

N° d'ordre : 2014 - 52

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

délivrée par l'ÉCOLE CENTRALE DE LYON (France) en cotutelle avec l'UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE (Canada)

Spécialité : STIC Santé et Micro et Nano Technologies École Doctorale : Électronique, Électrotechnique et Automatique (EEA) - ED 160

Soutenue publiquement le 18 décembre 2014 à ÉCULLY (France)

par Amandine CORNILLON

préparée à l'INSTITUT DES NANOTECHNOLOGIES DE LYON (UMR5270)

Test de génotypage plaquettaire *in vitro* à base de sandwichs de microparticules biofonctionnalisées. Détection par capteur de fluorescence à ondes évanescentes, imagerie de fluorescence et cytométrie en flux

Composition du jury :

M. Jean-Pierre CLOAREC	Professeur – École Centrale de Lyon	Directeur de thèse
M. Paul G. CHARETTE	Professeur – Université de Sherbrooke	Directeur de thèse
Mme Éliane SOUTEYRAND	Directrice de Recherche CNRS – École Centrale de Lyon	Directrice de thèse
M. Denis BOUDREAU	Professeur – Université Laval - Québec	Rapporteur
Mme. Christine MÉNAGER	Professeur - Université Pierre et Marie Curie - Paris	Rapporteur
M. Réjean FONTAINE	Professeur – Université de Sherbrooke	Rapporteur
Mme Marie-Hélène DELVILLE	Directrice de Recherche CNRS – Institut de Chimie et de Matière condensée de Bordeaux	Présidente du jury
M. Yves MÉRIEUX	EFS Rhône-Alpes site de Gerland - Lyon	Invité
M. Manfred SCHAWALLER	CEO Davos Diagnostics - Davos	Invité



À mes grands-parents

« Ever tried. Ever failed. No matter. Try again. Fail again. Fail better. », Samuel Beckett, Worstward Ho, 1983

RÉSUMÉ

Cette thèse porte sur l'élaboration d'un outil de capture d'ADN permettant d'identifier une mutation génétique (SNP) grâce à la formation de sandwichs avec des particules de carboxylatex biofonctionnalisées avec des oligonucléotides couplée à une détection de la fluorescence. Le modèle biologique choisi pour ce projet est le génotypage plaquettaire et plus particulièrement la recherche du gène biallélique HPA-1.

Le principal objectif de ce travail a été d'optimiser un outil de capture préalablement développé dans l'équipe (*Trévisan, 2011*) afin de réduire le nombre d'étapes et de simplifier la mise en œuvre globale du test en modifiant les interactions moléculaires utilisée pour capturer l'ADN cible et en utilisant des particules fluorescentes comme élément de détection. En présence d'ADN cible, des sandwichs sont formés entre les particules fluorescentes et les particules magnétiques biofonctionnalisées. Ces sandwichs sont purifiés par séparation magnétique et la fluorescence est détectée par trois méthodes : la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et l'Evareader (détection par ondes évanescentes).

Dans un premier temps, les paramètres de fonctionnalisation chimique et biologique des différentes particules (magnétiques et fluorescentes) ont été déterminés et optimisés ainsi que les conditions d'hybridation pour la capture de l'ADN cible.

Ensuite, la formation des sandwichs et leur détection ont été suivies par des mesures de fluorescence en utilisant trois méthodes différentes : la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et l'Evareader (capteur à ondes évanescentes). Les résultats obtenus avec les différentes méthodes de détection sont concordants et montrent que l'outil de capture d'ADN développé permet de capturer la cible synthétique (oligonucléotide) HPA-1 en réduisant le temps d'analyse de 45 min. Dans nos conditions, le test permet de discriminer l'allèle a de l'allèle b du gène HPA-1 qui ne diffère que d'un nucléotide. Le rapport des signaux de fluorescence issus du sandwich spécifique et du sandwich non spécifique est d'environ 2,5 à 3. Ce rapport devra être amélioré par la suite, en optimisant les conditions de formation des sandwichs.

La prochaine étape consistera à optimiser le système de capture d'ADN développé pour gagner en spécificité et déterminer la limite de détection du test. Ce test devra également être validé avec des échantillons biologiques.

A plus long terme, la fluorescence pourra être détectée par un photodétecteur miniaturisé actuellement développé à l'Université de Sherbrooke. Des études préliminaires présentées dans ce manuscrit montrent les potentialités de ce nouveau transducteur.

<u>Mots-clés</u>: Microparticules magnétiques, microparticules fluorescentes, sandwichs, génotypage plaquettaire, capteur à ondes évanescentes, cytométrie en flux, oligonucléotide

i

ABSTRACT

This thesis is about the development of a new assay to capture DNA. This assay is based on the formation of sandwiches between biofunctionnalized with oligonucleotides carboxylatex microparticles combined with fluorescence detection. It should be able to discriminate single nucleotide polymorphism (SNP). This assay is designed to be applied to platelet genotyping for the research of the gene HPA-1.

The main goal of this work was to improve an assay previously developed (*Trévisan, 2011*) by INL and EFS Rhône-Alpes. The objectives are to reduce the number of steps and to simplify the test. To do so, the molecular interactions used in order to capture target DNA are modified and fluorescent microparticles are used for the detection. In the presence of target DNA, sandwiches are formed between both biofunctionnalized fluorescent and magnetic particles. Those sandwiches are purified through magnetic separation. Then, fluorescence is detected by three methods: flow cytometry, fluorescence imaging and Evareader (detection with an evanescent wave).

First, chemical and biological parameters for the functionalization of the different particles (magnetic and fluorescent) are determined. The conditions for the capture of target DNA were optimized.

Then, the formation and the detection of the sandwiches were estimated by measuring the fluorescence using three different methods: flow cytometry, fluorescence imaging and Evareader. The results obtained with the three methods are consistent. They show that the new system enables to capture synthetic target (oligonucleotide) HPA-1 with a reduction of total time analysis of 45 min. In our conditions, SNP can be discriminated for HPA-1 gene. For this discrimination, the fluorescence signal ratio about 2.5 to 3. This ratio should be improved by optimizing the conditions of sandwiches formation.

Next step will consist in the optimization of the system developed to capture DNA in order to gain specificity and to determine the limit of detection. This test should also be validated with biological samples.

In the long term, fluorescence could be detected by a miniaturized photodetector developed in the University of Sherbrook. Preliminary studies presented in this manuscript show the potentialities of this new transducer.

<u>Key-words</u>: Magnetic microparticles, fluorescent microparticles, sandwiches, platelet genotyping, envanescent wave sensor, flow cytométry, oligonucleotide

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle entre l'École Centrale de Lyon et l'Université de Sherbrooke et en collaboration avec l'Établissement Français du Sang Rhône-Alpes. Qui dit cotutelle et projet multidisciplinaire, dit beaucoup de rencontres, d'interactions et de personnes qui ont permis et/ou ont participé à l'aboutissement de ce travail de thèse et que je voudrais remercier. C'est ce que je vais tenter de faire par ces quelques mots en espérant oublier personne.

Je souhaite dans un premier temps remercier les équipes de direction des différents laboratoires impliqués dans cette thèse en cotutelle à savoir Mme Catherine BRU-CHEVALIER et M. Christian SEASSAL pour l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL - UMR 5270 CNRS), M. Abdelkader SOUIFI et M. Michael CANVA pour le Laboratoire Nanotechnologies & Nanosystèmes (UMI-LN2 – UMI 3463) et M. Gérard SCORLETTI, directeur de l'école doctorale EEA pour m'avoir permis de réaliser cette thèse. Je remercie également M. Dominique RIGAL de l'EFS Rhône-Alpes pour m'avoir permis l'accès aux locaux du site de Gerland.

Je remercie également, la Région Rhône-Alpes, l'Université de Lyon et l'UMI-LN2 pour les financements apportés au cours de cette thèse.

Je souhaite maintenant remercier mon équipe d'encadrement, M. Jean-Pierre CLOAREC, et Mme Éliane SOUTEYRAND de l'INL pour leur accueil, les discussions scientifiques, leurs conseils, leur soutient dans les moments les plus difficiles, et pour l'autonomie qu'ils m'ont accordée qui m'a permis d'évoluer autant sur le plan scientifique que personnel. Je remercie également M. Paul CHARETTE de l'Université de Sherbrooke pour son accueil et ses avis qui m'ont aidé à m'adapter au mieux à l'environnement québécois. Merci à tous de m'avoir permis d'aller au bout de ce doctorat.

Je remercie M. Denis BOUDREAU et Mme Christine MÉNAGER pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteurs et pour leurs remarques judicieuses. Je remercie également Mme Marie-Hélène DELVILLE pour avoir accepté de présider mon jury de thèse et M. Réjean FONTAINE pour avoir accepté d'être mon rapporteur du côté Canadien.

Je tiens maintenant à remercier plusieurs personnes avec qui la collaboration a été précieuse et sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Je remercie donc vivement M. Yves MÉRIEUX du laboratoire d'immunologie plaquettaire de l'EFS Rhône-Alpes pour ses conseils et son expertise en ce qui concerne le génotypage plaquettaire et la biologie moléculaire ainsi que pour sa patience, sa disponibilité et pour avoir pris le temps de relire et de corriger ce travail. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec vous, vous m'avez beaucoup appris et je vous en remercie. Je remercie également les techniciennes du laboratoire d'immunologie plaquettaire pour leur accueil et leur disponibilité lors de mon passage dans le laboratoire et Mme Janine BERNAUD pour m'avoir aidé et conseillé lors de la réalisation des mesures de cytométrie.

Je remercie M. Manfred SCHAWALLER, directeur de Davos Diagnostics, pour ses conseils sur l'utilisation de l'Evareader qu'il a développé et pour avoir été présent lors de ma soutenance.

Je remercie aussi vivement Thierry COURCIER pour sa patience et pour les explications lors de nos essais de mesure avec le photodétecteur BQJ.

Merci également à Virginie MONNIER et Francisco PALAZON pour les images réalisées au MEB et pour les explications de cette technique.

Je remercie également les équipes et les collègues rencontrés à l'INL et à l'Université de Sherbrooke, qui ont partagé mon quotidien pendant ce doctorat.

Je remercie donc les membres de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologies de l'INL pour leur accueil, leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur convivialité! Je garderai des souvenirs mémorables des pauses café de 10h et des repas agrémentés des spécialités de chacun et d'anecdotes plus drôles les unes que les autres ! Merci aux Yann CHEVOLOT, Emmanuelle LAURENCEAU. Magali permanents. PHANER-GOUTORBE, Éliane SOUTEYRAND, Virginie MONNIER, Isabel NABETH, Jean-Pierre CLOAREC, Thomas GEHIN, Guy STREMSDOERFER et Maryline Di SERIO. Un grand merci aussi aux doctorants et ATER qui ont partagé les moments de galères et les bons moments durant cette thèse. Merci à ceux devenus depuis docteurs, Zhugen, Ning, Alice, Delphine dont les conseils ont été précieux. Merci à Francisco qui a commencé sa thèse en même temps que moi et qui est devenu mon collègue de bureau, de muscu, confident de mes déboires et de mes avancées... Merci pour tout collègue. Merci et bon courage à ceux encore dans l'aventure, Liu, Maxime, Lucie, Francesca, Mathieu, Feyxiong, pour votre présence, votre écoute et les soirées passées ensemble. Merci aux ATER, Marie-Virginie, Anaïs et Salomé. Merci à tous pour la bonne ambiance de travail et le soutien apportés. Malgré les hauts et les bas, je pense que j'ai eu la chance d'être dans une très bonne équipe ce qui a participé à l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie également les membres du laboratoire de biophotonique et d'optoélectronique à l'Université de Sherbrooke. Mon séjour parmi vous a été plus court mais très enrichissant. Merci à Laurence CONVERT (pour les précieux conseils de rédaction entre autres), Pierre-Jean ZERMATTEN, Alan RENAUDIN, Aurélien DUVAL, Vincent CHABOT, Jean-Nicolas MELANCON, Frédéric BANVILLE, Guillaume BAUDIN, Thierry COURCIER, Rémy BÉLAND et Sandie DE BONNEAULT. Merci à tous pour votre accueil, vos conseils, le partage de vos connaissances et pour certains pour m'avoir fait découvrir la vie québécoise, pour les repas partagés, le power-yoga et les sorties ski.

Merci également aux secrétaires et aux services informatiques de l'INL, l'École Centrale et l'Université de Sherbrooke qui m'ont permis de survivre aux méandres administratifs et informatiques. Merci au Learning-Lab pour le prêt des robots de téléprésence pendant la soutenance.

