depuis peu par Horiba Jobin Yvon) a été la recherche de nouvelles chimies de dépôt en améliorant la détection afin d'ouvrir la voie sur de nouvelles applications en SPRi. La plateforme Biopuces localisée au LISBP à Toulouse est spécialisée, dans sa partie service, sur la production et l'analyse de biopuces à ADN basées sur la détection par fluorescence. Les thématiques de recherche sont orientées vers le développement de nouvelles techniques de greffage, de dépôt et sur l'analyse d'interactions entre biomolécules en absence de marquage. La thèse s'est inscrite dans cette optique. L'utilisation d'un système permettant de suivre en temps réel et sans marquage des interactions avec des biomolécules est particulièrement intéressante pour remplacer dans l'avenir les biopuces à fluorescence. Le Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) est également impliqué dans le projet au niveau de la nano-structuration de la surface et dans la recherche de nouvelles techniques de dépôt pouvant augmenter le signal en SPRi.

La thèse s'est inscrite dans le contexte de l'étude en SPRi des interactions avec l'ADN. Le travail est subdivisé en trois axes principaux. Au cours du premier chapitre, la recherche d'une chimie de dépôt par simple contact et l'augmentation de la densité de dépôt sur prisme seront abordées. Nous traiterons dans le second chapitre de l'amélioration de la limite de détection par nano-structuration de la surface. Enfin, le troisième chapitre regroupe les deux études réalisées en collaboration avec d'autres laboratoires qui ont participé à la compréhension des mécanismes biologiques abordés, telles que l'étude du phénomène de partition du plasmide F chez *E.coli* ou la recherche de ligands spécifiques des séquences télomériques humaines.

Chapitre I. Recherche d'une chimie de greffage d'oligonucléotides sur l'or

I. Introduction

En milieu biologique, les interactions entre biomolécules se déroulent dans des environnements complexes où un grand nombre de paramètres peuvent varier (pH, température, concentration en ions...). L'intérêt en laboratoire est de limiter la complexité de l'analyse en étant aussi proche que possible des conditions observées en milieu biologique. L'objectif est donc de rechercher des systèmes d'analyses de faible complexité qui permettent de suivre des interactions entre biomolécules à partir de données physiques exploitables (figure 17).

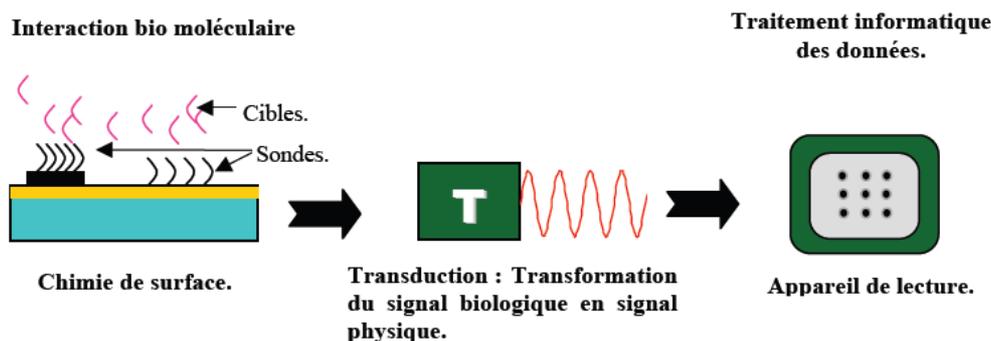


Figure 17. Représentation schématique d'un biocapteur

Les biopuces sont un bon compromis pour cela. Le principe consiste à mesurer les interactions entre des molécules déposées sur une surface (sondes) et des molécules en solution (cibles). Selon le mode de détection employé, l'information obtenue (fluorescence, variation de masse...) est ensuite analysée par traitement informatique.

La fiabilité d'une interaction observée dépend de plusieurs facteurs dont notamment, l'efficacité de l'immobilisation des sondes, leur disponibilité et leur stabilité. Ainsi, les sondes doivent être suffisamment ancrées et stables sur la surface au cours de l'expérience, pour permettre d'évaluer correctement une interaction et aussi pour une réutilisation éventuelle de la puce. Le dépôt des sondes doit également être homogène et l'accessibilité des cibles maximale. Ce dépôt implique de maîtriser un certain nombre de connaissances pour

l'accrochage des biomolécules. La chimie de greffage utilisée est donc primordiale et elle dépend de la surface utilisée. Ces dernières années, avec le développement de la SPRi, la recherche de chimies de fonctionnalisation de surface pour l'accroche de biomolécules sur l'or s'est accentuée. Nous nous sommes intéressés aux chimies de dépôt basées sur l'électro-dépôt et sur le dépôt dit par simple contact. Par commodité, nous avons choisi d'employer la dénomination de simple contact en absence d'électro-dépôt, mais sans oublier de considérer que l'électro-dépôt se fait également par contact.

Le travail de thèse a consisté dans un premier temps à trouver une chimie simple d'utilisation et peu coûteuse pour fixer de façon stable des sondes d'acides nucléiques. Cette chimie a ensuite été comparée aux techniques basées sur l'électro-dépôt.

I.1 L'électro-dépôt

L'électro-dépôt, comme son nom l'indique, est une technique permettant de déposer des molécules sous l'action d'un champ électrique. Dans le présent chapitre, nous allons évoquer deux techniques relativement récentes qui utilisent des dérivés pyrrole ou diazonium.

Le pyrrole, molécule aromatique de formule brute C_4H_5N , rentre dans la biosynthèse de nombreuses molécules organiques. En 1979, Gardini et ses collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence qu'une polymérisation du pyrrole pouvait être induite par électro-oxydation de monomères de pyrrole [82]. Presque 20 ans plus tard, le pyrrole a été utilisé pour la première fois en SPRi pour déposer des biomolécules sur des surfaces d'or [83]. Pour ce faire, du pyrrole modifié par le N-hydroxySuccinimide réagit avec la fonction NH_2 d'un ADN modifié ou d'une protéine. On obtient alors des sondes modifiées par un pyrrole. L'électro-dépôt s'effectue sur la surface du prisme avec une aiguille spécifique qui en plus de déposer, permet le passage du courant avec l'aide d'une contre-électrode sur l'or. L'électro-oxydation d'une sonde modifiée par un pyrrole se fait en présence de monomères de pyrrole (figure 18). On parle alors de copolymérisation ou de polymérisation de différentes molécules (sondes modifiées et monomères de pyrrole). Avec le dépôt d'ADN contenant un pyrrole, la limite de détection de cibles complémentaires d'ADN est de l'ordre de 10 nM [84].

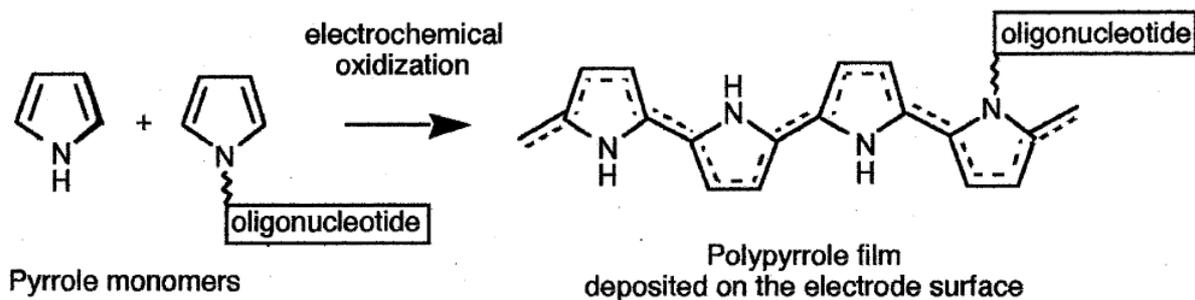


Figure 18 Principe de l'électro-copolymérisation de sondes ADN modifiées par un pyrrole [84].

Les applications de cette technique d'immobilisation sont nombreuses. On peut citer par exemple l'interaction entre des sondes nucléotidiques déposées et la protéine p53 [85]. L'intérêt est également de déposer des protéines qui sont plus instables et hétérogènes que l'ADN. En effet, la méthode d'immobilisation doit préserver l'intégrité fonctionnelle et structurale des protéines déposées. L'efficacité de l'électro-dépôt d'anticorps fonctionnalisés par un pyrrole a depuis été démontrée et on peut citer l'étude d'interaction entre anticorps et antigènes [70].

Le diazonium ($R-N_2^+$) est utilisé en chimie organique depuis plus d'un siècle. La fonctionnalisation des protéines par un diazonium n'est pas récente et on trouve en 1931 un premier exemple de glycosylation d'une protéine à l'aide d'une fonction diazonium [86]. L'électro-dépôt de composés fonctionnalisés par un diazonium s'opère par électro-réduction. Ce procédé est utilisé depuis peu pour déposer des protéines, que ce soit sur des électrodes en graphite [87] ou plus récemment sur l'or [88] (figure 19), préfigurant ainsi à des études d'interactions en SPRi [89].

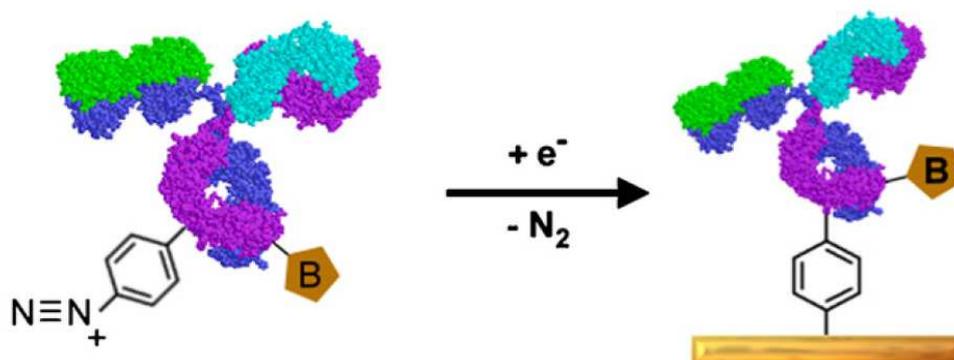


Figure 19. Principe de l'électro-réduction d'anticorps diazonium sur une surface de carbone [88].

L'efficacité de l'électro-dépôt n'est plus à démontrer. Cependant, cette technique n'est pas compatible avec de simples robots de dépôt et un appareillage spécifique est nécessaire. De plus, les ions diazonium sont également instables [90]. Les sondes doivent subir d'abord une fonctionnalisation et le dépôt doit d'effectuer extemporanément.

I.2 Le dépôt par contact

L'interaction entre la fonction soufre (S) et l'or (Au) est considérée comme une des plus fortes liaisons impliquant l'or à un non métal [91]. Cependant, la nature de cette interaction est sujet à controverse [92] et bien que la chimisorption des thiols sur l'or soit principalement envisagée [93,94], l'hypothèse de la formation d'une liaison covalente n'est pas exclue [95]. La fixation de molécules fonctionnalisées par un thiol sur une surface d'or se caractérise par la formation d'une monocouche auto assemblée, appelée SAM pour l'anglais «Self-assembled monolayers» [96]. Contrairement aux molécules modifiées par un pyrrole et un diazonium, l'accrochage de molécules fonctionnalisées par un thiol se fait par simple dépôt sur l'or. Les thiols peuvent ainsi être utilisés pour accrocher sans électro-dépôt, des biomolécules étudiées en SPRi et deux stratégies sont envisageables.

La première approche consiste à un empilement de différentes couches moléculaires successives sur la surface d'or, permettant ensuite l'accroche de la biomolécule. Il existe de très nombreux exemples de stratégies multicouches sur l'or. Dans la plupart des cas, on commence par fonctionnaliser l'or avec le 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), molécule contenant un soufre (interagit sur l'or) et un groupement acide carboxylique chargé négativement. Des dérivés amines chargés positivement comme le poly-L-lysine (PL) peuvent ensuite interagir par liaisons électrostatiques sur les groupements carboxyliques [97]. La poly(éthylèneimine) ou PEI peut également être utilisée dans ce cas. Après adsorption d'extravidine par liaison électrostatique sur la couche de PEI, des sondes biotinylées seront déposées ([98] ; figure 20).

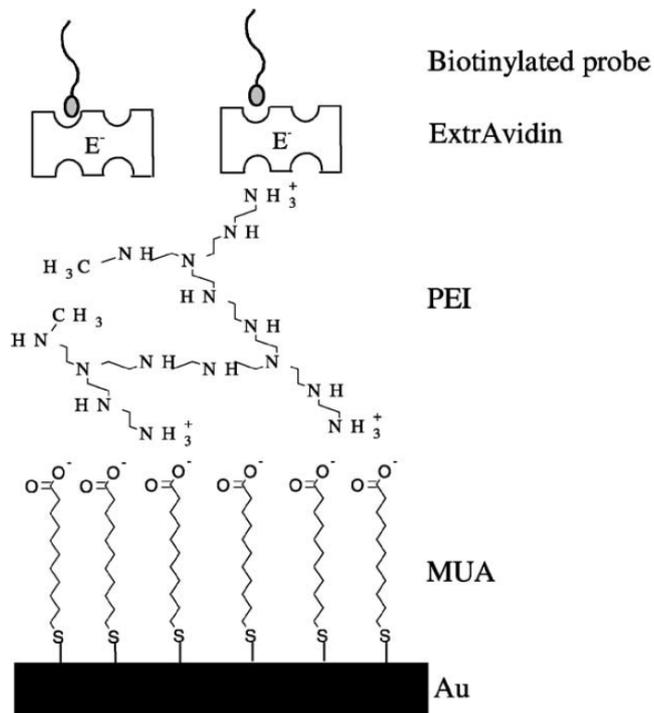


Figure 20. Représentation schématique d'une fonctionnalisation multicouche pour fixer des oligonucléotides modifiés avec une biotine [98].

Le MUA est fixé sur la surface par interaction entre la fonction thiol (SH) et l'or. La PEI interagit par liaison électrostatique sur les groupements carboxyles du MUA. L'extravidine chargée négativement interagit avec les NH_3^+ du PEI. Les oligonucléotides biotinylés se fixent ainsi sur l'extravidine.

Une autre technique est d'employer des surfaces cystéamine-glutaraldehyde pour fixer des protéines par l'intermédiaire de leurs fonctions NH_2 [99]. Bien que la stratégie de dépôt consistant à utiliser des multicouches auto-assemblées soit efficace, l'obtention de ces surfaces est longue, en raison du nombre de fonctionnalisations successives qu'elle nécessite.

Pour contourner le problème, la seconde approche est de déposer directement des biomolécules modifiées sur la surface d'or. Le greffage sur l'or d'oligonucléotides modifiés en 5' par un hexane-thiol ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_6$) est bien connu dans la littérature [100]. La chaîne carbonée hexane joue le rôle d'espaceur en limitant l'interaction des amines et en favorisant l'hybridation avec des ADN cibles complémentaires [101]. Basé sur ce principe, des interactions ADN/ADN ont été observées en SPR avec le système Biacore [100].

I.3 Bilan

En regard des exemples présentés ici sur le dépôt de biomolécules sur l'or, différentes tendances se dégagent. Le dépôt peut se faire avec ou sans électro-dépôt et directement ou indirectement sur la surface. L'objectif a été de rechercher une chimie de dépôt simple, robuste, améliorant la détection, s'affranchissant si possible de l'électro-dépôt pour permettre avec la technologie disponible au laboratoire, de développer le multiplexage. Le travail présenté ci-après décrit la démarche que nous avons suivie pour cela.

II. Validation de chimies de greffage par fluorescence

II.1 Principe

Avant d'entamer les expériences en SPRi, nous avons recherché une chimie de greffage sans électro-dépôt, qui soit efficace sur l'or. La stratégie employée a été d'évaluer de manière indirecte, le greffage des sondes d'ADN par l'hybridation avec des cibles complémentaires fluorescentes. Ce travail a pu être possible grâce à toutes les technologies disponibles sur la plateforme Biopuces telles que les appareils de dépôt, les chambres d'hybridation et les scanners à fluorescence. Le principe a consisté pour chaque chimie de greffage, à déposer des oligonucléotides sondes sur des plaquettes de silicium recouvertes d'une couche d'or de 50 nm. Des oligonucléotides cibles complémentaires fluorescents (cyanine 5) ont ensuite été hybridés (figure 21).

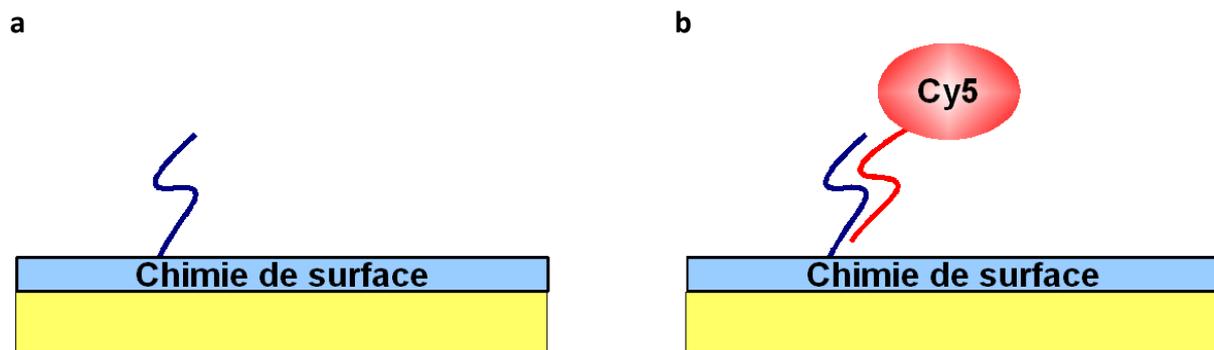


Figure 21. Evaluation par fluorescence de l'efficacité du dépôt d'ADN sur l'or.

a) Les oligonucléotides sondes sont déposés après fonctionnalisation chimique de la surface d'or. **b)** Une hybridation avec des cibles complémentaires marquées à la cyanine 5 permet après détection de fluorescence, d'évaluer l'accroche des sondes à la surface.

Nous sommes partis du principe qu'en cas de greffage efficace des sondes, l'hybridation d'ADN complémentaires marqués sera visualisée par fluorescence. En revanche, si les ADN sondes se décrochent de la surface, ils seront éliminés lors des étapes de lavage qui ont lieu après l'hybridation et aucune fluorescence ne sera détectée au final. Au cours de ce travail, trois stratégies de greffage d'oligonucléotides sondes sur une surface ont été testées.

La première stratégie a consisté à déposer des sondes oligonucléotidiques non modifiées. Ces sondes sont chargées négativement par l'intermédiaire de leurs phosphates

et nous avons envisagé leur accroche par interaction électrostatique sur une surface chargée positivement. La molécule utilisée pour cela est le 11-amino-1-undecanethiol, de formule brute $C_{11}H_{25}NS$, son extrémité soufre permet sa fixation sur l'or et l'autre extrémité est une fonction NH_3^+ qui rend la surface chargée positivement (figure 22).

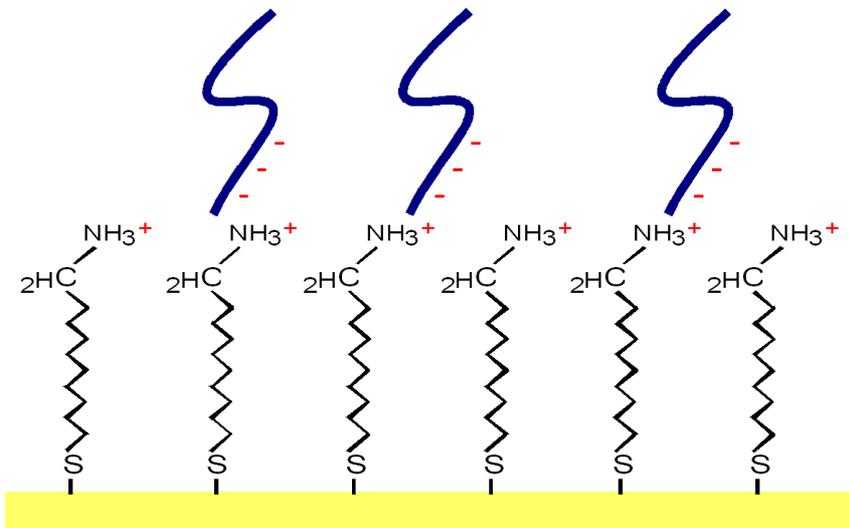


Figure 22. Dépôt d'oligonucléotides sondes chargés négativement et interagissant avec les NH_3^+ du 11-amino-1-undecanethiol fonctionnalisé sur l'or.

La seconde stratégie a été de former après activation EDC/NHS une liaison amide (liaison covalente) entre un oligonucléotide sonde porteur d'une modification NH_2 et le groupement carboxyle du 11-mercaptopundecanoic acide (MUA), (figure 23a).

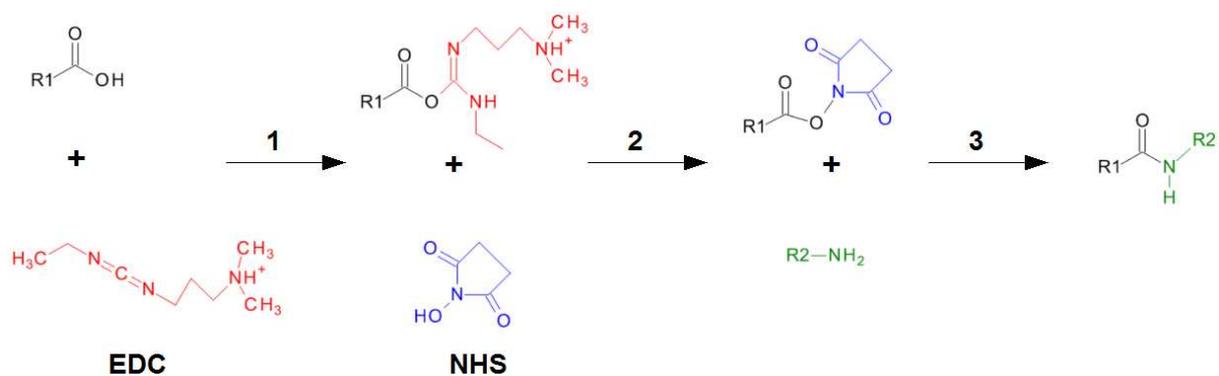


Figure 23a. Formation d'une liaison amide après activation EDC/NHS.

Le groupement R1 représente le MUA avec sa fonction acide carboxylique à une extrémité ; R2 est l'oligonucléotide sonde. (1) La fonction carboxylique du MUA est activée par le 1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC). (2) Le composé obtenu réagit avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) pour donner un ester NHS. (3) La liaison amide sera ensuite formée en présence du groupement NH_2 de l'oligonucléotide modifié.

Au final, après fonctionnalisation de la surface par MUA, activation EDC/NHS et greffage des oligonucléotides NH_2 par liaison covalente, nous avons obtenu la surface suivante (figure 23b).

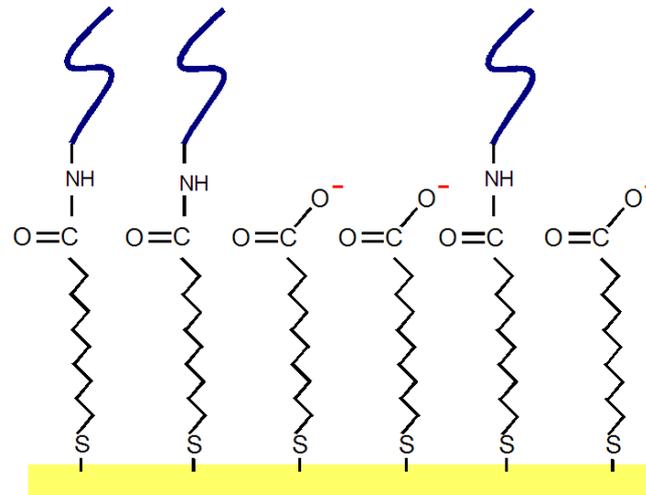


Figure 23b. Dépôt d'oligonucléotides modifiés $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_6$ sur une surface MUA après activation EDC/NHS.

La dernière stratégie (la plus directe) a consisté à déposer directement sur l'or des oligonucléotides modifiés en 5' par un thiol et un bras espaceur, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6$ (figure 24).

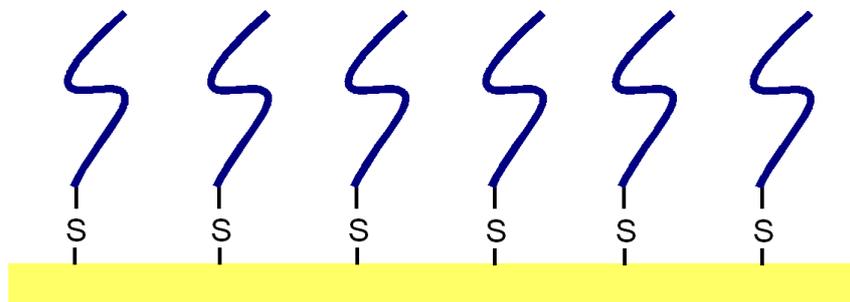


Figure 24. Dépôt d'oligonucléotides modifiés $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6$ sur l'or.

II.2 Comparaison de chimie de greffage par fluorescence

L'efficacité de chacune des trois chimies de greffage présentées précédemment a été évaluée après dépôt de sondes de 25 mer et hybridation de celles-ci avec des cibles de 25 mer parfaitement complémentaires et fluorescentes (cyanine 5). Des sondes de séquences aléatoires et de même taille (Rand25mer) ont également été déposées et sont utilisées comme témoins négatifs. Les oligonucléotides sont déposés à une concentration de $50 \mu\text{M}$.

La première expérience a consisté à comparer le greffage d'oligonucléotides non modifiés par interaction électrostatique sur des surfaces 11-amino-1-undecanethiol et le greffage d'oligonucléotides NH₂ par formation d'une liaison covalente (amide) sur des surfaces MUA (activées EDC/NHS). Après injections des cibles complémentaires marquées à la cyanine 5, nous avons obtenu par fluorescence les résultats présentés figure 25.

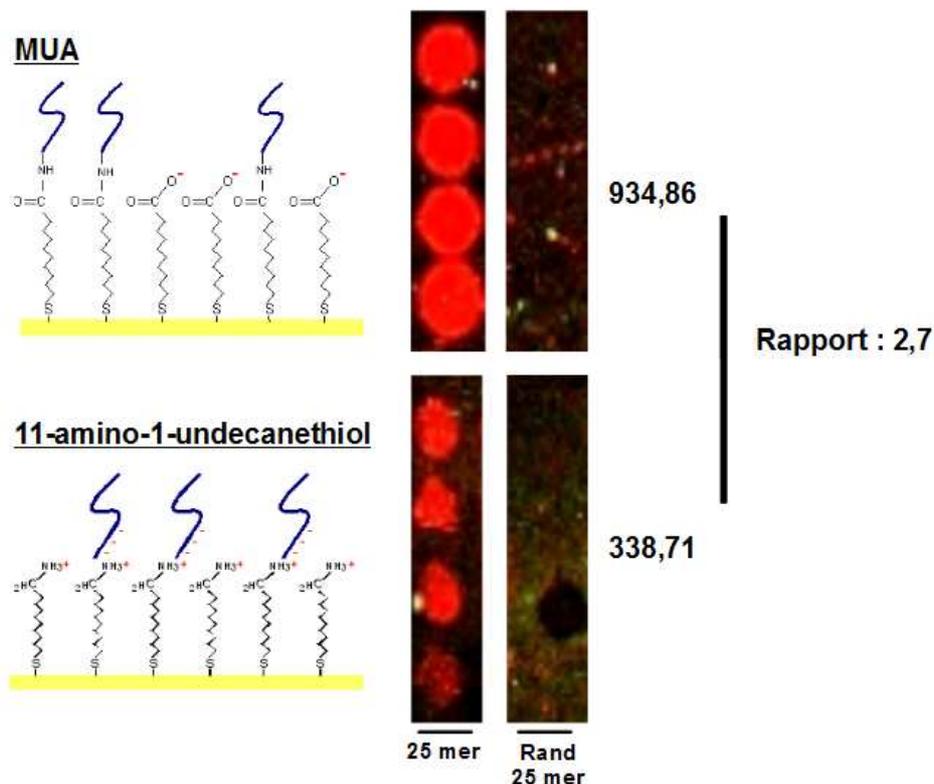


Figure 25. Mesure comparative de l'intensité de fluorescence après hybridation de 1µM de cibles complémentaires 25 mer marquées à la cyanine 5.

Les oligonucléotides sondes sont déposés à une concentration de 50 µM. Les valeurs indiquées correspondent à la moyenne des intensités de pixel observées sur les spots d'oligonucléotides 25 mer. Les sondes Rand25mer ne sont pas complémentaires des cibles marquées et sont considérées comme des témoins négatifs.

Tout d'abord et quelque soit la chimie de greffage utilisée, aucune hybridation n'est visible avec les sondes Rand 25mer (séquences aléatoires) et l'hybridation est seulement présente sur les sondes 25 mer (séquences complémentaires). Si on compare avec ces dernières, les deux chimies de greffage, nous avons observé qu'après hybridation de cibles 25 mer, les valeurs d'intensité de fluorescence sont 2,7 fois supérieures avec les surfaces MUA, par rapport aux surfaces 11-amino-1-undecanethiol. La chimie de greffage faisant intervenir la surface MUA est donc plus envisageable en SPRI, les liaisons covalentes formées sont plus

stables que les interactions électrostatiques observées après dépôt des sondes sur des surfaces 11-amino-1-undecanethiol.

Avec le dépôt direct des oligonucléotides modifiés par un groupement HS-(CH₂)₆ et après hybridation avec des cibles 25 mer marquées à la cyanine 5 (1,67 μM), nous avons obtenu les résultats présentés figure 26.

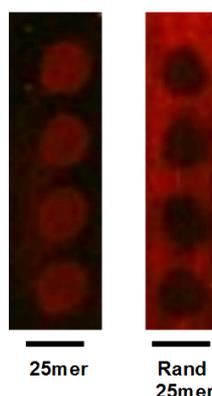


Figure 26. Image obtenue sur scanner à fluorescence après hybridation avec 1,67 μM de cibles complémentaires 25 mer marquées à la cyanine 5.

Les oligonucléotides sondes sont déposés à une concentration de 50 μM. Les sondes 25mer sont complémentaires des cibles marquées et les sondes Rand25 mer sont considérées comme des témoins négatifs.

Contrairement aux deux précédentes chimies de greffage, cette chimie est basée sur l'accrochage direct sur l'or des sondes nucléotidiques modifiées par un thiol (SH). Après injections de cibles marquées à la cyanine 5, des intensités de fluorescence ont été observées sur les sondes complémentaires. Ces résultats sont concluants et ont montré clairement que le dépôt sur l'or d'oligonucléotides sondes modifiés par un thiol est possible et son utilisation pour la SPRI a été envisagée. L'absence de fluorescence et donc d'interaction avec les sondes de séquences aléatoires a attesté de la pertinence des résultats. Nous avons cependant constaté la présence de bruit de fond sur la surface d'or, particulièrement autour des spots des sondes Rand25mer. On peut également s'interroger sur la très forte concentration nécessaire en cibles marquées (1,7 μM) pour visualiser une hybridation en fluorescence. Nous interprétons ce résultat par la présence d'interférences lumineuses sur l'or qui minimisent la fluorescence observée.

III. Validation de chimies de greffage en SPRi

III.1 Expériences préliminaires

Les résultats précédents ont permis d'envisager deux chimies de greffage d'oligonucléotides comme potentiellement prometteuses pour l'étude d'interactions par SPRi.

Les expériences concernant le dépôt d'oligonucléotides modifiés par un NH_2 après activation EDC/NHS sur une surface de prisme fonctionnalisée par le MUA n'ont donné aucune interaction mesurable en SPRi après injection de cibles complémentaires. L'utilisation de soude à 0,1M, utilisée pour déshybrider les oligonucléotides complémentaires et pour «nettoyer» la surface avant la première injection en cibles, a été imputée. En effet, son injection entraîna une disparition quasi-totale des spots visibles en SPRi. Des expériences complémentaires en fluorescence ont confirmé cette hypothèse et une diminution par quatre de l'intensité de fluorescence a été quantifiée après injection de soude.

Le dépôt par simple contact d'oligonucléotides modifiés par un thiol (SH) a été testé sur prisme d'or et comparé à l'électro-dépôt d'oligonucléotides fonctionnalisés par un pyrrole. Les oligonucléotides sondes utilisés sont de différentes tailles (25 mer, 50 mer et 70 mer) (figure 27). Les sondes Rand 25 sont considérées comme des témoins négatifs.

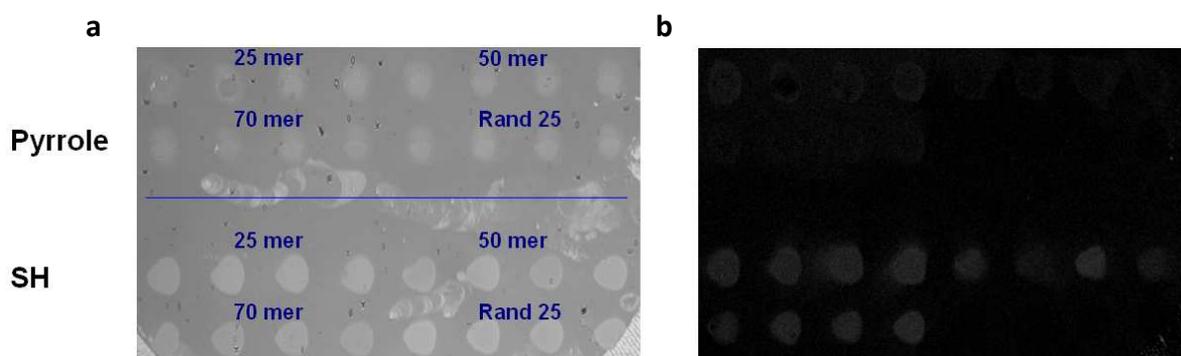


Figure 27. Test de dépôt et interaction en SPRi.

a) Image brute observée en SPRi après dépôt d'oligonucléotides sondes à $50\mu\text{M}$ (4 replicas par sonde). Pour plus de clarté, le plan de dépôt est superposé à l'image. b) Image différentielle obtenue après injection de $1\mu\text{M}$ de cible complémentaire 25 mer.