Je tiens maintenant à remercier les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de cette thèse en dehors du laboratoire : mes amis et ma famille. Merci à Émilie, Marion, Sandrine et Léna, les amies de longues dates rejoints par François, Fiona et Gauthier. On se voit moins et on a pris des routes différentes mais les soirées passées avec vous sont toujours aussi agréables. Merci à Amaylis et Sophie pour nos week-ends détentes entre filles, Lucie et Henry pour l'hébergement et les bons moments passés à Montréal, à Francisco et Elisa pour les repas et les soirées en votre compagnie, à Sandie et Kyle, une belle rencontre, à Vincent, Vanessa, Pascal et Marie-Sol, à l'équipe ECLAT : Alice, Laura, Flavien, Cyrielle, Patricio et Jérémy. Merci à tous pour tous les moments passés ensemble

Je remercie également toutes les personnes qui sont venues me rendre visite à Sherbrooke (Johanna et Sam, Émilie et François, Hervé et mes parents) ça m'a fait plaisir de partager cela avec vous et ça réconforte toujours d'avoir de la visite à l'autre bout du monde.

Je remercie bien sûr ma famille sans qui je ne serai jamais allée aussi loin. Les repas de famille sont toujours un moment agréable qui permet de se ressourcer avec vous. Comme on dit, on ne choisit pas sa famille et je me dis que je suis vraiment bien tombée.

Merci à mes parents pour m'avoir toujours soutenue et supportée quoi qu'il arrive. J'espère que vous garderez de bons souvenirs de votre séjour au Canada. Merci pour tout, sans vous je n'aurais pas réussi. Merci à mon frère, Fabien, d'être là, d'avoir relu ma thèse et pour les week-ends passés à Lyon, à Dublin ou ailleurs.

Enfin, merci à Hervé de m'avoir supporté au quotidien, pour être venu partager une partie de l'aventure Canadienne avec moi et pour tes attentions de tous les jours pendant ces trois ans et pour longtemps encore puisque cette thèse m'aura permis de te rencontrer.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ		I
ABSTRACT		111
REMERCIEM	ENTS	v
TABLE DES N	IATIÈRES	VII
LISTE DES FIC	GURES	XI
LISTE DES TA	BLEAUX	xvii
LISTE DES AB	RÉVIATIONS ET DES SYMBOLES	XIX
CHAPITRE 1.	INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 CON	TEXTE DU PROJET	1
1.2 Defi	NITION DU PROJET ET DES OBJECTIFS DE LA THESE	4
1.2.1	Projet global	4
1.2.2	Objectifs de la thèse	6
1.3 Plan	I DU DOCUMENT	6
CHAPITRE 2.	ÉTAT DE L'ART	9
2.1 Met	HODES USUELLES DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE	9
2.1.1	La réaction en chaîne par polymérase (PCR)	9
2.1.2	La méthode immuno-enzymatique (ELISA)	13
2.2 DIFF	ERENTES MICRO ET NANOPARTICULES UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE IN VITRO	15
2.2.1	Nanoparticules d'or	15
2.2.2	Quantum dots	16
2.2.3	Particules magnétiques	17
2.2.4	Particules fonctionnalisées et multifonctionnelles	18
2.3 TECH	INIQUES DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE IN VITRO UTILISANT LES MICRO ET NANOPARTICULES	19
2.3.1	Système de détection optique	20
2.3.2	Diagnostic par résonance magnétique (DMR)	40
2.3.3	Détection basée sur l'agrégation et les changements colorimétriques visibles à l'œil nu	42
2.4 Labo	DRATOIRES SUR PUCE ET NANO DISPOSITIFS	44
2.5 Out	ILS DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE IN VITRO COMMERCIALISES UTILISANT LES MICRO ET NANOPARTICULES	47
2.5.1	Utilisant la cytométrie en flux : Luminex [®] et Becton Dickinson [®]	47
2.5.2	Utilisant une approche par biocode-barres : Nanosphere	48
2.6 LE G	ENOTYPAGE PLAQUETTAIRE	51
2.6.1	Les plaquettes et le système HPA (Human Platelet Antigen)	51
2.6.2	Intérêts du typage plaquettaire	52
2.6.3	Méthodes usuelles de typage plaquettaire : le génotypage par PCR et le phénotypage par	MAIPA

53

	2.6.4	Intérêts et enjeux de développer de nouvelles méthodes de génotypage	56
2.	7 Cond	CLUSION GENERALE ET POSITIONNEMENT DU PROJET PAR RAPPORT A L'ETAT DE L'ART.	58
СНА	PITRE 3.	CONCEPTION DU SYSTÈME SIMPLIFIÉ DE CAPTURE D'ADN	61
3.	1 Сані	ER DES CHARGES	62
3.	2 Desc	RIPTION DU SYSTEME SIMPLIFIE DE CAPTURE D'ADN A BASE DE PARTICULES MULTIFONCTIONNELLES	63
3.	3 Cond	CEPTION DES DIFFERENTES ETAPES DE LA NOUVELLE METHODE	69
	3.3.1	Préparation du test	69
	3.3.2	Formation des sandwichs	75
	3.3.3	Analyse de la fluorescence	86
3.	4 Cond		89
СНА	PITRE 4.	RÉALISATION DU SYSTÈME SIMPLIFIÉ DE CAPTURE D'ADN	93
4.	1 Prep	ARATION DU TEST : FONCTIONNALISATION DES PARTICULES MAGNETIQUES ET FLUORESCENTES	93
	4.1.1	Lavages et purifications des particules	94
	4.1.2	Détermination des conditions de fonctionnalisation	98
4.	2 Form	ATION DES SANDWICHS EN PRESENCE D'ADN CIBLE	109
	4.2.1	Rappel des conditions de formation des sandwichs	109
	4.2.2	Tampon de réaction	110
	4.2.3	Caractérisation de l'hybridation de la cible par imagerie de fluorescence	113
4.	3 Dete	CTION DE LA FORMATION DES SANDWICHS PAR DIVERS INSTRUMENTS DE MESURES DE LA FLUORESCENCE	119
	4.3.1	Caractérisation des différents appareils de mesure vis-à-vis des particules fluorescentes	
	fonctio	nnalisées	119
	4.3.2	Échantillons préparés	125
	4.3.3	Mesures de fluorescences des sandwichs obtenues avec le scanner de fluorescence	126
	4.3.4	Mesures de fluorescence des sandwichs obtenues avec l'Evareader	130
	4.3.5	Mesures de fluorescence des sandwichs obtenues par cytométrie en flux	135
	4.3.6	Comparaison des différentes techniques de détection de la fluorescence	141
4.	4 Cond	CLUSION	144
4.	5 Pers	PECTIVES	146
	4.5.1	Augmenter les performances de capture d'ADN du test	146
	4.5.2	Optimisation de la mesure du signal de fluorescence en optimisant les sandwichs	148
	4.5.3	Simplification de la mise en œuvre du test	149
	4.5.4	Autres développements	150
СНА	PITRE 5.	TRAVAUX EXPLORATOIRES	153
5.	1 Рнот	ODETECTEUR MINIATURISE	153
	5.1.1	Contexte	153
	5.1.2	Présentation du photodétecteur BQJ	154
	5.1.3	Études préliminaires réalisées	156

5.1.4	Conclusion	162
5.2 Vers	DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	163
5.2.1	Extraction et purification de l'ADN	163
5.2.2	Coupure de l'ADN par enzymes de restrictions	166
5.2.3	Conclusion	167
CHAPITRE 6.	CONCLUSION GÉNÉRALE	171
ANNEXES		175
ANNEXE A	PERFORMANCES D'OUTILS DE DIAGNOSTIC UTILISANT DES PARTICULES	I
ANNEXE B	MÉTHODES DE DÉTECTION DE FLUORESCENCE UTILISÉES POUR LE PROJET	111
B.1 Pr	RINCIPES DE LA FLUORESCENCE	111
B.2 O	UTILS DE DETECTION DE FLUORESCENCE UTILISES POUR CE PROJET	VI
B.2.1.	Détection par cytométrie de flux	VI
B.2.2.	Détection par Scanner de fluorescence	_VIII
В.2.3.	Détection par un biocapteur à onde évanescente, l'Evareader	<i>IX</i>
ANNEXE C	RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS	xı
C.1 CARA	CTERISATION DES PARTICULES	XI
C.1.1.	Particules fluorescentes	XI
С.1.2.	Particules magnétiques	_xiv
C.2 CARA	CTERISATION DES OLIGONUCLEOTIDES (ODN)	XVII
ANNEXE D	PROTOCOLE COMPLET DE CAPTURE D'ADN À L'AIDE DE PARTICULES FONCTIONNALISÉES _	_xxı
D.1 N	IATERIELS	_xxi
D.2 Pr	REPARATION DES TUBES EPPENDORF	XXII
D.3 Fo	DNCTIONNALISATION DES PARTICULES MAGNETIQUES ET DES PARTICULES FLUORESCENTES	XXII
D.4 Fo	DRMATION DES SANDWICHS	xxv
D.5 C/	ARACTERISATION DE LA FONCTIONNALISATION / DE L'HYBRIDATION	XXVI
D.6 A	NALYSE DE LA FLUORESCENCE	xxvii
D.6.1.	Par scanner de fluorescence	xxvii
D.6.2.	Par cytométrie de fluxX	xviii
D.6.3.	Par Evareader	XXIX
ANNEXE E	CALCUL DE LA VITESSE DE CENTRIFUGATION SELON LA LOI DE STOKES	хххі
ANNEXE F	CALCUL DU NOMBRE DE PARTICULES FLUORESCENTES CAPTURÉES ET ANALYSÉES X	xxIII
LISTE DES RÉF	-ÉRENCES	κχχν

LISTE DES FIGURES

- Figure 2-10 : a) Représentation schématique d'un biocapteur réalisé pour la détection d'antigène par SPR, b) Graphique montrant le décalage de l'angle SPR observé après l'injection de différentes

- Figure 3-4 : Différentes configurations pouvant être présentes dans la solution après le processus de formation des sandwichs. A) particules magnétiques (BM) seules ne s'étant pas hybridées avec l'ADN cible ; B) particules fluorescentes (BF) seules ne s'étant pas hybridées avec l'ADN cible, C) ADN cible ne s'étant pas hybridé sur les particules, D) ADN cible hybridé avec une BM mais pas de BF, E) ADN cible hybridé avec une BF mais pas de BM, F) BF ayant formé des sandwichs avec plusieurs BM, G) BM ayant formé des sandwichs avec plusieurs BF.
- Figure 3-5 : Différentes voies possibles de formation des sandwichs. A) formation des sandwichs en une étape avec une hybridation simultanée des particules magnétiques (BM) et des particules fluorescentes

- Figure 3-8 : A) Pourcentage de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X B) Simulation du rendement d'hybridation de la *sonde a* avec la *cible a* par rapport à celui de la *sonde b* avec la *cible a* dans le PBS 0.07X. Ce rendement est optimal aux alentours de 66°C mais le nombre de sandwichs formés est alors faible (<1%).

- Figure 4-3 : A) Schéma des échantillons analysés ; B) Schéma de l'analyse des surnageants contenant les ODN non immobilisés sur les particules suite au processus de biofonctionnalisation des particules 102

Figure 4-11 : Schémas des différents échantillons préparés 126

- Figure 4-13 : Mesures de fluorescence par scanner à 635 nm des particules au cours des différentes étapes de la formation des sandwichs : (A) avant l'hybridation avec la cible (particules dans le PBS 0.3X), (B) Après ajout de 2,5 μM de cibles, hybridation et retrait de l'excès de cibles par purification magnétique (dans le PBS 0.3X) et (C) après le processus complet de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X.
- Figure 4-15 : Pentes moyennes résultant de la mesure de la cinétique de fluorescence à 635 nm entre 0 et 200 secondes. (a) Témoins ODN (sans particules et marqués avec un Cy5) : ODN sans biotine à une concentration de 0,1 μM qui constitue le témoin négatif puisqu'il n'est pas immobilisé au fond du puits ; et ODN avec biotine à une concentration de 0,1 μM qui constitue le témoin positif car il va venir s'immobiliser au fond du puits par interaction avec la neutravidine ; (b) Particules non fonctionnalisées mises en présence de cible, (c) particules fonctionnalisées sans cible, et (d) sandwichs [BMg-cible-BFg] complet.

Figure 4-16 : Histogrammes de fluorescence obtenus par mesures de cytométrie en flux à 633 nm. 137

- Figure 5-1 : Exemple de reconstruction de spectre de fluorescence de deux populations de quantum dots en milieu liquide, avec les mesures de BQJ (pointillés bleus clairs). Le spectre de fluorescence mesuré avec un spectrophotomètre classique est indiqué en rouge. (issu de (*Courcier et al, 2014*))......... 155

Figure 5-6 : Carte de restriction de l'ADN sur le gène HPA1a166

Figure 5-7 : Photo représentant les bandes d'ADN après migration sur gel d'agarose avec du BET. MT correspond au marqueur de taille en Kpb, T- correspond à un échantillon sans ADN, T+ correspond à un échantillon d'ADN non digéré et les autres échantillons ont été digérés par les enzymes de restriction. Les cercles rouges correspondent à l'ADN non digérés et le cercle vert correspond à l'endroit où devrait se trouver la bande de l'ADN digéré
Figure B-6-1: Processus de restitution d'énergie lors du retour à l'état fondamental d'une molécule excitée par un photon (<i>Valeur, 2004</i>)III
Figure B-6-2 : Diagramme de Jablonski [www.olympusmicro.com]IV
Figure B-6-3 : Illustration du déplacement de Stokes à travers les spectres d'absorption et d'émission de la quinine [www.olympusmicro.com]V
Figure B-6-4: représentation schématique d'un cytomètre de flux, [http://www.ifr87.cnrs- gif.fr/pbc/equipement/cytometre.html]VII
Figure B-6-5 : Schéma de fonctionnement d'un scanner de fluorescence à détection confocale. (www.arrayit.com)
Figure B-6-6 : A) Photos des EVA-chip servant de support pour l'analyse ; B) Evareader, support dans lequel sont introduites les EVA-chip et où la fluorescence pourra être lue en temps réel (© Davos Diagnostics) ; C) Schéma de la détection de la technique de détection de fluorescence dans un puits d'une EVA-chip (©Davos Diagnostics)X
Figure C-6-7 : Spectre UV d'une solution de particules fluorescentes à 8.10 ⁸ particules / ml dans le PBS réalisé avec 5 μ l de solution dans une microcuve en quartz ayant un trajet optique de 1 mmXI
Figure C-6-8 : Courbe de calibration des particules fluorescentes dans le PBS en UV-vis à 425 nmXII
Figure C-6-9 : Mesures de la fluorescence du tampon (PBS 03X) et des particules fluorescentes au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nmXIII
Figure C-6-10 : Mesure de cytométrie du tampon PBS 0.3X et des particules fluorescentes. A) Mesures en fonction de la taille et de la granularité, B) Mesures en fonction de la fluorescence et de la granularité et C) Histogrammes de fluorescence avec le pourcentage de particules détectéesXIV
Figure C-6-11 : Spectre UV d'une solution de particules magnétiques à 2.10 ⁷ particules / ml dans le PBS réalisé avec 5 μl de solution dans une microcuve en quartz ayant un trajet optique de 1 mmXV
Figure C-6-12 : Mesures de la fluorescence du tampon (PBS 03X) et des particules magnétiques au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nmXV
Figure C-6-13 : Mesure de cytométrie du tampon PBS 0.3X et des particules magnétiques. A) Mesures en fonction de la taille et de la granularité, B) Mesures en fonction de la fluorescence et de la granularité et C) Histogrammes de fluorescence avec le pourcentage de particules détectéesXVI
Figure C-6-14 : Spectre UV de solutions d'ODN dans le PBS 0.3X réalisé avec 5 µl de solution dans une microcuve en quartz ayant un trajet optique de 1 mmXVIII
Figure C-6-15 : Courbe de calibration des ODN dans le PBS en UV-vis à 260 nm
Figure C-6-16 : Mesures de la fluorescence des ODN au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nmXIX
Figure D-6-17 :Réaction chimique de la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes avec des ODN par voie chimique utilisant l'EDCI et le NHSXXIII
Figure D-6-18 : Évaluation du greffage des ODN-cy5 sur les particules par UV-visible et mesures de la fluorescence des surnageants. La concentration introduite (témoin = ODN-cy5 dans le tampon) est déterminée par UV-vis. Le témoin et les surnageants d'ODN-cy5 sont déposés sur une lame de verre

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes de PCR utilisées pour le génotypage 12
Tableau 2-2 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes ELISA utilisées pour les immunotests 14
Tableau 2-3 : Performances analytique de la PCR-SSP et du test ELISA. 20
Tableau 2-4 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules associés à desméthodes de détection optiques pour la mise en évidence de biomolécules
Tableau 2-5 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules associés à unedétection par résonnance magnétique pour la mise en évidence de biomolécules42
Tableau 2-6 : Différents outils de diagnostic <i>in vitro</i> utilisant les micro et nanoparticules pour la réalisation de d'outils de diagnostic basés sur l'agrégation et les changements colorimétriques visibles à l'œil nu. 44
Tableau 2-7 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules et réalisés sur puce 47
Tableau 2-8 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules commercialisés 50
Tableau 3-1 : Différentes spécifications de chaque méthode et appareils de détection de fluorescence utilisésdans ce travail68
Tableau 3-2 : Caractéristiques des particules utilisées pour le test de capture d'ADN
Tableau 3-3 : Séquences d'oligonucléotides utilisés. Les modifications sont en gras et les SNP sont en gras et soulignés
Tableau 4-1 : Pourcentage de perte en particules fluorescentes à la fin du processus de fonctionnalisationsuivant les différentes techniques de lavage
Tableau 4-2 : Différents protocoles testés pour l'activation et la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes
Tableau 4-3 : Résultats obtenus pour chaque échantillon et détermination du pourcentage de fonctionnalisation correspondant au pourcentage de COOH ayant greffés un ODN
Tableau 4-4 : Paramètres retenus pour l'activation et la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes
Tableau 4-5 : Composition ionique des tampons et formule de calcul de la force ionique FI
Tableau 4-6 : Analyse de l'hybridation de la cible avec des sondes portées par des particules magnétiques. L'hybridation est réalisée à 45°C avec une concentration initiale en cible de 2,5 μM dans le PBS 0,3X.
Tableau 4-7 : Comparaison entre elles des trois méthodes de détection de la fluorescence testés pour mettreen évidence la présence de sandwichs spécifiques en présence de la cible
Tableau 4-8 : Voies d'améliorations générales du système de capture d'ADN
Tableau 4-9 : Séquences d'oligonucléotides envisagées pour améliorer les performances du test de capture d'ADN. Les nucléotides ajouter à la séquence initiale sont en rouge
Tableau 5-1 : Tableau comparatif de différentes méthodes d'extraction d'ADN 165
Tableau A-6-1 : Différents outils de diagnostic <i>in vitro</i> utilisant les micro et nanoparticules associés à diverses méthodes de détection pour la mise en évidence de biomolécules
Tableau A-6-2 : Différents outils de diagnostic <i>in vitro</i> utilisant les micro et nanoparticules associés à diverses méthodes de détection pour la mise en évidence de séquence d'ADN
Tableau D-6-3 : Paramètres de mesures de la fluorescence avec le scanner Innoscan 710XXVIII

Tableau D-6-4 : Paramètres de mesures en cytométrie de flux	(XVIII
Tableau F-6-5 : Paramètres nécessaires au calcul du nombre de particules fluorescentes capturées suite au processus de formation des sandwichs	XXIV

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SYMBOLES

Symboles et abréviations	Définition
$ec{g}$	Accélération de la pesanteur
°C	Degré celsius
μl	Microlitre (1.10 ⁻⁶ litres)
μm	Micromètre (1.10 ⁻⁶ mètres)
А	Nombre d'Avogadro (6.02.10 ²³ moles ⁻¹)
Ag	Symbole chimique de l'argent
aM	Attomolaire (1.10 ⁻¹⁸ moles)
Au	Symbole chimique de l'or
A_{λ}	Absorbance
BCB	Biocode-barres
BET	Bromure d'éthidium
BF	Particules fluorescentes
BF480	Particules fluorescentes (EstaporX, $\lambda_{\text{exc}}\text{=}$ 460 nm ; $\lambda_{\text{ém}}$ = 480 nm), Bangs Laboratories
BF690	Particules fluorescentes (Flash Red, $\lambda_{exc}\text{=}$ 660 nm ; $\lambda_{\acute{e}m}$ = 690 nm), Bangs Laboratories
BFg	Particules fluorescentes fonctionnalisées avec des sondes a ou b
BFt-	Particules fluorescentes non activées ayant été mises en présence de <i>sondes a</i> ou b (adsorption non spécifique des sondes)
BM	Particules magnétiques
BMg	Particules magnétiques fonctionnalisées avec des sondes de capture
BMg + BFg	Particules fonctionnalisées sans cible
BMg c BFg	Particules fonctionnalisées mise en presence de cible (sandwich)
BMt-	Particules magnétiques non activées ayant été mises en présence de <i>sondes de capture</i> (adsorption non spécifique des sondes)
BMt c BFt	Échantillon où la cible est mise en presence de particules ayant des ODN adsorbés à leur surface
BQJ	Buried Quad junction
С	Concentration
C_{cible}	Concentration en cible sur les particules en moles
CdSe	Cadmium selenide
Cl	Symbole chimique du chlore
CLIO	Cross-linked oxyde
cm	Centimètre (10 ⁻² mètres)
CMOS	Complementary metal-oxyde-semiconductor
C _{ODN}	Concentration en ODN
СООН	Fonction acide carboxylique
CRN2	Centre de Recherche de Nanofabrication et Nanocaractérisation
Су	Cyanine
DLS	Dynamic Light Scattering

Symboles et	Définition
abréviations	
DMR	Diagnostic par résonance magnétique
DNA	Desoxyribonucleic acid
3	Coefficient d'extinction molaire
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)
EFS	Établissement français du sang
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
fM	Femtomolaire (1.10 ⁻¹⁵ moles)
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSC	Forward Light Scattering
g	Gramme
G	Force centrifuge
GP	Glycoprotéine
h	Heure
HPA	Human Platelet Antigen
Ι	Intensité de fluorescence
lg	Immunoglobuline
INL	Institut des nanotechnologies de Lyon
IRM	Imagerie par résonance magnétique
kpb	Kilo paire de base (1.10 ³ bases)
L	Litre
I	Longueur du trajet optique de la cuve
LED	Litgh –Emitting Diode = Diode électroluminescente
LOD	Limit of detection
Μ	Molaire
MAIPA	Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet antigens Assay
MEB	Microscopie électronique à balayage
MHNRh	Maladie hémolytique du nouveau-né
min	Minutes
ml	$Millilitre (1.10^{\circ} itres)$
mivi	Millimolaire (=1.10° moles /litre)
/V	Nombre de particules detectees
	Symbole chimique du sodium
IVcible	Nombre de cible sur les particules
IV cible int	Nombre de COOH / particules
NdEoP	Nonlible de COOR / particules
nureb	Nonogrammo (1 10 ⁻⁹ grammos)
пв	Nanogrannine (1.10 grannines)
nm	Nanomàtro (1.10 ⁻⁹ màtros)
N .	Nombre de particules
Npart N	Nombre de sondes par particule
Nerved and the second s	Nombre théorique de sondes par particule
sondes th	Aligodésovyribonucléotide
	Ongoucsonymboliuceolluc

Symboles et abréviations	Définition
Panal	Nombre de particules analysées
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism
PCR-SSP	Polymerase chain reaction sequence specific primers
рН	Potentiel hydrogène
PPT	Purpura post-transfusionnel
PSA	Prostate specific antigen
QD	Quantum dot
r	rayon
Rdt	rendement
Ref	Référence
sec	Secondes
SERS	Surface Enhanced Raman Scattering
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPIO	Superparamagnetic iron oxyde
SPR	Surface Plasmon Resonance
SSC	Side Scattered Light (cytométrie)
SSC	Saline Sodium citrate (tampon)
Т2	Temps de relaxation transversal
Таq	Thermus aquaticus
Tm	Melting temperature
TNA	Thrombopénie néonatale allo-immune
U.A.	Unités arbitraires
UV	Ultraviolet
V	Vitesse de centrifugation
V _{chute}	Vitesse de chute
ZnS	Sulfure de Zinc
η	Viscosité dynamique
λ_{em}	Longueur d'onde d'émission
λ_{exc}	Longueur d'onde d'excitation
ρΙ	Masse volumique du liquide
ρs	Masse volumique de la particule
σ	Écart type
R sandw45	Rendements de formation des sandwichs à 45°C
R sandw58	Rendements de formation des sandwichs à 58°C
V _{anal}	Volume d'analyse
V _{sol}	Volume d'échantillon

CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Contexte du projet

La population mondiale est en constante augmentation avec une croissance de 1% par an. Avec le développement des pays émergents, l'amélioration des conditions sanitaires, de la prévention et l'accès grandissant aux soins, l'espérance de vie ne cesse d'augmenter alors que la natalité diminue (données Insee). De ce fait, la population mondiale est de plus en plus vieillissante. La proportion de personnes âgées de plus de 60 ans est passée de 9,2 % en 1990 à 11,7% en 2013 et devrait doubler d'ici 2050 pour atteindre 21,1% de la population mondiale (*United Nations, 2013*) (Figure 1-1).



Figure 1-1 : Évolution entre 1950 et 2050 de la population âgée de plus de 60 ans dans le monde en fonction du développement des régions. (Source : Nations Unies, World population aging report 2013).