Le dépôt est resté visible au cours de l'expérience et les interactions ADN/ADN sont directement visualisées par imagerie. On voit clairement ici des interactions plus importantes sur la partie inférieure de l'image correspondant aux sondes fonctionnalisées par un thiol. Cependant, les images obtenues en SPRi avec le SPRi-Plex sont purement indicatives et seules les mesures des variations de réflectivité sont quantifiables. En effet, l'image brute permet d'avoir un aperçu du dépôt mais en aucune manière de donner une indication sur la quantité de sondes déposées sur la surface. L'image différentielle est également qualitative mais elle est très utile pour avoir une approximation de l'interaction. Les variations de réflectivité ont ensuite été calculées entre le début et la fin de l'injection (figure 28a). Pour plus de lisibilité, l'ensemble des valeurs est représenté sous forme de diagramme (figure 28b).

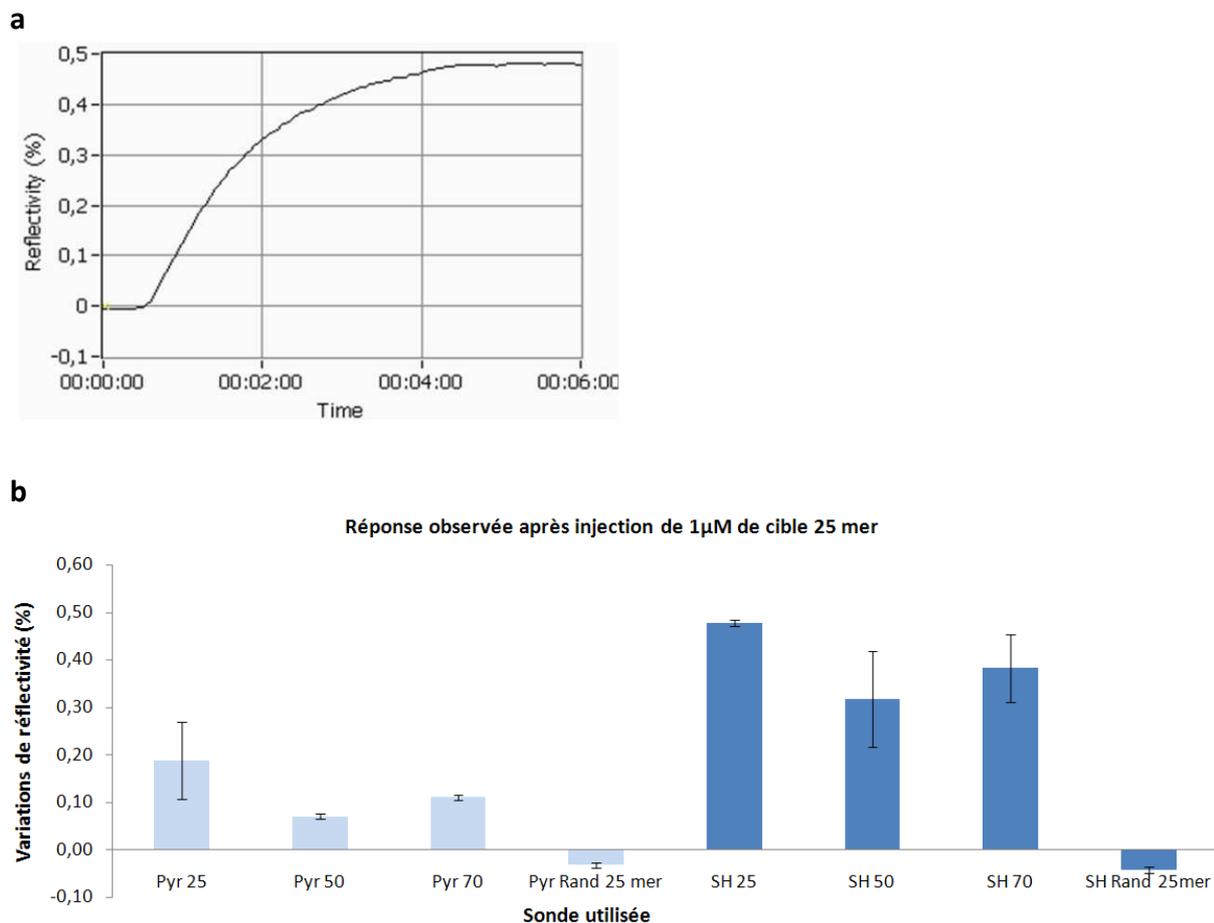


Figure 28. Quantification de la réponse en SPRi.

a) Exemple de courbe d'interaction observée entre de l'ADN 25 mer (SH) déposé à 50 μ M et 1 μ M de cible 25mer. b) Diagramme représentant les variations de réflectivité obtenues après injection de 1 μ M de cible 25 mer et en fonction des différentes sondes nucléotidiques déposées (pyrrole ■ et thiol ■). Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 4 répliques (spots) pour chaque sonde.

Le choix du contrôle s'avère primordial. Idéalement, sa nature doit être très proche des molécules sondes étudiées. Le contrôle permet ainsi de prendre en compte toutes les interactions non spécifiques et de soustraire les variations de réflectivité correspondantes aux réponses observées avec les ADN d'intérêt. Dans notre cas, le choix de définir l'or (après saturation avec de la BSA) comme contrôle a été validé par l'observation de réponses très similaires avec les sondes de séquences aléatoires (témoins négatifs). L'or après saturation avec de la BSA a ainsi été considéré comme contrôle pour les expériences suivantes. Concernant les résultats, l'expérience a montré l'efficacité de dépôt des oligonucléotides modifiés par un thiol par rapport aux réponses plus faibles observées avec les sondes électro-déposées. Les réponses sont également liées à la taille des sondes et sont moindres avec les sondes 50 et 70 mer lors de l'interaction avec l'oligonucléotide complémentaire 25 mer. La présence de structures secondaires à température ambiante a probablement gêné l'hybridation, ce point sera développé plus loin.

L'expérience suivante a eu pour objectif de déterminer la concentration optimale de dépôt des oligonucléotides modifiés par un thiol (dépôtés sans électro-dépôt) et ceux modifiés par un pyrrole (électro-dépôtés). La figure 29 montre les variations de réflectivité obtenues avec les deux chimies de greffage et en fonction des différentes concentrations en sondes allant de 10 μM à 70 μM .

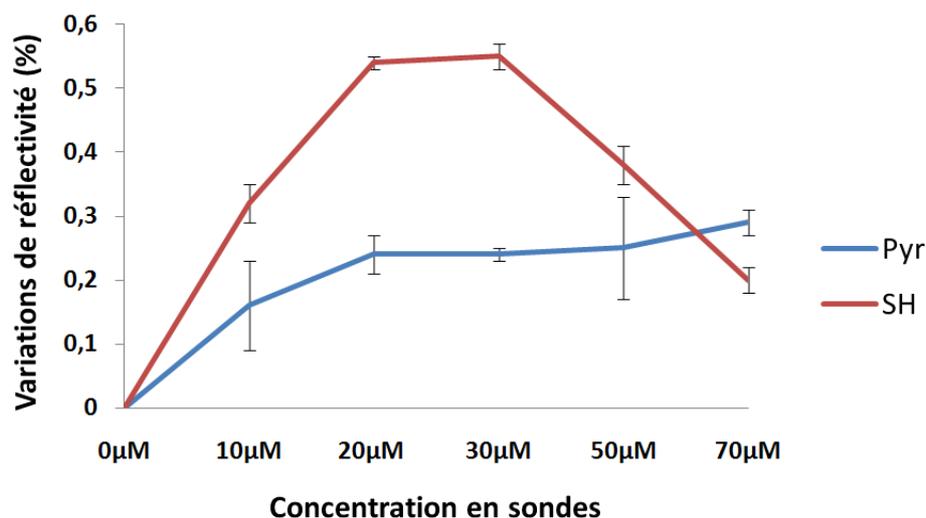


Figure 29. Influence de la concentration en sonde sur la réponse observée en SPRI.

Les variations de réflectivité sont mesurées après injection de 100nM de cible 25mer. (Pyr) ■ désigne les oligonucléotides 25 mer modifiés avec un pyrrole et (SH) ■ les oligonucléotides 25 mer modifiés HS-(CH₂)₆. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 3 répliques pour chaque sonde.

La concentration optimale en sonde est un compromis entre une concentration trop faible qui ne permet pas d'obtenir un signal détectable en SPRi et une concentration trop forte qui provoque un encombrement stérique entre les sondes et donc un manque d'accessibilité. La théorie s'applique complètement avec les oligonucléotides fonctionnalisés par un SH, où la concentration optimale en dépôt est située entre 20 et 30 μM . En revanche, avec les oligonucléotides sondes modifiés par un pyrrole, la réponse a augmenté jusqu'à 20 μM pour atteindre ensuite un plateau. Cette différence pourrait s'expliquer par une concentration en oligonucléotides modifiés par un pyrrole qui est moindre du fait de la présence en excès de pyrrole libre. Au cours d'une expérience complémentaire, nous avons observé que des variations de réflectivité supérieures sont observées avec les oligonucléotides modifiés par un pyrrole, lorsqu'ils sont déposés sans pyrrole libre (non montré). Enfin, les différences de variation de réflectivité observées avec les deux stratégies ont permis, entre nos mains, de démontrer une meilleure efficacité de dépôt des oligonucléotides modifiés par un thiol si on se place à une concentration entre 20 et 30 μM .

Nous avons déterminé que les oligonucléotides modifiés par un thiol interagissent avec l'or. Cependant, nous avons voulu confirmer que c'était bien la fonction thiol qui était responsable de l'accroche sur l'or. Pour le déterminer, une expérience comparative a été effectuée (figure 30), avec en parallèle du dépôt par contact d'oligonucléotides modifiés par un thiol, le dépôt d'oligonucléotides non modifiés et le dépôt d'oligonucléotides modifiés par un groupement NH_2 qui est connu pour interagir sur l'or [101].

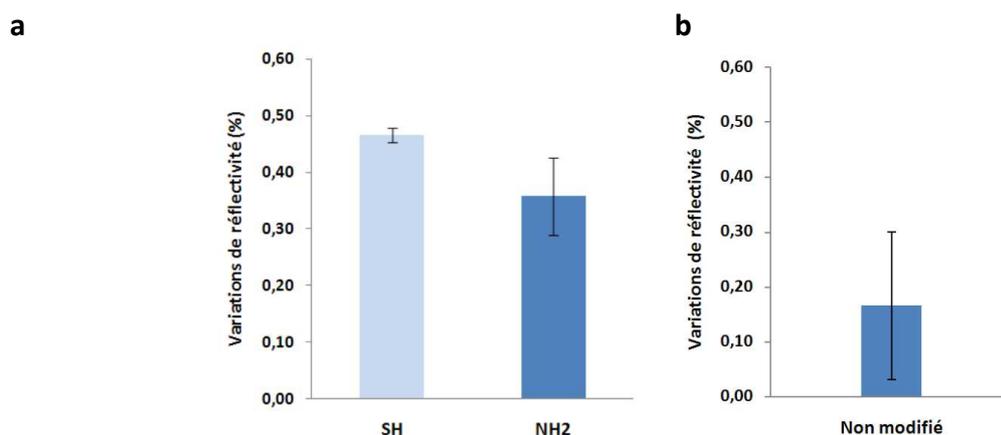


Figure 30. Importance de la modification SH sur le dépôt d'oligonucléotides par contact

a) Des oligonucléotides 25 mer modifiés SH et NH_2 sont déposés à 30 μM , 100 nM de cibles complémentaires sont injectés. b) L'interaction est suivie après dépôt de 30 μM d'oligonucléotides non modifiés et injection de 1 μM de cibles complémentaires. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 8 répliquas pour chaque sonde.

Les résultats obtenus ont démontré que le dépôt d'oligonucléotides modifiés par un thiol reste le plus efficace et une variation de 0,47% de réflectivité a été observée après injection de 100 nM de cibles complémentaires. L'efficacité de dépôt des oligonucléotides modifiés NH₂ est légèrement plus faible, avec une réponse de 0,36% de réflectivité. Cependant, l'écart-type est plus important qu'avec le dépôt d'oligonucléotides modifiés SH et s'interprète comme une forte hétérogénéité de dépôt. Enfin, l'accroche est très mauvaise avec les oligonucléotides sondes non modifiés. En effet, en injectant 1μM de cibles complémentaires, on observe trois fois moins de signal (0,17% de réflectivité) par rapport à des sondes oligonucléotidiques fonctionnalisées par un thiol et pour lesquelles nous avons mesuré après injections de 100 nM de cibles 0,47% de réflectivité.

Ces résultats ont confirmé l'efficacité et la spécificité de la fonction thiol pour l'accroche d'oligonucléotides sondes sur la surface d'or. Dans les expériences suivantes, nous avons cherché à déterminer si ce mode de dépôt était vraiment compétitif vis à vis de chimies basées sur l'électro-dépôt.

III.2 Études comparatives de chimies avec ou sans électro-dépôt

Au cours d'une expérience préliminaire (partie III.1), nous avons observé une meilleure efficacité de dépôt des oligonucléotides modifiés par un thiol par rapport à l'électro-dépôt d'oligonucléotides modifiés par un pyrrole. Nous avons voulu vérifier ces observations et dans le même temps, évaluer l'électro-dépôt d'oligonucléotides modifiés par une fonction diazonium. Afin de limiter les biais dus à l'expérimentation ou au prisme lui-même, nous avons réalisé indépendamment les expériences sur trois prismes différents (figure 31). Les valeurs présentées correspondent ainsi aux moyennes des résultats obtenus sur 3 prismes.

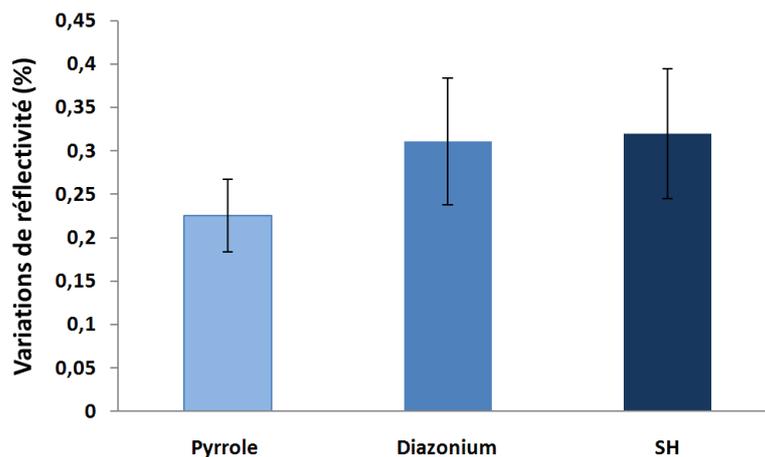


Figure 31. Comparaison des chimies de dépôt basées ou non sur l'électro-dépôt.

Les oligonucléotides modifiés sont de taille 25 mer et sont déposés à 30 μM . Les variations de réflectivité sont déterminées après injection de 100 nM de cibles complémentaires 25 mer. Les écarts-types sont calculés à partir des valeurs observées sur trois prismes dorés.

Les variations de réflectivité obtenues après injection de cibles complémentaires indiquent clairement que le dépôt de sondes nucléotidiques modifiées par un thiol est plus efficace que l'électro-dépôt d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un pyrrole et similaire à l'électro-dépôt d'oligonucléotides fonctionnalisés avec un diazonium.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'électro-dépôt des sondes sur la surface d'or des prismes. Pour cela, les oligonucléotides modifiés par un diazonium et un pyrrole ont été déposés avec ou sans électro-dépôt. Les valeurs de variations de réflectivité indiquées dans l'expérience sont déduites des résultats enregistrés sur trois prismes (figure 32).

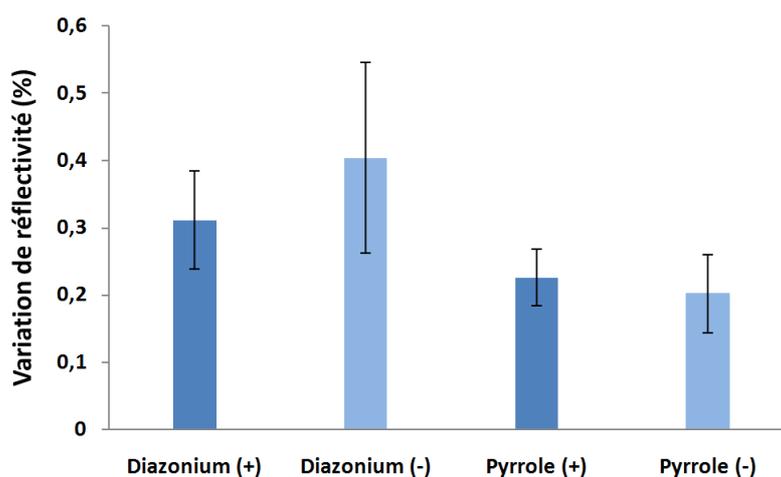


Figure 32. Importance de l'électro-dépôt avec les oligonucléotides modifiés par un pyrrole et un diazonium.

Les dépôts sont effectués avec (+) ou sans (-) passage de courant électrique. Les oligonucléotides sont de taille 25 mer et déposés à une concentration de 30 μM . Les cibles complémentaires 25 mer sont injectées à 100 nM. Les écarts-types sont calculés à partir des valeurs observées sur les trois prismes.

Les résultats observés sont surprenants, on s'attendait à une absence d'interaction avec les oligonucléotides modifiés par un pyrrole et un diazonium lorsqu'ils sont déposés par simple contact sur la surface du prisme. Cependant, des variations de réflectivité similaires sont observées avec les oligonucléotides modifiés par un pyrrole ou un diazonium, lorsqu'ils sont déposés avec ou sans électro-dépôt. Ces observations ont été confirmées par un grand nombre d'expériences. Un doute pouvait néanmoins subsister avec les oligonucléotides dont la modification avec un pyrrole a été réalisée dans notre laboratoire. En effet la fonctionnalisation s'opère à partir d'oligonucléotides modifiés avec un NH_2 qui interagissent avec un pyrrole NHS. Il est possible dans ce cas qu'en absence de réaction totale, des oligonucléotides résiduels modifiés avec un NH_2 se fixent sur la surface. Cette hypothèse a depuis été abandonnée après le dépôt par simple contact d'oligonucléotides commerciaux modifiés par un groupement pyrrole, qui ont donné exactement les mêmes résultats (non montrés).

En conclusion, la stratégie utilisant des oligonucléotides modifiés par un thiol a présenté de nombreux avantages. Le premier reste son efficacité, avec un dépôt au moins aussi efficace que les chimies basées sur l'électro-dépôt, nous nous sommes affranchis des contraintes liées au passage d'un courant électrique et donc de la nécessité de disposer d'un appareillage spécifique. De plus, les oligonucléotides modifiés par un thiol sont facilement accessibles. Au contraire, les fonctionnalisations des oligonucléotides par un pyrrole ou un diazonium nécessitent l'emploi de composés onéreux dont certains intermédiaires sont instables dans le temps.

IV. Stabilité des oligonucléotides modifiés par un thiol

IV.1 Stabilité au cours du dépôt

Il reste maintenant à caractériser la stabilité des oligonucléotides modifiés par des thiols pour savoir s'ils sont vraiment applicables à des expériences en SPRI. Nous avons tout d'abord vérifié si une hétérogénéité de dépôt des sondes pouvait être liée à l'oxydation des thiols (avec l'oxygène de l'air) et à la formation de ponts disulfures (S-S) au cours du temps (figure 33).

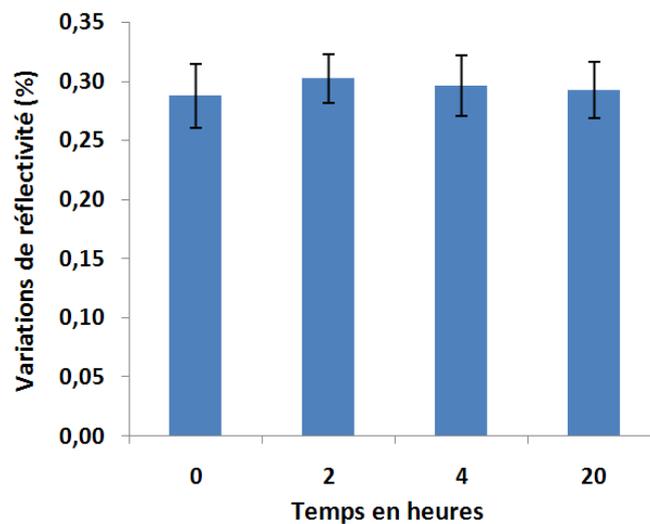


Figure 33. Stabilité des sondes fonctionnalisées par un thiol à température ambiante (20°C).

Des oligonucléotides 25 mer conservés sans précaution particulière, à une concentration de 20 μ M sont déposés à différents intervalles de temps entre 0 et 20 heures sur un même prisme. Les variations de réflectivité sont mesurées après injection de cibles complémentaires 25 mer à 100 nM. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 8 répliques pour chaque sonde.

Après injection de cibles complémentaires, nous pouvons de manière indirecte évaluer la qualité de dépôt. Les résultats obtenus ne montrent aucune différence d'interaction entre les oligonucléotides déposés au temps zéro et ceux déposés après 20 heures. La formation de ponts disulfures n'a donc pas gêné le dépôt. Ces observations sont confirmées dans la littérature car l'interaction entre un thiol et l'or (S-Au) est plus forte que l'interaction entre deux thiols (S-S) [102,103]. L'emploi d'oligonucléotides modifiés par une fonction thiol (SH) est donc parfaitement envisageable pour des études à plus haut débit où des temps de dépôt plus importants sont nécessaires.

IV.2 Stabilité au cours de l'expérience SPRI

Nous avons ensuite déterminé la stabilité de l'ancrage des oligonucléotides modifiés par un thiol à la surface du prisme, après injections successives de cibles complémentaires. Une diminution de l'interaction indiquerait que les sondes ne sont pas suffisamment ancrées à la surface. Les variations de réflectivité ont été mesurées sur 20 injections répétées d'oligonucléotides cibles, alternées par des injections de soude à 0,1 M pour dissocier les brins d'ADN complémentaires (figure 34).

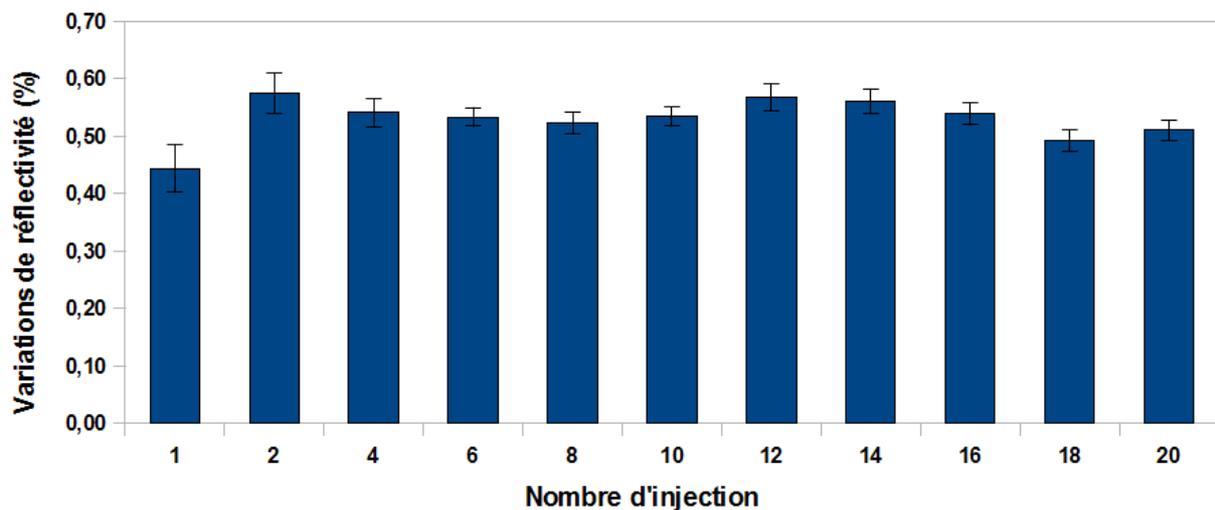


Figure 34. Évaluation de la stabilité au cours d'une expérience SPRI.

Les oligonucléotides sondes 25 mer sont déposés à 30 μM . Les variations de réflectivité sont observées après injections de 100 nM de cibles complémentaires 25 mer. Des régénérations à la soude sont effectuées entre chaque injection afin de déshybrider les brins complémentaires. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 8 répliques pour chaque sonde.

Globalement, nous avons observé un signal relativement régulier au cours des différentes injections (aux alentours de 0,5 % de réflectivité). L'énergie de liaison entre un thiol et l'or est donc suffisamment forte pour maintenir l'accroche des oligonucléotides modifiés au cours des expériences SPRI. On note cependant qu'une réponse inférieure a été mesurée lors de la première injection et qu'elle provenait probablement de la présence de tampon de dépôt qui peut gêner l'interaction. La faible irrégularité entre les différentes injections est due aux variations expérimentales lors des injections.

IV. 3 Stabilité à haute température.

Le contrôle de la température garantit une plus grande spécificité au cours de l'expérience mais il est surtout primordial lorsqu'on souhaite travailler de manière plus rigoureuse. Par exemple, la présence de structures secondaires peut interférer lors de l'hybridation entre acides nucléiques complémentaires et introduire un biais dans les résultats observés. De plus, une température adéquate est nécessaire pour visualiser des mutations ponctuelles (mismatch). Le principe est donc de rechercher la température optimale qui permet d'une part de limiter la présence des structures secondaires et d'autre part d'augmenter la spécificité d'hybridation avec des brins « mismatch ». Cependant, la crainte réside dans la stabilité des liaisons S-Au lors d'une augmentation de la température. Pour le vérifier, nous avons comparé l'interaction ADN/ADN sur un prisme avant et après que celui-ci ait été placé en solution dans le tampon de course à une température de 65°C pendant 30 minutes (figure 35).

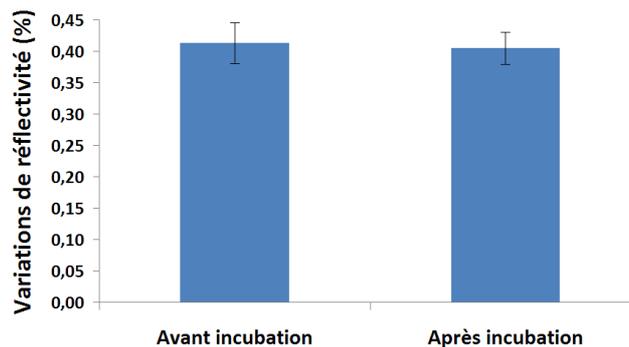


Figure 35. Influence de la température sur la stabilité des sondes

Les sondes 25 mer sont déposées à 30 μ M. Les cibles complémentaires 25 mer sont injectées à 100 nM, avant et après incubation à 65°C. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 3 réplicas pour chaque sonde et sur un même prisme.

L'augmentation de température à 65°C n'a pas modifié la valeur de réflectivité résultant de l'hybridation. Ce qui nous permet de conclure que la liaison thiol-or n'est pas affectée par une température au moins située au voisinage de 60-65°C, température habituellement utilisée dans les expériences de biopuces à ADN. L'augmentation de la température d'hybridation peut donc être envisagée pour la recherche de mutations ponctuelles telles que les SNP et pour limiter la présence des structures secondaires des oligonucléotides sondes et cibles. Ce dernier point a été développé ci-après.

Nous avons ainsi montré que la température influence la réponse observée en fonction de la taille des oligonucléotides étudiés (figures 36 et 37). Les expériences ont été réalisées chez Genoptics avec un système équipé d'un réglage et d'un contrôle de la température au niveau de la cuve fluïdique.

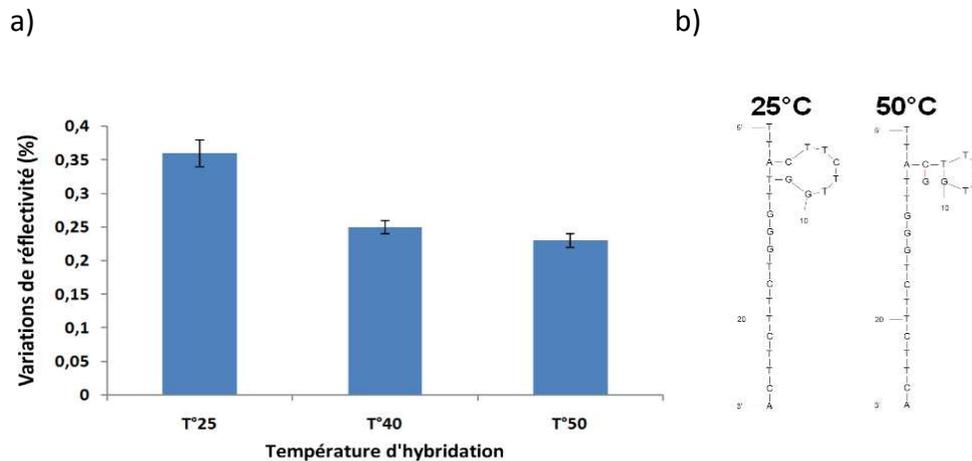


Figure 36. Influence de la température sur l'hybridation entre cibles et sondes de 25 mer

a) Les sondes 25 mer sont déposées à 30 μM et les cibles de même taille et parfaitement complémentaires sont injectées à 100 nM et cela à trois températures différentes, 25°C, 40°C et 50°C. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 4 réplïcas pour chaque sonde. b) Représentation schématique des structures secondaires théorïques des sondes de 25 mer à 25 et 50°C.

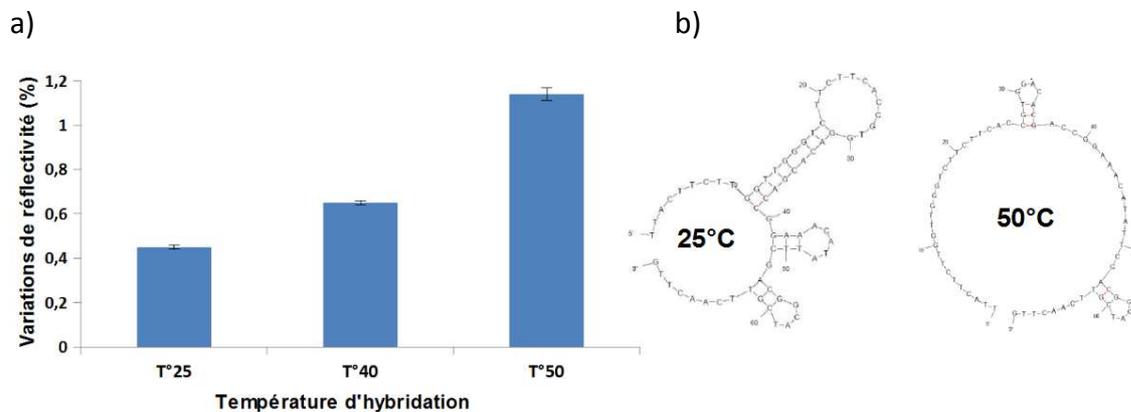


Figure 37. Influence de la température sur l'hybridation entre cibles et sondes 70 mer

a) Les sondes 70 mer sont déposées à 30 μM et les cibles sont injectées à 100 nM et cela à trois températures différentes, 25°C, 40°C et 50°C. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 4 réplïcas pour chaque sonde. b) Représentation schématique des structures secondaires théorïques des sondes de 70 mer à 25 et 50°C.

Avec les sondes 25 mer, où les appariements intra-sondes sont peu nombreux, l'augmentation de la température de 25 à 50°C a eu pour effet de diminuer légèrement l'hybridation des cibles complémentaires. Nous avons interprété cela comme une diminution de l'énergie de liaison entre oligonucléotides, due à l'augmentation de la température. Avec les sondes 70 mer, l'hybridation a été fortement améliorée avec l'augmentation de la

température, comme en atteste le fait que nous avons des variations de réflectivité trois fois supérieures en partant de 25 à 50°C. Le nombre d'appariements intra-sondes a ainsi diminué considérablement à 50°C et l'hybridation a été favorisée. Les structures secondaires de l'ADN ont donc directement influencé l'hybridation. L'importance du contrôle de la température a ainsi été montrée et au delà, la stabilité des oligonucléotides modifiés par un thiol pour ce genre d'étude.

IV.4 Stabilité au cours du temps

Un atout majeur de la SPRI est la possibilité de réutiliser la puce. Afin que cet avantage soit préservé, le greffage des sondes doit être parfaitement stable sur une longue durée. Au cours des expériences décrites ci-dessous, nous avons déterminé les conditions optimales de conservation des prismes pour maintenir l'intégrité et la stabilité des oligonucléotides modifiés par un thiol et déposés sur l'or. Les effets de la température de stockage et de l'exposition à la lumière ont ainsi été testés sur une période de six mois. Chaque valeur correspond à la moyenne obtenue sur trois prismes différents sur lesquels sont moyennés trois injections en cibles complémentaires. Les résultats sont présentés sur le diagramme ci-après (figure 38).

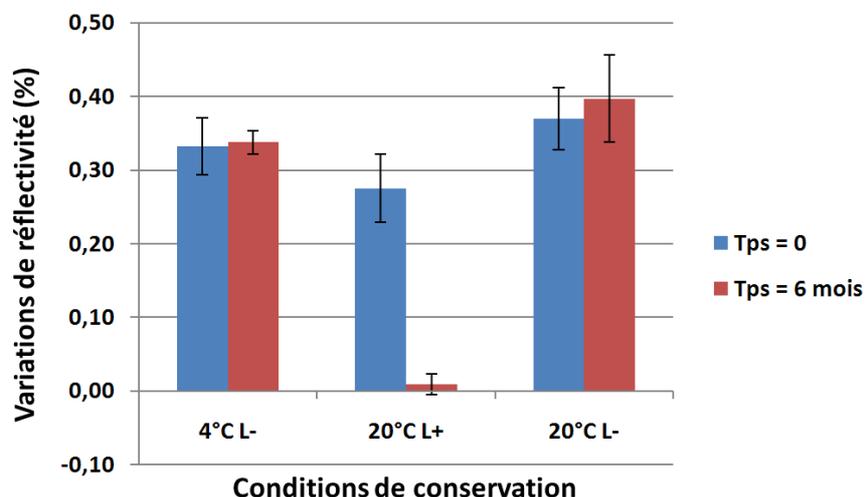


Figure 38. Détermination de la stabilité au cours du temps du dépôt d'oligonucléotides modifiés par un thiol. Des oligonucléotides 25 mer sont déposés à une concentration de 30 μ M, les injections sont effectuées avec des cibles complémentaires de 25 mer à 100 nM. La température de stockage des prismes est de 4°C (réfrigérateur) ou de 20°C (température ambiante). La conservation se déroule à l'abri de la lumière ambiante (L-) ou à lumière ambiante (L+). Les barres bleues représentent la mesure des interactions au temps zero (Tps = 0) et les barres rouges après six mois de stockage dans les différentes conditions (Tps = 6 mois). Les écarts-types sont calculés à partir des moyennes des réponses observées (8 répliques) sur trois prismes indépendants pour chaque condition.

Les variations de réflectivité sont similaires au temps 0 et 6 mois plus tard, lorsque les prismes sont conservés en absence de lumière, à 4 et à 20°C. On peut donc déduire que les liaisons (S-Au) entre les oligonucléotides sondes et le prisme sont très stables dans le temps (en absence de lumière) et que la température (4 ou 20°C) n'a pas d'influence. En revanche, en présence de lumière et à 20°C, le signal mesuré en SPRi a pratiquement disparu au bout de 6 mois et les spots sont devenus complètement invisibles (figure 39).

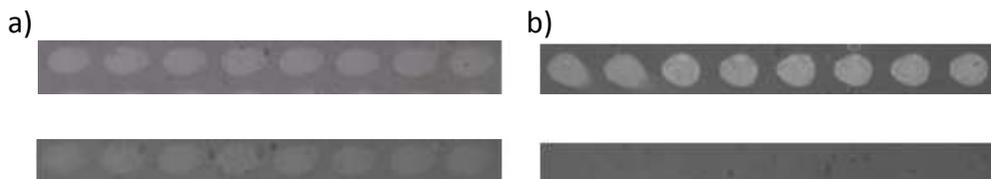


Figure 39. Exemples d'images brutes de spots avant et après différentes conditions de stockages.

Les images du haut sont obtenues avant stockage et celle du bas après conservation pendant 6 mois, 4°C dans l'obscurité (a) et à lumière et à température ambiante (b).

La lumière a donc endommagé les sondes nucléotidiques présentes sur la surface. Nous ne savons pas expliquer plus en profondeur l'effet de la lumière sur la dégradation des sondes mais nous savons que l'ADN exposé ainsi ne s'hybride plus avec des cibles complémentaires. Il ressort de ces résultats que la seule condition indispensable à la conservation du prisme est l'absence la lumière.

IV.5 Conclusion

La stabilité des oligonucléotides modifiés par un thiol a été confirmée. Le dépôt peut s'effectuer de manière homogène sur plusieurs heures et il reste stable au cours de l'expérience SPRi, même si la température est augmentée jusqu'à 65°C. De plus, les prismes peuvent être parfaitement conservés plusieurs mois en absence de lumière. Par ailleurs, la très forte homogénéité de dépôt a été validée. En effet, pour une même sonde déposée, on observe après injection de cibles complémentaires, un coefficient de variabilité (rapport de l'écart-type sur la moyenne) dans la réponse observée de moins de 10% (non montré). Tous ces avantages, font des oligonucléotides modifiés par un thiol, des sondes de choix pour une utilisation en SPRi.

V. Augmentation de la densité de dépôt

Avec le développement de la SPRi et des techniques de dépôt, l'augmentation de la densité de dépôt appelée aussi multiplexage, est envisageable. L'intérêt qui en découle est d'étudier simultanément un grand nombre d'interactions en parallèle et d'effectuer ainsi des études de criblage de biomolécules. Le multiplexage nécessite néanmoins certains impératifs, un système de dépôt miniaturisé, une caméra suffisamment résolutive pour définir les spots individuellement et enfin un système de traitement informatique performant pour analyser la masse conséquente des données engendrées.

L'appareillage de dépôt reste cependant la principale limite et le dépôt par gouttes de solution de sondes pour la SPRi est beaucoup plus adapté au multiplexage comparé aux systèmes basés sur des canaux micro-fluidiques. Nous avons ainsi utilisé l'appareil de dépôt ChipWriterPro, disponible sur la plateforme Biopuces, il permet de déposer par simple contact des biomolécules avec des aiguilles creuses de seulement 100 μm de diamètre. La première étape a consisté à déterminer si la taille des spots pouvait influencer la réponse observée en SPRi (figure 40).

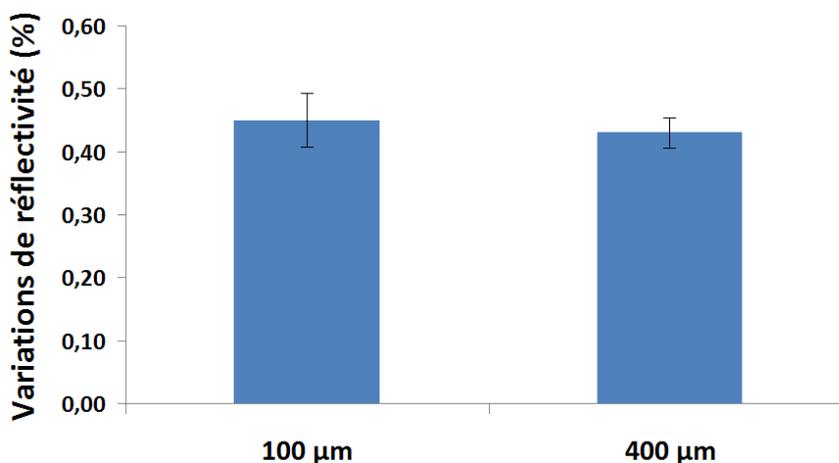


Figure 40. Influence de la taille du dépôt sur la réponse observée en SPRi.

Le dépôt est effectué avec des oligonucléotides sondes 25 mer à 30 μM et des sondes complémentaires 25 mer sont injectée à 100 nM. Des aiguilles de 100 μm et de 400 μm de diamètre sont utilisées pour le dépôt. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 10 répliques pour chaque sonde, sur un prisme.

À la vue de ces résultats, les variations de réflectivité sont les mêmes quelque soit la taille des dépôts. L'augmentation de la densité a donc été possible sans perte d'efficacité de

réponse et nous avons déposé plus de 1000 fois la même sonde sur le même prisme, comme l'atteste l'image suivante (figure 41).

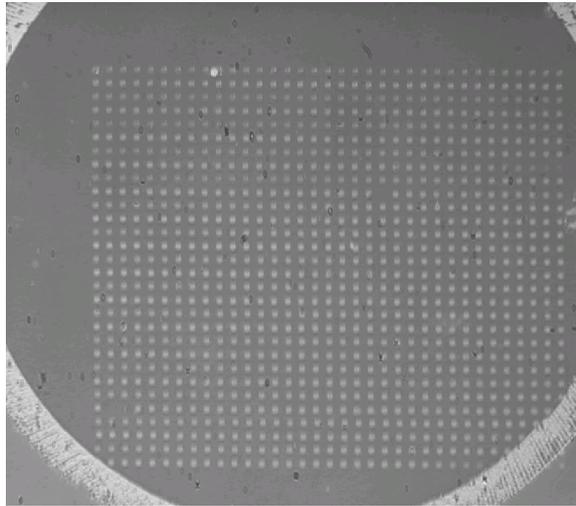


Figure 41. Image brute observée sur SPRI-Plex après dépôt de 1050 spots
L'oligonucléotide sonde 25 mer est déposé à une concentration de 30 μ M.

Le dépôt de 1050 gouttes a ici été effectué avec le même oligonucléotide sonde modifié par un thiol, mais il serait tout à fait envisageable d'effectuer un dépôt avec 1050 sondes différentes car nous avons vu que le temps de dépôt n'influence pas la qualité du dépôt. Les limitations proviennent surtout du logiciel d'analyse qui ne permet pas actuellement de suivre plus de 256 interactions de sondes différentes. Le logiciel est en cours d'optimisation par Genoptics–Horiba Scientific. La densité de dépôt pourrait également être augmentée en diminuant le diamètre de l'aiguille. Il faudra dans ce cas, aussi améliorer la résolution de la caméra CCD qui est de 20 μ m sur notre appareil.

Chapitre II. Amélioration de la détection

I. Introduction

La limite de détection d'oligonucléotides cibles est aux alentours de 10 nM en SPRi, alors qu'elle est de 10 pM pour les techniques de marquage par fluorescence [84]. Par conséquent, le défi consiste à améliorer la détection pour rendre la SPRi compétitive vis-à-vis des techniques sans marquage. Dans cette optique, deux principales stratégies peuvent être envisagées. La première consiste à greffer sur les cibles des nanoparticules d'argent ou d'or pour augmenter leur masse et donc le signal SPR observé [104,105,106]. Cette technique étant basée sur la modification des cibles, nous perdons l'avantage de la détection sans marquage.

La seconde stratégie que nous avons suivie a consisté à modifier la surface avec des structures spatiales favorisant les interactions. Nous avons testé deux méthodes, le greffage sur la surface d'or de dendrimères [107] et l'utilisation de nanoparticules d'or qui peuvent améliorer la détection du signal [108,109,110]. Pour toutes les expériences qui vont suivre, nous avons défini le seuil de détection à 0,05% de réflectivité, ce qui correspond à trois fois le bruit de fond situé entre 0,01 et 0,02%.

II. Surfaces dendrimères

Les dendrimères sont des polymères isomoléculaires dont la taille et la masse moléculaire peuvent être contrôlées de manière rigoureuse. Ils sont formés d'arborescences divergentes à partir d'un cœur central via la répétition d'une séquence de réactions. Une génération est construite à chaque séquence de réaction. La structure ainsi obtenue permet de servir à la fois de lien et d'espaceur entre la surface et les biomolécules déposées. La taille et le nombre de sites réactifs des dendrimères sont modulables, le dernier paramètre conduisant potentiellement à une augmentation de la densité de sondes sur la surface, donc à une meilleure sensibilité de détection. Nous avons choisi de travailler avec des dendrimères aldéhydes pour fixer des oligonucléotides modifiés par un groupement NH_2 . Les dendrimères utilisés ici sont des G4 (4 générations) et ont un diamètre de 7 nm (figure 42).

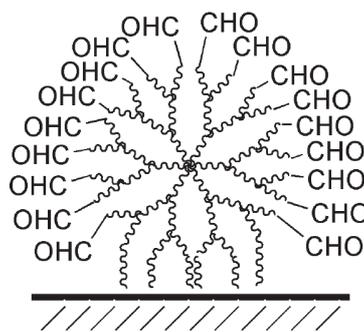


Figure 42. Représentation schématique d'un dendrimère aldéhyde [107]

Le principe de fixation des dendrimères et des oligonucléotides NH_2 est décrit ci-dessous (figure 43).

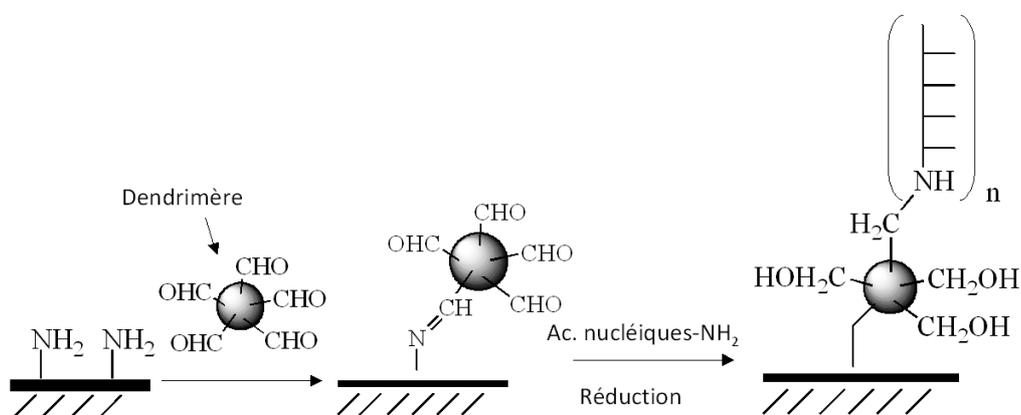


Figure 43. Principe de fixation d'acides nucléiques NH_2 sur des dendrimères CHO.

Les fonctions aldéhydes des dendrimères interagissent avec les amines présentes sur la surface du support et les NH_2 des acides nucléiques. La stabilisation de l'accroche s'effectue après réduction des liaisons C=N en C-N.

Comme le montre la figure 43, les dendrimères aldéhydes sont immobilisés sur la surface par l'intermédiaire de groupements NH_2 . L'introduction des NH_2 sur l'or peut être réalisée avec une molécule possédant à la fois une fonction amine et une fonction thiol. Nous avons choisi de tester deux molécules pour la fixation des dendrimères, le 11-amino-1-undecanethiol ($\text{C}_{11}\text{H}_{25}\text{NS}$) et la cystéamine ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NS}$). Pour contrôle, la fixation des dendrimères a également été testée sur une surface d'or seul. L'efficacité de fixation des dendrimères ainsi que le gain qu'ils peuvent potentiellement apporter dans la détection ont été évalués par SPRI après dépôt d'oligonucléotides sondes sur chacune des différentes surfaces de dendrimères et injections de cibles complémentaires (figure 44).

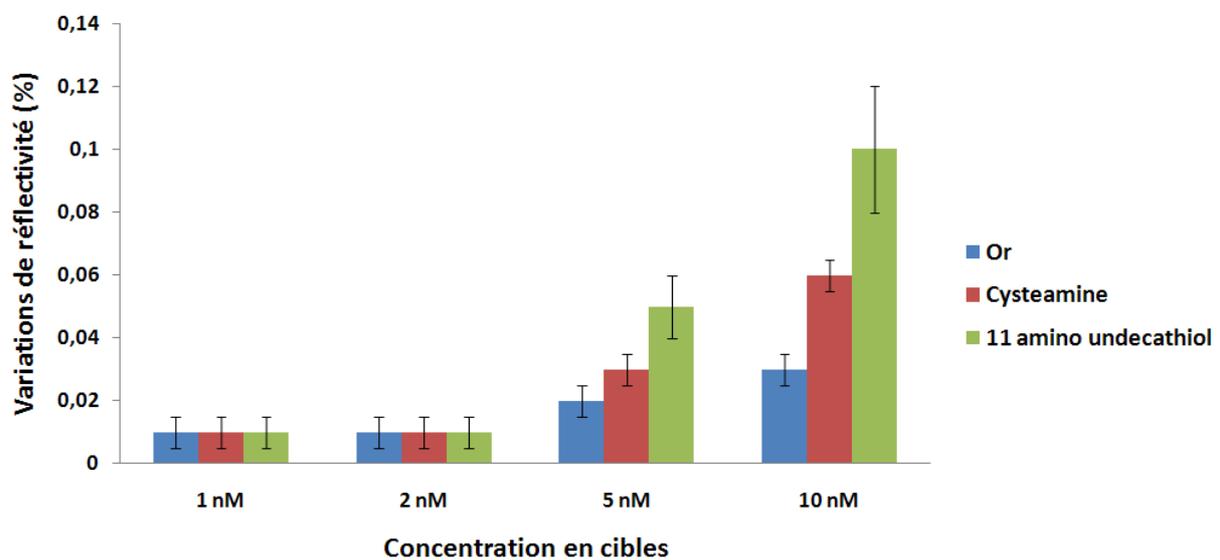


Figure 44. Influence de la surface dendrimère sur la réponse observée en SPRI.

Des oligonucléotides sondes 25 mer sont déposés à une concentration de $30 \mu\text{M}$ sur différentes surfaces. Les interactions SPRI sont obtenues après injection de cibles complémentaires 25 mer à différentes concentrations. Les écarts-types sont calculés à partir des réponses observées sur 8 répliques pour chaque sonde.

Nous avons remarqué que les variations de réflectivité obtenues avec l'injection de cibles 25 mer à des concentrations de 1 et 2 nM sont situées sous le seuil de détection (0,05% de réflectivité) avec toutes les surfaces testées. Des réponses au dessus du bruit de fond sont observées à partir de 5 nM d'injection en cibles pour la surface dendrimère/11-amino-1-undecanethiol et à 10 nM pour la surface dendrimère/cystéamine. L'absence de réponse significative avec la surface dendrimère/or (au dessus de 0,05%) ne permet pas de confirmer l'adsorption des dendrimères sur l'or seul. En revanche, avec les autres surfaces, les dendrimères favorisent les interactions entre cibles et sondes complémentaires. Cette amélioration a vraisemblablement été due à une meilleure accessibilité des sondes

nucléotidiques sur la surface. Par ailleurs, l'efficacité des dendrimères a varié en fonction de la molécule utilisée pour son accroche sur l'or. Ainsi, un signal environ deux fois supérieur est observé lorsque les dendrimères sont fixés avec le 11-amino-1-undecanethiol. Ce gain peut s'expliquer soit par une meilleure fixation sur l'or du 11-amino-1-undecanethiol par rapport à la cystéamine et donc des dendrimères, ou alors par une meilleure accessibilité des dendrimères aux fonctions NH_2 présentées en surface, due à la plus longue chaîne carbonée du 11-amino-1-undecanethiol.

III. Surfaces de nanoparticules d'or

III.1 Greffage des nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or appelées en anglais Gold NanoParticules (GNP), sont couramment utilisées en SPRi pour améliorer la détection. Que ce soit en favorisant les interactions par nanostructuration de la surface ou plus fréquemment pour accroître les variations de réflectivité en augmentant la masse des cibles injectées sur lesquelles elles sont fixées. Cette dernière approche fait cependant perdre l'avantage de travailler sans modification de la cible. La stratégie que nous avons suivie a été d'augmenter la probabilité de rencontre entre sondes et cibles par augmentation de la rugosité de surface et donc en immobilisant plus de sondes et/ou en les rendant plus disponibles pour l'interaction. Cette rugosité a été obtenue en greffant des nanoparticules d'or directement sur la surface d'or du prisme. Le principal obstacle reste l'accrochage de manière stable des GNP sur la surface. L'emploi de dithiols tel que l'hexanedithiol est ainsi envisagé dans la littérature [111] mais elle nécessite des conditions particulières d'expérimentation. Nous avons choisi de tester d'autres dithiols tels que le dithiothréitol (DTT) ou l'éthanedithiol. Des résultats comparatifs ont montré que l'utilisation du DTT était préférable. Le mode de fixation des GNP sur l'or avec le DTT est schématisé ci-dessous (figure 45).

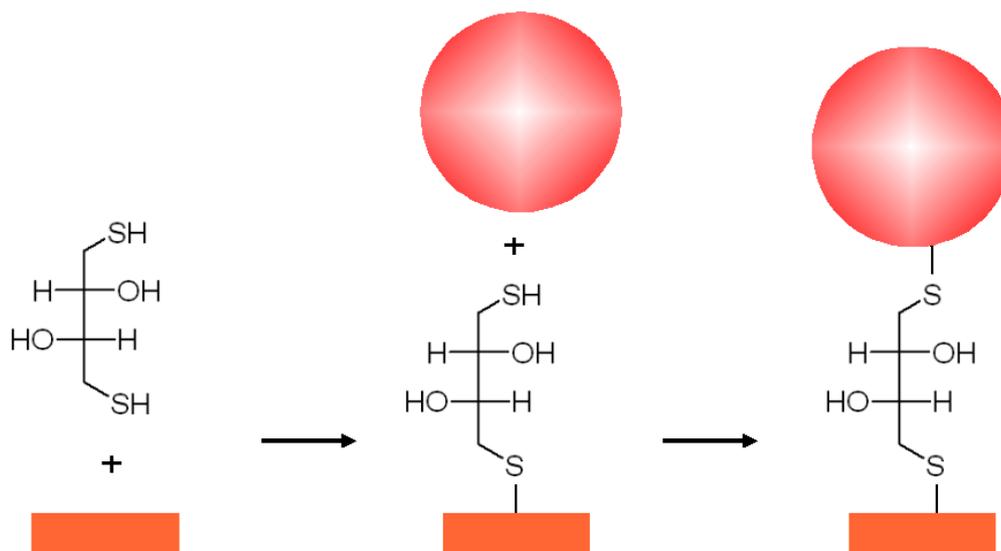


Figure 45. Représentation schématique de la fixation de GNP sur l'or.

Les GNP sont fixés sur la surface après ajout de DTT. Une fonction SH permet la fixation du DTT sur l'or du prisme et l'autre la fixation du colloïde.

La principale interrogation soulevée ici est la disponibilité des fonctions thiols pour l'accroche des GNP. En effet, il est possible que pour chaque molécule de DTT, les deux groupements thiols interagissent sur la surface d'or et qu'aucun thiol ne soit accessible aux GNP. Il était donc indispensable de confirmer la présence des GNP sur la surface après fonctionnalisation au DTT. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de microscopie à force atomique (AFM). Très brièvement, cette technique est basée sur le balayage d'une pointe sur une surface et permet entre autres de déterminer la topographie et la rugosité. Des mesures comparatives ont ainsi été effectuées en AFM, entre une surface d'or seul et une surface obtenue après ajout de DTT et des GNP de 40 nm (figure 46).

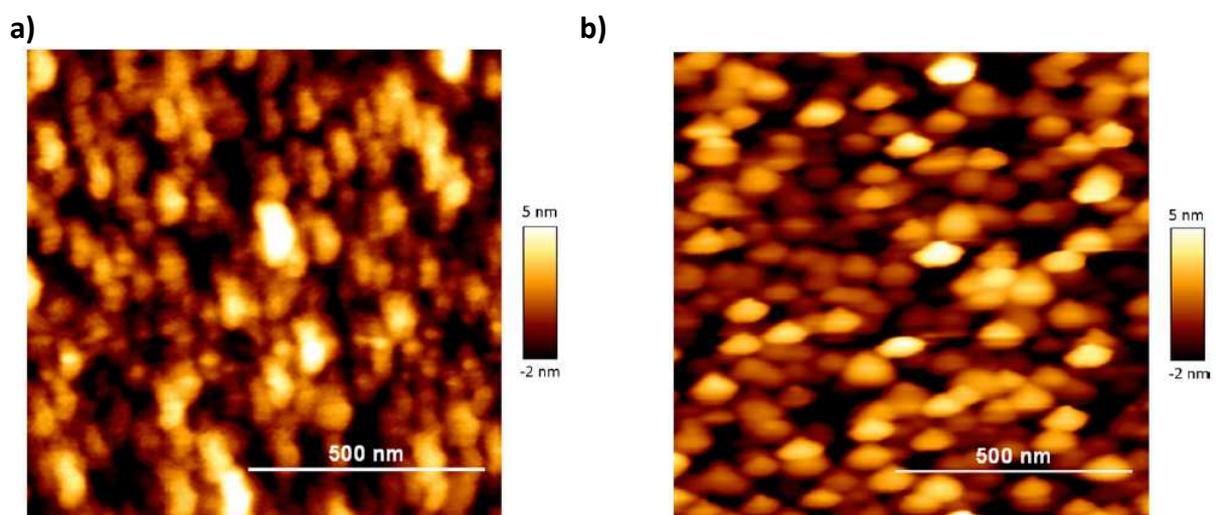


Figure 46. Images AFM d'une couche d'or seul (a) et d'une surface sur laquelle a été déposée du DTT et des GNP de 40 nm (b).

La principale information tirée de cette expérience est la présence de GNP directement visualisés par AFM (b). Il est donc possible de greffer des GNP sur la surface d'or par l'intermédiaire du DTT. En revanche, on peut s'interroger sur les valeurs de mesures de rugosité «Peak To Valley» (PTV) indiquées ici. En effet, la rugosité est de 9,4 nm pour la surface d'or seul alors qu'elle est seulement de 12,76 nm en présence de GNP. Nous pouvons émettre différentes hypothèses responsables de cette faible différence. D'une part, la rugosité très élevée de l'or seul peut être attribuée au plasma oxygène effectué pour nettoyer la surface mais qui peut également l'endommager. D'autre part, la rugosité de 12,76 nm avec des colloïdes de 40 nm de diamètre pourrait s'expliquer par le chevauchement entre eux de ces derniers. Une des solutions envisagées pour augmenter la rugosité serait de diminuer la quantité de GNP fixés pour limiter leur trop proche proximité.

III.2 Influence de la taille des nanoparticules d'or sur la détection

Après avoir confirmé que la fixation des GNP sur l'or était réalisable, nous avons voulu déterminer si leur diamètre pouvait influencer la réponse observée en SPRI. Nous supposons en effet que la rugosité peut varier avec la taille des GNP mais également provoquer un éloignement des sondes de la surface d'or du prisme et une diminution de l'amplitude de l'onde évanescente. L'objectif a donc été de déterminer la taille idéale de GNP permettant un compromis entre rugosité et éloignement de la surface. Pour cela, des expériences comparatives ont été effectuées en SPRI, après avoir déposé des sondes nucléotidiques sur différentes surfaces de GNP et en les comparant avec les résultats obtenus sur une surface d'or seul (figure 47).

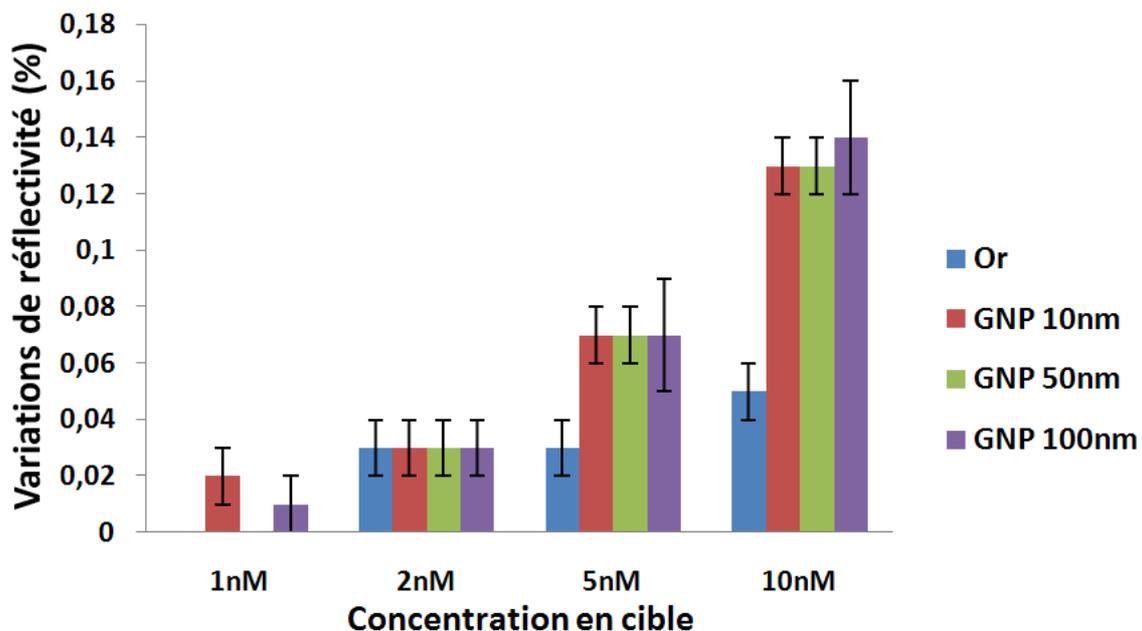


Figure 47. Influence de la taille des GNP sur la réponse observée en SPRI.

Des sondes nucléotides 25 mer sont déposées à 30 μ M sur chacune des surfaces, les interactions sont observées après injection de cibles complémentaires 25 mer.

En considérant le seuil de détection à 0,05% de réflectivité, la limite de détection a été de 10 nM en cibles injectées avec une surface d'or seul. Cette limite de détection est classiquement ce qu'on observe en SPRI [84]. En revanche, avec les surfaces sur lesquelles ont été greffées des GNP, nous observons 0,03% de réflectivité après injection de 2 nM de cibles 25 mer et 0,07% après injection de 5 nM de ces mêmes cibles. La limite de détection est donc située entre 2 et 5 nM. Une amélioration de la détection autour d'un facteur trois a donc été obtenue lorsqu'on utilise les GNP. Par ailleurs, nous n'avons pas observé de

différence de réponse lorsque l'on change le diamètre des GNP. Une des hypothèses est que les GNP de tailles plus importantes permettent l'accroche de plus de sondes mais dans le même temps, le signal SPR est plus faible car les sondes sont plus éloignées de la surface.

IV. Conclusion

L'approche choisie pour améliorer la détection en SPRi a été de modifier la surface pour favoriser les interactions intermoléculaires. La limite de détection a été diminuée par deux avec le greffage sur la surface de dendrimères et par trois avec le greffage de GNP, avec la possibilité de détecter entre 2 et 5 nM d'oligonucléotides cibles. Cependant, les réponses sont encore loin de ce qu'on observe avec le marquage par fluorescence avec une détection à 10 pM. Pour palier ce problème, un exemple récent dans la littérature a montré que l'utilisation de sondes nucléotidiques hairpin était beaucoup plus efficace que des sondes linéaires [112] avec une détection d'oligonucléotides cibles à 0,5 fM en SPR. Cette stratégie pourrait être combinée avec l'utilisation de surfaces sur lesquelles ont été greffées des GNP.

Chapitre III.1 Recherche de ligands spécifiques des G-quadruplex

I. Contexte

Une des caractéristiques principales des cellules cancéreuses est leur grande facilité à proliférer et à se répandre dans l'organisme. Cette prolifération est notamment liée à la capacité qu'elles ont à limiter le raccourcissement des télomères. Les télomères sont des séquences répétées (TTAGGG)_n présentes à l'extrémité des chromosomes et qui sont impliquées dans le vieillissement cellulaire. Dans le cas des cellules somatiques humaines, à chaque division cellulaire une petite partie des télomères n'est pas répliquée. Cette perte de matériel génétique n'a dans un premier temps aucune conséquence car les télomères ne sont pas codants et jouent seulement un rôle de protection. Cependant, au bout d'un certain nombre de divisions cellulaires, les extrémités télomériques disparaissent et le maintien du matériel génétique n'est plus assuré, conduisant ainsi à la mort de la cellule. En revanche, chez les cellules cancéreuses, une enzyme polymérase appelée télomérase est capable de synthétiser les extrémités télomériques manquantes [113,114]. La télomérase est ainsi surexprimée dans plus de 85% des cancers et son rôle est significatif dans l'immortalisation des cellules cancéreuses et dans le développement des tumeurs [115].

Un des objectifs dans la recherche de nouvelles thérapies contre le cancer, serait de trouver un moyen de limiter l'action de la télomérase. Pour cela, une des voies envisagées est de favoriser le maintien des structures en G-quadruplex des extrémités télomériques. Les G-quadruplex sont des structures très particulières à quatre brins que peuvent adopter les acides nucléiques riches en guanine tels que les télomères [116,117]. Dans ces structures, les guanines ont ainsi la possibilité d'interagir entre elles par liaisons hydrogènes pour former des plateaux appelés G-tétrade ou G-quartet. L'ensemble d'un G-quadruplex est maintenu par interaction de stacking entre trois Q-quartet et par la présence facultative d'un noyau métallique central (figure 48).

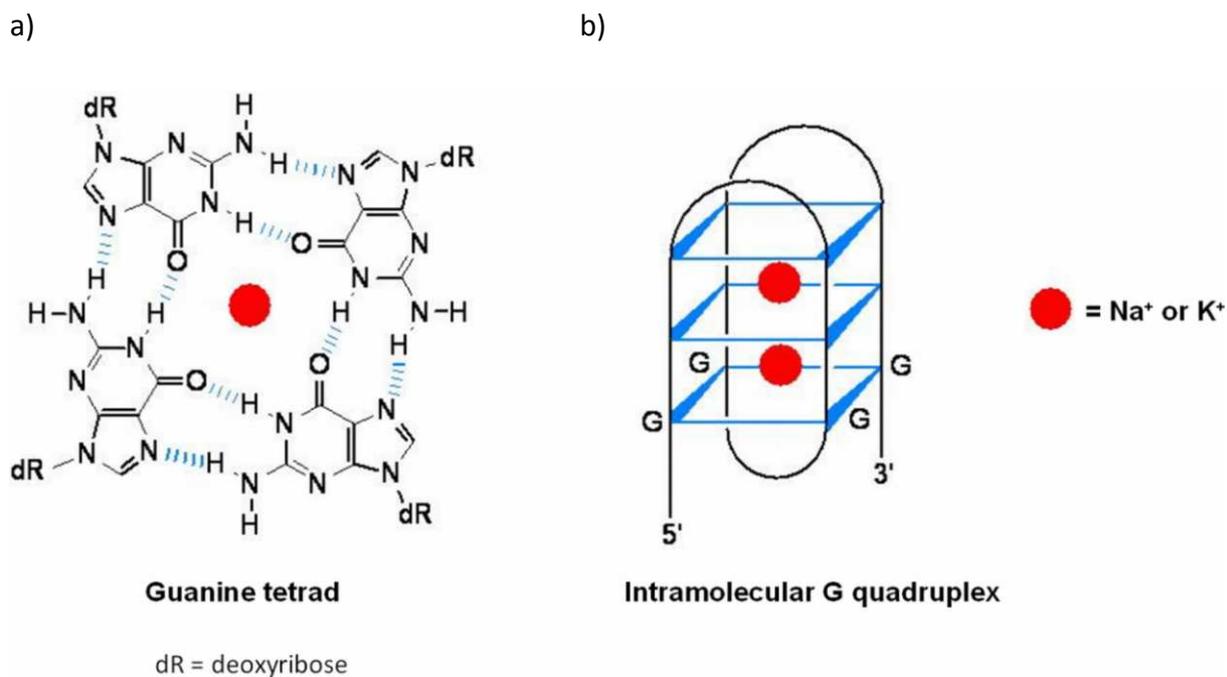


Figure 48. Exemple de structure quadruplex.

a) Formation d'un G-quartet par interaction entre guanines. b) Représentation schématique d'un G-Quadruplex dont la structure est maintenue, l'empilement des trois G-quartet et la présence d'ions Na⁺ ou K⁺.

L'activité de la télomérase n'est possible que si l'ADN télomérique est sous forme simple brin. Ainsi, en présence de structures G-quadruplex, la télomérase s'avère incapable de reconnaître les télomères [118]. La stabilisation des quadruplex est donc un objectif majeur et la recherche de molécules pour stabiliser ces structures est très prometteuse dans la conception de nouveaux traitements anticancéreux [119,120].

Dans le cadre de cette étude, nous avons travaillé en étroite collaboration avec l'équipe de Geneviève Pratviel intitulée «Métaux en Biologie et Chimie Médicinale» au Laboratoire de Chimie de Coordination (LCC) à Toulouse. Le travail présenté ci-après comporte deux objectifs. D'une part, nous avons analysé la spécificité d'interaction et les affinités de différentes molécules cibles candidates avec les ADN de structure G-quadruplex. D'autre part, nous avons cherché à déterminer s'il était possible en SPRI et avec notre chimie de greffage, de suivre des interactions avec de petites molécules (inférieures à 1 KDa).