Le vieillissement de la population a des répercussions économiques et sociales importantes et induit notamment une augmentation de la prévalence de maladies chroniques comme le diabète, les maladies cardiovasculaires ou les cancers aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Le traitement de ces maladies est lourd et coûteux et n'est pas forcément accessible à toutes les populations. L'apparition de ces maladies peut être diminuée par la prévention des facteurs de risques (comme la sédentarité, le tabagisme ...) mais elles peuvent également être mieux soignées si elles sont diagnostiquées de manière précoce par la détection de marqueurs biologiques par exemple. Le développement des techniques de biologie moléculaire et sérologique a permis l'élaboration d'outils de diagnostic performants et ciblés pour mettre en évidence ces marqueurs biologiques dans le génome et le protéome. Les techniques les plus utilisées en laboratoire sont des méthodes de biologie moléculaire comme la PCR (Polymerase Chain Reaction) et les tests sérologiques de type ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). La PCR est une technique permettant d'amplifier des régions d'ADN afin de mettre en évidence la présence d'un gène ou d'une mutation génétique. Les tests de type ELISA permettent de mettre en évidence certaines protéines exprimées à la surface des cellules. Si ces techniques sont très performantes et utilisées en routine dans les laboratoires d'analyses, elles nécessitent toutefois du matériel spécialisé parfois encombrant, l'emploi de nombreux réactifs, un certain temps de traitement de l'échantillon et du personnel qualifié ce qui augmente le coût et le temps d'analyse. La demande en termes de diagnostic moléculaire in vitro va donc vers l'élaboration d'outils fiables plus rapides, maniables, faciles à prendre en main pour les professionnels de santé et permettant de réaliser les analyses au plus près du patient afin d'améliorer son confort (Kalorama Information, 2011). De plus, d'un point de vue analytique, on attend de ces outils qu'ils détectent de faible quantité de biomolécules dans des fluides biologiques et qu'ils soient très spécifiques pour obtenir des informations précises et précoces à l'aide des marqueurs biologiques et génétiques d'un patient et donc de mieux diagnostiquer et prévenir l'évolution de sa maladie en apportant une réponse thérapeutique adaptée et personnalisée.

Afin de répondre à ce marché, la tendance actuelle dans le domaine du diagnostic médical est donc de miniaturiser et de simplifier les appareils et les méthodes. Ces dernières années, de nombreuses avancées ont été réalisées notamment avec le développement des nanotechnologies et des laboratoires sur puce. Ces puces permettent de réaliser des tests moléculaires sur des supports miniaturisés avec un faible volume d'échantillon. Des tests de diagnostic moléculaire comme la PCR ont été adaptés sur puce dont certaines sont commercialisées par des compagnies comme Life Technologies ou QuantaLife. Ces PCR sur puce sont sensibles, permettent de travailler avec des volumes d'échantillon de l'ordre du microlitre, d'obtenir un résultat rapidement et sont peu encombrantes (*Ahmad et al, 2012; Slyadnev, 2013*). De nombreuses avancées ont aussi été réalisées en ce qui concerne l'automatisation des tests. Toujours dans le domaine de la PCR, des automates commercialisés permettent de réaliser toutes les étapes d'une PCR de l'extraction d'ADN depuis le sang total jusqu'à l'obtention du résultat grâce à un robot, mais là encore, les appareils sont très coûteux.

Les micro et nanoparticules ayant des propriétés optiques et physiques particulières sont également des outils de choix pour réaliser des dispositifs de diagnostic miniaturisés. Elles sont utilisées pour capturer des biomolécules, purifier les échantillons et les concentrer ou encore comme éléments de détection. Elles permettent de travailler avec de petits volumes et sont fonctionnalisables. De ce fait, elles sont de plus en plus utilisées dans la réalisation d'outils de diagnostic moléculaire *in vitro* et le nombre de travaux sur cette thématique n'a cessé d'augmenter ces dernières années (Figure 1-2).



Figure 1-2 : Nombre d'articles parus par année entre 1975 et 2013 à partir d'une recherche par mots-clefs "molecular diagnostics", "*in vitro*" et "*particle*" dans la base de données Scopus.

Si de nombreux travaux associant l'usage de particules multifonctionnelles pour la capture de biomolécules à diverses méthodes de détection (optique, magnétique, électrique...) ont été décrits dans la littérature (*Pei et al, 2013*), (*Kurkina et al, 2012*), l'outil de diagnostic idéal n'existe pas encore. Cependant, de nouveaux outils de diagnostics moléculaires sont en cours de développement afin de répondre au mieux à toutes ces attentes et devraient arriver sur le marché dans les prochaines années.

Le projet de doctorat présenté ici s'appuie sur toutes ces expertises et ces avancées technologiques afin de développer un outil à base de particules fonctionnalisées pour réaliser des tests biologiques *in vitro* et plus particulièrement appliqué au génotypage plaquettaire.

1.2 Définition du projet et des objectifs de la thèse

1.2.1 Projet global

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet global dont l'objectif est de développer un outil d'identification d'une mutation génétique en utilisant des particules fonctionnalisées et à l'aide de processus innovants avec une application au génotypage plaquettaire. Afin de répondre aux exigences et aux attentes des professionnels de santé, cet outil devra être miniaturisé, simple d'utilisation et devra réaliser toutes les étapes nécessaires à la détection de l'ADN. Comme le montre la Figure 1-3, cet outil de diagnostic se présenterait sous la forme d'une puce avec un aimant intégré permettant de réaliser tout le test, de l'introduction de l'échantillon biologique jusqu'à l'obtention du résultat interprété et cela avec une faible quantité d'échantillon et en peu de temps. Cette puce devra donc comporter plusieurs compartiments afin de réaliser les trois étapes principales du test :

- 1) L'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon sanguin,
- 2) La capture, la purification de l'ADN par des particules magnétiques et la formation de sandwichs avec des particules fluorescentes en vue de la détection de l'ADN cible,
- La détection de la fluorescence grâce à un détecteur intégré à la puce pour mettre en évidence la présence de l'ADN cible.

De plus, la puce devra intégrer un réseau de canaux microfluidiques afin d'acheminer les différents réactifs, de réaliser les lavages et d'éliminer les impuretés ou les réactifs en excès.

Un tel projet est ambitieux et pluridisciplinaire puisqu'il faut prendre en compte les caractéristiques biologiques de l'ADN, les aspects de fonctionnalisation de surface des particules et les aspects de détection du signal. De même, le design de la puce, l'intégration et la miniaturisation du détecteur sont des éléments complexes à prendre en compte.



Figure 1-3 : Schéma du projet global consistant au développement d'un outil de diagnostic de mutations génétiques se présentant sous la forme d'un laboratoire sur puce complet permettant de réaliser: 1) l'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de sang total, 2) la capture de l'ADN grâce à des particules fonctionnalisées et la purification magnétique de l'échantillon et 3) la détection de la présence de l'ADN cible grâce à un détecteur intégré à la puce.

Ce projet met en jeu et rassemble des compétences de divers univers techniques et scientifiques. Il associe les expertises de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon en France (INL, UMR 5270) dans le domaine de la chimie de surface, des interactions biomoléculaires et dans le développement de biocapteurs (*Cloarec et al, 2008*) ; de l'Établissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes (France) en termes de biologie moléculaire et d'immunologie plaquettaire ; et du Laboratoire Nanotechnologies et Nanosystèmes (LN2, UMI – 3463) de l'Université de Sherbrooke (Canada) dans le développement de dispositifs photoniques et de biocapteurs miniaturisés et plus particulièrement dans le développement de photodétecteurs miniaturisés (*Convert et al, 2011; Richard et al, 2012*).

Parmi tous les défis à relever pour aboutir à la mise au point d'un tel outil diagnostic, ce travail de thèse va essentiellement porter sur la partie de capture de l'ADN par des particules fonctionnalisées.

1.2.2 Objectifs de la thèse

L'objectif principal de ce travail de thèse est donc le développement d'un outil de capture d'ADN à base de particules biofonctionnalisées pour détecter les mutations génétiques.

Cette thèse présente la poursuite des travaux précédemment réalisés et compilés dans la thèse de Marie Trévisan (*Trévisan, 2011*) et qui sera décrit dans la section \square . Ce précédent travail est le fruit d'une collaboration, déjà longue, entre l'INL et l'EFS Rhône-Alpes. Il a donné lieu à l'élaboration d'un outil de capture d'ADN avec un signal amplifié par une approche biocode-barres (*Nam et al, 2003; Goluch et al, 2006*) et une détection de la fluorescence par un biocapteur à onde évanescente (*Trevisan et al, 2010*). Cet outil est prometteur mais nécessite de nombreuses étapes du fait de la méthode utilisée.

Le travail de thèse développé ici vise à optimiser l'outil de diagnostic déjà exploré en le simplifiant de manière à réduire les étapes de l'analyse, d'optimiser le temps de manipulation et d'analyse et diminuer le volume d'échantillon nécessaire. Pour cela, l'outil de capture d'ADN sera basé sur la formation de sandwichs insérant l'ADN cible entre des particules magnétiques et des particules fluorescentes biofonctionnalisées.

Pour réaliser cette optimisation il convient de dégager les étapes clefs et les étapes limitantes du procédé. Dans ce travail, la nouvelle approche de capture de l'ADN sera présentée et commentée. Les étapes limitantes comme la fonctionnalisation des particules, les méthodes de purification de l'échantillon, l'importance des réactifs utilisés et les conditions d'hybridation pour la capture de l'ADN seront décrites et discutées. Les performances de l'outil de capture d'ADN seront mesurées à l'aide de différentes techniques de détection soient usuelles (cytométrie en flux et scanner de fluorescence) ou soit innovante (Evareader). Les résultats obtenus seront comparés les uns aux autres.

1.3 Plan du document

Après cette introduction qui constitue le chapitre 1 de ce manuscrit de thèse, le chapitre 2 présentera l'état de l'art dans le domaine du diagnostic moléculaire *in vitro*. Dans un premier temps, les méthodes usuelles de diagnostic moléculaire seront présentées. Puis des systèmes innovants de diagnostic moléculaire *in vitro* utilisant les micro et

nanoparticules seront décrits en fonction des méthodes et de la technique de détection utilisées. Quelques dispositifs commercialisés seront également décrits. Les performances des systèmes énoncés dans l'état de l'art seront comparées avec les méthodes usuelles de diagnostic *in vitro*. Dans une deuxième partie, l'état de l'art se portera sur le typage plaquettaire qui est le modèle biologique choisi pour ce projet. Les méthodes de typage, leurs intérêts et leurs enjeux seront discutés. Pour terminer l'état de l'art, nous conclurons sur le positionnement de notre projet par rapport aux différents dispositifs décrits.

Le chapitre 3 détaillera la conception du système simplifié de capture d'ADN avec les principaux changements et améliorations réalisés par rapport à l'approche préalablement développée. Les différentes étapes de la conception de l'outil de capture d'ADN et les choix réalisés pour chaque étape seront détaillés.

Le chapitre 4 décrit les expérimentations réalisées pour caractériser le système de capture d'ADN et la réalisation du test complet. Les résultats obtenus seront analysés avec divers outils de détection d'ADN. Les performances du système et les différentes méthodes de détection seront analysées et discutées. Les perspectives d'amélioration du système seront également exposées

Le chapitre 5 développera quelques travaux exploratoires réalisés en termes de traitement de l'échantillon biologique et de détection avec un outil de détection miniaturisé.

Enfin, le chapitre 6 conclura sur le travail de thèse.

CHAPITRE 2. ÉTAT DE L'ART

Dans ce chapitre, les méthodes de détection usuelles de diagnostic moléculaire *in vitro* sont présentées dans un premier temps. Ensuite, les différentes micro et nanoparticules pouvant être utilisées pour le diagnostic sont décrites. Différentes techniques de diagnostic moléculaire utilisant ces particules sont présentées en fonction de la méthode de détection qu'elles font intervenir et elles sont comparées avec les méthodes usuelles précédemment décrites. Enfin quelques dispositifs de laboratoire sur puce et des outils de diagnostic commercialisés sont présentés. Pour finir, le modèle biologique choisi pour notre étude, le génotypage plaquettaire et ses enjeux seront décrits dans la dernière section.