Pour ces expériences, cinq sondes nucléotidiques ont été déposées sur prismes, elles sont modifiées en 5' avec un -SH et 10 bases thymine jouent le rôle d'espaceur (Tableau 3). Deux sondes quadruplex (Qx et QxMod) sont issues de séquences télomériques humaines

qui contiennent chacune quatre répétitions TTAGGG. L'oligonucléotide Qx correspond à une séquence nucléotidique sauvage où plusieurs formes de quadruplex sont possibles [121]. En revanche, QxMod se replie seulement sous une forme quadruplex comme l'ont démontré des expériences de RMN [122]. Des séquences doubles brins nommées ici dbGC et dbAT sont respectivement riches en GC ou en TA. Une séquence aléatoire simple brin est nommée ici « sb ».

Qx	5 ' TTTT TTTT TTTT TAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3 '
QxMod	5 ' TTTT TTTT TTTT TGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGA 3 '
dbAT	5 ' TTTT TTTT TTTT TCGCGCGCGGTTTTCGCGCGCG 3 '
dbGC	5 ' TTTT TTTT TTTT TCGAATTCGTCTCCGAATTCG 3 '
sb	5 ' TTTT TTTT TTTT TGGCATAGTGCCTGGGCGTTAGC 3 '

Tableau 3. Séquences sondes utilisées

Les sondes sont modifiées en 5' par un groupement SH et déposées sur la surface par simple contact.

Nous avons travaillé avec un grand nombre de molécules cibles susceptibles de par leur structure aromatique de réagir avec les G-quadruplex. Tout d'abord, nous avons testé des porphyrines avec différents noyaux métalliques et porteuses de différentes ramifications, des bras courts (Mn-TMPyP, Ni-TMPyP, Co-TMPyP, Au-TMPyP et H2-TMPyP), des bras dits moyens (Mn-BM et Au-BM) et des bras long (Mn-LB, Ni-LB et Co-LB). Ensuite, nous avons étudié d'autres molécules telles qu'un complexe platine et terpyridine (Pt-ctPy), un composé phenanthroline (PhenDC3), une quinacridine (MMQ12) et un dérivé dicarboxamide 2,6-pyridine (360D) fournis par MP Teulade Fichou de l'institut Curie à Orsay.

Parmi toutes les molécules testées, un certain nombre n'ont pas donné de résultats exploitables et reproductibles. Nous avons ainsi observé des interactions non spécifiques sur la surface et des constantes d'affinité très différentes d'une expérience sur l'autre. Seules sont présentées ici les molécules cibles qui ont donné des résultats exploitables et reproductibles en SPRi. Il s'agit de la porphyrine Mn-TMPyP, de Pt-ctPy, de PhenDC3 et de la molécule 360D, les masses moléculaires des composés (sans leurs contres-ions) sont respectivement de 731,75 ; 689,54 ; 550,61 et 449,50 Da (Figure 49).

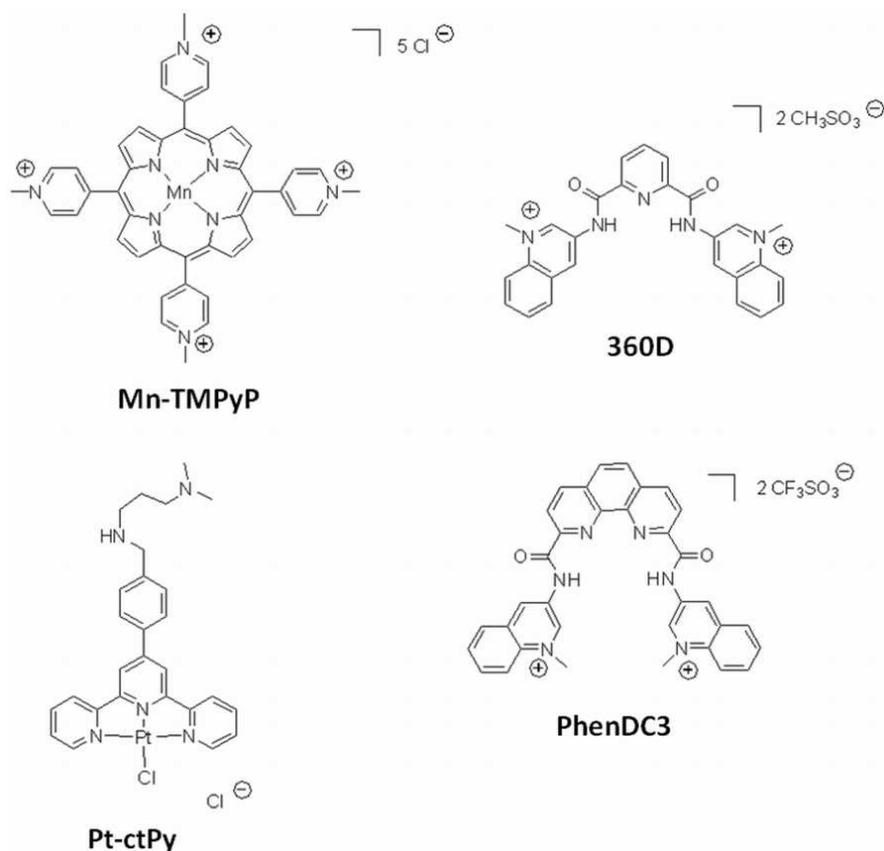
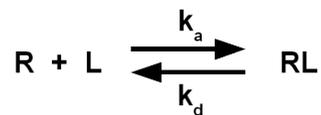


Figure 49. Structure chimique des composés Mn-TMPyP, 360D, Pt-ctPy et PhenDC3.

On trouve un certain nombre d'exemples d'interactions entre ces molécules et l'ADN dans la littérature. On sait que Pt-ctPy n'est pas spécifique des quadruplex et s'intercale majoritairement entre les paires de base [123]. En revanche les molécules 360D et PhenDC3 interagissent spécifiquement sur les quadruplex [124,125]. Mn-TMPyP a une bonne affinité pour les quadruplex [126] mais également pour les séquences double brin riches en AT [127]. Ces données sont issues principalement d'expériences de FRET. La nouveauté dans le travail effectué ici a été d'étudier simultanément en SPi, l'interaction de chaque cible avec différentes structures d'acides nucléiques et y compris avec l'ADN simple brin dont l'affinité n'a pas encore été caractérisée pour certains de ces dérivés.

II. Méthode de calcul des constantes d'affinité

Avant de calculer les constantes d'affinité, il est nécessaire de définir le modèle d'interaction. Nous partons d'un modèle simple qui suppose qu'une petite molécule diffusible (ici la cible ou le ligand [L]) interagit réversiblement avec un récepteur (ici la sonde [R]) selon l'équation suivante :



Les constantes k_a et k_d sont respectivement exprimées en $M^{-1}s^{-1}$ et en s^{-1} . À l'équilibre, nous avons la relation suivante :

$$\frac{[R_{eq}][L_{eq}]}{[RL_{eq}]} = \frac{k_d}{k_a} = K_D = \frac{1}{K_A}$$

Cette relation permet d'obtenir la constante d'association K_A (en M^{-1}) et de dissociation K_D (en M). Pour cela, il est nécessaire de se placer à l'équilibre et de suivre si possible les interactions à plusieurs concentrations en ligand (cible). Les équations utilisées avec le logiciel ScrubberGen permettent d'obtenir expérimentalement les valeurs de k_a et k_d (et donc K_A et K_D) à partir des variations de réflectivité observées :

$$1) \Delta Rf(t) = \Delta Rf_0 \cdot e^{-k_d \cdot t}$$

$$2) \Delta Rf(t) = \Delta Rf_{eq} \cdot (1 - e^{-(k_a \cdot [L] + k_d) \cdot t})$$

Le k_d est calculé lors de la phase de dissociation, c'est-à-dire au moment du rinçage qui suit la fin de l'injection de cibles. Dans l'équation 1, $\Delta Rf(t)$ représente la variation de réflectivité en fonction du temps, ΔRf_0 est la variation de réflectivité au début du rinçage, t est le temps exprimé en secondes. Le k_a est en revanche déterminé au cours de la phase d'association (injection). ΔRf_{eq} est la variation de réflectivité à l'équilibre et $[L]$ correspond à la concentration en cible injectée (M). Afin d'obtenir un résultat fiable, trois paramètres primordiaux sont à respecter. Tout d'abord, il est nécessaire d'être le plus proche possible de l'équilibre au cours de l'injection. Ensuite, il faut se placer à une concentration en cible, ni trop faible car trop proche du bruit de fond et ni trop élevée car le risque d'interactions non spécifiques s'accroît. Enfin, la validité des constantes cinétiques calculées dépend de la

qualité de l'ajustement des courbes théoriques sur les courbes expérimentales. La justesse de cet alignement est classiquement déterminée par le coefficient de détermination (R^2). D'une valeur comprise entre 0 et 1, une courbe est d'autant plus ajustée que le R^2 est proche de 1. De manière générale, un ajustement ou un «fitting» en anglais, est considéré comme fiable si le R^2 est au dessus de 0,9. Avec le logiciel Scrubber, un autre paramètre est utilisé : il s'agit du *Res sd* qui est l'écart quadratique moyen entre la courbe théorique et la courbe expérimentale (la moyenne de la somme des différences au carré entre les points des courbes théoriques et expérimentales). Le *Res sd* doit être le plus proche possible de 0 et nous sommes partis du principe que pour qu'un fit soit satisfaisant, il faut un *Res sd* inférieur à 10% du R_{max} (valeur maximale atteinte par la courbe). Les calculs d'affinité présentés ci-après ont tous rempli cette condition.

III. Formation des G-quadruplex

Avant d'effectuer des études comparatives de liaisons entre les petites molécules cibles et les différentes structures nucléotidiques, il a été nécessaire de déterminer si le repliement des G-quadruplex sur la surface du prisme était correct. Cependant, la SPRI ne permet pas de visualiser la structure d'un composé et elle quantifie seulement la variation de masse sur la surface au cours d'une interaction. On sait en revanche que les structures quadruplex sont connues pour être stabilisées par les ions K^+ et/ou Na^+ [128] qui contrairement aux ions Li^+ ne stabilisent pas la structure quadruplex [129]. L'idée a donc été de mesurer les interactions de la porphyrine Mn-TMPyP avec un ADN quadruplex (Qx) et un ADN double brin (dbGC), en présence de 200 mM de KCl ou de 200 mM de LiCl dans le tampon réactionnel. Mn-TMPyP ayant une affinité supérieure sur les quadruplex, elle devrait donc interagir majoritairement sur le quadruplex en présence de K^+ et indifféremment sur Qx et dbGC en présence de Li^+ . Les résultats sont présentés figure 50.

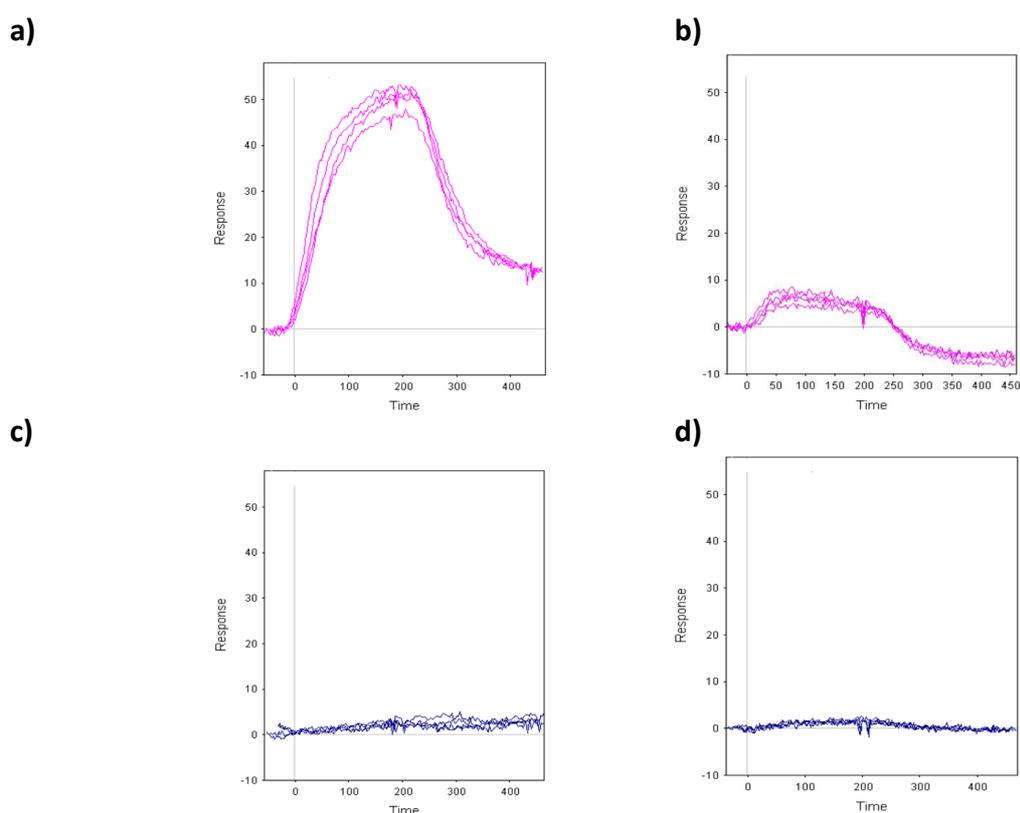


Figure 50. Courbes d'interaction obtenue en SPRI.

Les courbes ont été obtenues à partir du logiciel ScrubberGen. Les sondes sont déposées à 25 μ M. Pour chaque sonde, quatre spots sont déposés et quatre courbes sont observées. Les réponses sont exprimées en variations de réflectivité multipliées par 100. Les injections sont effectuées avec 200 nM de Mn-TMPyP. Les conditions sont les suivantes : a) Qx avec 200 mM de KCl b) Qx avec 200 mM de LiCl c) dbGC avec 200 mM de KCl d) dbGC avec 200 mM de LiCl.

Nous sommes partis du principe que la cinétique d'interaction ne pouvait pas être calculée en dessous de 0,15% de réflectivité (trois fois le seuil de détection). Avec l'ADN double brin, la composition en K^+ ou Li^+ n'a pas changé le profil des interactions, et pratiquement aucune variation de réflectivité n'a été observée. En revanche, seule la présence de K^+ , a permis de mesurer une interaction significative entre le quadruplex (Qx) et Mn-TMPyP. De ces observations, nous avons déduit qu'en présence de K^+ , le quadruplex était formé et a interagi préférentiellement avec Mn-TMPyP. Les expériences suivantes ont donc été effectuées en présence de KCl à 200 mM.

IV. Identification des cibles G-quadruplex

Après avoir confirmé que le repliement de l'ADN sous sa forme quadruplex était effectif au cours d'une expérience SPRI, nous avons quantifié les interactions entre cibles candidates et différentes structures d'acides nucléiques.

Les affinités de Mn-TMPyP, 360D, Pt-ctPy et PhenDC3 avec les différentes structures d'acides nucléiques sont récapitulées (tableau 4) et certains exemples d'interaction avec Mn-TMPyP et 360D sont présentés figure 51.

	Mn-TMPyP	360D	Pt-ctPy	PhenDC3
Qx	$2 \cdot 10^6$	$9 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$
QxMod	$9 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$
dbGC	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^4$
dbAT	$8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^3$
sb	$1 \cdot 10^4$	$7 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^5$	$6 \cdot 10^5$

Tableau 4. Récapitulatif des constantes d'affinité (M^{-1}) observées au cours des expériences SPRI. Mn-TMPyP a été injecté à trois concentrations, 125nM, 250 nM et 500nM ; 360D et PhenDC3 à 1 et 2 μ M ; Pt-ctPy à 2 et 5 μ M.

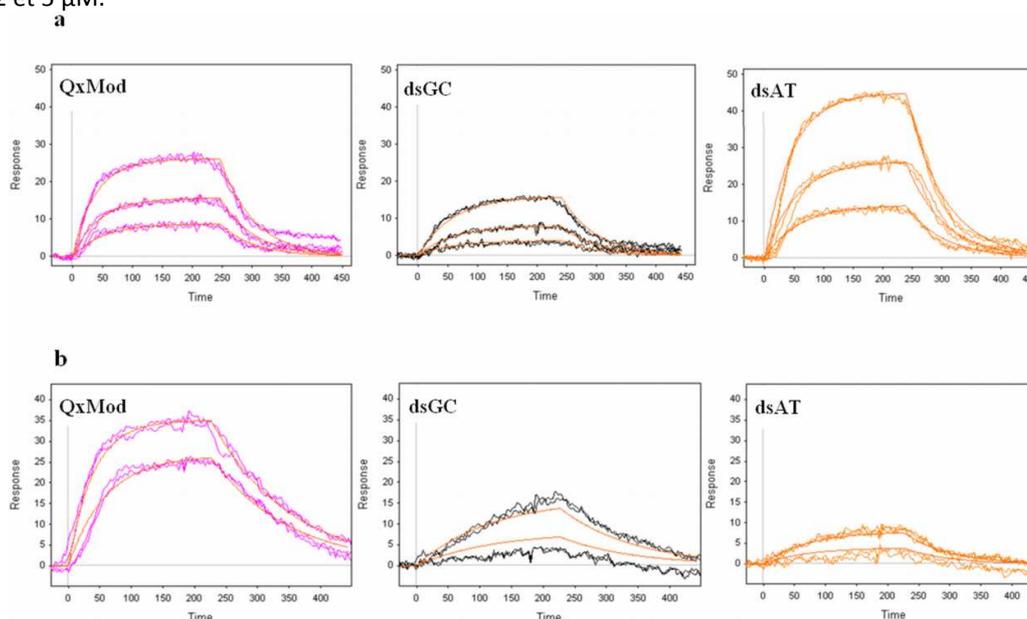


Figure 51. Exemples d'interactions observées en SPRI avec Mn-TMPyP (a) et 360D (b).

Comme l'attestent les valeurs présentées dans le tableau 4, Mn-TMPyP a une affinité similaire avec les quadruplex ($K_A \approx 10^6 \text{ M}^{-1}$) et la séquence double brin riche en AT ($K_A = 8.10^5 \text{ M}^{-1}$). Ces observations, sont en accord avec la littérature [126]. Cependant, nous avons observé figure 51a, de plus fortes interactions avec dbAT, alors que l'affinité est très légèrement inférieure. Cette différence a probablement été due au fait que Mn-TMPyP n'a pas interagi de la même manière avec les quadruplex et les doubles brins riches en AT. En effet, Mn-TMPyP a interagi probablement sur l'ADN quadruplex par stacking (interaction entre cycles aromatiques) et sur l'ADN double brins par interaction électrostatique dans le sillon mineur de l'ADN [127]. En revanche, l'affinité de Mn-TMPyP est très faible avec les doubles brins riches en GC ($K_A = 5.10^{-3} \text{ M}^{-1}$), l'encombrement stérique présent dans le petit sillon de l'ADN provoqué par le groupement amine (NH_2) des guanines en est probablement la cause [130]. Tous ces résultats sont en parfait accord avec la littérature. L'étude avec le simple brin a en revanche été une première et a démontré sa faible affinité avec Mn-TMPyP (1.10^4 M^{-1}).

La molécule 360D (450 Da) est celle qui a le plus faible poids moléculaire. Les résultats présentés table 4 ont confirmé la haute affinité des ADN quadruplex avec une constante d'association K_A d'environ 10^6 M^{-1} alors qu'elles sont seulement de 2.10^3 M^{-1} et 7.10^3 M^{-1} pour les doubles brins et simple brin respectivement. Ces résultats sont confirmés pour les G-quadruplex et les doubles brins [124,131]. La faible affinité de 360D pour le simple brin est observée et renforce le potentiel de cette molécule comme ligand spécifique des G-quadruplex.

Les expériences SPRI ont montré que Pt-ctPy avait une bonne affinité sur l'ADN quelque soit sa structure (tableau 4), avec des constantes d'affinité de l'ordre de 6 à 7.10^5 M^{-1} . Ces résultats sont en accord avec la littérature et montrent que Pt-ctPy n'a aucune spécificité pour les ADN G-quadruplex [132].

Enfin, la molécule PhenDC3 a interagi fortement avec l'ADN G-quadruplex et peu avec les séquences doubles brins (table 1). Les constantes d'associations sont comprises entre 6.10^5 et 1.10^6 M^{-1} pour les quadruplex Qx et QxMod respectivement. Il est intéressant de constater également que l'affinité de PhenDC3 a également été très forte avec l'ADN simple brin avec un K_A de 6.10^5 M^{-1} . L'affinité de PhenDC3 sur les ADN G-Quadruplex et

doubles brins a été confirmée [125]. Cependant, il n'existe aucune autre étude d'affinité du simple brin avec PhenDC3.

V. Conclusion

La détection de petites molécules est un défi majeur en SPR, où la variation de masse sur la surface est proportionnelle au signal détecté. On trouve cependant un certain nombre d'exemples d'interactions de petites molécules en Biacore, que ce soit entre quadruplex et porphyrines [133,134] mais également avec d'autres molécules telle que la sulpiride (341 Da) et la méthylsulfonamide (95 Da), [135,136]. La nouveauté ici a été d'utiliser la SPRi pour combiner le multiplexage et le suivi d'interactions avec des molécules cibles inférieures à 1 KDa telle que le ligand 360D (449,5 Da).

Par ailleurs, nous avons comparé nos résultats en SPRi, avec ceux obtenus par FRET dans la littérature, comme par exemple avec les travaux de De Cian [132] sur Pt-ctPy, PhenDC3 et 360D (figure 52). Nous avons ainsi déterminé les constantes d'affinité des autres ligands des ADN G-quadruplex qui n'avaient été jusqu'alors que calculées avec Mn-TMPyP [126].

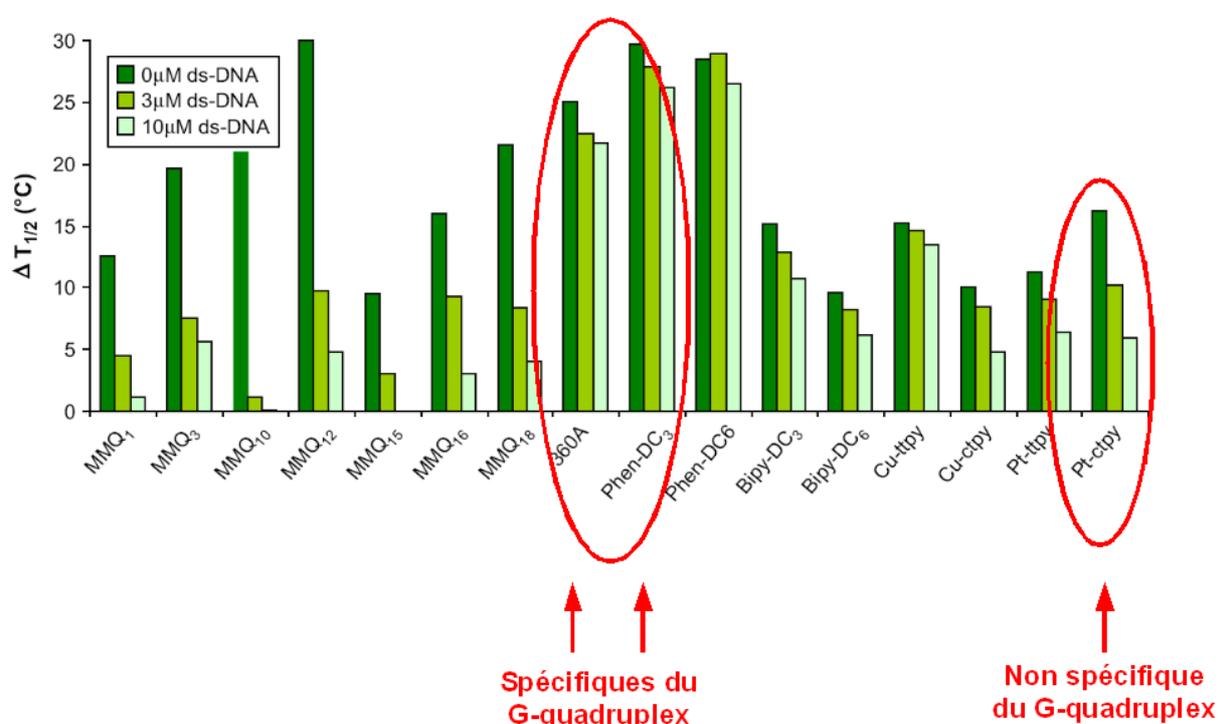


Figure 52. Représentation sous forme de diagramme des résultats obtenus de FRET avec les molécules 360A, Phen-DC3 et Pt-ctPy [132].

La molécule 360A diffère seulement de 360D par le contre ion utilisé. La stabilité de la structure quadruplex est ici évaluée par FRET en présence de compétiteur double brin. Les molécules 360A et Phen-DC3 interagissent spécifiquement avec le quadruplex et le stabilisent. En revanche, l'ajout d'ADN double brin entraîne un décrochage de Pt-ctPy et une diminution de sa stabilité du G-Quadruplex.

Le FRET (voir introduction du manuscrit) est basé sur le transfert de fluorescence entre deux fluorophores (un donneur et un accepteur), lorsqu'ils se trouvent à une distance inférieure à 10 nm. Cette distance n'est ici possible que si les ADN quadruplex (modifiés aux extrémités 5' et 3' par les fluorophores) sont sous forme repliée. Au contraire, si les quadruplex sont dénaturés, les deux fluorophores sont plus éloignés et le FRET est impossible. La stabilisation des quadruplex par les ligands (cibles) a été évaluée en fonction de la température et de la concentration en compétiteurs doubles brins. Les ligands Phen-DC3 et 360D ont interagi préférentiellement avec les quadruplex, donc ceux-ci sont stabilisés et la température nécessaire à leur dénaturation est supérieure. Lorsque le ligand interagit également avec le double brin (Pt-ctPy), le quadruplex est moins stabilisé et la température de dénaturation est inférieure. Ces observations sont parfaitement en accord avec ce que nous avons observé en SPRI.

En conclusion, Pt-ctPy interagit indifféremment sur l'ADN quelque soit les séquences testées et les ligands Mn-TMPyP, 360D et PhenDC3 ont une forte affinité pour les ADN G-quadruplex (10^6 M^{-1}). Cependant, Mn-TMPyP interagit également avec les séquences double brin riches en AT et PhenDC3 avec les séquences simple brin. De ce fait, la molécule 360D est la seule à interagir exclusivement sur les G-quadruplex. Elle est donc une molécule candidate satisfaisante pour stabiliser les quadruplex et pour empêcher théoriquement l'action de la télomérase. Enfin, concernant à plus long terme l'utilisation de ligands spécifiques des G-quadruplex à visée anticancéreuse, il faut considérer qu'il existe également d'autres acides nucléiques pouvant se structurer comme les télomères en G-quadruplex, comme dans certaines régions promotrices [137]. Les ligands utilisés devront donc être spécifiques des G-Quadruplex des télomères. L'ensemble de ces travaux a donné lieu à une publication soumise.

Chapitre III.2 Étude d'un complexe de partition bactérien

I. Contexte

Chez les bactéries pathogènes, la virulence se définit par leur propension à se multiplier et à agir de façon nocive sur un organisme. La prolifération cellulaire est d'une importance primordiale dans la virulence et dépend d'une série de processus essentiels tels que l'expression du génome, la réplication, la recombinaison et la partition [138,139]. La plupart de ces mécanismes sont relativement bien connus. En revanche, les mécanismes de partition des génomes (appelés aussi ségrégation) sont encore mal compris chez les bactéries, même pour les systèmes plasmidiques les plus étudiés tels que le plasmide F d'*E.coli*. L'absence de compartimentation cellulaire complique en effet la visualisation directe des évènements de ségrégation. Ce qui n'est pas le cas des cellules eucaryotes où la partition du génome est observée depuis plus d'un siècle par microscopie optique et dont les étapes du processus sont maintenant bien caractérisées [140].

La partition consiste à transmettre au cours d'une division cellulaire, l'intégralité du génome aux cellules filles. Ce phénomène primordial est également impliqué dans la réplication, l'organisation et la compaction de l'ADN [141,142]. La compréhension en détail des mécanismes moléculaires impliqués, pourrait ainsi ouvrir la voie à la recherche de nouvelles classes d'antibiotiques agissant spécifiquement au niveau du cycle cellulaire.

Au cours des dernières décennies, l'étude de la partition chez les bactéries a été envisagée. En 1983, un locus impliqué dans la ségrégation du plasmide F chez *E.coli* a été découvert pour la première fois [143]. Ce locus nommé de façon générique *parABS* est composé de deux gènes *parA* et *parB* et d'une séquence centromérique *parS*. Le gène *parA* code pour une ATPase et *parB* pour une protéine de reconnaissance à l'ADN centromérique *parS* [144]. Ces trois éléments sont nécessaires à la partition du plasmide et assurent un nombre constant de réplicons au cours des générations successives. Des gènes homologues à *parABS* ont depuis été identifiés sur des bactéries à Gram positif et à Gram négatif [145] et des homologues sont présents chez la grande majorité des chromosomes bactériens [146].

En étroite collaboration avec Jean-Yves Bouet du Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM), nous nous sommes intéressés au complexe de partition *parABS* (historiquement appelés *sopABC* pour *Stability Of Plasmid*) impliqué dans la partition du plasmide F chez *E. coli*. Dans ce système, la protéine SopA est une ATPase impliquée dans le déplacement du plasmide. La protéine dimérique SopB a une position centrale car elle est reconnue par SopA et elle se fixe spécifiquement sur la séquence centromérique *sopC* du plasmide. On sait également que les activités de SopA, sont fortement stimulées en présence de SopB et *sopC* [147]. L'interaction entre SopB et *sopC* est ainsi primordiale dans le processus de partition, formant un complexe nucléoprotéique, appelé complexe de partition, qui est l'équivalent fonctionnel du kinétochore chez les cellules eucaryotes. Le centromère *sopC* est composé de 12 répétitions de 43 paires de bases contenant chacune une séquence répétée inversée de 16 paires de bases (figure 53).

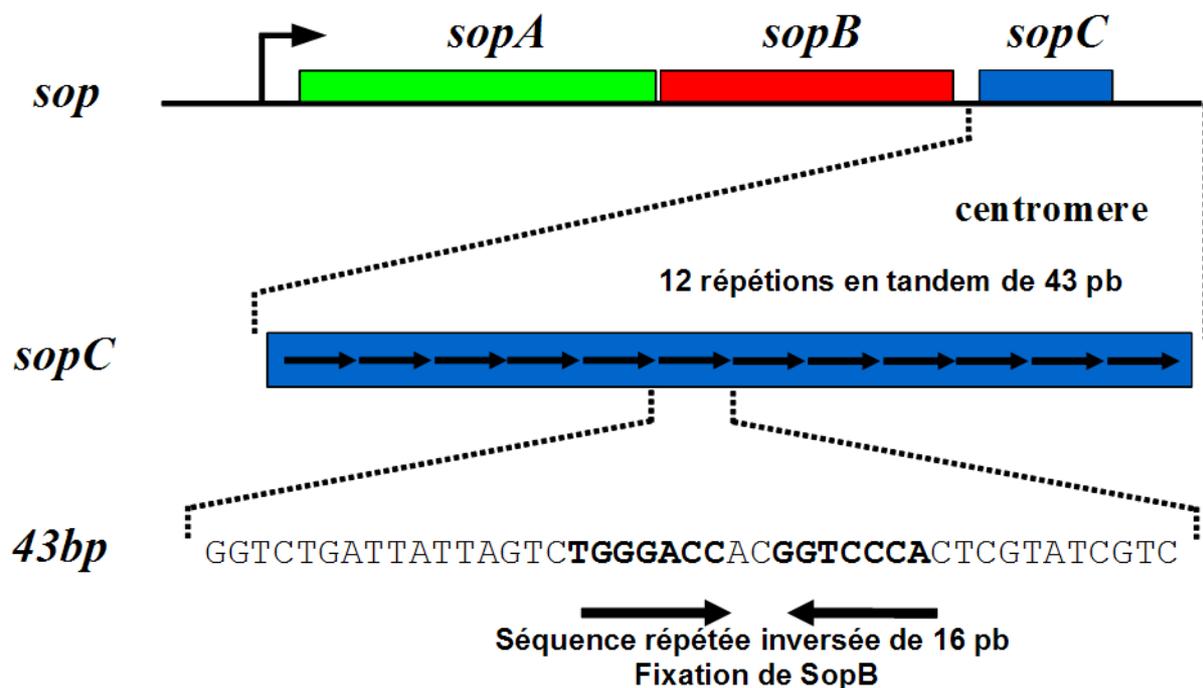


Figure 53. Représentation schématique du locus *sopABC* du plasmide F d' *E. coli*.

Le locus *sopABC* code pour deux protéines, l'ATPase SopA et la protéine SopB. La séquence centromérique *sopC* n'est pas codante et elle est composée de 12 répétitions de séquences en tandem de 43 pb. Chacune de ces répétitions est potentiellement reconnue par *sopB* et comporte une séquence inversée de 16 pb.

II. Validation de l'étude d'interaction SopB/*sopC* en SPRI

La stratégie suivie a été d'étudier l'interaction entre la protéine SopB et une séquence consensus de *sopC* décrite pour la première fois en 1985 [150]. Cette séquence consensus est reconnue sous forme double brin par SopB. Le premier objectif a donc été de voir si la structure double brin portant la séquence consensus pouvait être obtenue à partir d'un oligonucléotide simple brin, sonde C2, qui pourrait se replier sur lui-même grâce à une séquence complémentaire séparée par une boucle de 5 T (figure 55).

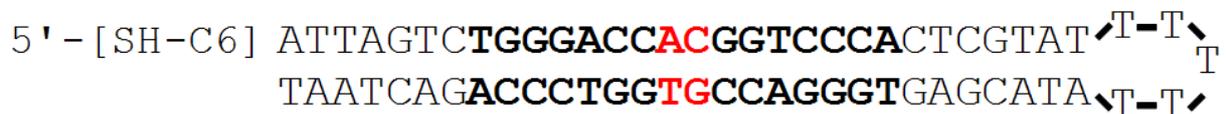


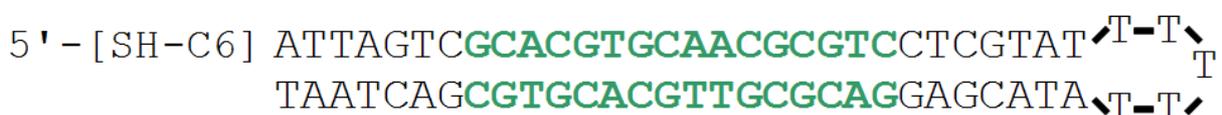
Figure 55. Repliement sous forme double brin de la sonde nucléotidique C2.

La séquence double brin obtenue est de 30 paires de base. La séquence où se fixe la protéine SopB est de 16 pb (en gras). Les autres bases sont dites accessoires. Les deux paires de bases en rouges sont ce que l'on appelle l'AC central.

Nous avons déposé sur le même prisme doré la sonde C2 (double brin), une sonde C2a sous forme simple brin avec la séquence consensus :



et une sonde, C1, utilisée comme témoin négatif, de séquence aléatoire mais de composition nucléotidique identique à C2 :



Les oligonucléotides déposés sont modifiés en 5' par une fonction thiol (voir chapitre 1).

Des interactions sont ensuite observées après injections de différentes concentrations en protéines SopB purifiées (figure 56).

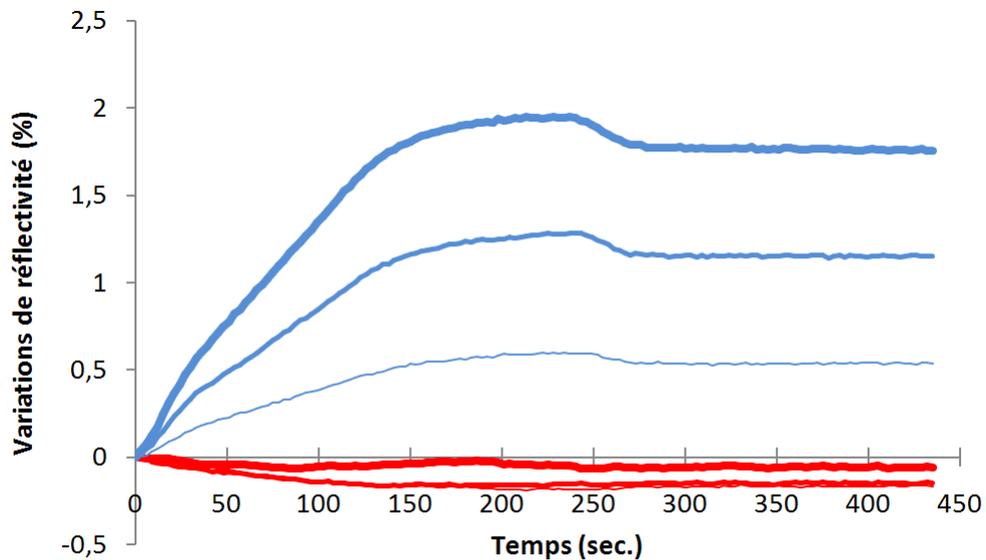


Figure 56. Interaction de SopB purifiée avec la séquence centromérique sopC.

Les mesures SPRi sont effectuées après injection d'une solution de protéine SopB purifiée. Les courbes sont obtenues après soustraction de la réponse obtenue avec C1. SopB est injectée à différentes concentrations (— 50 nM, — 100 nM, — 150 nM). Les interactions avec l'ADN double brin C2 (en bleu) et l'ADN simple brin C2a (en rouge) sont suivies au cours du temps.

Les résultats observés ont montré clairement des interactions significatives entre la protéine SopB (70 KDa sous forme dimérique) et la séquence centromérique C2 sous forme double brin. L'absence de réponse avec la séquence C2a simple brin montre que C2 a été bien repliée sous forme double brin au cours de l'expérience. L'allure des courbes réponses n'a pas montré de diminution conséquente à la fin de l'injection (240 secondes), ce qui indique qu'il n'y a pas eu de dissociation visible entre la protéine SopB et l'ADN centromérique C2. Cette interaction très forte a empêché de calculer des constantes d'affinité et seule l'injection de soude à 0,1M a permis une dissociation forcée (non montré). Ce résultat préliminaire a démontré que la SPRi était tout à fait compatible pour suivre en direct des interactions ADN/protéines de manière spécifique.

On peut remarquer en comparaison avec la SPR sans imagerie (Biacore), que l'interaction entre la séquence consensus C2 et la protéine SopB purifiée s'observe à partir

de 2,5 nM [151]. Dans notre cas, nous avons choisi de suivre les interactions entre 50 et 150 nM de SopB mais nous avons cependant obtenu un signal faible à 10nM (non montré). La détection est dans ce cas moins bonne qu'avec une configuration en canaux comme sur le système Biacore.

L'objectif a ensuite été de déterminer si à la place d'injecter des protéines purifiées, il était possible de suivre les interactions avec des extraits bruts bactériens où SopB était surexprimée. Les résultats sont présentés figure 57. Ne connaissant pas la concentration en SopB dans les extraits bruts, nous avons réalisé une gamme de dilution et choisi la dilution adéquate pour comparer les résultats comparés à ceux des extraits purifiés.

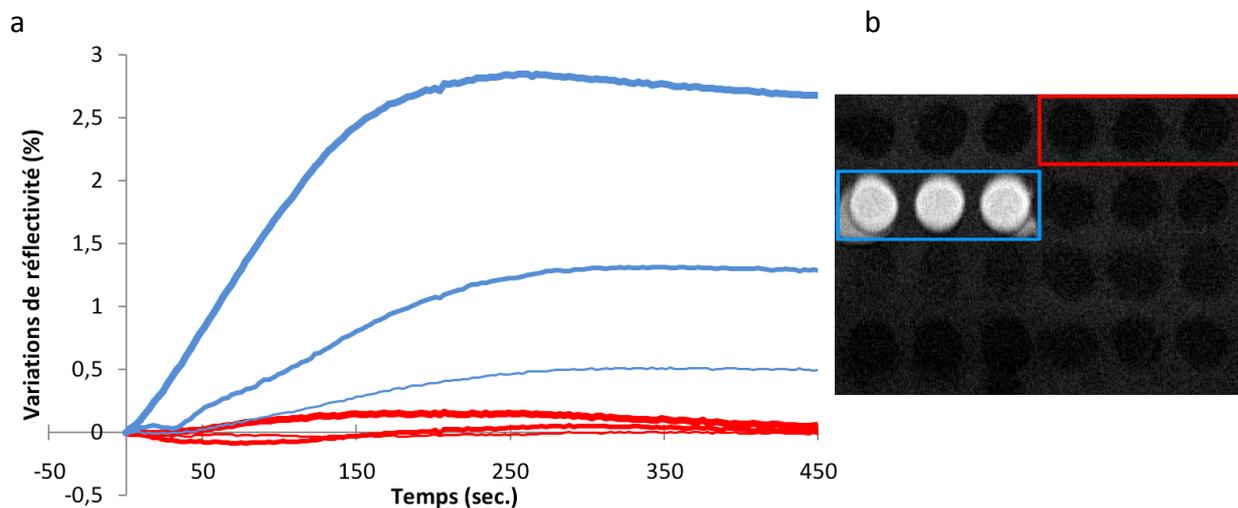


Figure 57. Interaction de SopB non purifiée avec la séquence centromérique sopC.

(a) Les mesures SPRi sont effectuées après injection de protéine SopB non purifiée. Les courbes sont obtenues après soustraction de la réponse obtenue avec C1. SopB est injectée à différentes dilutions d'extraits bruts (..... 0,02%, ———= 0,05%, ————— = 0,1%) et interagit avec l'ADN double brin C2 (en bleu) et l'ADN simple brin C2a (en rouge).

(b) L'image différentielle en SPRi est obtenue après injection d'extraits bruts dilués au 1/1000^{ème} (0,1%). Le rectangle bleu indique la réponse visualisée avec C2 et le rectangle rouge celle avec C2a.

Des variations de réflectivité significatives sont observées avec la séquence centromérique C2, alors qu'aucune interaction n'est visible avec la sonde simple brin C2a. L'image différentielle confirme parfaitement l'interaction spécifique de SopB sur C2. Ces résultats sont similaires à ceux observés avec les injections de SopB purifiée et indiquent que les interactions en SPRi sont très spécifiques pour étudier seulement SopB parmi toutes les protéines présentes dans les extraits cellulaires. La purification n'est donc pas indispensable. L'approche SPRi est donc validée et une étude plus poussée a pu être mise en place. Au

cours des expériences suivantes, nous effectuerons tout de même en parallèle les interactions avec les extraits bruts et les protéines purifiées. Nous avons également vérifié que la protéine SopB mutée (SopB-K191A-R195A ; [151]) sur son site de reconnaissance à *SopC* était incapable d'interagir avec la séquence C2 (résultats non montrés).

III. Étude de l'interaction SopB/*sopC*.

Le but de cette étude a été de déterminer quel était le motif nucléotidique idéal impliqué dans l'interaction SopB/*sopC*. Nous avons ainsi testé 45 séquences nucléotidiques de *sopC* porteuses de différentes variations par rapport à la séquence consensus C2. Par souci de lisibilité, nous ne présenterons que la partie consensus des sondes sous forme simple brin (les sondes ont toutes la structure décrite Fig. 55). Par ailleurs, les expériences se sont déroulées en dessous de la concentration saturante en cibles, nous avons déterminé celle-ci à 500 nM pour SopB purifié et à 1% en extraits bruts (non montré).

III.1 Site de fixation de SopB.

La séquence centrale de 16 paires de bases est essentielle pour lier la protéine dimérique SopB [152,153]. Cependant, aucune étude n'a jusqu'à présent démontré l'implication précise des séquences accessoires entourant la séquence centrale. Afin de caractériser l'ensemble des déterminants requis pour l'interaction SopB-*sopC*, des oligonucléotides sondes porteurs de différentes mutations sur la séquence centrale ou sur les séquences accessoires ont été déposés sur prisme. Les résultats d'interaction en SPRI sont montrés figure 58 (page suivante).

a

C2 : ATTAGTCTGGGACC**AC**GGTCCC**ACT**CGTAT
 C24: ATTAGTCTGGG**CCC**ACTGTTCCACTCGTAT
 C25: ATTAGTCTG**AGACT**ACGATTCCACTCGTAT
 C26: **TTCTCTCT**GGG**CCC**ACTGTTCCACT**T**GTAT
 C27: AT**CAGCGT**G**AGACT**ACGATTCCAT**CAATGC**
 C28: ATTA**ACTT**GGGACC**AC**GGTCCC**ACT**CGTAT
 C29: ATTA**ACTT**GGGACC**AC**GGTCCCAT**CT**GTAT

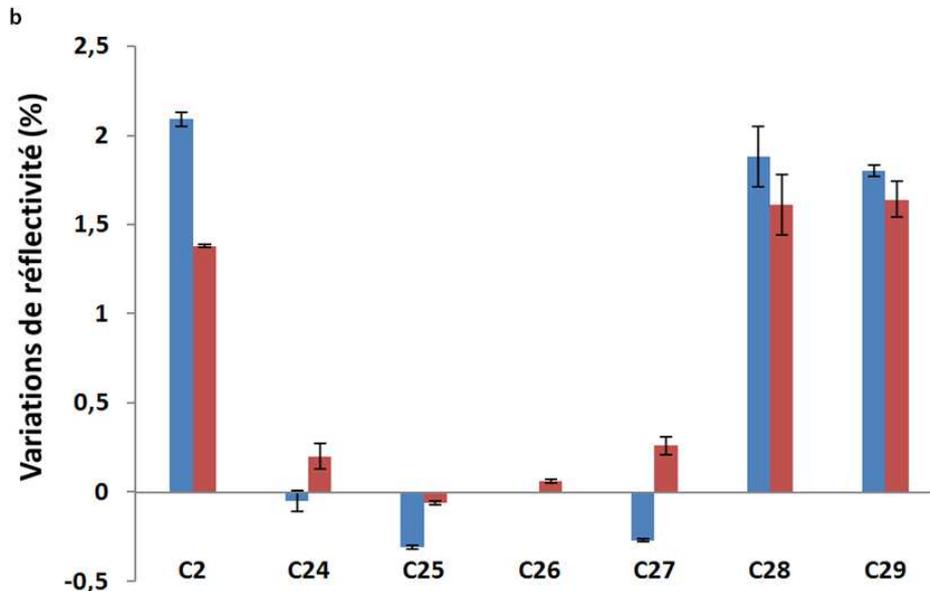


Figure 58. Détermination du site de fixation de SopB.

a) Séquences sondes utilisées. La séquence centrale est en gras. Les bases mutées par rapport à la séquence sauvage C2 sont représentées en vert. Les sondes C24 et C25 sont porteuses de mutations sur la séquence centrale. Les sondes C28 et C29 sont mutées seulement sur les séquences accessoires. Les sondes C26 et C27 sont mutées aux deux endroits.

b) Diagramme représentant les réponses SPRI après injection de SopB purifiée ou non. Les variations de réflectivité sont obtenues en fin d'injection de 250 nM de SopB purifiée (en bleu) et de 0,1% d'extraits cellulaires (en rouge).

Ces résultats ont montré que seule la partie centrale était impliquée dans la reconnaissance par SopB. En effet, si les séquences accessoires sont mutées (C28 et C29), les interactions sont entre 1,5 et 2% de réflectivité, ce qui est similaire à C2. Alors que des mutations dans la partie centrale des sondes (C24, C25, C26 et C27) ont induit une perte de la fixation de SopB. Toutes ces observations sont comparables, que l'on utilise des protéines SopB purifiées ou non. A la vue de ces résultats, seule la partie centrale de 16 paires de base a été étudiée plus en détail.

On remarque également que les séquences C24 et C25 sont celles naturellement présentes sur la première et la dernière répétition de *sopC* (figure 54). Cela révèle donc qu'*in vitro* ces séquences ne fixent pas SopB. De plus, si on remet ces séquences dans leur contexte naturel, sondes C26 et C27, avec des variations supplémentaires en dehors des 16 pb, on n'observe

pas non plus d'interaction. Ces données suggèrent donc que la première et la dernière répétition ne sont pas fonctionnelles *in vivo*.

III.2 Interactions de SopB sur la séquence centrale.

La séquence centrale consensus se compose d'un AC central et de deux séquences répétées inversées de 7 paires de bases. On sait également que la protéine SopB est sous forme dimérique et que chaque monomère interagit avec une séquence répétée inversée. L'intérêt ici a été de déterminer si SopB pouvait interagir avec une seule séquence répétée inversée, c'est-à-dire par un seul monomère. L'importance de l'AC central qui n'a encore jamais été caractérisée va également être évaluée (figure 59).

a

C2 : ATTAGTCTGGGACC**ACGGT**CCCACTCGTAT
 C3 : ATTAGTCTGGGACC**ATGGT**CCCACTCGTAT
 C4 : ATTAGTCTGGGACC**CAGGT**CCCACTCGTAT
 C5 : ATTAGTCTGGGACC**TAGGT**CCCACTCGTAT
 C6 : ATTAGTCTGGGACC**CGGGT**CCCACTCGTAT
 C7 : ATTAGTCTGGGACC**CGGT**CCCACTCGTAT
 C8 : ATTAGTCTGGGACC**TGGGT**CCCACTCGTAT
 C40 : ATTAGTCTGGGACC**ACACGGT**CCTCGTAT
 C41 : ATTAGTCTGGGACC**CAACGGT**CCTCGTAT

b

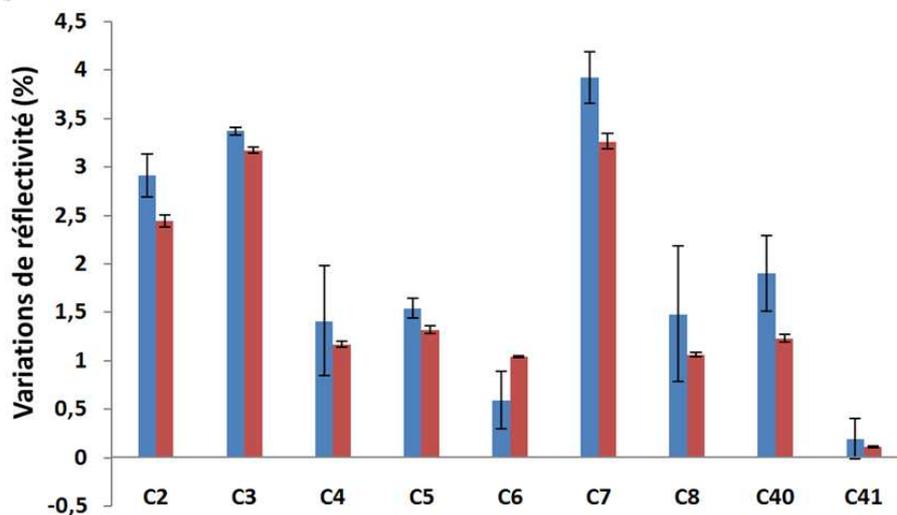


Figure 59. Interaction de SopB sur la partie centrale.

a) Séquences sondes utilisées. La séquence centrale est en gras. Les bases mutées par rapport à la séquence sauvage C2 sont représentées en vert. Les sondes C3 à C8 sont mutées seulement sur l'AC central. Une des deux séquences répétées inversées est mutée sur la sonde C40. La sonde C41 est mutée sur l'AC central et sur une séquence répétée inversée.

b) Diagramme représentant les réponses SPRI après injection de SopB purifiée ou non. Les variations de réflectivité sont obtenues en fin d'injection de 400 nM de SopB purifiée (en bleu) et de 0,5% d'extraits cellulaires (en rouge).

Au cours de l'expérience précédente (voir III.1), les mutations présentes sur les deux séquences inversées répétées de la partie centrale ont empêché la fixation de SopB. Ici, l'objectif a été de déterminer si une seule séquence répétée inversée consensus pouvait tout de même permettre la fixation de SopB. Cela a été effectivement le cas avec la sonde C40 qui n'est mutée que sur une seule séquence inversée répétée. Les variations de réflectivité observées sont de l'ordre de 1,5% avec C40 et de 2,5% avec la sonde C2. Cette différence peut s'expliquer par une moindre fixation de SopB ou alors par la fixation d'un seul monomère. Cette expérience a également consisté à étudier l'importance du AC central dans l'interaction et les séquences mutées C3 à C8 sont analysées. Les résultats sont très différents d'une séquence mutée à l'autre et dépendent du nombre de nucléotides mutés. En effet, avec C3 et C7 où des réponses similaires à C2 sont observées, une seule mutation est présente. En revanche, des variations de réflectivité deux à trois fois plus faibles avec les sondes C4, C5, C6 et C8 sont mesurées en présence de deux mutations. Enfin, si une sonde est mutée à la fois sur l'AT central et sur une séquence répétée inversée (sonde C41), l'interaction avec SopB est inexistante. Ceci confirme donc l'importance de l'AC central dans l'interaction. De plus, de façon très intéressante, la fixation n'est pas perdue quand on garde une séquence avec une Purine et une Pyrimidine.

En résumé nous avons montré que l'interaction avec SopB est possible avec une seule séquence répétée inversée et que l'AC central sans être indispensable est fortement impliqué dans l'interaction avec SopB.

III.3 Détermination des bases impliquées dans l'interaction

Cette expérience a permis d'identifier plus précisément les bases impliquées dans la fixation de SopB. Pour cela, plusieurs sondes sont testées. Elles comportent une ou plusieurs bases mutées sur la partie centrale de 16 paires de bases. Les résultats sont présentés figure 60.

a

Sonde utilisée	Séquence centrale
C2	TGGGACCACGGTCCCA
C10	TGGAACCACGGTCCCA
C10.5	TGGGACCACGGTTCCTCA
C11	TGGAACCACGGTTCCTCA
C12	TGGGACCACGATCCCA
C12.5	TGGGATCACGGTCCCA
C13	TGGGATCACGATCCCA
C14	TGGGACACGGTCCCA
C14.5	TGGGACCACGTCCCA
C15	TGGGACACTGTCCCA
C16	TGGGCCACGGTCCCA
C16.5	TGGGACCACGGGCCCA
C17	TGGGCCACGGGCCCA
C18	TGAGACCACGGTCCCA
C19	TGAGACCACGGTCTCA
C20	TAGGACCACGGTCCCA
C20.5	TGGGACCACGGTCCTA
C21	TAGGACCACGGTCCTA
C22	CGGGACCACGGTCCCA
C22.5	TGGGACCACGGTCCCG
C23	CGGGACCACGGTCCCG
C42	TGGGATAACGGTCCCA
C43	TAGGATAACGGTCCCA
C44	CGAACCCACGGTCCCA
C45	CGAACCCACGGGTTCG

b

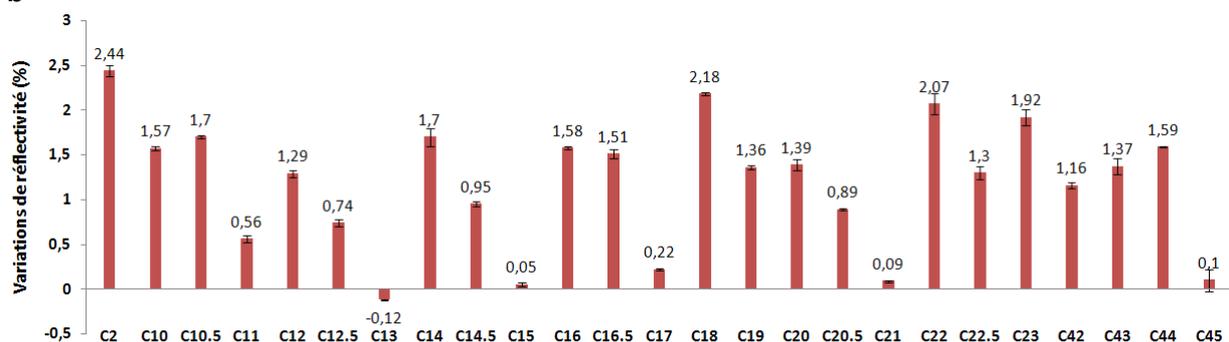


Figure 60. Détermination des bases impliquées dans l'interaction avec SopB

a) Tableau récapitulatif des sondes mutées. Seules les séquences centrales sont mutées et représentées ici.

b) Diagramme représentant les réponses SP_{Ri} après injection de SopB. Les variations de réflectivité sont obtenues en fin d'injection de 0,5% d'extraits bruts contenant SopB.

Remarque : Les réponses avec 400 nM de SopB purifiés sont similaires à ce qui est obtenu avec les extraits bruts et ne sont pas présentés ici pour plus de lisibilité.

Tout d'abord, les variations de réflectivité observées avec les sondes C42 à C45 ont confirmé ce qui avait été déduit dans l'expérience précédente. En effet, si une des séquences répétées inversées a été mutée, une baisse de l'interaction est observée (C42 à C44). En revanche, si ce sont les deux, la perte du signal a été totale (C45).

On peut définir trois degrés d'implication de chaque base dans l'interaction avec SopB, les bases indispensables, les bases fortement impliquées et les bases non nécessaires. Une base est considérée comme indispensable si elle suffit à elle seule à empêcher l'interaction avec un seul monomère de SopB. Ainsi, si une base indispensable est seulement mutée sur une séquence répétée inversée (C12-C12.5, C14-C14.5, C16-C16.5 et C20-C20.5), alors un monomère de SopB se fixe sur l'autre séquence inversée répétée et la perte d'interaction est partielle. En revanche, si des bases indispensables sont mutées sur les deux séquences inversées répétées, aucune interaction de SopB n'est possible (C13, C15, C17 et C21). Les bases sont dites «fortement impliquées» si lorsqu'elles sont mutées, elles induisent une perte quasi-totale de l'interaction avec SopB (C11). Enfin, certaines bases sont considérées comme «non nécessaires», si lorsqu'elles sont mutées sur les deux séquences répétées inversées, elles n'entraînent pas ou peu de perte d'interaction, c'est le cas avec les sondes C19 et C23.

Ces différentes observations ont permis de déduire le motif de liaison à SopB suivant.



Les bases en gras sont les bases «indispensables» à l'interaction avec SopB, les n définissent les bases non nécessaires à l'interaction et les autres bases sont fortement impliquées.

Ces résultats ont ensuite été comparés à ceux obtenus récemment dans une étude structurale de l'interaction SopB/*sopC* [153]. En raison d'une trop faible résolution, les auteurs n'avaient pas de manière précise identifié les bases impliquées dans l'interaction

avec SopB. En regroupant leurs données et nos résultats, nous avons obtenu le modèle suivant (figure 61).

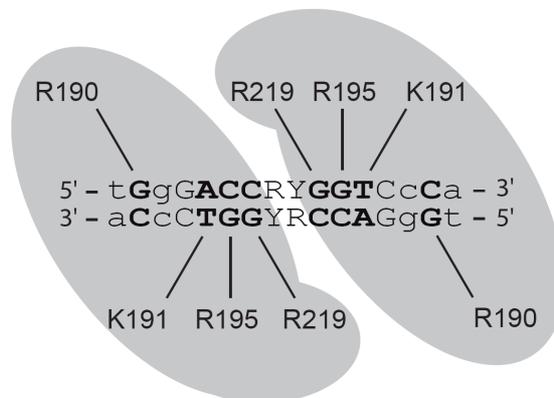


Figure 61. Représentation schématique de l'interaction du dimère SopB sur *sopC*.

Les deux parties grisées représentent chacune, un monomère de SopB. Les acides aminés interagissant spécifiquement avec les acides nucléiques sont ainsi déterminés.

Les études cristallographiques menées par Schumacher [153] sont en accord avec ce que nous avons obtenu. Les bases que nous avons identifiées comme indispensables sont bien impliquées dans l'interaction avec des acides aminés présents sur SopB. Ainsi, l'arginine 190 interagit avec la guanine en deuxième position en 5'. Les arginines 219 et 195 reconnaissent les guanines en dixième et onzième position en 5'. La lysine 191 interagit avec la thymine en position douze en 5'.

IV. Conclusion

L'ensemble de ce travail a démontré le potentiel de la SPRi dans la réalisation d'études multiplexes par criblage ainsi que dans la possibilité d'étudier des interactions avec des protéines non purifiées c'est-à-dire directement à partir d'extraits cellulaires. Dans cette étude, nous avons étudié une interaction impliquée dans le phénomène de partition chez la bactérie et plus particulièrement entre la protéine dimérique SopB et l'ADN centromérique *sopC*. Ce travail a ainsi permis d'une part de démontrer que l'interaction pouvait s'effectuer indépendamment sur un seul monomère de SopB et que certaines bases étaient indispensables à l'interaction avec SopB. L'ensemble de ces résultats est en cours de rédaction pour le journal *Nucleic Acids Research*.

Conclusion générale

Le projet de thèse s'est inscrit dans une approche interdisciplinaire ayant comme objectif de rechercher une chimie de greffage d'oligonucléotides sur l'or et d'améliorer la détection en SPRI. Ces travaux, à l'interface entre la biologie, la chimie et la physique, ont été effectués en lien avec différents laboratoires impliqués dans le projet (Genoptics-Horiba-Scientific, la plateforme Biopuces et le LAAS). Le premier objectif a été atteint et le dépôt d'oligonucléotides modifiés par un thiol a ainsi donné d'excellents résultats en termes de détection, de reproductibilité et de stabilité. Le greffage des oligonucléotides par simple contact a permis d'utiliser toutes les technologies disponibles sur la plateforme biopuces pour répondre à la première attente de Genoptics Horiba-Scientific qui était d'augmenter la densité de greffage. Nous avons ainsi obtenu une densité de 1000 spots sur un seul prisme. Cependant, nous sommes aujourd'hui limités pour deux raisons. Tout d'abord, la résolution de la caméra CCD de 20 μm rend difficilement observable des spots de moins de 100 μm et empêche ainsi d'augmenter la densité de dépôt qui est techniquement possible au laboratoire. Ensuite, le logiciel d'analyse ne permet pas de traiter au-delà de 256 interactions différentes. La résolution de ces deux problèmes est donc indispensable si on veut poursuivre le multiplexage pour permettre des études par criblage. Le deuxième axe de la thèse a consisté à améliorer la détection. Les meilleurs résultats ont été obtenus après fonctionnalisation de la surface par des nanoparticules d'or (GNP). Avec des GNP de 100 nm de diamètre greffées sur la surface, des variations de réflectivité trois fois plus importantes sont observées par rapport à une surface d'or seul et la limite de détection d'ADN cibles complémentaires est située entre 2 et 5 nM. Il y a donc pratiquement un facteur 1000 avec la détection par fluorescence où 10 pM d'oligonucléotides cibles peuvent être visualisés. L'ensemble des travaux sur les chimies de greffage et sur l'utilisation des GNP pour améliorer la détection a donné lieu à une publication dans le journal *Sensors and Actuators B* [154].

Cependant, toutes ces avancées ne sont utiles que si des applications dans le domaine de la biologie sont possibles. De nouvelles thématiques ont été engagées dans ce

sens et un travail enrichissant et complémentaire s'est effectué avec le concours de différents laboratoires.

En étroite collaboration avec l'équipe de Geneviève Pratviel au LCC, nous avons recherché des ligands spécifiques des G-quadruplex. L'intérêt apporté par ce travail est double. D'une part, nous avons montré qu'il était possible en SPRi de détecter des interactions avec des molécules de seulement quelques centaines de daltons. D'autre part, certains ligands ont été caractérisés comme se fixant préférentiellement sur les structures G-quadruplex des télomères. La molécule 360D pourrait ainsi être utilisée pour stabiliser les structures G-quadruplex et inhiber l'action de la télomérase qui est surexprimée dans certains cancers. Ces résultats ont donné lieu à une publication soumise (Pillet *et al.*, soumis).

Dans le même temps, l'étude du complexe de partition du plasmide F chez *E.coli* a été abordée avec Jean-Yves Bouet au LMGM. Ces travaux sont basés sur des interactions ADN/protéines et plus particulièrement entre la protéine SopB et la séquence centromérique *sopC*. Nous avons montré que la SPRi était suffisamment sensible pour suivre des interactions avec la protéine SopB qu'elle soit purifiée ou non. Par ailleurs, nous avons été capables de suivre l'interaction de la protéine SopB avec 45 séquences nucléotidiques. Nous avons ainsi défini au nucléotide près, une séquence consensus reconnue spécifiquement par SopB. Une publication est en cours de rédaction pour l'ensemble de ce travail.

Perspectives

Les avancées apportées dans l'amélioration de la détection restent insuffisantes pour concurrencer des systèmes de détection par marquage. Nous allons travailler sur ce problème en l'abordant sur des aspects nouveaux. Nous allons ainsi organiser le dépôt de nanoparticules d'or de manière à produire une exaltation très intense du signal par SERS [44]. L'utilisation de dendrimères déposés en réseaux est également envisagée, la périodicité introduite pourrait ainsi augmenter le signal observé [155]. Des travaux sur le dépôt de dendrimères en réseaux par timbrage sur des plaquettes de silicium ont déjà été effectués (figure 62 ; [156]) et seront envisagés sur la surface d'or des prismes.

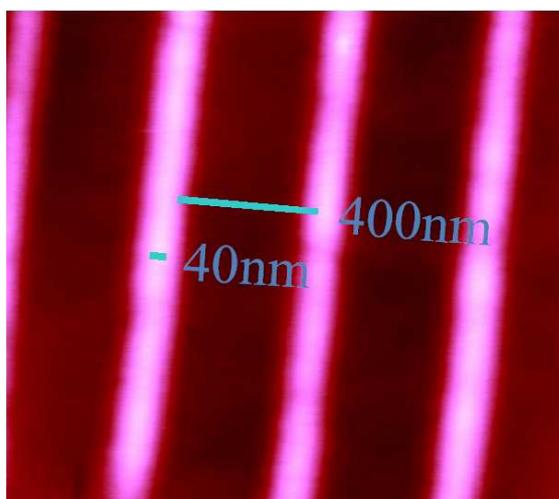


Figure 62 Image AFM d'un dépôt de dendrimères en réseau, avec des lignes de 40 nm au pas de 400 nm.

Le multiplexage est un atout majeur apporté à la SPRI. La société Genoptics-Horiba est en train de développer un logiciel d'analyse qui permettra de suivre plus de 256 interactions sur le même prisme. Nous serons ainsi capables de réaliser des études par criblage plus larges et de suivre plus de 1000 interactions en temps réel.

La chimie de greffage basée sur la formation de liaisons S-Au est très efficace, stable, peu onéreuse et facile à mettre en œuvre pour le dépôt d'oligonucléotides. Elle ouvre également la voie à de nombreuses applications. Nous avons par exemple détecté la présence d'ARN messagers directement à partir d'extraits bruts et d'ARN purifiés. La

présence de structures secondaires à température ambiante n'a pas permis d'obtenir des réponses significatives. Le système de contrôle de la température est donc primordial si on souhaite réaliser des études transcriptomiques. On peut également envisager la détection d'ARNmi, qui sont des ARN d'une vingtaine de bases et qui sont impliqués dans un grand nombre de processus de régulation et dans certains cancers. La SPRi pourrait être ainsi utilisée comme une méthode de diagnostic rapide. Dans ce but, nous avons testé la détection d'ARNmi synthétiques de 22 bases et le seuil de détection a été déterminé aux alentours de 10 nM, soit 15 ng. Cette détection est pour l'heure trop faible pour la détection *in vivo* des ARNmi mais l'amélioration de la détection permettra de l'envisager. Enfin, nous avons réalisé en collaboration avec Jean-Louis Marty du laboratoire BioMem à Perpignan une expérience préliminaire de détection de l'ochratoxine (toxine alimentaire) par l'utilisation d'aptamères sondes déposés sur la surface d'or d'un prisme.

En revanche, l'utilisation de thiol pour le greffage de protéines sur l'or n'est pas adaptée car les thiols peuvent jouer un rôle dans leur structuration des protéines. D'autres modes de dépôt sont donc envisageables si on souhaite déposer des protéines sur la surface. On peut par exemple utiliser les fonctions NH₂ des protéines pour une accroche avec des groupements glutaraldéhydes sur la surface ou en fonctionnalisant les NH₂ avec une fonction pyrrole ou diazonium. Des études préliminaires encourageantes ont été réalisées dans ce sens avec François Boudsocq du Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote (LBME) où nous avons déposé des protéines sur des surfaces glutaraldéhydes et observé des interactions en SPRi entre différentes polymérases.