2.1 Méthodes usuelles de diagnostic moléculaire

2.1.1 La réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La réaction en chaîne par polymérase ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est la méthode la plus utilisée dans les laboratoires pour détecter de l'ADN. Elle permet d'amplifier in vitro et de manière spécifique de petites séquences d'ADN. Les séquences sont amplifiées par une succession de cycles thermiques comportant chacun trois étapes essentielles à l'amplification de l'ADN (Figure 2-1). La première étape consiste à dénaturer l'ADN pour le faire passer de l'état double brin à l'état simple brin en le chauffant. La seconde étape repose sur l'hybridation sur le brin codant et le brin répliquant de l'ADN d'amorces correspondant à de courtes séquences d'oligonucléotides qui s'hybrident de manière spécifique en amont de la région d'ADN à amplifier. L'élongation de l'ADN constitue la dernière étape du cycle thermique pendant laquelle une enzyme, la Taq Polymérase synthétise le brin d'ADN complémentaire au brin natif à partir de l'amorce. Le nouveau brin d'ADN ainsi obtenu va lui-même être amplifié lors du cycle de PCR suivant et au bout du troisième cycle de PCR, l'amplification successive des brins d'ADN va donner des amplicons qui correspondent à de l'ADN double-brins de taille plus courte que l'ADN natif et contenant la séquence d'intérêt. Les amplicons sont à leur tour amplifiés jusqu'à la fin de la PCR (Figure 2-1). De cette manière, l'ADN est amplifié de manière exponentielle. Durant la PCR, les cycles sont répétés de 30 à 50 fois afin d'avoir une quantité d'amplicon suffisante. Une PCR complète dure entre 1h30 et 3h et a un rendement moyen de 65% lorsque les conditions d'amplification sont bien adaptées. Enfin, les amplicons sont révélés le plus souvent par chromatographie sur gel d'électrophorèse avec agent intercalant de type BET couplé à une détection par la lumière UV (*J.C. Kaplan et al, 2007*).



Figure 2-1 : Schéma du principe d'amplification de l'ADN par PCR [Wikipédia] et graphique représentant les variations de température en fonction du temps durant les différentes étapes du cycle de PCR [http://bioutils.unige.ch]

La PCR est la méthode de référence pour le génotypage car elle est sensible et permet d'obtenir quelques centaines de nanogrammes d'amplicons à partir de quantité d'ADN très faible (*J.C. Kaplan et al, 2007*). Après 30 cycles de PCR, environ 10⁶ amplicons sont obtenus à partir d'un brin d'ADN. La PCR permet également de détecter des différences de 1 nucléotide (SNP) entre deux brins d'ADN. Elle est facilement automatisable car tous les réactifs peuvent être introduits dans un même tube et le contrôle de la température et du temps des différents cycles de PCR est réalisé dans un automate : le thermocycleur. De plus, l'amplification de plusieurs échantillons d'ADN en même temps peut être réalisée en plaque
à puits ce qui permet de réaliser plusieurs analyses simultanément. La PCR comporte toutefois certains inconvénients. Il s'agit d'une technique longue puisqu'elle nécessite une extraction préalable de l'ADN et une étape de détection après amplification. Il faut environ une demi-journée pour avoir un résultat à partir d'un échantillon biologique. De plus, afin d'éviter les contaminations d'ADN lors de la réalisation de la PCR, les étapes de pré et post PCR sont réalisées dans des zones différentes ce qui est contraignant en matière d'infrastructure. De même, la préparation des échantillons et des plaques à puits doit être réalisée de manière très rigoureuse pour limiter les contaminations, ce qui nécessite du personnel formé. De plus, lors de l'étape de détection par gel d'électrophorèse un agent intercalant, le BET, qui est un produit mutagène, peut être utilisé. La séquence d'ADN à amplifier doit également être préalablement connue, et les sondes ainsi que les cycles thermiques optimaux doivent être définis pour que l'amplification se fasse au mieux afin d'avoir le moins d'erreurs possible. La réalisation d'une PCR nécessite également un appareil spécial, le thermocycleur, ainsi que des réactifs assez onéreux (J.C. Kaplan et al, 2007). Des méthodes dérivées de la PCR classique ont été développées afin de réduire les coûts, le volume d'échantillon et le temps d'analyse en réalisant du multiplexage ou en permettant la lecture des résultats en temps réel (RT-PCR). Ces méthodes ainsi que les avantages et les inconvénients de chacune sont comparés dans le Tableau 2-1.

Des kits commerciaux sont maintenant disponibles pour réaliser des PCR. Le kit TaqMan[®] développé par Roche contient des sondes marquées avec un fluorophore pour pratiquer la PCR en temps réel. Associé à un appareillage commercial comme le Light-Cycler (Roche, Bâle, CH) ou le 7500 Fast Real Time PCR SystemTM (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), ces kits permettent de réaliser 96 PCR avec 1 μ l d'ADN (équivalent à 5-20 ng d'ADN) par échantillon en 30 minutes et sans détection par électrophorèse (*Lefferts et al, 2010*). Ces kits rendent la PCR plus rapide et nécessitent peu d'échantillon sanguin (quelques microlitres) mais restent assez chers (100-250 €) et ne sont pas adaptés à tous les tests de génotypage. Le kit KAPA Blood PCR (CliniSciences, France) amplifie les fragments d'ADN à partir d'un échantillon de sang total et ne nécessite donc pas d'étape d'extraction de l'ADN préalable. Le test est donc plus rapide mais n'est pas adapté à tous les essais de génotypage et une étape de détection est toujours requise *a posteriori*.

Les méthodes de PCR sont très utilisées en laboratoire pour le diagnostic à partir d'ADN. Toutefois chaque méthode a ses avantages et ces inconvénients (Tableau 2-1). D'une manière générale, elles sont contraignantes à mettre en œuvre et sont souvent coûteuses. Il est donc nécessaire de développer de nouveaux systèmes de génotypage plus simples, rapides et avec des performances similaires ou améliorées par rapport à la PCR.

	Principe	Avantages	Inconvénients	Ref
PCR classique	Amplification exponentielle de courtes séquences spécifiques d'ADN grâce à des sondes.	-Simple -Facilement automatisable -Sensible	-Besoin d'une étape de détection après amplification -Besoin de connaître les séquences à amplifier au préalable -La longueur de la séquence à amplifier ne peut pas dépasser 3 kb	(J.C. Kaplan et al, 2007; Monteiro et al, 2011)
PCR en temps réel	Suivi de l'évolution de la PCR en direct par mesure de la fluorescence émise par un fluorophore lié à une sonde.	-Quantitatif -Résultats en temps réel -Pas besoin d'étape de détection après amplification -Possibilité d'automatisation - Multiplexage	-Sondes coûteuses -Nécessite des tests préliminaires -Nécessite un appareillage spécifique	(Arinsburg et al, 2012)
PCR –SSP (sequence specific primers)	L'amplification n'aura lieu que si le nucléotide en 3' de la sonde est complémentaire de la séquence à amplifier. Dans le cas contraire, la sonde ne pourra pas s'hybrider et l'amplification n'aura pas lieu	-Idéal pour détecter les SNP - Amplification d'ADN double brin inconnu -Simple	-Besoin d'une étape de détection après amplification -Besoin de deux sondes différentes -Difficile à automatiser	(Arinsburg et al, 2012), (Shyamala et al, 1989; Cavanagh et al, 1997)
PCR Multiplexe	Amplification simultanée et spécifiques de différentes séquences d'ADN de tailles variées en un seul puits grâce à l'introduction de plusieurs sondes dans le mélange de réaction	-Amplification simultanée de différentes séquences -Econome en réactifs -Rapide	-Besoin d'une étape de détection après amplification -Nécessite plusieurs sondes -Difficulté d'optimiser l'essai -Les séquences d'ADN à amplifier doivent avoir des tailles suffisamment différentes pour pouvoir être différenciées.	(J.C. Kaplan et al, 2007; Monteiro et al, 2011)
PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)	L'ADN est amplifié par PCR classique puis les amplicons sont soumis à une digestion enzymatique. Si l'allèle contenant le site de restriction enzymatique requis est présent, l'ADN sera clivé, sinon il restera intègre.	-Simple -Peu coûteux	-Besoin d'une étape de détection après amplification -Nécessite une étape supplémentaire de digestion enzymatique -Nécessite qu'un site de restriction soit présent sur un allèle et pas sur l'autre -Ne permet pas le multiplexage -Difficile à automatiser	(Hurd et al, 2002; Arinsburg et al, 2012)

Tableau 2-1 : Avantages et	inconvénients des	différentes me	éthodes de PCR	utilisées pour	le génotypage
----------------------------	-------------------	----------------	----------------	----------------	---------------

2.1.2 La méthode immuno-enzymatique (ELISA)

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est un outil de diagnostic très utilisé en laboratoire pour la détection et la quantification de pathogènes, d'antigènes (Hutchings et al, 2006), d'anticorps (Brown et al, 1997) et de protéines en générale (Hnasko et al, 2011). L'ELISA est un immunotest réalisé en phase solide et utilisant les interactions antigène / anticorps couplées à une enzyme qui génère un signal en induisant un changement colorimétrique. Le test ELISA peut être réalisé de différentes façons (Figure 2-2) dont les avantages et les inconvénients sont décrits dans le Tableau 2-2. Chacune de ces méthodes est composée de deux systèmes clefs : le système de capture et le système de détection. Le système de capture peut être un antigène ou un anticorps attaché à la surface solide de manière chimique ou par adsorption. Le système de détection est le plus souvent une enzyme liée à un anticorps spécifique de la molécule ou du complexe immun à détecter. Un substrat de l'enzyme est ajouté pour induire un changement optique (le plus souvent un changement de couleur) qui est quantifié par spectrophotométrie par exemple et qui permet de déterminer la quantité de la molécule recherchée dans l'échantillon. Dans tous les tests ELISA, la molécule recherchée est le composant limitant, et le système de capture et de détection sont présents en excès. Puisqu'ils sont basés sur des interactions antigène / anticorps, les tests ELISA sont très sensibles. Avec une détection du signal par spectrophotométrie, il est possible de détecter environ 1 ng/ml de molécules dans un échantillon (Engvall et al, 1972). Les différentes étapes du test sont essentiellement des étapes de lavages et d'incubations ce qui rend le test facilement automatisable. Les tests ELISA pour lesquels l'élément de capture est immobilisé sur la surface par adsorption sont moins spécifiques. En effet, l'interaction antigène / anticorps peut être déstabilisée au cours du temps par les différentes étapes de l'essai et par la réversibilité de l'adsorption à la surface (Hainque et al, 2008). L'ELISA sandwich où l'anticorps est lié chimiquement à la surface réduit ces effets mais nécessite plus d'étapes et de réactifs.

Des kits pour réaliser des tests ELISA sont commercialisés. Leur coût varie de 100 à 400 € et le volume nécessaire pour réaliser l'essai est inférieur à 100 µl par puits.



Figure 2-2 : Schémas des différentes configurations les plus utilisées pour réaliser le test ELISA [http://www.piercenet.com]

Tableau 2-2 : Avantages et inconvénients des différentes méthodes ELISA utilisées pou	r les	immunotests
---	-------	-------------

	Principe	Avantages	Inconvénients	Réf
ELISA directe	L'antigène est déposé sur la surface solide par adsorption et est révélé par un anticorps couplé à une enzyme.	- Simple - Facilement automatisable - Sensible - Quantitatif - Spécifique - Permet le multiplexage	 Nécessité d'avoir un anticorps spécifique de l'antigène à détecter Coûteux Plusieurs étapes Long Nécessite de nombreux réactifs 	(Engvall et al, 1972; Butler, 2000)
ELISA indirecte	L'antigène connu est déposé sur la surface solide par adsorption, l'anticorps complémentaire de l'antigène se fixe dessus et un anticorps secondaire couplé à une enzyme et dirigé contre le premier anticorps va se fixer sur le complexe immun formé.	 Simple Facilement automatisable Sensible Quantitatif Spécifique Permet le multiplexage 	 Nécessite deux anticorps Risque d'adsorption non spécifique Long Coûteux 	(Butler, 2000)
ELISA sandwich	Un anticorps de capture est immobilisé sur la surface solide. Il fixe l'antigène qui va lui-même fixer un anticorps complémentaire sur lequel viendra se fixer un anticorps secondaire couplé à une enzyme.	- Les anticorps sont liés chimiquement au support Plus spécifique que les autres ELISA	 Nécessite deux ou trois anticorps Risque d'adsorption non spécifique Long Coûteux 	(Butler, 2000; Hainque et al, 2008)

Les tests PCR et ELISA sont utilisés en routine pour réaliser des diagnostics *in vitro* à partir d'ADN ou de protéines. Toutefois, ils sont coûteux et longs. En effet, même s'ils sont facilement automatisables, ils nécessitent beaucoup d'étapes et la préparation préalable des échantillons est longue et contraignante. Actuellement, de nombreuses recherches sont menées afin de simplifier, miniaturiser et / ou trouver des alternatives à ces méthodes. Pour cela, les micro et nano particules sont de plus en plus utilisées et permettent de développer des outils de diagnostic moléculaires *in vitro* sensibles, miniaturisés et nécessitant le minimum de réactifs et d'échantillons biologiques. Les paragraphes suivants décrivent les

différentes particules utilisées et quelques méthodes de diagnostic moléculaire à base de micro et nanoparticules développées ces dernières années.