Enfin, nous avons demandé et obtenu un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) pour poursuivre sur 15 mois les travaux entamés sur l'amélioration de la limite de détection en SPRi et pour approfondir en collaboration avec le LMGM, les études sur la mitose bactérienne.

Matériel et Méthodes

Recherche d'une chimie de greffage d'oligonucléotides sur l'or

Oligonucléotides utilisés

Conception des oligonucléotides

Le design des oligonucléotides a été effectué à partir de la séquence d'un gène codant pour la protéine HSP12 chez la levure YFL014W.

Séquence en acides nucléiques du gène codant pour HSP12

5 ' ATGTCTGACGCAGGTAGAAAAGGATTCGGTGAAAAAGCTTCTGAAGCTTTGAAGCCAGAC
TCTCAAAGTCATACGCTGAACAAGGTAAGGAATACATCACTGACAAGGCCGACAAGGTCGC
TGGTAAGGTTCAACCAGAAGACAACAAGGGTGTCTTCCAAGGTGTCCACGACTCTGCCGAAA
AAGGCAAGGATAACGCTGAAGGTCAAGGTGAATCTTTGGCAGACCAAGCTAGAGATTACATG
GGAGCCGCCAAGTCC**CAAGTTGAACGATGCCGTGGAATATGTTTCCGGTCGTGTCCACGGTGA
AGAAGACCCAACCAAGAAGTAA** 3 '

Sondes

25 mer

5 ' TTACTTCTTGG**T**TGGGTCTTCTTCA 3 '

50 mer

5 ' TTACTTCTTGGTTGGGTCTTCTTCCACCGTGGACACGACCGGAAACATATT 3 '

70 mer

5 ' TTACTTCTTGGTTGGGTCTTCTTCCACCGTGGACACGACCGGAAACATATTCGACGGCATC
GTTCAACTTG 3 '

Rand 25 mer

5 ' CGTAGCATATAGACATACGATCTAC 3 '

Rand 70 mer

5 ' GTACTACGATAGATCTAGATCAGTATCATATGAGCATGATAGCGTAGCATGCGATAGCGT
ATCACTGTAT 3 '

Cibles

25 mer

5 ' TGAAGAAGACCCAACCAAGAAGTAA 3 '

70 mer

5 ' CAAGTTGAACGATGCCGTGCGAATATGTTTCCGGTCGTGTCCACGGTGAAGAAGACCCAAC
CAAGAAGTAA 3 '

Fonctionnalisation des oligonucléotides

Les sondes modifiées en 5' par une chaîne carbonée de 6 carbones et comportant une fonction thiol (SH) ou par une fonction amine (NH₂) ont été commandées chez *Operon*. La sonde 25 mer modifiée par un pyrrole a été synthétisée par *Eurogentec*. Les cibles non modifiées ou fonctionnalisées en 5' par une Cyanine 5 (marqueur fluorescent) sont commandées chez *Operon*.

Les oligonucléotides modifiés par un pyrrole au laboratoire ont été obtenus à partir d'oligonucléotides porteurs d'une fonction NH₂ (*Operon*) et de pyrrole-N-hydroxysuccinimide fourni par Yoann Roupioz au laboratoire de Chimie pour la Reconnaissance et l'Etudes d'Assemblages Biologiques (CREAB), du CEA de Grenoble. La fonctionnalisation a été réalisée dans l'obscurité pendant 2 heures à température ambiante, dans un volume réactionnel de 100 µl à pH 8,2 contenant 50 µM d'oligonucléotides modifiés NH₂, 5 mM de pyrrole-N-hydroxysuccinimide et 20 mM de NaHCO₃ (*Sigma Aldrich*). Afin de se débarrasser des pyrrole-N-hydroxysuccinimide libres, nous avons précipité les oligonucléotides 6 heures à -20°C avec un volume d'isopropanol 100% et 0,1 volume d'acétate de sodium 3M à pH 5,2. Après centrifugation à 13000g pendant 10 minutes et élimination du surnageant, les oligonucléotides sont récupérés dans le culot. Le culot a ensuite été rincé avec de l'éthanol 70 %, puis séché sous vide avec l'appareil Concentrator 5301 de chez *Eppendorf*. Les oligonucléotides modifiés sont suspendus avec 50 µl d'eau milliQ et leur concentration a été évaluée par dosage au Nanodrop (ThermoScientific) à 260 nm.

Les oligonucléotides modifiés par un diazonium sont obtenus à partir d'oligonucléotides modifiés par une fonction aminobenzyl-amine (ABA) de chez *Eurogentec*. La réaction est réalisée en présence de 30 µM d'oligonucléotides ABA avec 20 mM d'HCl et 20 mM de NaNO₂ (*Sigma Aldrich*) durant 10 min à 4°C.

Les premiers tests de dépôt par contact sont effectués sur des plaquettes de silicium de 25 mm de long, 7 mm de large et 525 μm d'épaisseur. Ces plaquettes ont été métallisées par évaporation d'une couche d'or de 50 nm au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) après un traitement oxydatif et un dépôt de titane. Avant chaque fonctionnalisation, un traitement au plasma O_2 est effectué au LAAS pour oxyder la surface et éliminer tous les résidus organiques. Les conditions de plasma sont les suivantes, 1000 mL/min de dioxygène pendant 5 minutes à 300 W. L'appareil utilisé est un plasma oxygène modèle 300 de chez *PVA Tepla*.

Les surfaces 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA)/ N-Hydroxysuccinimide (NHS) ont été obtenues en deux temps. Tout d'abord, les surfaces d'or (plaquettes ou prismes) sont trempées 24 heures à température ambiante et à l'abri de la lumière dans une solution contenant 5 mM de MUA dans l'éthanol absolu. Afin d'éliminer l'excès de MUA, des lavages avec de l'éthanol absolu, de l'éthanol à 95% et de l'eau milliQ sont effectués. Ensuite, la fonction acide carboxylique des MUA a été activée par le 1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide (EDC) qui a réagi avec le N-Hydroxysuccinimide (NHS) pour donner une surface MUA/NHS. La réaction s'est déroulée sous agitation pendant 45 minutes, dans 5 ml de tampon Hepes 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 contenant 0,1M d'EDC et 0,5M de NHS. Après un lavage de 10 minutes avec du tampon, la surface MUA/NHS est prête pour le dépôt d'oligonucléotides NH_2 .

Les surfaces 11-amino-1-undecanethiol sont obtenues par simple trempage pendant 24 heures à température ambiante et dans l'obscurité de la surface d'or avec 5 mM de 11-amino-1-undecanethiol hydroxychloride dans une solution d'éthanol absolu. La surface est ensuite rincée avec de l'éthanol absolu.

Conditions de dépôt

Les tampons de dépôt utilisés sont différents d'une expérience à l'autre, notamment en fonction de la nature des modifications des oligonucléotides déposés (SH, NH_2 , pyrrole, diazonium), du mode de dépôt (simple contact ou électro-dépôt) et de la surface sur laquelle sont déposés les oligonucléotides (or seul, MUA/NHS...). Nous avons ainsi employé un

tampon phosphate Na_2HPO_4 , 0,1 M à pH 9 pour déposer par simple contact, les oligonucléotides NH_2 sur les surfaces MUA/NHS et sur les surfaces 11-amino-1-undecanethiol. Pour déposer par simple contact les oligonucléotides SH et NH_2 sur une surface d'or seul, nous avons utilisé du tampon SSC 3X (450 mM de NaCl et 45 mM de citrate à pH 7). Les oligonucléotides modifiés par une fonction pyrrole, sont déposés par simple contact ou par électro-dépôt en utilisant un tampon contenant 20 mM de monomères de pyrrole, 10 % de volume en glycérol, 50 mM de NaCl et de tampon phosphate à pH 6,8. Enfin, les oligonucléotides portant une fonction diazonium sont déposés dans leur solution de réaction (20 mM d'HCl et 20 mM de NaNO_2).

Deux appareils sont utilisés pour le dépôt. L'Omnigrid Micro (*Digilab*) permet de déposer par électro-dépôt ou par simple contact en utilisant des aiguilles plates d'un diamètre de 400 μm . Le ChipWriterPro (*Bio Rad*) effectue des dépôts par contact en utilisant des aiguilles plates ou creuses qui nous ont permis de déposer respectivement des spots d'environ 400 μm et 100 μm de diamètre.

Expériences en fluorescence

L'efficacité de dépôt des oligonucléotides modifiés SH sur une surface d'or seul et des oligonucléotides modifiés NH_2 sur les surfaces MUA/NHS et 11-amino-1-undecanethiol a été évaluée indirectement après hybridation d'un oligonucléotide complémentaire 25 mer fluorescent (cyanine 5) et quantification de la fluorescence.

L'hybridation est effectuée en appliquant sur les plaquettes d'or 6 μl de solution d'hybridation contenant 1 μl d'oligonucléotide 25 mer-Cy5 à la concentration souhaitée (1 μM ou 1,67 μM), 4 μl de tampon d'hybridation (450 mM de NaCl, 45 mM de citrate, 0,02% de SDS, pH 7) et 1 μl d'ADN de sperme de saumon pour saturer la surface. Les hybridations sont réalisées pendant 2 heures à 42°C. Après hybridation, trois différents lavages de 5 minutes sont réalisés avec du SDS (0,02 %) et du tampon SSC dont la composition à 3 X est de 450 mM de NaCl, 45 mM de citrate, pH7. Le premier lavage est effectué avec du SSC 2X

avec en plus 0,1 % de SDS ; le second lavage avec du SSC à 0,2 X et le dernier lavage 0,1 X de SSC. Les plaquettes ont ensuite été séchées avec une centrifugeuse à plaque (*Labnet*).

Les mesures de fluorescence sont réalisées sur le scanner Axon/GenePix 4000A commercialisé par *Molecular Devices*. Les paramètres du scan ont été choisis lors d'un pré-scan, la valeur de PMT (acronyme de l'Anglais Photomultiplier Tubes, définissant la puissance de détection des photons émis) que nous avons appliquée avec le GenePix 4000A a été de 800 à 635 nm et la résolution de 10 μm . Les valeurs de fluorescence sont exprimées en moyenne de l'intensité des pixels et sont quantifiées avec le logiciel Genepix (*Molecular Devices*).

Conditions d'utilisation en SPRi

Les puces utilisées en SPRi sont des prismes de verre comportant une couche d'accroche de chrome de 5 μm sur laquelle a été déposée 50 μm d'or (SPRi-Biochip, *GenOptics Horiba-Scientific*). L'appareil SPRi-Plex est utilisé pour la détection des interactions en SPRi. Les prismes et le SPRi-Plex sont conçus et produits par la société *GenOptics-Horiba Scientific* (figure 63). Le logiciel utilisé pour le contrôle de l'appareil SPRi est le SPRiView 4.1.1 (*GenOptics Horiba-Scientific*). Les mesures de réflectivité se font à angle fixe après définition de l'angle de travail. Avant les injections de cibles, une saturation de la surface est effectuée par injection de BSA dans du tampon Denhardt 1X (*Sigma Aldrich*) qui contient 0,02 % de BSA, 0,02 % de ficoll et 0,02 % de polyvinylpyrrolidone. Une calibration est ensuite réalisée avec l'injection de tampon de course à 1,25X. En effet, le flux n'est pas forcément homogène sur la surface du prisme et entre spots identiques, ce qui entraîne des réponses qui peuvent être légèrement différentes. Pour réduire ces variations internes au système, une injection avec du tampon de course concentré (1,25X) est réalisée avant chaque expérience, afin de provoquer volontairement une variation de réflectivité entre spots qui permet alors une normalisation. Le tampon de course utilisé est du PBS 10 mM à pH 7,4 contenant 158 mM de NaCl. Les cibles sont diluées dans ce tampon de course, injectées à un débit de 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ et en utilisant une boucle d'injection de 200 μl . A la fin de l'injection, de

la soude à 0,1M est utilisée pour dissocier les brins complémentaires. Les données obtenues sont analysées avec les logiciels SPRI1000 ou SPRIAnalysis 1.2.1 (*GenOptics Horiba-Scientific*).

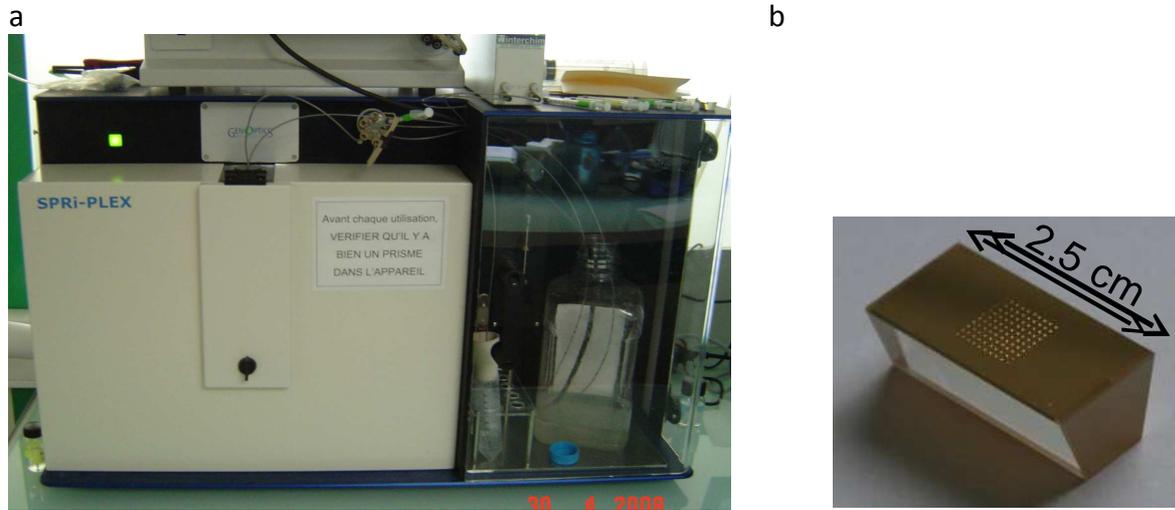


Figure 63. Photos du SPRI-Plex (a) et d'un prisme (ou SPRI-Biochip) après dépôt (b) utilisés au cours d'une expérience SPRI.

Amélioration de la détection

Surfaces dendrimères

La fixation des dendrimères aldéhydes a demandé comme pré-requis, la présence de groupements NH_2 sur la surface d'or. Pour cela, deux dérivés amino-thiols ont été testés séparément, le 11-amino-1-undecanethiol et la cystéamine. Avant fonctionnalisation, les prismes sont traités 5 minutes au plasma oxygène (1000 ml/min à 300W) puis incubés pendant 24 heures à température ambiante dans une solution contenant 5 mM de 11-amino-1-undecanethiol dans l'éthanol absolu ou 15 mM de cystéamine dans l'eau milliQ. Les prismes sont ensuite plongés 6 heures dans une solution de dendrimères à $58\mu\text{M}$ (fournis par l'équipe de JP Majoral au LCC) dans le Tétrahydrofurane (THF). Après trois rinçages successifs avec du THF, de l'acétone et de l'éthanol, les surfaces sont séchées sous un flux de diazote.

Le tampon phosphate à 0,3M pH 9 est utilisé pour déposer par contact les oligonucléotides modifiés NH_2 . La stabilisation de la liaison imine ainsi formée est obtenue par réduction des liaisons $\text{C}=\text{N}$ par immersion du prisme deux heures dans une solution contenant du NaBH_4 (3,5 g/L) dans de l'eau milliQ (figure 64). Les expériences SPRI se déroulent dans les mêmes conditions que dans la partie «Recherche d'une chimie de greffage d'oligonucléotides sur l'or».

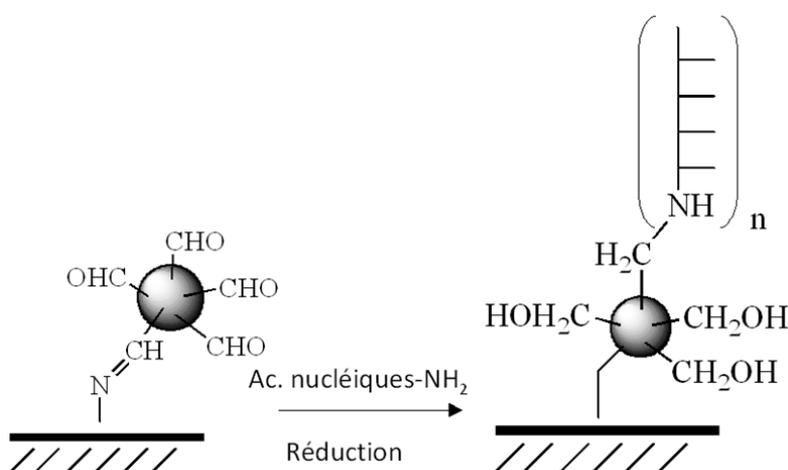


Figure 64. Représentation schématique de la réduction au NaBH_4 après fixation des dendrimères sur la surface et dépôt de nucléotides modifiés NH_2 .

Surfaces de nanoparticules d'or

La fonctionnalisation des prismes par des nanoparticules d'or (GNP) de différentes tailles (10 nm, 40 nm, 50 nm et 100 nm) est réalisée comme suit. Après 5 minutes de traitement au plasma oxygène (1000 mL/min à 300W, cage de Faraday), les prismes sont immergés pendant 1 heure dans une solution d'éthanol absolu contenant 20 mM de DTT (Sigma Aldrich). Après rinçage à l'éthanol absolu et à l'eau milliQ, les nanoparticules sont greffées par simple immersion du prisme dans une solution aqueuse contenant 0,01% de GNP (*BBInternational*).

La présence de GNP sur l'or a été confirmée par AFM avec l'aide de Christophe Thibault au LAAS, en utilisant le JPK Nano Wizard II (*JPK Instruments*) et des pointes Veeco MLCT (*Veeco Probes*) avec une constante élastique de 1 Nm^{-1} . La topographie de la surface n'a pas directement été mesurée sur les prismes, mais sur une plaquette de silicium sur laquelle la surface d'or a été fonctionnalisée ou non avec des colloïdes de 40 nm comme décrit précédemment.

Des oligonucléotides modifiés SH (chapitre I) sont ensuite déposés par contact dans du tampon SSC3X (450 mM de NaCl, 45 mM de citrate, 0,02% de SDS, pH 7). Les conditions des expériences SPRi sont identiques à celles décrites dans le chapitre I.

Recherche de ligands spécifiques des G-quadruplex

Oligonucléotides et ligands utilisés

Oligonucléotides

Les sondes provenant de chez *Eurogentec* sont modifiées en 5' par une fonction thiol et purifiées sur gel de polyacrylamide.

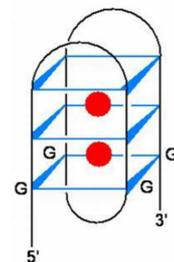
Sondes G-Quadruplex

Qx (32-mer)

5' TTTTTTTTTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'

QxMod (34 mer)

5' TTTTTTTTTTTGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGA 3'



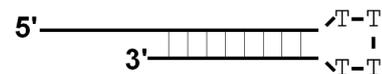
Sondes doubles brins

dbGC (32-mer)

5' TTTTTTTTTTTTCGCGCGCGTTTTTCGCGCGCG 3'

dbAT (30-mer)

5' TTTTTTTTTTTTCGAATTCGTCTCCGAATTCG 3'



Sonde simple brin

Sb (32-mer)

5' TTTTTTTTTTTGGCATAGTGCGTGGGCGTTAGC 3'



Ligands

Les porphyrines ont été synthétisées dans l'équipe de Métaux en Biologie et Chimie Médicinale (MBCM) dirigée par Geneviève Pratviel au LCC à Toulouse. Elles sont constituées de différents noyaux métalliques (Mn, Ni, Au, Co) et de différentes ramifications qui sont : bras court (TMPyP), bras moyens (BM) et bras long (LB). Les différentes solutions mères de porphyrines sont à des concentrations comprises entre 1 et 2 mM dans de l'eau milliQ. Entre chaque expérience, les solutions mères sont conservées à -20°C.

Les molécules Phen-DC3, MMQ12, Pt-ctPy et 360D sont synthétisées au laboratoire de Marie-Paule Teulade-Fichou à l'Institut Curie à Orsay. Les ligands MMQ12 et 360D sont solubles dans l'eau et conservés à une concentration de 1mM dans l'eau milliQ. Les molécules Pt-ctPy et Phen-DC3 sont insolubles dans l'eau et sont à 10 mM dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) 100%. Toutes ces molécules sont stockées à -20°C.

Structuration des G-Quadruplex et dépôt

La structuration des ADN G-Quadruplex est obtenue par chauffage pendant 5 minutes à 95°C d'une solution de quadruplex à 25 µM dans du tampon HEPES 10 mM à pH 8 avec 200 mM de KCl, puis refroidissement progressif sur une nuit à température ambiante. Par souci d'uniformité entre les résultats, les séquences double brin et simple brin subissent le même traitement. Après structuration, les ADN sondes (modifiés SH) sont déposées directement par contact sur l'or en utilisant l'appareil de dépôt ChipWriterPro (*Biorad*) et une aiguille de 400 µm de diamètre. Pour chaque sonde, le dépôt est réalisé en quadruplet.

Conditions d'utilisation en SPRI.

Les expériences se déroulent à un débit de 50 µL/min. Avant la première injection, une saturation est effectuée avec du tampon Denhardt 1X (*Sigma Aldrich*) qui contient 0,02% de BSA, 0,02% de ficoll et 0,02% de polyvinylpyrrolidone. Les tampons de course utilisés sont différents selon le ligand injecté. Avec Mn-TMPyP et 360D le tampon de course utilisé est de l'HEPES 10 mM à pH7 contenant 200 mM de KCl. Les ligands Phen-DC3 et Pt-ctPy sont insolubles dans une solution 100% aqueuse, le tampon employé est à base de cacodylate de lithium 10 mM pH7 avec 100 mM de KCl et 1% de DMSO. Les calibrations sont effectuées avec des solutions de tampon de course à 1,25X. Pour chaque interaction observée, l'association a été de 240 secondes (200 µL de ligand injecté) et la dissociation de 240 secondes avec un rinçage de 200 µl de tampon de course. Le cas échéant, nous avons utilisé du SDS à 0,02% pour obtenir une dissociation totale du complexe Ligand/Récepteur. Les interactions sont ensuite analysées avec le logiciel ScrubberGen (*BioLogic software*).

Etude du complexe de partition du plasmide F

Oligonucléotides et protéines utilisés

Oligonucléotides

Les sondes nucléotidiques modifiées en 5' par une fonction SH et purifiées sur gel sont commandées chez *Sigma Aldrich*. Les sondes ont été conçues à partir de la séquence centromérique *sopC* présente chez le plasmide F. La séquence C2 est considérée comme la séquence consensus de reconnaissance à la protéine SopB et elle est présente sur 4 des 12 répétitions de *sopC*. Les sondes C3 et C11 sont également des séquences sauvages issues d'une seule répétition chacune. Toutes les autres sondes sont porteuses de mutations non sauvages qui ont été testées pour les besoins des expériences. La sonde C1 contient sur sa partie centrale, une séquence aléatoire non reconnue par SopB et elle a été considérée au cours des expériences SPRI comme le témoin négatif.

Pour chaque sonde, la partie centrale de 16 bases est en gras, les bases en rouge représentent ce qu'on appelle l'AC central. Les bases en vert sont mutées par rapport à la séquence consensus C2. Les séquences sont écrites dans le sens 5' -> 3'.

C1

ATTAGTC**GCACGTGCAACGCGTC**CTCGTATtttttATACGAG**GACGCGTTGCACGTGCG**ACTAAT

C2

ATTAGTC**TGGGACCACGGTCCC**ACTCGTATtttttATACGAG**TGGGACC****GTGGTCCC**AGACTAAT

C2a

ATTAGTC**TGGGACCACGGTCCC**ACTCGTAT

C3

ATTAGTC**TGGGACC****ATGGTCCC**ACTCGTATtttttATACGAG**TGGGACC****ATGGTCCC**AGACTAAT

C4

ATTAGTC**TGGGACC****CAGGTCCC**ACTCGTATtttttATACGAG**TGGGACC****TGGTCCC**AGACTAAT

C5

ATTAGTC**TGGGACC****TAGGTCCC**ACTCGTATtttttATACGAG**TGGGACC****TAGGTCCC**AGACTAAT

C6

ATTAGTC**TGGGACC****CGGGTCCC**ACTCGTATtttttATACGAG**TGGGACC****CGGGTCCC**AGACTAAT

C7

ATTAGTCTGGGACC**CGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**CGGT**CCCAGACTAAT

C8

ATTAGTCTGGGACC**TGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**CAGT**CCCAGACTAAT

C9

ATTAGTCTGGGACC**GTGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**ACGGT**CCCAGACTAAT

C10

ATTAGTCTGG**AACCACGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**GTGGT**CCAGACTAAT

C10.5

ATTAGTCTGGGACC**ACGGT**TCCCTCGTATtttttATACGAGTGG**AACC**GTGGTCCCAGACTAAT

C11

ATTAGTCTGG**AACCACGGT**TCCCTCGTATtttttATACGAGTGG**AACC**GTGGTCCAGACTAAT

C12

ATTAGTCTGGGACC**ACGAT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGAT**CGTGGT**CCCAGACTAAT

C12.5

ATTAGTCTGGGAT**CACGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**GTGAT**CCCAGACTAAT

C13

ATTAGTCTGGGAT**CACGAT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGAT**CGTGAT**CCCAGACTAAT

C14

ATTAGTCTGGGAC**AACGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**GTGT**CCCAGACTAAT

C14.5

ATTAGTCTGGGACC**ACTGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGAC**AGTGGT**CCCAGACTAAT

C15

ATTAGTCTGGGAC**ACTGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGAC**AGTGT**CCCAGACTAAT

C16

ATTAGTCTGGG**CCACGGT**CCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**GTGG**CCCAGACTAAT

C16.5

ATTAGTCTGGGACC**ACGG**CCCCCTCGTATtttttATACGAGTGGG**CCC**GTGGTCCCAGACTAAT

C17

ATTAGTCTGGG**CCACGG**CCCCCTCGTATtttttATACGAGTGGG**CCC**GTGGGCCCAGACTAAT

C18

ATTAGTCTG**AGACC**ACGGTCCCCTCGTATtttttATACGAGTGGGACC**GTGGT**CTCAGACTAAT

C19

ATTAGTCTG**AGACC**ACGGT**CTC**ACTCGTATtttttATACGAGT**AGACC**GTGGT**CTC**AGACTAAT

C20

ATTAGTCTAGGACCACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACCGTGGTCCTAGACTAAT

C20.5

ATTAGTCTGGGACCACGGTCCCTACTCGTATtttttATACGAGTAGGACCGTGGTCCCAGACTAAT

C21

ATTAGTCTAGGACCACGGTCCCTACTCGTATtttttATACGAGTAGGACCGTGGTCCTAGACTAAT

C22

ATTAGTCCGGGACCACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAGACTAAT

C22.5

ATTAGTCTGGGACCACGGTCCCCTCGTATtttttATACGAGCGGGACCGTGGTCCCAGACTAAT

C23

ATTAGTCCGGGACCACGGTCCCCTCGTATtttttATACGAGCGGGACCGTGGTCCCAGACTAAT

C24

ATTAGTCTGGGCCCACGTGTTCCACTCGTATtttttATACGAGTGGAAACAGTGGGCCCAGACTAAT

C25

ATTAGTCTGAGACTACGATTCCACTCGTATtttttATACGAGTGGAAATCGTAGTCTCAGACTAAT

C26

TTCTCTCTGGGCCCACGTGTTCCACTTGTATtttttATACAAGTGGAAACAGTGGGCCCAGAGAGAA

C27

ATCAGCGTGAGACTACGATTCCATCAATGCTtttttGCATTGATGGAATCGTAGTCTCACGCTGAT

C28

ATTAACCTGGGACCACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAAGTTAAT

C29

ATTAACCTGGGACCACGGTCCCAAGTGTATtttttATACAACCTGGGACCGTGGTCCCAAGTTAAT

C30

ATTAGCTTGGGACCACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAAGCTAAT

C31

ATTAGTTTGGGACCACGGTCCCAATCGTATtttttATACGAGTGGGACCGTGGTCCCAACTAAT

C32

CACGACTTGGGACCACGGTCCCAACTACGCtttttGCGTAGTTGGGACCGTGGTCCCAAGTCGTG

C40

ATTAGTCTGGGACCACACGCGTCTCGTATtttttATACGAGGACGCGTGTGGTCCCAGACTAAT

C41

ATTAGTCTGGGACCACACGCGTCTCGTATtttttATACGAGGACGCGTGTGGTCCCAGACTAAT

C42

ATTAGTCTGGGATAACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACC GTTATCCCAGACTAAT

C43

ATTAGTCTAGGATAACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACC GTTATCCTAGACTAAT

C44

ATTAGTCCGAACCCACGGTCCCACTCGTATtttttATACGAGTGGGACC GTGGGTTCCGACTAAT

C45

ATTAGTCCGAACCCACGGGTTCTCGTATtttttATACGAGCGAACCC GTGGGTTCCGACTAAT

Protéines cibles

Les protéines SopB, qu'elles soient purifiées ou non, sauvages ou mutées, sont produites par Aurore Sanchez et Jean-Yves Bouet dans le Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM) à Toulouse. Les protéines SopB sont purifiées selon le protocole décrit par Ah-Seng *et al.*, 2004 [151].

Conditions de dépôt

Les sondes sont déposées à une concentration de 25 μ M avec le tampon SSC 3X de chez *Sigma Aldrich* (450mM de NaCl et 45mM de sodium citrate, pH 7). L'appareil de dépôt ChipWriterPro (*Biorad*) et des aiguilles d'un diamètre de 400 μ m sont utilisés pour déposer les ADN sondes en duplicat.

Conditions d'utilisation en SPRI

Le tampon de course utilisé est composé d'HEPES-KOH à 20 mM et à pH 7,4 et 100 mM de KCl, 50 μ g/mL d'ADN de sperme de saumon et un 1 mM de DTT. Les solutions à injecter sont préparées extemporanément dans ce tampon de course. Avant les injections de SopB, la surface est saturée avec du tampon Denhardt de chez *Sigma Aldrich* (0,02 de BSA, 0,02 % de ficoll et 0,02 % de polyvinylpyrrolidone). Une calibration a ensuite été effectuée

avec du tampon de course à 1,25X. Les injections sont de 200 μ L avec un débit de 50 μ L/min, l'association et la dissociation ont duré 4 minutes chacune. Les variations de réflectivité sont mesurées à la fin des injections et sont traitées avec le logiciel d'analyse SPRiAnalysis1.2.1 (*Genoptics Horiba-Scientific*). Entre chaque injection, de la soude 0,1M est utilisée pour dissocier SopB de *sopC*.

Références

- [1] Avogadro A. Essai d'une manière de déterminer les masses relatives des molécules élémentaires des corps, et les proportions selon lesquelles elles entrent dans ces combinaisons. *Journal de physique, de chimie et d'histoire naturelle* (1811) **73**: pp. 58-76.
- [2] Yalow R & Berson S. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *The Journal of Clinical Investigation* (1960) **39**: pp. 1157-1175.
- [3] Wide L, Bennich H & Johansson SG. Diagnosis of allergy by an in-vitro test for allergen antibodies. *Lancet* (1967) **2**: pp. 1105-1107.
- [4] Boucherie H, Massoni A & Monribot-Espagne C. Radiolabeling for two-dimensional gel analysis. *Methods Mol Biol* (2008) **424**: pp. 125-135.
- [5] Flores J, Green KY, Garcia D, Sears J, Perez-Schael I, Avendaño LF, Rodriguez WB, Taniguchi K, Urasawa S & Kapikian AZ. Dot hybridization assay for distinction of rotavirus serotypes. *J Clin Microbiol* (1989) **27**: pp. 29-34.
- [6] Valeur B. From Well-Known to Underrated Applications of Fluorescence. *Springer Ser Fluoresc* (2008) **4**: pp. 21-43.
- [7] Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* (2005) **51**: pp. 2415-2418.
- [8] Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* (1948) **437**: pp. 55-75.
- [9] Trugnan G, Fontanges P, Delautier D & Ait-Slimane T. [FRAP, FLIP, FRET, BRET, FLIM, PRIM...new techniques for a colourful life]. *Med Sci (Paris)* (2004) **20**: pp. 1027-1034.
- [10] Vaasa A, Lust M, Terrin A, Uri A & Zaccolo M. Small-molecule FRET probes for protein kinase activity monitoring in living cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2010) **397**: pp. 750-755.
- [11] Schena M, Shalon D, Davis RW & Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* (1995) **270**: pp. 467-470.
- [12] Brown PO & Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* (1999) **21**: pp. 33-37.
- [13] Heinrichs S, Kulkarni RV, Bueso-Ramos CE, Levine RL, Loh ML, Li C, Neuberg D, Kornblau SM, Issa J, Gilliland DG, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Estey EH & Look AT. Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics. *Leukemia* (2009) **23**: pp. 1605-1613.
- [14] Iorio MV, Ferracin M, Liu C, Veronese A, Spizzo R, Sabbioni S, Magri E, Pedriali M, Fabbri M, Campiglio M, Ménard S, Palazzo JP, Rosenberg A, Musiani P, Volinia S, Nenci I, Calin GA, Querzoli P, Negrini M & Croce CM. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* (2005) **65**: pp. 7065-7070.