2.2 Différentes micro et nanoparticules utilisées pour le diagnostic moléculaire in vitro

Par leurs propriétés particulières, telles leur taille et leur rapport surface/volume élevé, les micro et nanoparticules sont des outils de choix pour développer des dispositifs miniaturisés. Grâce aux progrès réalisés dans la synthèse des particules, il est possible de créer des particules multifonctionnelles et facilement fonctionnalisables. Elles peuvent également être marquées avec un fluorophore ou posséder des propriétés multiples (particules magnétiques fluorescentes, particules thermosensibles). Un certain nombre de particules ont été développées mais quatre types, les particules magnétiques, les nanoparticules d'or, les quantum dots et les particules fonctionnalisées et multifonctionnelles sont plus particulièrement utilisées pour créer des outils de diagnostic *in vitro* afin de détecter des agents pathogènes, faire du génotypage ou mettre en évidence la présence d'un biomarqueur par exemple.

2.2.1 Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or sont composées d'un cœur diélectrique entouré d'une fine couche d'or. Leur taille varie entre 0,8 et 250 nm (*Azzazy et al, 2009*). Leurs propriétés optiques et physiques font d'elles de bons outils de détection car elles favorisent l'absorption de la lumière et sa diffusion. Ces propriétés varient en fonction de la taille des particules, de leur forme et de la distance qui les sépare les unes des autres. Lorsque les particules se rapprochent à une distance de moins de 25 nm, leurs propriétés de diffusion et d'absorption de la lumière varient, et cela se traduit par un changement de couleur de la solution du rouge vers le bleu. Les nanoparticules d'or possèdent également des propriétés d'extinction de fluorescence (quenching). Du fait de ces propriétés, et parce qu'elles sont facilement synthétisables et fonctionnalisables, les nanoparticules d'or sont très utilisées comme éléments de détection pour le diagnostic moléculaire *in vitro (Azzazy et al, 2012)*. Souvent elles sont couplées à une détection par fluorescence, à du SERS (Surface Enhanced Raman Scattering), à la SPR (Surface Plasmon Resonance) ou à la conductimétrie

(*Jain, 2005*). Elles peuvent également être utilisées comme élément de capture des biomolécules d'intérêt lorsqu'elles sont fonctionnalisées ou pour l'imagerie médicale (*Saha et al, 2012*).

2.2.2 Quantum dots

Les quantum dots (QDs) sont des cristaux de semi-conducteurs ayant un diamètre de 2 à 10 nm (Azzazy et al, 2009; Valizadeh et al, 2012). Les QDs ont la capacité d'émettre une fluorescence importante quand ils sont excités par une lumière UV. Cette fluorescence est caractérisée par un large spectre d'excitation et un spectre d'émission étroit. Les QDs sont photostables, ils évitent le photoblanchiment et ont une bonne résistance à la dégradation. La fluorescence des QDs varie en fonction de leur taille et du semi-conducteur dont ils sont composés (Jain, 2005). Plus leur diamètre est important, plus la longueur d'onde émise est grande (vers le rouge) et inversement (Figure 2-3). En ce qui concerne les outils de diagnostic in vitro, les QDs sont principalement utilisés comme marqueurs et éléments de détection. Des tests utilisant les QDs comme détecteurs de biomarqueurs de cancer ou pour marquer des molécules comme des anticorps ou de l'ADN à des fins de détection de maladies infectieuses par exemple ont été décrits (Valizadeh et al, 2012). Les QDs ont toutefois le désavantage d'être cytotoxiques et peuvent s'oxyder au contact de l'eau ou de l'oxygène (Hurd et al, 2002; Azzazy et al, 2009), (Probst et al, 2012). Leur émission dépend également de leur environnement chimique et de leur fonctionnalisation qui peuvent entraîner un phénomène de clignotement des QDs.



Figure 2-3 : Illustration de la variation des spectres de fluorescence de QDs CdSe/ZnS en fonction de leur taille quand ils sont excités à 365 nm [www.elec-intro.com]

2.2.3 Particules magnétiques

Les particules magnétiques sont des micro ou des nanoparticules possédant un cœur ou une enveloppe de métal qui leur confère des propriétés magnétiques. Grâce à ces propriétés, elles peuvent être utilisées pour des applications médicales diverses comme en imagerie par résonance magnétique (IRM), pour la délivrance de médicaments, ou pour la thérapie en oncologie via l'hyperthermie (*Shinkai et al, 2002*). Pour le diagnostic *in vitro*, elles sont principalement utilisées pour réaliser des séparations, des purifications ou des concentrations d'échantillons après avoir été fonctionnalisées avec des biomolécules (anticorps, oligonucléotides...) complémentaires de la molécule à mettre en évidence (*Shinkai et al, 2002; Haun et al, 2010; Frimpong et al, 2010*). En effet, du fait de leur forte magnétisation, ces particules permettent de réaliser des séparations magnétiques rapides et simples grâce à un aimant. Cela permet d'éviter d'utiliser la centrifugation ou la filtration pour purifier ou laver des échantillons et de ce fait d'avoir moins de pertes ou de contraintes sur l'échantillon. De plus, elles sont stables, peu coûteuses, permettent la détection en milieu turbide et sont biocompatibles (Haun et al., 2010).

Les particules magnétiques peuvent également être utilisées comme outil de détection puisque leur agrégation entraîne des changements dans leur environnement magnétique. La mesure de ces changements permet de mettre en évidence la présence de la biomolécule recherchée comme cela sera expliqué plus tard.

2.2.4 Particules fonctionnalisées et multifonctionnelles

Il existe principalement trois méthodes pour ajouter une ou plusieurs fonction à une particule (magnétique, latex, or, QDs, etc...) : la fonctionnalisation de surface, l'enrobage dans un autre matériau ou l'incorporation d'un autre matériau dans la masse de la particule (particule cœur-coquille).

Les progrès en chimie de surface ont permis de fonctionnaliser facilement toutes sortes de particules (magnétiques, latex, or, QDs, etc...), *in situ* ou après synthèse, pour leur conférer des propriétés supplémentaires. Il est donc possible d'ajouter des groupements chimiques à la surface des particules afin de fixer des biomolécules telles que des protéines, des récepteurs, des antigènes, des anticorps ou des oligonucléotides. Ces particules biofonctionnalisées pourront servir d'outils de capture ou de marquage de la biomolécule cible pour sa détection.

Un autre moyen de conférer de nouvelles propriétés à des particules est de les enrober avec un matériau aux propriétés particulières et/ou avec une substance luminescente. Ainsi, certains polymères comme le poly(N-isopropylacrylamide) peuvent attribuer des propriétés thermo-dépendantes aux particules (*Balasubramaniam et al, 2011*). Ces particules multifonctionnelles sont de plus en plus utilisées pour élaborer des outils de diagnostic car elles ont des propriétés riches et modulables en fonction de paramètres simples tels que la température ou le pH.

L'incorporation d'un fluorophore ou d'un colorant à l'intérieur de la masse de la particule ou dans le polymère d'enrobage permet de rendre des particules luminescentes, ce qui leur confère également des propriétés intéressantes. L'incorporation du fluorophore dans la particule le protège du photoblanchiment et de la dégradation. Les particules rendues fluorescentes sont souvent à base de polymères comme le latex mais peuvent également avoir un cœur magnétique ou de silicium, ce qui en fait des particules multifonctionnelles. En effet, en enrobant des particules magnétiques avec un polymère marqué avec un fluorophore, les nouvelles particules auront à la fois des propriétés magnétiques et optiques. Des particules luminescentes diverses sont utilisées comme marqueurs pour détecter de manière directe ou indirecte les biomolécules d'intérêts lors d'un diagnostic *in vitro*.(*Probst et al, 2012*).

Comme nous venons de le voir, il existe plusieurs sortes de micro et nanoparticules pouvant être utilisées pour le diagnostic moléculaire *in vitro* et chacune d'elles a des propriétés particulières qui lui sont propres. Notons également l'apparition de nouvelles nanostructures comme les nanotubes qui sont utilisés pour réaliser des outils de diagnostic *in vitro*. Il s'agit de petite structure avec un diamètre de quelques nanomètres et qui ont des propriétés semi-conductrices (*Wanekaya et al, 2006*). Ils sont souvent utilisés pour réaliser des biocapteurs avec une détection électrique (*Hahm et al, 2004*; *Wanekaya et al, 2006*; *Chang et al, 2011*). Ces structures et ces biocapteurs ne seront pas développés ici.

Nous allons maintenant décrire différentes méthodes de détection avec lesquelles ces particules peuvent être couplées pour réaliser des outils de diagnostic moléculaire. Nous allons particulièrement nous intéresser aux avantages et aux inconvénients de chacun.

2.3 Techniques de diagnostic moléculaire in vitro utilisant les micro et nanoparticules

Ces dernières années, de nombreux outils de diagnostic *in vitro* basés sur l'utilisation de micro et/ou nanoparticules comme éléments de capture ou de détection de la molécule cible couplés à des méthodes de détection diverses (électrochimiques, magnétiques, optiques...) ont été développés. Dans cette section, quelques-unes de ces techniques sont présentées. La liste des techniques est loin d'être exhaustive mais elle comprend divers systèmes couplés avec des méthodes de détection optiques, des systèmes utilisant la résonance magnétique ou dont le résultat est visible à l'œil nu. Quelques dispositifs de laboratoires sur puce déjà commercialisés seront également présentées.

Les performances annoncées de ces tests seront comparées avec celles des outils usuels de diagnostic précédemment présentés. Les critères de comparaison seront principalement axés sur le volume d'échantillon nécessaire, le temps d'analyse, la limite de détection (LOD) et la spécificité de détection.

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel	ADN	750	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++	+++	(Shyamala
d'électrophorèse	fragmenté et	μL				copies	(SNP)		et al,
	amplifié =								1989;
	amplicon								Hurd et al,
									2002),
									(Cavanagh
									et al,
									1997)
ELISA	protéine	750	100 µl	3h	30 min	1.10 ⁻¹¹ g	+++	+++	(Butler,
		μl				de			2000)
						protéine			

Tableau 2-3 : Performances analytique de la PCR-SSP et du test ELISA.(Réf = références, V. éch = volume d'échantillon, LOD = limite inférieure de détection)

2.3.1 Système de détection optique

Détection par mesure de la lumière diffusée et absorbée

Deux méthodes vont être décrites ici, la méthode de détection par UV-visible qui mesure la lumière absorbée et la méthode de DLS (Dynamic Light scattering) qui mesure la diffusion de la lumière dans des conditions particulières.

• Spectroscopie d'adsorption UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une technique permettant de mesurer le spectre d'absorption de molécules dans l'ultraviolet (200-400 nm), le visible (400-700 nm) et le proche infrarouge (750-1400 nm). Ce spectre dépend de la nature et de la composition de l'échantillon analysé. Cette méthode de détection est principalement utilisée pour quantifier différentes molécules ou pour détecter des changements colorimétriques dans des solutions contenant des ions métalliques.

En ce qui concerne l'élaboration d'outils de diagnostic moléculaire *in vitro* à base de particules et couplé à une détection par UV-visible, Zhan et al décrivent une méthode simple pour la détection d'ADN viral (*Zhan et al, 2010*). Elle consiste en la formation de sandwichs, en présence de l'ADN cible, entre des particules magnétiques et des particules d'or biofonctionnalisées avec des sondes oligonucléotidiques complémentaires de l'ADN cible. Les sandwichs sont ensuite isolés par séparation magnétique et dénaturés. La taille des

nanoparticules d'or est ensuite augmentée grâce à une réaction catalytique en présence d'AuCl4-. Les propriétés optiques des nanoparticules d'or dépendent de leur taille et sont facilement observables par spectroscopie UV-visible. L'augmentation de leur taille va se traduire par une augmentation du signal d'absorption à une longueur d'onde donnée. La taille des particules obtenues est directement liée au nombre de particules d'or disponibles et donc indirectement à la quantité d'ADN cible initialement présent dans la solution. L'essai n'est pas très sensible (détection de 6.10⁵ oligonucléotides) et est assez longue (3h30). Toutefois, il est simple à mettre en œuvre et ne nécessite pas beaucoup de réactifs ni d'instrumentation complexe. Il serait donc intéressant de voir les résultats obtenus avec cette méthode pour des échantillons biologiques.

Un essai similaire est décrit par Jans et al (*Jans et al, 2011*) pour la détection de la protéine PSA (prostate specific antigen). Dans ce cas les particules sont fonctionnalisées avec des anticorps spécifiques de la PSA. Après la formation de sandwichs, l'échantillon est purifié par séparation magnétique et les nanoparticules d'or qui ne sont pas liées à un sandwich sont dosées par spectroscopie UV-visible. Cette fois l'essai ne nécessite pas d'étape de dénaturation des sandwichs et ne dure plus que 2 h. La limite de détection du test (quelques ng de protéine) est supérieure à celle obtenue par ELISA.

Les tests couplant l'utilisation de nanoparticules avec une détection par spectroscopie UV-visible sont simples et nécessitent des appareils faciles à utiliser mais ils n'augmentent pas significativement les performances du test par rapport aux méthodes usuelles.

• DLS (Dynamic light scattering)

La détection par diffusion de la lumière (DLS pour Dynamic Light Scattering) est basée sur la mesure de la variation d'intensité de lumière diffusée lorsqu'elle rencontre une particule. Du fait que ces variations dépendent de la taille des particules, cette méthode met en évidence la dispersion de taille de particules en suspension ou en solution dans un échantillon mais aussi l'agrégation des particules. Cette méthode est simple et quantitative mais elle est limitée à des échantillons non turbides et purifiés. En effet, la présence de particules parasites dans l'échantillon peut créer des interférences de mesures. Pour évaluer la lumière diffusée un appareil spécifique mesurant des particules dont la taille varie de quelques nanomètres à quelques dizaines de micromètres est utilisé.

Pour le diagnostic moléculaire, cette méthode de détection peut être couplée à des nanoparticules d'or qui vont s'agréger en présence de la molécule cible qui peut être un antigène (*Driskell, 2011*), une protéine (*Liu et al, 2009; Huo, 2010*) ou de l'ADN (*Dai et al, 2008*).

Dans ces études, le principe est sensiblement toujours le même. Des nanoparticules d'or de 30 à 40 nm de diamètre sont biofonctionnalisées avec des éléments de capture (des anticorps ou des oligonucléotides). La molécule cible se lie avec les éléments de capture et entraîne l'agrégation des particules entre elles. La détection par DLS mesure la taille des agrégats qui est directement corrélée à la quantité de molécules capturées (Figure 2-4). Cette méthode est simple, ne nécessite qu'une seule étape et peut facilement être automatisée. Elle détecte des quantités de protéines de l'ordre de quelques nanogrammes (*Liu et al, 2009; Huo, 2010*) et des quantités d'ADN de l'ordre de 3.10⁹ oligonucléotides) (*Dai et al, 2008*). Si l'étape de détection est très courte (quelques secondes), le test entier dure environ 2h. Cette méthode est sensible et spécifique car elle permet la détection de SNP (*Dai et al, 2008*) mais il faut un équipement complexe et coûteux pour la mettre en œuvre.



Figure 2-4 : Illustration de la capture d'une biomolécule en une étape par des particules d'or biofonctionnalisées et avec une détection par DLS. a) pour la capture d'une protéine (illustration issue de (*Liu et al, 2009*) et b) pour la capture d'ADN (illustration issue de (*Dai et al, 2008*)).

L'utilisation de particules couplées à une technique de détection par absorption ou diffusion de la lumière pour le diagnostic moléculaire est donc une méthode simple basée

sur la mesure d'agrégats mais la limite de détection est plus importante comparée aux méthodes de diagnostic usuelles telles que la PCR et l'ELISA. D'autres méthodes permettent de détecter un faible signal comme les méthodes utilisant la fluorescence.

> Par scanométrie

La détection par scanométrie a été décrite par Mirkin et al en 2000 (*Taton et al, 2000*). Elle est basée sur les propriétés optiques des particules d'or dont le signal est amplifié par dépôt d'argent à leur surface. Couplée à une méthode de détection utilisant les biocodebarres, elle permet de détecter de faible quantité d'ADN non amplifié.

La technique des biocode-barres permet d'avoir plusieurs éléments de détection pour une biomolécule d'intérêt et ainsi d'augmenter le signal afin de détecter de faibles quantités de biomolécules. Elle a été décrite pour la première fois par l'équipe de Mirkin en 2003 (*Nam et al, 2003*).

D'une manière générale, la méthode des biocode-barres nécessite deux éléments. Un élément sert à capturer la molécule cible. Il s'agit le plus souvent d'une particule magnétique biofonctionnalisée avec des anticorps ou des oligonucléotides complémentaires de la molécule cible. Le second est un élément de détection. Il s'agit d'une particule également fonctionnalisée avec des biomolécules complémentaires de la cible et avec des biocodebarres. Les biocode-barres sont des oligonucléotides doubles brins pouvant s'hybrider et se séparer facilement. L'un des brins est greffé sur la surface de la particule et l'autre est marqué avec un élément de détection (autre particule, fluorophores, QDs...). En présence de la molécule cible, un sandwich se forme entre l'élément de capture et l'élément de détection. Les sandwichs sont isolés par séparation magnétique. Par la suite, les biocodebarres sont dénaturés et leur présence est mise en évidence par un instrument de détection. La présence effective des biocode-barres après la séparation magnétique révèle indirectement la présence de la molécule cible. Le fait qu'une particule capturant la molécule d'intérêt soit fonctionnalisée avec une multitude de biocode-barres permet d'avoir plusieurs éléments de détection par biomolécule et donc de mettre en évidence de faibles quantités de cibles.

Dans la méthode décrite par Mirkin et utilisant la scanométrie, l'ADN cible est capturé et sa présence est révélée grâce à des biocode-barres liés à des nanoparticules d'or.

Les biocode-barres sont ensuite récupérés et hybridés avec des oligonucléotides immobilisés sur une surface transparente comportant différents plots avec des oligonucléotides différents. Les biocode-barres liés aux nanoparticules d'or s'hybrideront avec les oligonucléotides qui leur sont complémentaires et donc sur une partie bien spécifique de la plaque. La présence de biocode-barres (et donc indirectement de l'ADN cible) est révélée par la présence des nanoparticules d'or. Pour amplifier le signal, les nanoparticules d'or sont recouvertes d'argent via la réduction des ions argent en présence d'hydroquinone (Figure 2-5). Une coloration grise caractérise alors les endroits où l'argent s'est déposé et donc où la cible est présente. Les résultats sont observés grâce à un simple scanner. Sur la plaque, la localisation de la zone où se sont fixés les biocode-barres permet d'identifier la cible capturée, tandis que l'observation des différentes nuances de gris permet de quantifier la présence de particules d'or recouvertes d'argent et donc d'ADN présent dans l'échantillon.



Figure 2-5 : Représentation schématique de la technique de détection par scanométrie sur puce développée par Mirkin et al (issue de (*Taton et al, 2000*)).

Cette méthode est performante car elle permet d'amplifier fortement le signal et ne nécessite pas d'instrument de détection coûteux. Elle est très sensible et permet de détecter des protéines avec une limite de détection de l'ordre de 1 aM (10⁻¹⁸ g) (*Goluch et al, 2006*) et de l'ADN génomique bactérien avec une limite de détection de l'ordre de 2.5 fM (environ 10⁵ copies) d'ADN (*Hill et al, 2007*). De plus, elle peut être réalisée sur puce (*Goluch et al, 2006*).

Toutefois, la méthode décrite ici pour détecter un faible signalest longue (environ 6 h). Cette technique a été améliorée et a donné lieu à un outil de diagnostic commercialisé qui sera décrit dans la section 2.5 de cet état de l'art.

> Par mesure de la fluorescence

La détection par fluorescence est très employée dans le diagnostic médical. En effet, elle peut se faire avec un appareillage simple et, de nombreux procédés ont été développés pour marquer différents types de biomolécules (anticorps, oligonucléotides...). D'autre part, un grand nombre de fluorophores est disponible, ce qui rend possible le multiplexage. Dans les outils de diagnostics médicaux, les fluorophores sont essentiellement utilisés pour mettre en évidence la molécule cible ou comme marqueurs pour différencier différentes molécules. La détection de la fluorescence peut être réalisée avec des appareils simples mais le signal d'émission doit être suffisamment fort principalement si la quantité de molécules à détecter est faible (ce qui est souvent le cas dans des échantillons biologiques de patient). Dans ce paragraphe, nous allons décrire quelques méthodes utilisant la détection de fluorescence et appliquées au diagnostic moléculaire. Les principes de bases de la fluorescence sont décrits à l'ANNEXE B.

Il existe de très nombreuses méthodes afin de faire de la détection de molécules grâce aux propriétés de la fluorescence comme par exemple le FRET (*Zhang et al, 2010*). Nous avons choisi de développer ici des méthodes utilisant la méthode des biocode-barres ainsi que des méthodes utilisant une détection par la cytométrie en flux pour détecter de faibles quantités de molécule. Nous comparerons les résultats obtenus avec ces méthodes par la suite.

<u>Tests utilisant la méthode des biocode-barres avec détection par un biocapteur à ondes</u> <u>évanescentes</u>

Cette technique de biocode-barres a d'abord été proposée par Mirkin qui l'associe à une détection par scanométrie comme cela est décrit au début de la section 2.3.1. L'utilisation de fluorophores ou de QDs couplée à la méthode de détection par biocodebarres est également intéressante car la fluorescence est rapide à détecter et permet le multiplexage, comme le montrent certaines études (*Liu et al, 2008; Xiang et al, 2011*). Le système de capture d'ADN développé par Trévisan et al pour le génotypage plaquettaire utilise la méthode des biocode-barres couplée à une détection par un système à ondes évanescentes.

Ce système, est un biocapteur développé par Davos Diagnostics dont le principe est basé sur l'excitation par ondes évanescentes de fluorophores proches de la surface d'un prisme ou liés à celle-ci. La réaction se passe dans une barrette appelée EVA-chip (Figure 2-6 A) composée de deux parties : une partie supérieure comportant les puits dans lesquels seront introduits les échantillons et une partie inférieure composée d'un prisme optique. Une EVA-chip comporte huit puits. Pour réaliser la détection de fluorescence, l'EVA-chip est introduite dans un Evareader (Figure 2-6 B) composé, entre autres, d'un laser à une longueur d'onde de 635 nm. Lorsque le faisceau laser frappe l'interface entre le liquide contenu dans le puits et le prisme, il est diffusé dans une autre direction. Quelques photons issus du faisceau laser pénètrent dans la couche liquide du puits formant un champ évanescent de 200 nm au-dessus de l'interface entre le liquide et le prisme (Figure 2-6 C). Si des fluorophores se trouvent dans ce champ évanescent, ils sont excités par les photons du laser et émettent à leur tour des photons qui sont détectés par un détecteur placé sous le prisme. Afin d'avoir le maximum de fluorophores dans le champ évanescent, la surface du prisme est biofonctionnalisée de manière à immobiliser les fluorophores au fond du puits de l'EVA-chip grâce à des interactions biologiques (de type neutravidine-biotine, antigène-anticorps...). Lors de la mesure de fluorescence par l'Evareader, chaque puits est analysé cycliquement à raison d'une seconde par puits. Au cours du temps, de plus en plus de fluorophores sont immobilisés au fond du puits et la cinétique de fluorescence (et donc de l'immobilisation des fluorophores) est mesurée en temps réel pour chaque puits. Les résultats sont présentés sous la forme de graphiques représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. L'Evareader possède l'avantage de réduire les étapes de manipulations, de purifications et de lavages souvent nécessaires avant la détection avec d'autres types de méthodes.



Figure 2-6 : A) Photos des EVA-chip servant de support pour l'analyse ; B) Evareader, support dans lequel sont introduites les EVA-chip et où la fluorescence pourra être lue en temps réel (© Davos Diagnostics) ; C) Schéma de la détection de la technique de détection de fluorescence dans un puits d'une EVA-chip (©Davos Diagnostics

Dans le travail de Trévisan et al, l'Evareader est utilisé pour détecter la fluorescence émise par les fluorophores portés par les biocode-barres (*Trevisan et al, 2010*). La cible, ici la séquence d'ADN plaquettaire HPA-1, est capturée et mise en évidence par la formation de sandwichs entre des particules magnétiques et des particules de latex fonctionnalisées avec des oligonucléotides qui lui sont complémentaires. Les biocode-barres sont situés sur les particules de latex et sont marqués à leur extrémité par une biotine et un Cy5 (Figure 2-7 a-1) qui émet une fluorescence lorsqu'il est excité à 635 nm. Lorsque les sandwichs incluant la cible ont été isolés par séparation magnétique, les biocode-barres sont récupérés et immobilisés à la surface d'une barrette servant à l'analyse par l'Evareader. L'Evareader est un outil de détection de la fluorescence basé sur l'excitation par ondes évanescentes de fluorophores situés à la surface du puits d'une barrette (Figure 2-7 a-2). Cette surface est recouverte de neutravidine. Les biocode-barres introduits dans la barrette s'immobilisent au fond du puits grâce à la biotine qu'ils portent et qui interagit avec la neutravidine. L'onde évanescente de l'Evareader excite uniquement les fluorophores présents dans les 200 nm au-dessus de la surface du puits (Figure 2-6 C). Seuls les fluorophores capturés sur la surface contribuent significativement au signal. La cinétique de capture des biocode-barres fluorescents au fond du puits est ainsi mesurée en temps réel (Figure 2-7 a-3).

Ce système complet de diagnostic permet de détecter 6.10⁵ copies d'ADN synthétique (Figure 2-7 b) en 5 h et permet de détecter le polymorphisme entre deux allèles qui diffèrent seulement d'un nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism) comme le montre la Figure 2-7 b.