- [15] Sarkar D, Parkin R, Wyman S, Bendoraite A, Sather C, Delrow J, Godwin AK, Drescher C, Huber W, Gentleman R & Tewari M. Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays. *Nucleic Acids Res* (2009) **37**: p. e17.
- [16] Kostrzynska M & Bachand A. Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens. *Can J Microbiol* (2006) **52**: pp. 1-8.
- [17] Dankbar DM, Dawson ED, Mehlmann M, Moore CL, Smagala JA, Shaw MW, Cox NJ, Kuchta RD & Rowlen KL. Diagnostic microarray for influenza B viruses. *Anal Chem* (2007) **79**: pp. 2084-2090.
- [18] Jelinek R & Kolusheva S. Carbohydrate biosensors. *Chem Rev* (2004) **104**: pp. 5987-6015.
- [19] Galanina OE, Mecklenburg M, Nifantiev NE, Pazynina GV & Bovin NV. GlycoChip: multiarray for the study of carbohydrate-binding proteins. *Lab on a Chip* (2003) **3**: pp. 260-265.
- [20] Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Pötz O, Kramer S & Joos TO. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics* (2003) **3**: pp. 2155-2166.
- [21] Schäferling M & Nagl S. Optical technologies for the read out and quality control of DNA and protein microarrays. *Anal Bioanal Chem* (2006) **385**: pp. 500-517.
- [22] Kukar T, Eckenrode S, Gu Y, Lian W, Megginson M, She J & Wu D. Protein microarrays to detect protein-protein interactions using red and green fluorescent proteins. *Anal Biochem* (2002) **306**: pp. 50-54.
- [23] Pflieger KDG & Eidne KA. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nat Methods* (2006) **3**: pp. 165-174.
- [24] Boute N, Jockers R & Issad T. The use of resonance energy transfer in high-throughput screening: BRET versus FRET. *Trends Pharmacol Sci* (2002) **23**: pp. 351-354.
- [25] Oner SS, Maher EM, Breton B, Bouvier M & Blumer JB. Receptor-regulated interaction of activator of G-protein signaling-4 and Galphai. *J Biol Chem* (2010) **285**: pp. 20588-20594.
- [26] Ballal R, Cheema A, Ahmad W, Rosen EM & Saha T. Fluorescent oligonucleotides can serve as suitable alternatives to radiolabeled oligonucleotides. *J Biomol Tech* (2009) **20**: pp. 190-194.
- [27] Dixon MC. Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring: Enabling Real-Time Characterization of Biological Materials and Their Interactions. *Journal of Biomolecular Techniques* (2008) **19**: pp. 151-158.
- [28] Mecea VM. From Quartz Crystal Microbalance to Fundamental Principles of Mass Measurements. *Analytical Letters* (2005) **38**: pp. 753-767.
- [29] Nguyen TH & Elimelech M. Plasmid DNA adsorption on silica: kinetics and conformational changes in monovalent and divalent salts. *Biomacromolecules* (2007) **8**: pp. 24-32.
- [30] Peh WYX, Reimhult E, Teh HF, Thomsen JS & Su X. Understanding ligand binding effects on the conformation of estrogen receptor alpha-DNA complexes: a combinational quartz crystal

microbalance with dissipation and surface plasmon resonance study. *Biophys J* (2007) **92**: pp. 4415-4423.

[31] Richter R, Mukhopadhyay A & Brisson A. Pathways of lipid vesicle deposition on solid surfaces: a combined QCM-D and AFM study. *Biophys J* (2003) **85**: pp. 3035-3047.

[32] Buzhynskyy N, Golczak M, Lai-Kee-Him J, Lambert O, Tessier B, Gounou C, Bérat R, Simon A, Granier T, Chevalier J, Mazères S, Bandorowicz-Pikula J, Pikula S & Brisson AR. Annexin-A6 presents two modes of association with phospholipid membranes. A combined QCM-D, AFM and cryo-TEM study. *J Struct Biol* (2009) **168**: pp. 107-116.

[33] Schofield AL, Rudd TR, Martin DS, Fernig DG & Edwards C. Real-time monitoring of the development and stability of biofilms of *Streptococcus mutans* using the quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Biosens Bioelectron* (2007) **23**: pp. 407-413.

[34] Liu AQ, Huang HJ, Chin LK, Yu YF & Li XC. Label-free detection with micro optical fluidic systems (MOFS): a review. *Anal Bioanal Chem* (2008) **391**: pp. 2443-2452.

[35] Burg TP, Godin M, Knudsen SM, Shen W, Carlson G, Foster JS, Babcock K & Manalis SR. Weighing of biomolecules, single cells and single nanoparticles in fluid. *Nature* (2007) **446**: pp. 1066-1069.

[36] Armani DK, Kippenberg TJ, Spillane SM & Vahala KJ. Ultra-high-Q toroid microcavity on a chip. *Nature* (2003) **421**: pp. 925-928.

[37] Armani AM, Kulkarni RP, Fraser SE, Flagan RC & Vahala KJ. Label-free, single-molecule detection with optical microcavities. *Science* (2007) **317**: pp. 783-787.

[38] Lee MR & Fauchet PM. Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection. *Opt Express* (2007) **15**: pp. 4530-4535.

[39] Heeres JT, Kim S, Leslie BJ, Lidstone EA, Cunningham BT & Hergenrother PJ. Identifying modulators of protein-protein interactions using photonic crystal biosensors. *J Am Chem Soc* (2009) **131**: pp. 18202-18203.

[40] Nie S & Emory S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* (1997) **275**: pp. 1102-1106.

[41] Leung S, Winkle RF, Wootton RCR & deMello AJ. A method for rapid reaction optimisation in continuous-flow microfluidic reactors using online Raman spectroscopic detection. *Analyst* (2005) **130**: pp. 46-51.

[42] Cao YC, Jin R & Mirkin CA. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science* (2002) **297**: pp. 1536-1540.

[43] Han XX, Zhao B & Ozaki Y. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal Bioanal Chem* (2009) **394**: pp. 1719-1727.

[44] Cerf A, Molnár G & Vieu C. Novel approach for the assembly of highly efficient SERS substrates. *ACS Appl Mater Interfaces* (2009) **1**: pp. 2544-2550.

- [45] Kretschmann E & Raether H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z. Naturforsch* (1968) **4**: pp. 299-304.
- [46] Liedberg B & Lundström I. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B* (1993) **11**: pp. 63-72.
- [47] Stenberg E, Persson B, Roos H & Urbaniczky C. Quantitative Determination of Surface Concentration of Protein with Surface Plasmon Resonance Using Radiolabeled Proteins. *Journal of Colloid and Interface Science* (1991) **143**: pp. 513-526.
- [48] Maillart E. Développement d'un système optique d'imagerie en résonance de plasmons de surface pour l'analyse simultanée de multiples interactions biomoléculaires en temps réel. Université PARIS XI ORSAY.2004.
- [49] Ho HP, Wu SY, Yang M & Cheung AC. Application of white light-emitting diode to surface plasmon resonance sensors. *Sensors and Actuators B* (2001) **80**: pp. 89-94.
- [50] Stark PRH, Halleck AE & Larson DN. Short order nanohole arrays in metals for highly sensitive probing of local indices of refraction as the basis for a highly multiplexed biosensor technology. *Methods* (2005) **37**: pp. 37-47.
- [51] Fujimaki M, Rockstuhl C, Wang X, Awazu K, Tominaga J, Ikeda T, Koganezawa Y & Ohki Y. Biomolecular sensors utilizing waveguide modes excited by evanescent fields. *J Microsc* (2008) **229**: pp. 320-326.
- [52] Jorgenson RC & Yee SS. A fiber-optic chemical sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B* (1993) **12**: pp. 213-220.
- [53] Hoa XD, Kirk AG & Tabrizian M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: a review of recent progress. *Biosens Bioelectron* (2007) **23**: pp. 151-160.
- [54] Kurihara K, Ohkawa H, Iwasaki Y, Niwa O, Tobita T & Suzuki K. Fiber-optic conical microsensors for surface plasmon resonance using chemically etched single-mode fiber. *Analytica Chimica Acta* (2004) **523**: pp. 165-170.
- [55] Slavik R, Homola J & Brynda E. Novel spectral fiber optic sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B* (2001) **74**: pp. 106-111.
- [56] Hastings JT, Guo J, Keathley PD, Kumaresh PB, Wei Y, Law S & Bachas LG. Optimal self-referenced sensing using long- and short- range surface plasmons. *Opt Express* (2007) **15**: pp. 17661-17672.
- [57] Fan X, White IM, Shopova SI, Zhu H, Suter JD & Sun Y. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review. *Anal Chim Acta* (2008) **620**: pp. 8-26.
- [58] Aslan K, Lakowicz JR & Geddes CD. Plasmon light scattering in biology and medicine: new sensing approaches, visions and perspectives. *Curr Opin Chem Biol* (2005) **9**: pp. 538-544.

- [59] Wu B & Wang Q. Investigation of highly sensitive surface plasmon resonance biosensors with Au nanoparticles embedded dielectric film using rigorous coupled wave analysis. *Optica Applicata* (2009) **39**: pp. 31-41.
- [60] Alleyne CJ, Kirk AG, McPhedran RC, Nicorovici NP & Maystre D. Enhanced SPR sensitivity using periodic metallic structures. *Opt Express* (2007) **15**: pp. 8163-8169.
- [61] Liu H, Wang B, Leong ESP, Yang P, Zong Y, Si G, Teng J & Maier SA. Enhanced surface plasmon resonance on a smooth silver film with a seed growth layer. *ACS Nano* (2010) **4**: pp. 3139-3146.
- [62] Wang L, Li T, Du Y, Chen C, Li B, Zhou M & Dong S. Au NPs-enhanced surface plasmon resonance for sensitive detection of mercury(II) ions. *Biosens Bioelectron* (2010) **25**: pp. 2622-2626.
- [63] Goodrich TT, Lee HJ & Corn RM. Enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging method using RNase H and RNA microarrays for the ultrasensitive detection of nucleic acids. *Anal Chem* (2004) **76**: pp. 6173-6178.
- [64] Rich RL & Myszka DG. Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis. *Anal Biochem* (2007) **361**: pp. 1-6.
- [65] Borch J & Roepstorff P. Combinations of SPR and MS for characterization of native and recombinant proteins in cell lysates. *Mol Biotechnol* (2006) **33**: pp. 179-190.
- [66] Bouffartigues E, Leh H, Anger-Leroy M, Rimsky S & Buckle M. Rapid coupling of Surface Plasmon Resonance (SPR and SPRi) and ProteinChip based mass spectrometry for the identification of proteins in nucleoprotein interactions. *Nucleic Acids Res* (2007) **35**: p. e39.
- [67] Nedelkov D. Development of surface plasmon resonance mass spectrometry array platform. *Anal Chem* (2007) **79**: pp. 5987-5990.
- [68] Bellon S, Buchmann W, Gonnet F, Jarroux N, Anger-Leroy M, Guillonneau F & Daniel R. Hyphenation of surface plasmon resonance imaging to matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry by on-chip mass spectrometry and tandem mass spectrometry analysis. *Anal Chem* (2009) **81**: pp. 7695-7702.
- [69] Poetsch A, Schlüsener D, Florizone C, Eltis L, Menzel C, Rögner M, Steinert K & Roth U. Improved identification of membrane proteins by MALDI-TOF MS/MS using vacuum sublimated matrix spots on an ultraphobic chip surface. *J Biomol Tech* (2008) **19**: pp. 129-138.
- [70] Grosjean L, Cherif B, Mercey E, Roget A, Levy Y, Marche PN, Villiers M & Livache T. A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process. *Anal Biochem* (2005) **347**: pp. 193-200.
- [71] Villiers M, Cortès S, Brakha C, Marche P, Roget A & Livache T. Polypyrrole-peptide microarray for biomolecular interaction analysis by SPR imaging. *Methods Mol Biol* (2009) **570**: pp. 317-328.
- [72] Fatehullah A, Doherty C, Pivato G, Allen G, Devine L, Nelson J & Timson DJ. Interactions of the 67 kDa laminin receptor and its precursor with laminin. *Biosci Rep* (2010) **30**: pp. 73-79.

- [73] Nogues C, Leh H, Langendorf CG, Law RHP, Buckle AM & Buckle M. Characterisation of peptide microarrays for studying antibody-antigen binding using surface plasmon resonance imagery. *PLoS One* (2010) **5**: p. e12152.
- [74] Mercey E, Sadir R, Maillart E, Roget A, Baleux F, Lortat-Jacob H & Livache T. Polypyrrole oligosaccharide array and surface plasmon resonance imaging for the measurement of glycosaminoglycan binding interactions. *Anal Chem* (2008) **80**: pp. 3476-3482.
- [75] Song E & Pohl NLB. Carbohydrate arrays: recent developments in fabrication and detection methods with applications. *Curr Opin Chem Biol* (2009) **13**: pp. 626-632.
- [76] Nishimura Y, Adachi H, Kyo M, Murakami S, Hattori S & Ajito K. A proof of the specificity of kanamycin-ribosomal RNA interaction with designed synthetic analogs and the antibacterial activity. *Bioorg Med Chem Lett* (2005) **15**: pp. 2159-2162.
- [77] Fiche JB, Fuchs J, Buhot A, Calemczuk R & Livache T. Point mutation detection by surface plasmon resonance imaging coupled with a temperature scan method in a model system. *Anal Chem* (2008) **80**: pp. 1049-1057.
- [78] Fuchs J, Dell'Atti D, Buhot A, Calemczuk R, Mascini M & Livache T. Effects of formamide on the thermal stability of DNA duplexes on biochips. *Anal Biochem* (2010) **397**: pp. 132-134.
- [79] Mandir JB, Lockett MR, Phillips MF, Allawi HT, Lyamichev VI & Smith LM. Rapid determination of RNA accessible sites by surface plasmon resonance detection of hybridization to DNA arrays. *Anal Chem* (2009) **81**: pp. 8949-8956
- [80] Fang S, Lee HJ, Wark AW & Corn RM. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. *J Am Chem Soc* (2006) **128**: pp. 14044-14046.
- [81] Neo SJ, Su X & Thomsen JS. Surface plasmon resonance study of cooperative interactions of estrogen receptor alpha and transcriptional factor Sp1 with composite DNA elements. *Anal Chem* (2009) **81**: pp. 3344-3349.
- [82] Panero S, Prospero P, Bonino F, Scrosati B, Corradini A & Mastragostino M. Characteristics of electrochemically synthesized polymer electrodes in lithium cells—III. Polypyrrole. *Electrochimica Acta* (1987) **32**: pp. 1007-1011.
- [83] Livache T, Guedon P, Brakha C, Roget A, Levy Y & Bidan G. Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon resonance hybridization detection. *Synthetic metals* (2001) **121**: pp. 1443-1444.
- [84] Livache T, Maillart E, Lassalle N, Mailley P, Corso B, Guedon P, Roget A & Levy Y. Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips. *J Pharm Biomed Anal* (2003) **32**: pp. 687-696.
- [85] Maillart E, Brengel-Pesce K, Capela D, Roget A, Livache T, Canva M, Levy Y & Soussi T. Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction. *Oncogene* (2004) **23**: pp. 5543-5550.

- [86] Goebel WF & Avery OT. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate-proteins : iv. the synthesis of thep-aminobenzyl ether of the soluble specific substance of type iii pneumococcus and its coupling with protein. *J Exp Med* (1931) **54**: pp. 431-436.
- [87] Corgier BP, Marquette CA & Blum LJ. Diazonium-protein adducts for graphite electrode microarrays modification: direct and addressed electrochemical immobilization. *J Am Chem Soc* (2005) **127**: pp. 18328-18332.
- [88] Polsky R, Harper JC, Wheeler DR, Arango DC & Brozik SM. Electrically addressable cell immobilization using phenylboronic acid diazonium salts. *Angew Chem Int Ed Engl* (2008) **47**: pp. 2631-2634.
- [89] Corgier BP, Bellon S, Anger-Leroy M, Blum LJ & Marquette CA. Protein-diazonium adduct direct electrografting onto SPRI-biochip. *Langmuir* (2009) **25**: pp. 9619-9623.
- [90] Dahmen S & Bräse S. The First Stable Diazonium Ion on Solid Support-Investigations on Stability and Usage as Linker and Scavenger in Solid-Phase Organic Synthesis Nitrogen-Based Linkers. *Angew Chem Int Ed Engl* (2000) **39**: pp. 3681-3683.
- [91] Biener MM, Biener J & Friend CM. Revisiting the S-Au(111) interaction: static or dynamic?. *Langmuir* (2005) **21**: pp. 1668-1671.
- [92] Hasan M, Bethell D & Brust M. The fate of sulfur-bound hydrogen on formation of self-assembled thiol monolayers on gold: (1)H NMR spectroscopic evidence from solutions of gold clusters. *J Am Chem Soc* (2002) **124**: pp. 1132-1133.
- [93] Jirage KB, Hulteen JC & Martin CR. Effect of Thiol Chemisorption on the Transport Properties of Gold Nanotubule Membranes. *Anal. Chem* (1999) **71**: pp. 4913-4918.
- [94] Unsworth LD, Tun Z, Sheardown H & Brash JL. Chemisorption of thiolated poly(ethylene oxide) to gold: surface chain densities measured by ellipsometry and neutron reflectometry. *J Colloid Interface Sci* (2005) **281**: pp. 112-121.
- [95] Rodriguez JA, Dvorak J, Jirsak T, Liu G, Hrbek J, Aray Y & González C. Coverage effects and the nature of the metal-sulfur bond in S/Au(111): high-resolution photoemission and density-functional studies. *J Am Chem Soc* (2003) **125**: pp. 276-285.
- [96] Schwartz DK. MECHANISMS AND KINETICS OF SELF-ASSEMBLED MONOLAYER FORMATION. *Annual Review of Physical Chemistry* (2001) **52**: pp. 107-137.
- [97] Jordan CE, Frey BL, Kornguth S & Corn RM. Characterization of Poly-L-lysine Adsorption onto Alkanethiol-Modified Gold Surfaces with Polarization-Modulation Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Surface Plasmon Resonance Measurements. *Langmuir* (1994) **10**: pp. 3642-3648.
- [98] Bassil N, Maillart E, Canva M, Lévy Y, Millot M, Pissard S, Narwa R & Goosens M. One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations . *Sensors and Actuators B* (2003) **94**: pp. 313-323.

- [99] Chou S, Hsu W, Hwang J & Chen C. Development of an immunosensor for human ferritin, a nonspecific tumor marker, based on surface plasmon resonance. *Biosens Bioelectron* (2004) **19**: pp. 999-1005.
- [100] Wang R, Tombelli S, Minunni M, Spiriti MM & Mascini M. Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. *Biosens Bioelectron* (2004) **20**: pp. 967-974.
- [101] Herne TM & Tarlov MJ. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* (1997) **119**: pp. 8916-8920.
- [102] Raehm L, Kern J, Sauvage J, Hamann C, Palacin S & Bourgoin J. Disulfide- and thiol-incorporating copper catenanes: synthesis, deposition onto gold, and surface studies. *Chemistry* (2002) **8**: pp. 2153-2162.
- [103] Noh J. Nano-identification for the Cleavage of Disulfide Bond during the Self-Assembly Processes of Unsymmetric Dialkyl Disulfides on Au(111). *Bull. Korean Chem. Soc.* (2005) **26**: pp. 553-557.
- [104] Yao X, Li X, Toledo F, Zurita-Lopez C, Gutova M, Momand J & Zhou F. Sub-attomole oligonucleotide and p53 cDNA determinations via a high-resolution surface plasmon resonance combined with oligonucleotide-capped gold nanoparticle signal amplification. *Anal Biochem* (2006) **354**: pp. 220-228.
- [105] Stewart ME, Anderton CR, Thompson LB, Maria J, Gray SK, Rogers JA & Nuzzo RG. Nanostructured plasmonic sensors. *Chem Rev* (2008) **108**: pp. 494-521.
- [106] Manera MG, Spadavecchia J, Taurino A & Rella R. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance imaging: application in a DNA hybridization process. *J. Opt.* (2010) **12**: p. 035003.
- [107] Trévisiol E, Le Berre Anton V, Leclaire J, Pratviel G, Caminade AM, Majoral JP, François JM & Meunier B. Dendrimer slides, dendrichips: a simple chemical functionalization of glass slides with phosphorus dendrimers as an effective means for the preparation of biochips. *New J. Chem* (2003) **27**: pp. 1713-1719.
- [108] Wark AW, Lee HJ, Qavi AJ & Corn RM. Nanoparticle-enhanced diffraction gratings for ultrasensitive surface plasmon biosensing. *Anal Chem* (2007) **79**: pp. 6697-6701.
- [109] Sathuluri RR, Yamamura S & Tamiya E. Microsystems technology and biosensing. *Adv Biochem Eng Biotechnol* (2008) **109**: pp. 285-350.
- [110] Nusz GJ, Marinakos SM, Curry AC, Dahlin A, Höök F, Wax A & Chilkoti A. Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod. *Anal Chem* (2008) **80**: pp. 984-989.
- [111] Lu M, Li XH, Yu BZ & Li HL. Electrochemical behavior of Au colloidal electrode through layer-by-layer self-assembly. *J Colloid Interface Sci* (2002) **248**: pp. 376-382.
- [112] Luan Q, Xue Y & Yao X. A simple hairpin DNA sensor for label-free detection of sub-attomole DNA target. *Sensors and Actuators B* (2010) **147**: pp. 561-565.

- [113] Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* (1989) **59**: pp. 521-529.
- [114] Jacobs SA, Podell ER & Cech TR. Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol* (2006) **13**: pp. 218-225.
- [115] Sharma HW, Sokoloski JA, Perez JR, Maltese JY, Sartorelli AC, Stein CA, Nichols G, Khaled Z, Telang NT & Narayanan R. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**: pp. 12343-12346.
- [116] Wang Y & Patel DJ. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG₃(T₂AG₃)₃] G-tetraplex. *Structure* (1993) **1**: pp. 263-282.
- [117] Parkinson GN, Lee MPH & Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* (2002) **417**: pp. 876-880.
- [118] Zahler AM, Williamson JR, Cech TR & Prescott DM. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* (1991) **350**: pp. 718-720.
- [119] De Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou J & Mergny J. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* (2008) **90**: pp. 131-155.
- [120] Ou T, Lu Y, Tan J, Huang Z, Wong K & Gu L. G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem* (2008) **3**: pp. 690-713.
- [121] Singh V, Azarkh M, Exner TE, Hartig JS & Drescher M. Human telomeric quadruplex conformations studied by pulsed EPR. *Angew Chem Int Ed Engl* (2009) **48**: pp. 9728-9730.
- [122] Luu KN, Phan AT, Kuryavyi V, Lacroix L & Patel DJ. Structure of the human telomere in K⁺ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold. *J Am Chem Soc* (2006) **128**: pp. 9963-9970.
- [123] Bertrand H, Monchaud D, De Cian A, Guillot R, Mergny J & Teulade-Fichou M. The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex-DNA by metal-terpyridine complexes. *Org Biomol Chem* (2007) **5**: pp. 2555-2559.
- [124] Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, Riou J, Mergny J, Mailliet P & Boussin FD. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* (2005) **24**: pp. 2917-2928.
- [125] De Cian A, Delemos E, Mergny J, Teulade-Fichou M & Monchaud D. Highly efficient G-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. *J Am Chem Soc* (2007) **129**: pp. 1856-1857.
- [126] Dixon IM, Lopez F, Estève J, Tejera AM, Blasco MA, Pratviel G & Meunier B. Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *ChemBiochem* (2005) **6**: pp. 123-132.
- [127] Pitié M, Pratviel G, Bernadou J & Meunier B. Preferential hydroxylation by the chemical nuclease meso-tetrakis-(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrinatomanganese(III) pentaacetate/KHSO₅ at the 5' carbon of deoxyriboses on both 3' sides of three contiguous A.T base pairs in short double-stranded oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) **89**: pp. 3967-3971.

- [128] Gray RD & Chaires JB. Kinetics and mechanism of K⁺- and Na⁺-induced folding of models of human telomeric DNA into G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res* (2008) **36**: pp. 4191-4203.
- [129] Risitano A & Fox KR. Influence of loop size on the stability of intramolecular DNA quadruplexes. *Nucleic Acids Res* (2004) **32**: pp. 2598-2606.
- [130] Bromley SD, Ward BW & Dabrowiak JC. Cationic porphyrins as probes of DNA structure. *Nucleic Acids Res* (1986) **14**: pp. 9133-9148.
- [131] De Cian A, Gros J, Guédin A, Haddi M, Lyonnais S, Guittat L, Riou J, Trentesaux C, Saccà B, Lacroix L, Alberti P & Mergny J. DNA and RNA quadruplex ligands. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* (2008) : pp. 7-8.
- [132] Monchaud D, Allain C, Bertrand H, Smargiasso N, Rosu F, Gabelica V, De Cian A, Mergny J & Teulade-Fichou M. Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: a rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* (2008) **90**: pp. 1207-1223.
- [133] Redman JE. Surface plasmon resonance for probing quadruplex folding and interactions with proteins and small molecules. *Methods* (2007) **43**: pp. 302-312.
- [134] Dixon IM, Lopez F, Tejera AM, Estève J, Blasco MA, Pratviel G & Meunier B. A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA. *J Am Chem Soc* (2007) **129**: pp. 1502-1503.
- [135] Myszka DG. Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology. *Anal Biochem* (2004) **329**: pp. 316-323.
- [136] Papalia GA, Leavitt S, Bynum MA, Katsamba PS, Wilton R, Qiu H, Steukers M, Wang S, Bindu L, Phogat S, Giannetti AM, Ryan TE, Pudlak VA, Matusiewicz K, Michelson KM, Nowakowski A, Pham-Baginski A, Brooks J, Tieman BC, Bruce BD, Vaughn M, Baksh M, Cho YH, Wit MD, Smets A, Vandersmissen J, Michiels L & Myszka DG. Comparative analysis of 10 small molecules binding to carbonic anhydrase II by different investigators using Biacore technology. *Anal Biochem* (2006) **359**: pp. 94-105.
- [137] Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ & Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) **99**: pp. 11593-11598.
- [138] Helaine S, Thompson JA, Watson KG, Liu M, Boyle C & Holden DW. Dynamics of intracellular bacterial replication at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) **107**: pp. 3746-3751.
- [139] Goley ED, Iniesta AA & Shapiro L. Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. *J Cell Sci* (2007) **120**: pp. 3501-3507.
- [140] Gordon GS & Wright A. DNA segregation in bacteria. *Annu Rev Microbiol* (2000) **54**: pp. 681-708.
- [141] Gruber S & Errington J. Recruitment of condensin to replication origin regions by ParB/SpoOJ promotes chromosome segregation in *B. subtilis*. *Cell* (2009) **137**: pp. 685-696.

- [142] Murray H & Errington J. Dynamic control of the DNA replication initiation protein DnaA by Soj/ParA. *Cell* (2008) **135**: pp. 74-84.
- [143] Ogura T & Hiraga S. Partition mechanism of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. *Cell* (1983) **32**: pp. 351-360.
- [144] Ebersbach G & Gerdes K. Plasmid segregation mechanisms. *Annu Rev Genet* (2005) **39**: pp. 453-479.
- [145] Ogasawara N & Yoshikawa H. Genes and their organization in the replication origin region of the bacterial chromosome. *Mol Microbiol* (1992) **6**: pp. 629-634.
- [146] Yamaichi Y & Niki H. Active segregation by the *Bacillus subtilis* partitioning system in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**: pp. 14656-14661.
- [147] Bouet J, Ah-Seng Y, Benmeradi N & Lane D. Polymerization of SopA partition ATPase: regulation by DNA binding and SopB. *Mol Microbiol* (2007) **63**: pp. 468-481.
- [148] Biek DP & Shi J. A single 43-bp sopC repeat of plasmid mini-F is sufficient to allow assembly of a functional nucleoprotein partition complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994) **91**: pp. 8027-8031.
- [149] Yates P, Lane D & Biek DP. The F plasmid centromere, sopC, is required for full repression of the sopAB operon. *J Mol Biol* (1999) **290**: pp. 627-638.
- [150] Helsberg M & Eichenlaub R. Twelve 43-base-pair repeats map in a cis-acting region essential for partition of plasmid mini-F. *J Bacteriol* (1986) **165**: pp. 1043-1045.
- [151] Ah-Seng Y, Lopez F, Pasta F, Lane D & Bouet J. Dual role of DNA in regulating ATP hydrolysis by the SopA partition protein. *J Biol Chem* (2009) **284**: pp. 30067-30075.
- [152] Mori H, Mori Y, Ichinose C, Niki H, Ogura T, Kato A & Hiraga S. Purification and characterization of SopA and SopB proteins essential for F plasmid partitioning. *J Biol Chem* (1989) **264**: pp. 15535-15541.
- [153] Schumacher MA, Piro KM & Xu W. Insight into F plasmid DNA segregation revealed by structures of SopB and SopB-DNA complexes. *Nucleic Acids Res* (2010) **38**: pp. 4514-4526.
- [154] Pillet F, Thibault C, Bellon S, Maillart E, Trévisiol E, Vieu C, François JM & Anton Leberre V. Simple surface chemistry to immobilize DNA probes that significantly increases sensitivity and spots density of surface plasmon resonance imaging based microarray systems. *Sensors and Actuators B* (2010) **147**: pp. 87-92.
- [155] Tian S, Armstrong NR & Knoll W. Electrochemically tunable surface-plasmon-enhanced diffraction gratings and their (bio-)sensing applications. *Langmuir* (2005) **21**: pp. 4656-4660.
- [156] Thibault C, Severac C, Trévisiol E & Vieu C. Microtransfer molding of hydrophobic dendrimer. *Microelectronic Engineering* (2006) **83**: pp. 1513-1516.

Publications réalisées au cours de la thèse

1. Flavien Pillet, Christophe Thibault, Sophie Bellon, Emmanuel Maillart, Emmanuelle Trévisiol, Christophe Vieu, Jean M. François, Véronique Anton Leberre.

Simple surface chemistry to immobilize DNA probes that significantly increases sensitivity and spots density of surface plasmon resonance imaging based microarray systems.

Sensors and Actuators B 147 (2010) 87–92.

2. Flavien Pillet, Carmen Romera, Emmanuelle Trévisiol, Sophie Bellon, Marie-Paule Teulade-Fichou, Jean-Marie François, Geneviève Pratviel, Véronique Anton-Leberre.

Screening of small molecules with surface plasmon resonance imaging (SPRi) technology for drug discovery (soumise).



Simple surface chemistry to immobilize DNA probes that significantly increases sensitivity and spots density of surface plasmon resonance imaging based microarray systems

Flavien Pillet^{a,b,c}, Christophe Thibault^{a,d}, Sophie Bellon^c, Emmanuel Maillart^c,
Emmanuelle Trévisiol^{a,b,e}, Christophe Vieu^{a,d}, Jean M. François^{a,b,e}, Véronique Anton Leberre^{a,b,e,*}

^a University of Toulouse, INSA, UPS, INP & INRA, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France

^b Biochips Platform Toulouse Genopole, F-31077 Toulouse, France

^c Horiba Scientific-Genoptics, Bat 503, Plateau du Moulon, F-91401 Orsay, France

^d CNRS, LAAS, 7 Avenue du Colonel Roche, F-31077 Toulouse, France

^e CNRS-UMR 5504, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés, F-31400 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 September 2009

Received in revised form 26 February 2010

Accepted 8 March 2010

Available online 16 March 2010

Keywords:

DNA immobilisation chemistry
Surface plasmon resonance imaging
DNA microarray
Gold nanoparticle

ABSTRACT

SPRi technology is a promising method for label-free detection and quantification of biomolecules interactions. In this present work, we present huge advance in multiplexing and reduction of the detection limit of SPRi technology, considering DNA interactions. We have used without electrodeposition an alternative chemistry for direct deposition of oligonucleotide probes on gold surface by using thiol-modified oligonucleotide probes. This immobilization of DNA probes is extremely efficient, reproducible and easy to implement. In addition we increased the spotting density up to 1000 spots, using commercial spotters dedicated to high-density microarrays. Increasing the roughness of the gold surface with gold nanoparticles prior to probe attachment, we amplified the optical signal of SPR by a factor 3 enabling the detection of DNA targets at concentrations as low as 2 nM. Finally, all these improvements make very attractive and competitive the SPRi technology.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Detection and quantification of biomolecular interactions have developed at a high pace during the last decade, not only for deciphering complexity of cellular activities, but as technological platforms for numerous applications in medical, agriculture and environmental fields. Among other, we can mention diagnostic of genetic diseases, single nucleotide polymorphism detection [1], micro-RNA screening [2], detection of food-borne pathogens [3]. Fluorescent-based and enzyme-linked assays have a long tradition as bioanalytic tools. They offer the possibility of high-throughput screening and are well established for routine and highly parallel

analysis down to very low limits of detection [4,5]. This is exemplified by DNA microarrays technology for which detection and monitoring of DNA hybridization relies on the use of radiolabel or fluorescent probes [6–8]. Nevertheless, these fluorescent-based detections are costly, time-consuming and provide end-points data, which may lose in some cases the molecular interaction events. This has focused the interest in academic and in industry on the development of label-free, cost-effective biosensor methods for detecting interaction based on optical [9], micromechanical [10] or mass sensors [11]. Despite the fact that each of these methods has its own strengths and weaknesses, the optical biosensor based on surface plasmon resonance (SPR) on gold thin film is fast becoming the method of choice for affinity biosensing applications [12]. SPR spectroscopy is a surface sensitive technique that can be used to detect refractive index changes that occur within the evanescent field of propagating surface plasmon polaritons (SPPs) excited at metal–dielectric interfaces. A change in refractive index shifts the plasmon resonance condition, which can be detected as intensity, wavelength, or angle shifts to provide quantitative information about the binding event.

The surface plasmon resonance imaging (SPRi) is a label-free, surface spectroscopic method that presents the advantage over the conventional SPR sensor system, such as Biacore system [13], to

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; BSA, bovine serum albumin; CCD, charge coupled device; DNA, deoxyribonucleic acid; DTT, dithiothreitol; EDC, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; LOD, limit of detection; MUA, 11-mercaptoundecanoic acid; NHS, N-hydroxysuccinimide; PTV, the roughness peak to valley; RNA, ribonucleic acid; SAM, self-assembled monolayers; SNP, single nucleotide polymorphism; SNR, signal/noise ratio; SPPs, surface plasmon polaritons; SPRi, surface plasmon resonance imaging.

* Corresponding author at: LISBP/INSA, 135 Avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

E-mail address: Leberre@insa-toulouse.fr (V.A. Leberre).

detect multiple interactions onto an array of biomolecules covalently attached to chemically modified surface of a gold coated prism using a CCD camera [14]. A key parameter, among others, for high sensitivity and specificity of sensor arrays is the introduction of effective surface modification chemistry for probes biomolecules immobilization on the prism surface. Not only the immobilization of these biomolecules on the surface must give rise to uniform and reproducible signals but need to be enough stable for allowing re-use of the sensor arrays. Moreover, the surface modification should allow specific and optimal accessibility of the targets to the immobilized probes. The combination of these two properties should give the highest signal/noise ratio. In the case of probes attachment, among the currently chemical procedures used with SPRI devices, there is the electro-controlled copolymerisation of a pyrrole-modified biomolecules in the presence of free pyrrole [15,16]. Another method is the electrically addressable deposition of diazonium-modified probes on gold surface obtained by electroreduction of diazonium cation that results in the covalent linkage of the probes on the surface [17,18]. However, in both cases, the immobilization process is not compatible with simple mechanical spotters, as it requires a specific electrode device. Use of thiol containing molecules that organize as oriented and stable self-assembled monolayers (SAM) is an interesting alternative to electrical stimulation. As an example, the free carboxyl group of the 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) used to obtain a negatively charged SAM [19] can be activated by water soluble carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) to allow covalent linkage of NH₂-modified probes [20]. Another strategy for probes immobilization consists in modifying gold surface with multiple layers to obtain a last layer of ExtrAvidin which binds biotinylated probes [21,22]. However, this modification chemistry is relatively tedious because it needs multiple steps to produce the activated surface prior to deposit the probes.

Wang et al. [23] demonstrated that immobilisation procedure based on the direct coupling of thiol-derivatised oligonucleotide probes to gold sensor surfaces can be used for DNA sensing applications. But just the two commercially available instruments BIACORE XTM and SPREETATM, have been employed in this study. The great advantage of the SPRI-Plex system from Genoptics compared to other commercial instruments like Biacore[®] and Biorad[®] system is the analysis in parallel of more than hundred interactions. In this paper, we demonstrated that the immobilization of DNA probes on gold surface using thiol-modified oligonucleotide probes modified at their 5' extremity with a C6-SH group can be applied on the SPRI Plex from genoptics and is extremely efficient, and easy to build. Deposition carried out on non-modified gold surface (or plain gold SPRI-BiochipTM), did not require electrical stimulation and expensive specific robotic devices. The thiol modification of the probes was shown to be very stable at room temperature, contrary to pyrrole and diazonium probes that need to be prepared just prior to their spotting. In addition, the detection limit of complementary DNA strand to the DNA probes was decreased to the nanomolar scale when the thiols probes were bound to 50 nm gold nanoparticles deposited on the prism prior to spotting. Finally, this simple grafting chemistry allows increasing the array density to more than 1000 different spots on the same chip, with a simple and cost-effective mechanical spotter.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Synthetic amino (NH₂) and thiol (SH) modified oligonucleotide probe molecules and non-modified oligonucleotide target molecules were obtained from *Operon* (Germany). Pyrrole-

modified oligonucleotide probes were either purchased from *Eurogentec* (Belgium) or prepared by ourselves by pyrrolation of amino-modified oligonucleotides. The pyrrolation was carried out in 100 μL of a solution containing 50 μM oligonucleotides, 5 mM pyrrole-N-hydroxysuccinimide, 20 mM NaHCO₃ at pH 8.2, for 2 h at room temperature in the dark. Diazonium-modified oligonucleotides were made from aminobenzyl-amine oligonucleotides (*Eurogentec*) in presence of 10 mM HCl and 10 mM NaNO₂, during 10 min at 4 °C. The oligonucleotide sequences probes (25 and 70 mer) used are designed from the yeast *HSP12* gene and DNA targets (25 and 70 mer) were complementary to the oligonucleotide probes. The sequences are: *Probe25mer*^{5'}-TTA CTT CTT GGT TGG GTC TTC TTC A; *Probe70mer*^{5'}-TTA CTT CTT GGT TGG GTC TTC ACC GTG GAC ACC ACC GGA AAC ATA TTC GAC GGC ATC GTT CAA CTT G; *Random25mer*^{5'}-CGT AGC ATA TAG ACA TAC GAT CTA C; *Target25mer*^{5'}-TGA AGA AGA CCC AAC CAA GAA GTA A; *Target70mer*^{5'}-CAA GTT GAA AGA TGC CGT CGA ATA TGT TTC CGG TCG TGT CCA CGG TGA AGA AGA CCC AAC CAA GAA GTA A.

2.2. SPRI-BiochipsTM fabrication and surface modification

SPRI-BiochipsTM (prism) were designed exclusively for GenOptics SPRI systems (France). The chips were made of a high refractive index glass prism coated by vacuum-evaporation with a 50 nm gold thin film specially developed for imaging purposes. Modification of prism surface by gold nanoparticles were obtained by cleaning the prism surface for 5 min by oxygen plasma treatment (1000 ml/min at 300 W), followed by immersion of the prism for 1 h in absolute ethanol containing 20 mM of dithiothreitol (DTT) (Sigma–Aldrich, USA) and then 1 h incubation with gold colloids (BBInternational, UK) commercial suspension. Three different sizes of gold nanoparticles were employed for SPRI experiments, 10, 50 and 100 nm. Gold nanoparticles at 40 nm size were used for AFM characterizations. The nanoparticle-coated prisms were washed briefly in ethanol solution prior to use.

2.3. Spotting and conditions

Different buffers were employed for these experiments. A buffer typically used for electrospeaking of pyrrole oligonucleotides, named "pyrrole buffer" containing 20 mM monomers of pyrrole, PO₄ 50 mM, NaCl 50 mM, glycerol 10%, at pH 6.8. A commercial buffer 3X SSC (Sigma, USA) used for DNA microarray spotting (450 mM NaCl and 45 mM sodium citrate at pH 7). The diazonium-modified oligonucleotides were immediately deposited after diazotation reaction in the solution.

Contrary to Biacore[®] and Biorad[®] system (working on flow channels), spotting was realized apart from SPRI analysis device. Electrospeaking of pyrrole-modified DNA probes (2.4 V, 250 ms) and diazonium-modified DNA probes (−2 V, 2 s) were carried out on a modified Omnigrad Micro with a solid pin of 500 μm of diameter. The contact deposition of pyrrole- and SH-modified DNA were realized either on the Omnigrad Micro with the solid pin or on the ChipWriterPro with a quill pin of 150 μm of diameter.

2.4. SPRI detection

After oligonucleotide deposition, SPRI-Plex array system from Genoptics (France) was used for biomolecular interaction in working buffer, PBS 10 mM at pH 7.4 with 158 mM NaCl at a flow rate of 50 μl/min. The measurement of the reflectivity around the resonance angle allowed precise selection of the working angle for the kinetic measurements. The angle of incidence was then chosen at the point of maximum slope of the reflectivity dip caused by SPR. At this fixed angle, the amount of molecules bound to the probes is

directly related to the reflectivity variation. Before target injections, the prism surface was saturated by injection of BSA in Denhardt buffer (Sigma, USA), 0.02% albumin serum, 0.02% ficoll and 0.02% polyvinylpyrrolidone. Injections of target molecules were carried out in 200 μL of working buffer with a 200 μL loop injection valve. The surface was regenerated with NaOH 100 mM. Data were analyzed with Genoptics software *SPRi1000*. The reflectivity responses were obtained after subtraction of background on gold surface.

2.5. Atomic force microscopy (AFM)

AFM characterizations were carried out on a JPK Nano Wizard II. The AFM tips used were Veeco MLCT with a spring constant of 1 N m^{-1} . Surface topography was not investigated directly on a prism surface but on silicon chips metallized with a 50 nm gold thin film either without nanoparticle or after nanoparticle deposition. The surface roughness was quantified by the “peak to valley” measurement.

3. Results and discussion

3.1. Probe molecules fixation

Influence of the immobilization technique of DNA probes on the transducer sensitivity of the SPRi instrument was investigated by comparing direct spotting of thiol-modified (SH) probes with the electrical stimulation chemistry of diazonium and pyrrole-modified oligonucleotides, which are widely used with the SPRi-Plex system [24,17]. For each type of surface chemistry, a 25 mers DNA probes were spotted at a single concentration of 30 μM on the prism surface. In preliminary experiment we observed no interaction of the target injected with the negative control (Random 25 mer) or with the gold surface. Therefore for all the experiments present in this paper, we took gold surface as reference. Fig. 1 shows the reflectivity response of the SPRi system when a 25 mer oligonucleotide target complementary to the probe was injected at a single concentration of 1 μM onto three different arrays. The reflectivity response using thiol-modified probes (0.896%) was, respectively, 20 and 70% higher than the one with dia-

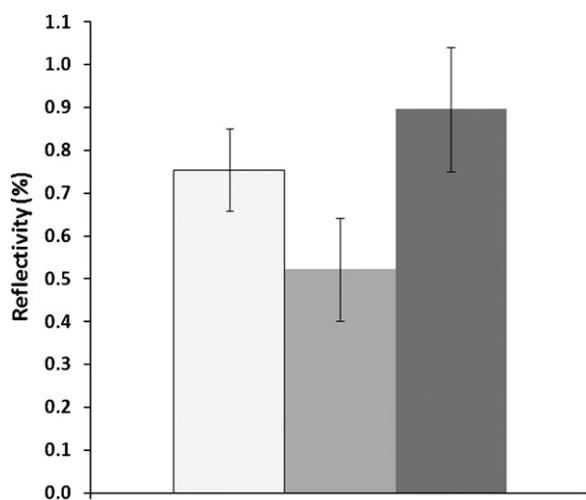


Fig. 1. Reflectivity response of SPRi system using array sensors made with three different surface chemistries to attach the 25 mer DNA probes on the prism gold surface of the biosensor. The production of arrays was done by electrical stimulation of diazonium-modified probes (□), pyrrole-modified probes (▒) or by direct spotting of SH-modified probes (■) on the SPRi-BiochipsTM. A 25 mer oligonucleotide complementary to the spotted DNA probes was injected on the arrays at a 1 μM concentration. The error bars represent the standard deviation based on three independently experiment obtained from three SPRi-BiochipsTM.

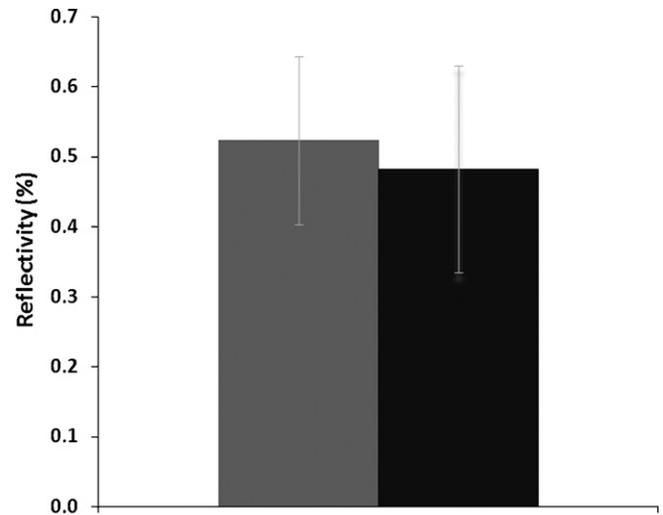


Fig. 2. Effect of the electrical stimulation on the reflectivity response of SPRi system using array sensors made with 25 mer pyrrole-modified probes. The spotting on SPRi-BiochipsTM (gold surface prism) of pyrrole-modified probes was made with (□) or without (■) electrical stimulation. The error bars represent the standard deviation based on three independently experiment obtained from three SPRi-BiochipsTM.

zonium (0.755%) and with pyrrole-modified DNA probes (0.523%). In addition, we found that the electro-polymerization attachment of the pyrrole-modified DNA probes on the gold surface of the prism (Fig. 2) was apparently not necessary since similar or even slightly higher reflectivity responses were found without imposing this electrical stimulation, which was previously described as the method for attachment of the biomolecules on this gold surface [15,24]. These results corroborated that a simple contact deposition works perfectly and can be compared favourably with other existing methods. It can be noticed that the reflectivity response of arrays made with diazonium-modified DNA probes was comparable than those bearing SH-modified DNA probes (see Fig. 1). However, the instability of diazonium ions and their fragmentation into nitrogen and reactive phenyl intermediates [25] due their long preparation do not favour the latter for the production of SPRi.

3.2. Probe molecules stability

Prior to develop a high-density array with SH-modified DNA probes, we had to verify the stability of these modified probes, since it is known that thiol function can form disulfide bonds (–S–S–) by oxidation at room temperature. These disulfide bridges could contribute to alter the structure of the probe, which might result in inconsistent probe density immobilization on the gold surface. To evaluate this problem, and therefore verify the reproducibility of the reflectivity response, we spotted the same SH-modified DNA probes on the gold surface with a time interval ranging between 2 and 20 h leaving the probe in solution at room temperature between two successive spotting times. We observed no difference in the reflectivity response for arrays made with freshly diluted SH-modified probes in the buffer (time 0) or with the same probes left for 20 h at room temperature prior to spotting (Fig. 3a). This result indicates either the possibility that disulfide bonds possible did not interfere with their attachment on the gold surface, or that there was no disulfide bond formed. Whatever the reason, this result was actually consistent with an earlier observation that the formation of disulfide bond does not have any effect on the grafting and availability of the probes molecules [26,27].

Since the DNA probes are covalently attached by S–Au bond on the prism surface, these arrays can be reused several times, more precisely the average relative signal loss is as low as 0.6%

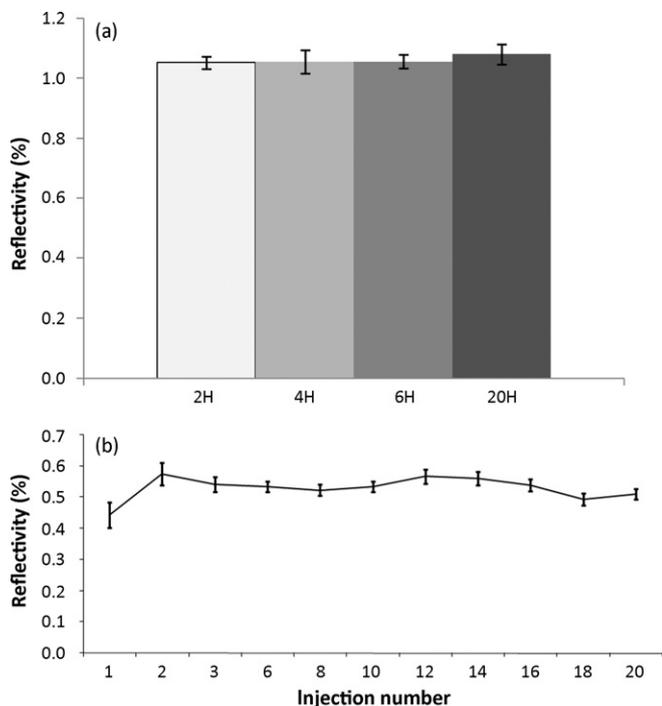


Fig. 3. Stability of 25 mer SH-modified probes at room temperature. (a) DNA probes were deposited at time interval ranging between 2 and 20 h (H) leaving the probe in solution at room temperature and reflectivity response was observed in SPRI after target injections at a 1 μ M concentration. The error bars represent the standard deviation during experiment, between eight different spots. (b) The stability and reproducibility of the SPRI system DNA biochips was evaluated by a 20 successive injection of a 25 mer oligonucleotide targets at 50 nM.

per injection as indicated by the same reflective response signal after 20 successive injections of the targets on the same array with a regeneration step between each target injection (Fig. 3b). In addition, we found that our thiol-modified DNA SPRI-BiochipsTM were extremely stable and robust, since incubation of these biochips at 65 °C for 30 min prior to injection of the targets did not modify the hybridization capacity as measured by the reflectivity response even after 6 months (data not shown). This result could be relevant for the future use of these SPRI-BiochipsTM in genomics, as for instance for single nucleotide polymorphism (SNP) detection.

3.3. Increase of the sensitivity using gold nanoparticles

Today fluorescence-based assays are more sensitive than SPRI method allowing very low limits of detection (picomolar range) [24]. A big issue of label-free detection is therefore to lower the limit of detection (LOD) (here, this parameter is defined as the minimal target concentration that gives a response 2-fold above the background), which is currently around 50 nM for small DNA targets using standard protocol of SPR imaging. To reduce this LOD, it is important to increase the signal/noise ratio (SNR). We therefore aimed at increasing the interaction signal by testing other surface modification. The detection limit can be improved by coupling the molecular recognition of the analyte at the surface of the metal with another event that leads to larger changes in the SPR signal. In this perspective, labelling the target analyte with gold (Au) or silver (Ag) nanoparticles can increase the SPR output [28]. Alternatively, the nanoparticles can be first immobilized on surfaces to increase the signal detection [29–31].

We decided to test this latter method by deposition of gold nanoparticles of 10, 50 and 100 nm diameter on the gold prism surface, with the expectation to increase the probe molecules density or their availability for interacting with targets. After contact

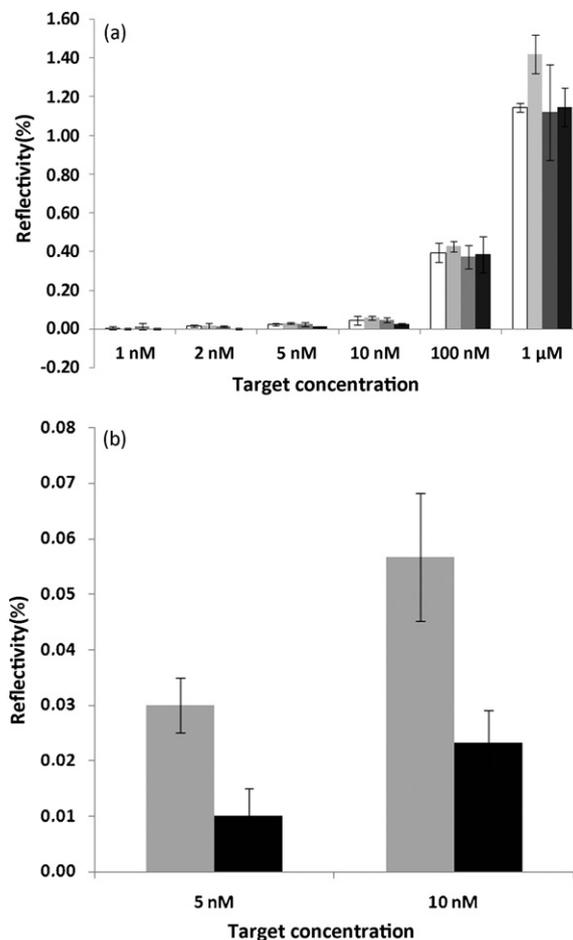


Fig. 4. Reflectivity response of the SPRI using SPRI-BiochipsTM modified or not, with gold nanoparticles of different size. (a) SPRI-BiochipsTM (gold surface prism) were first coated with gold nanoparticles of 10 nm (□), gold 50 nm (■), or 100 nm (■) or without nanoparticles (■) prior to the deposition of 25 mers SH-modified DNA probes. The response was obtained after injection of complementary targets at concentration ranging from 1 nM to 1 μ M. (b) Zoom of the reflectivity response of a prism surface coated with gold nanoparticles of 50 nm (■) and without gold nanoparticles (■) after injection of target molecules at concentrations ranging from 5 to 10 nM. For each surface, the error bars represent the standard deviation based on three independently experiment obtained from three SPRI-BiochipsTM.

deposition of 70 mer SH-modified DNA probes on the modified surface, the reflectivity response after hybridization with 70 mer target concentrations ranging from 1 nM to 1 μ M was measured and compared with and without gold nanoparticles on the surface (Fig. 4a). The use of gold nanoparticles turned out to improve the SPR signal, mainly for target concentration in the lower range of 2–5 nM. As shown in Fig. 4b, the reflectivity response of gold surface prism modified with 50 nm gold colloidal nanoparticles and bearing SH-probes was 2–3-fold higher than the gold surface bearing directly the SH-modified probes with a nanomolar target concentration. With this additional surface modification, it was possible to detect 2 nM of DNA target. This result indicates that the adsorption of gold nanoparticles onto the gold surface of the prism is a convenient method to enhance the signal obtained by SPRI. The origin of this improvement may be related to the modification of the roughness of the surface which increases the density of probe molecules grafted on the surface or alternatively to an electromagnetic effect related to the specific plasmonic resonance in such nanoparticles. In order to quantify the roughness developed on the prism surface by the nanoparticles, we have performed characterizations by AFM imaging (see Fig. 5). The roughness peak to valley (PTV) for simple gold surface (Fig. 5a) and gold colloidal nanoparticles

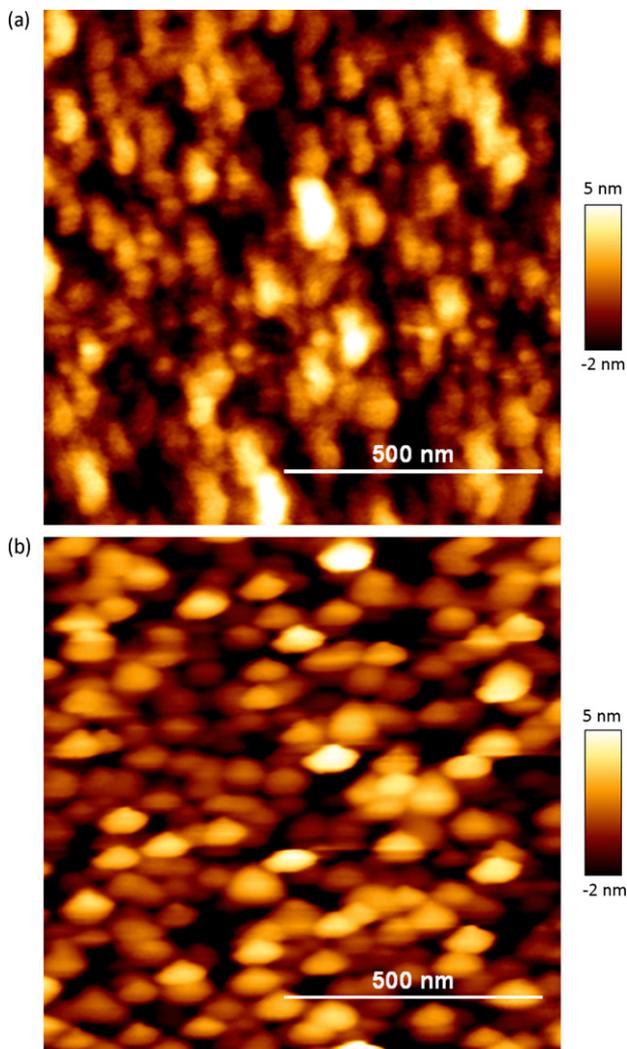


Fig. 5. AFM images of a thin gold film (a) deposited on a silicon wafer, same film after coating with 40 nm gold nanoparticles (b).

(Fig. 5b) surface was, respectively, of 9.4 and 12.76 nm. This 40% increase on the surface approximately multiplies by a factor of 2 the developed surface which could account for the observed improvement of the SPRi signal. However, and particularly at high target concentration, the signal obtained by SPRi is not proportional to the surface increase. These results suggest the presence of another phenomenon to improve SPRi signal.

3.4. Production of high-density SPRi arrays

Electrical stimulation needs an electrode adapted onto a needle in order to generate the electrochemical reaction for the attachment of the diazonium or pyrrole-modified DNA probes. This technique is less flexible and less productive compared to a simple and direct spotting with a mechanical robot or with microcontact printing technique [32]. To exemplify this capability, we have used SH-modified DNA probes to generate high-density biochips array for SPRi exhibit higher multiplexing than those microchannel systems [13]. We show in Fig. 6 that we were able to graft up to 1050 SH-modified spots on the prism gold surface using SMP3 quill pins from Telechem Array It, each spot being 150 μm in diameter. Moreover, we could monitor the hybridization kinetics of these 1050 probes after injection of 1 μM target on the arrays, giving simi-

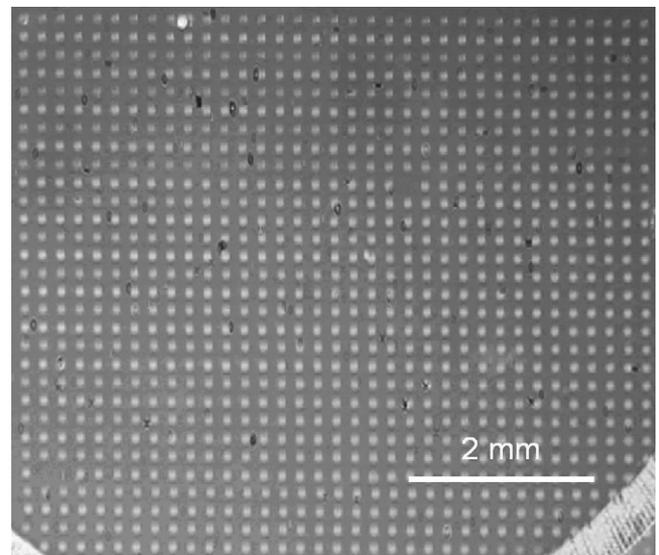


Fig. 6. Image obtained from the prism with SPRi-Plex device. SH-modified 25 mers oligonucleotides spotted on a SPRi prism using a quill pin with the spotter Chip Writer Pro from Biorad, in a microarray of 1050 sites with a diameter of 150 μm .

lar reflectivity response than those measured on spots of higher diameter (data not shown).

4. Conclusion

We established that direct deposition of DNA probes on gold surface using thiol-modified oligonucleotides is a remarkable alternative of the electro-controlled copolymerization of pyrrole- or diazonium-modified oligonucleotides classically recommended for SPRi technology. Electrical stimulation needs appropriate equipment and is less flexible than direct spotting methods. From our experiments, we conclude that this deposition chemistry is very efficient, robust, reproducible and easy to implement. This procedure is faster than gold surface functionalisation with self-assembled monolayers (SAMs). Moreover, the thiol-modified oligonucleotides immobilization does not require any specific equipment, and is compatible with commercial spotters devoted to high-density microarrays. It is the first time that high-density SPRi prisms with more than a thousand of different DNA probes fixed on the surface are proposed. Another major advance reported in this paper was to show that using 50 nm gold nanoparticles fixed on the prism surface prior to spot the probes, an increase of 2–3 in the reflectivity response of gold surface prism has been obtained, allowing a detection of DNA targets at concentrations as low as 2 nM.

Altogether, these improvements may bring the SPRi technology very attractive and competitive towards current biosensors useful in genomics studies as for example; genotyping analysis, environment or food pathogen detection.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Genoptics SA, the Region Midi Pyrénées (grant no. 06001327) and from Genopole Toulouse. We thank our colleagues at the Biochips platform Toulouse Genopole and Genoptics SA for fruitful discussion during this work.

References

- [1] S. Heinrichs, R.V. Kulkarni, C.E. Bueso-Ramos, R.L. Levine, M.L. Loh, C. Li, D. Neuberger, S.M. Kornblau, J. Issa, D.G. Gilliland, G. Garcia-Manero, H.M. Kan-

- tarjian, E.H. Estey, A.T. Look, Accurate detection of uniparental disomy and microdeletions by SNP array analysis in myelodysplastic syndromes with normal cytogenetics, *Leukemia* 23 (2009) 1605–1613.
- [2] D. Sarkar, R. Parkin, S. Wyman, A. Bendoraitis, C. Sather, J. Delrow, A.K. Godwin, C. Drescher, W. Huber, R. Gentleman, M. Tewari, Quality assessment and data analysis for microRNA expression arrays, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) e17.
- [3] M. Kostrzynska, A. Bachand, Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens, *Can. J. Microbiol.* 52 (2006) 1–8.
- [4] M. Campàs, I. Katakis, DNA biochip arraying, detection and amplification strategies, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1.
- [5] J. Bowden, P. Brennan, DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons, *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 42 (2004) 542–545.
- [6] B. Fouqué, B. Schaack, P. Obeid, S. Combe, S. Gétin, P. Barrिताult, P. Chaton, F. Chatelain, Multiple wavelength fluorescence enhancement on glass substrates for biochip and cell analyses, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2335–2340.
- [7] H. Kohlhammer, C. Schwaenen, S. Wessendorf, K. Holzmann, H.A. Kestler, D. Kienle, T.F.E. Barth, P. Möller, G. Ott, J. Kalla, B. Radlwimmer, A. Pscherer, S. Stilgenbauer, H. Döhner, P. Lichter, M. Bentz, Genomic DNA-chip hybridization in t(11;14)-positive mantle cell lymphomas shows a high frequency of aberrations and allows a refined characterization of consensus regions, *Blood* 104 (2004) 795–801.
- [8] J. Deng, X. Zhang, Y. Mang, Z. Zhang, Y. Zhou, Q. Liu, H. Lu, Z. Fu, Oligonucleotide ligation assay-based DNA chip for multiplex detection of single nucleotide polymorphism, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1277–1283.
- [9] J.D. Suter, I.M. White, H. Zhu, H. Shi, C.W. Caldwell, X. Fan, Label-free quantitative DNA detection using the liquid core optical ring resonator, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1003–1009.
- [10] F. Tian, K.M. Hansen, T.L. Ferrell, T. Thundat, D.C. Hansen, Dynamic microcantilever sensors for discerning biomolecular interactions, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1601–1606.
- [11] D.L. Polla, A.G. Erdman, W.P. Robbins, D.T. Markus, J. Diaz-Diaz, R. Rizq, Y. Nam, H.T. Brickner, A. Wang, P. Krulvitch, Microdevices in medicine, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2 (2000) 551–576.
- [12] M. Piliarik, H. Vaisocherová, J. Homola, Surface plasmon resonance biosensing, *Methods Mol. Biol.* 503 (2009) 65–88.
- [13] Y.N. Abdiche, D.S. Malashock, A. Pinkerton, J. Pons, Exploring blocking assays using Octet, ProteOn, and Biacore biosensors, *Anal. Biochem.* 386 (2009) 172–180.
- [14] P. Guedon, T. Livache, F. Martin, F. Lesbire, A. Roget, G. Bidan, Y. Levy, Characterization and optimization of a real-time, parallel, label-free, polypyrrole-based DNA sensor by surface plasmon resonance imaging, *Anal. Chem.* 72 (2000) 6003–6009.
- [15] T. Livache, P. Guedon, C. Brakha, A. Roget, Y. Levy, G. Bidan, Polypyrrole electrospotting for the construction of oligonucleotide arrays compatible with a surface plasmon resonance hybridization detection, *Synth. Met.* 121 (2001) 1443–1444.
- [16] L. Grosjean, B. Cherif, E. Mercey, A. Roget, Y. Levy, P.N. Marche, M. Villiers, T. Livache, A polypyrrole protein microarray for antibody-antigen interaction studies using a label-free detection process, *Anal. Biochem.* 347 (2005) 193–200.
- [17] B. Corgier, C. Marquette, L. Blum, Diazonium–protein adducts for graphite electrode microarrays modification: direct and addressed electrochemical immobilization, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 18328–18332.
- [18] R. Polsky, J.C. Harper, D.R. Wheeler, S.M. Dirk, D.C. Arango, S.M. Brozik, Electrically addressable diazonium-functionalized antibodies for multianalyte electrochemical sensor applications, *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 757–764.
- [19] C. Jordan, B. Frey, S. Kornguth, R. Corn, Characterization of poly-L-lysine adsorption onto alkanethiol-modified gold surfaces with polarization-modulation Fourier transform infrared spectroscopy and surface plasmon resonance measurements, *Langmuir* 10 (1994) 3642–3648.
- [20] L. Jang, H. Keng, Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer, *Biomed. Microdevices* 10 (2008) 203–211.
- [21] N. Bassil, E. Maillart, M. Canva, Y. Lévy, M. 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, *Sens. Actuators B* 94 (2003) 313–323.
- [22] I. Mannelli, L. Lecerf, M. Guerrouache, M. Goossens, M. Millot, M. Canva, DNA immobilisation procedures for surface plasmon resonance imaging (SPRI) based microarray systems, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 803–809.
- [23] R. Wang, S. Tombelli, M. Minunni, M.M. Spiriti, M. Mascini, Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 967–974.
- [24] T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, Y. Levy, Polypyrrole based DNA hybridization assays: study of label free detection processes versus fluorescence on microchips, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 687–696.
- [25] S. Dahmen, S. Bräse, The first stable diazonium ion on solid support—investigations on stability and usage as linker and scavenger in solid-phase organic synthesis nitrogen-based linkers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 3681–3683.
- [26] L. Raehm, J. Kern, J. Sauvage, C. Hamann, S. Palacin, J. Bourgoin, Disulfide- and thiol-incorporating copper catenanes: synthesis, deposition onto gold, and surface studies, *Chemistry* 8 (2002) 2153–2162.
- [27] J. Noh, Nano-identification for the cleavage of disulfide bond during the self-assembly processes of unsymmetric dialkyl disulfides on Au(111), *Bull. Kor. Chem. Soc.* 26 (2005) 4.
- [28] M.E. Stewart, C.R. Anderton, L.B. Thompson, J. Maria, S.K. Gray, J.A. Rogers, R.G. Nuzzo, Nanostructured plasmonic sensors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 494–521.
- [29] A.W. Wark, H.J. Lee, A.J. Qavi, R.M. Corn, Nanoparticle-enhanced diffraction gratings for ultrasensitive surface plasmon biosensing, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6697–6701.
- [30] R.R. Sathuluri, S. Yamamura, E. Tamiya, Microsystems technology and biosensing, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 109 (2008) 285–350.
- [31] G.J. Nusz, S.M. Marinakos, A.C. Curry, A. Dahlin, F. Höök, A. Wax, A. Chilkoti, Label-free plasmonic detection of biomolecular binding by a single gold nanorod, *Anal. Chem.* 80 (2008) 984–989.
- [32] C. Thibault, V. Le Berre, S. Casimirus, E. Trévisiol, J. François, C. Vieu, Direct microcontact printing of oligonucleotides for biochip applications, *J. Nanobiotechnol.* 3 (2005) 7.

Biographies

Flavien Pillet is currently a PhD student of Horiba Scientific – GenOptics, he is working in Biochip Platform, LISBP-INSA in France. His current interests are in the area of Surface Plasmon Resonance imaging and biosensors.

Christophe Thibault is “Maitre de Conférence” INSA Toulouse France. His is developing a novel method for multiplexing the Micro-Contact Printing technique which targets the deposition of 100–1000 different molecules in one step in the group «Nano-addressing/Nanobiotechnologies» LAAS-CNRS, Toulouse France.

Sophie Bellon, PhD, she is in charge of application development in Horiba Scientific – GenOptics since 2007.

Emmanuel Maillart, optical engineer from Institut d’Optique Graduate school (Orsay, France), he is PhD on the development of Surface Plasmon Resonance imaging system in the Institut d’Optique. Since 2005 he is in charge of instrumentation development working in GenOptics.

Emmanuelle Trévisiol CR1-CNRS. She is the chemist of the Biochip Platform located at the LISBP/INSA Toulouse France. She is working on chemistry for surface functionalisation and application to biochips.

Christophe Vieu is professor INSA Toulouse France. Director of the Group «Nano-addressing/Nanobiotechnologies» LAAS-CNRS, Toulouse France.

Jean-Marie François Professor INSA Toulouse France. Head of the Biochip Platform located at the LISBP/INSA Toulouse France.

Véronique Anton-LeBerre CR1-CNRS. She is working on the development of new technology of biochip: Biopatterning and Biodetection at the Biochip Platform located at the LISBP/INSA Toulouse France.