Figure 2-7 : a) Schémas montrant les grandes étapes de la détection d'ADN en utilisant la méthode des biocode-barres couplée à une détection de la fluorescence par l'Evareader[®] : 1) Schéma de capture de l'ADN (en rouge) par les particules magnétiques (MB) et de latex (LB) biofonctionnalisées. Les particules de latex portent les biocode-barres (en vert). 2) schéma de l'excitation des fluorophores par l'onde évanescente lorsque les biocode-barres sont immobilisés au fond du puits. 3) Evareader mesurant la cinétique de fluorescence en temps réel. b) Cinétiques de fluorescence mesurées en fonction de la concentration en cibles initiales après capture par le système de sandwich couplé à la méthode des biocode-barres et détection par Evareader. Les carrés rouges correspondent aux brins complémentaires (cible b + sonde b) et les triangles bleus correspondent aux brins non complémentaires (*cible a* + sonde b) (*Trévisan, 2011*)

Cette méthode développée à l'INL en collaboration avec l'EFS Rhône-Alpes constitue le point de départ du travail de thèse présenté dans ce document. Elle est prometteuse puisque ces performances en termes de sensibilité (détection de 6.10⁵ copies d'ADN ce qui est 10 x plus faible que la PCR-SSP) et de spécificité (détection de SNP) sont améliorées par rapport à la PCR. Toutefois, le test complet reste long (5 h) et l'utilisation des biocode-barres rajoutent des étapes complexes au test. Le test devra donc être optimisé et la LOD devra être évaluée avec des échantillons biologiques.

• Tests utilisant la méthode des biocode-barres pour une application de multiplexage

L'association de l'approche par biocode-barres avec une détection par fluorescence permet également de réaliser du multiplexage. Ainsi, dans l'essai décrit par Xiang et al, des particules magnétiques sont fonctionnalisées avec des oligonucléotides complémentaires de deux cibles différentes. Les biocode-barres sont portés par des QDs et sont marqués par des fluorophores différents suivant la cible à laquelle ils sont destinés (*Xiang et al, 2011*). La fluorescence est mesurée par spectrofluorimétrie à différentes longueurs d'ondes. La fluorescence du QD indique que la cible est présente et celle des fluorophores indique quelle est la cible capturée. Ce système est capable de discriminer des SNP avec une limite de détection de 8.10⁶ oligonucléotides et de détecter deux allèles simultanément en 1h30. Toutefois, cela nécessite de greffer deux sondes oligonucléotidiques différentes sur la même particule magnétique ce qui nécessite de maîtriser l'homogénéité de greffage des deux sondes. Cette technique est rapide mais difficile à mettre en œuvre et dans l'exemple donné, le seuil de détection est légèrement plus élevé que celui de la PCR-SSP. Cette méthode ne permet donc pas d'améliorer significativement les performances du test par rapport aux méthodes usuelles.

L'association de la fluorescence à la méthode des biocode-barres permet d'amplifier fortement le signal, ce qui est un point important pour la réalisation d'outils de diagnostic médicaux dont la vocation est de détecter des molécules biologiques parfois présentes en faible quantité. Les quantités de molécules synthétiques détectées dans les essais décrits ici restent toutefois plus basses que celles détectées avec la PCR-SSP.

<u>Test avec détection par cytométrie en flux</u>

La cytométrie en flux est une autre méthode de détection de la fluorescence. Elle permet l'analyse des propriétés optiques d'éléments individualisés en suspension lorsqu'ils passent à travers un rayon laser. Elle requiert un cytomètre de flux qui est un système optique complexe constitué de sources lumineuses, de photomultiplicateurs et de photodiodes pour détecter et évaluer le signal renvoyé par la particule (ce système sera décrit plus en détail dans le chapitre 3).

Le cytomètre de flux permet d'analyser la fluorescence et la diffusion de la lumière résultant du passage d'un élément dans le faisceau laser afin de collecter des données sur la taille, la granularité interne et la fluorescence de ces éléments (*Krishhan et al, 2009*). Certains cytomètres peuvent détecter plusieurs signaux de fluorescence simultanément. La cytométrie en flux est couramment utilisée en laboratoire et plus particulièrement en hématologie. Des méthodes de diagnostic utilisant des microparticules couplées à une détection par cytométrie en flux ont été développées pour détecter des antigènes, des anticorps, des oligonucléotides (*Krishhan et al, 2009*) (*Lizard et al, 2004*) et des cytokines (*Phillips et al, 2006*).

Associée à une méthode par biocode-barres, la cytométrie permet de détecter de faibles quantités d'ADN tout en réalisant une analyse multiplexe comme le montre l'étude de Li (*Li et al, 2005*). Les biocode-barres sont ici des dendrimères d'ADN marqués avec différentes quantités de deux fluorophores émettant à des longueurs d'ondes différentes ce qui confèrent une signature fluorescente différente à chaque biocode-barre (Figure 2-8 a). Ils sont également liés à un oligonucléotide complémentaire de la cible. En présence de la molécule cible, des sandwichs se forment ensuite entre une particule fonctionnalisée et les oligonucléotides de capture portant les biocode-barres. Quand les sandwichs passent devant le faisceau laser lors de l'analyse par cytométrie, le signal de fluorescence obtenu permet de déterminer la cible capturée. Cette méthode permet de détecter plusieurs ADN de pathogènes issus d'un même échantillon biologique avec une limite de détection de 1,5.10⁵ copies d'ADN, ce qui est plus bas que la limite de détection par PCR-SSP. Toutefois ce test requiert l'élaboration des dendrimères d'ADN formant les biocode-barres et nécessite beaucoup de sondes et d'oligonucléotides ce qui rend ce test coûteux.



Figure 2-8 : a) Schéma des dendrimères d'ADN constituant les biocode-barres, b) Schéma de la réalisation de l'essai de détection d'ADN pathogène par la méthode des biocode-barres. La détection se fait par cytométrie en flux. (résultats issus de (*Li et al*, 2005))

D'autres tests de multiplexage utilisant des particules couplées avec une détection par cytométrie en flux ont été décrits (*Spiro et al, 2000*). Ils utilisent des particules marquées avec différents ratio de fluorophore qui leur confèrent un signal de fluorescence unique. Elles sont ensuite fonctionnalisées avec des oligonucléotides de capture complémentaires de la molécule cible. Une étude réalisée avec des amplicons de PCR marqués avec un fluorophore montre que cette méthode permet de mettre en évidence 3,6.10⁹ amplicons de PCR. Cette technique a été améliorée et a donné lieu à des kits commercialisés permettant de détecter plusieurs amplicons de PCR dans un même échantillon. Ils seront décrits à la section 2.5. Ces techniques, couplées à une détection par cytométrie en flux, sont intéressantes pour réaliser des outils de diagnostic moléculaire *in vitro*. Elles sont rapides, nécessitent de faible volume d'échantillon et permettent des analyses multiplexes, simples, reproductibles et quantitatives. Néanmoins, les échantillons analysés doivent être préalablement purifiés pour ne pas contenir de particules parasites. De plus, le cytomètre en flux est un outil coûteux et nécessite des années de pratique et une certaine expertise pour le faire fonctionner.

En général, la fluorescence est souvent utilisée comme moyen de détection lors de la réalisation de diagnostic *in vitro* car elle est simple, basée sur des principes optiques connus et les mesures sont faciles à mettre en œuvre. De plus, un grand nombre de fluorophores ou de QDs sont maintenant disponibles, ce qui permet de réaliser des analyses multiples simultanément. Les méthodes utilisant la cytométrie ne peuvent toutefois être réalisées qu'avec des échantillons non turbides et dans des conditions où la molécule fluorescente est très stable. D'autres méthodes de détection optique existent et permettent la détection de la molécule cible sans avoir besoin de faire un marquage préalable avec un fluorophore comme les méthodes de détection par scanométrie ou par résonance de plasmon de surface.

Par résonance de plasmon de surface (SPR)

La résonance de plasmon de surface (SPR) est une méthode de détection basée sur la mesure de l'intensité de lumière réfléchie au contact d'une fine couche de métal. Les instruments de SPR sont constitués de trois parties : la partie optique, composée de la source lumineuse, d'un prisme et d'un détecteur, la partie liquide qui correspond à une fine couche diélectrique liquide située à la surface d'une couche métallique, elle est déposée à la surface d'un capteur qui constitue la troisième partie du système. La lumière émise par la source lumineuse traverse le prisme et la surface métallique. L'intensité de la lumière réfléchie au contact de la surface métallique est mesurée par un détecteur (Figure 2-9 c).

Sous certaines conditions dépendant principalement de l'angle d'incidence de la lumière avec la couche de métal et de la nature du prisme, des photons pénètrent dans la couche de métal et excitent des plasmons à l'interface entre le métal et le liquide. Ce phénomène induit l'apparition d'une onde évanescente et se traduit par la diminution de l'intensité de lumière réfléchie due à l'absorption de la lumière par les plasmons (*Schasfoort et al, 2008*). Quand un changement intervient dans le milieu liquide (changement de pH ou de concentration) ou quand il y a une accumulation de molécules à l'interface entre le liquide et le métal, le point pour lequel on observe un minimum de lumière réfléchie est décalé (Figure 2-9 b). Cette propriété est très utilisée sur le capteur SPR en vue de mettre en évidence la présence de molécules à l'interface entre la couche diélectrique et une couche de métal. La présence de biomolécules à la surface de la couche métallique induit un changement de l'indice de réfraction et donc de l'intensité de lumière réfléchie. La SPR permet de suivre en temps réel et sans marquage préalable le processus d'adsorption et de désorption des biomolécules sur une surface et de quantifier ces phénomènes (Figure 2-9 a). Dans le cas des biocapteurs, pour éviter l'adsorption non spécifique de biomolécules qui généreraient un signal SPR parasite et pour assurer la spécificité de la reconnaissance, la surface métallique est préalablement fonctionnalisée avec des éléments de capture complémentaires de la molécule d'intérêt



Figure 2-9 : Illustrations de : a) la variation du signal SPR lors de l'adsorption ou la désorption d'une molécule à la surface d'une surface d'or fonctionnalisée avec des anticorps. b) déplacement de l'angle pour lequel le minimum de lumière réfléchie est observée suite à des changements à la surface de la couche métallique. c)représentation schématique d'un outil de détection par résonance de plasmons de surface.(Issu de (*Cesar Andrade*, 2011))

La plupart des capteurs SPR sont réalisés sur des surfaces planes et leurs performances analytiques sont fortement liées à la fonctionnalisation de surface réalisée. Des études montrant les avancées faites en fonctionnalisation de surface et les performances obtenues avec des biocapteurs SPR sont décrites dans la revue de Wijaya et al (*Wijaya et al, 2011*).

Les micro et nanoparticules métalliques (et particulièrement ou d'or) sont toutefois de plus en plus utilisées pour réaliser des biocapteurs avec détection par SPR. Elles servent d'outil de détection et d'amplification ou de support pour réaliser les mesures SPR.

L'étude décrite par Chen et al est une bonne illustration de ce qui peut être réalisé avec la SPR pour le diagnostic moléculaire (Chen et al, 2013). Cette méthode est appliquée à la détection de marqueurs de la tuberculose (et plus spécialement du marqueur CFP-10). Elle utilise des nanoparticules d'oxyde de nickel (NiO) et une détection par SPR. Des anticorps dirigés contre le marqueur CFP-10 sont immobilisés sur la surface d'or du capteur SPR. Les marqueurs CFP-10 sont capturés par les anticorps et sont révélés par un anticorps secondaire greffé sur des nanoparticules NiO (Figure 2-10 a). L'ajout des nanoparticules NiO induit un décalage de l'angle SPR mesuré 3 fois supérieur à celui observé lorsque seuls les biomarqueurs sont capturés à la surface du capteur (Figure 2-10.b et c). Les nanoparticules NiO permettent donc d'amplifier le signal SPR observé. Cette méthode détecte les biomarqueurs sur une gamme de concentration allant de 0.1 à 150 ng /ml (Figure 2-10 d) et une limite de détection de 2.10⁻¹¹ g de molécules, ce qui est de l'ordre de grandeur de ce que l'on peut détecter avec le test ELISA. L'essai est réalisé en 30 à 60 minutes avec seulement 100 µl d'échantillon et les résultats sont observés en temps réel. Toutefois, la ligne de base du signal doit être stabilisée pendant 30 minutes avant l'ajout de la molécule cible, ce qui allonge la durée de l'essai.



Figure 2-10 : a) Représentation schématique d'un biocapteur réalisé pour la détection d'antigène par SPR, b) Graphique montrant le décalage de l'angle SPR observé après l'injection de différentes concentrations de CFP-10. c) Graphique montrant le décalage de l'angle SPR observé après ajout d'anticorps secondaires anti-CFP-10 greffés sur des particules NiO. d) Graphique représentant le décalage de l'angle SPR en fonction de la quantité de molécule cible introduite avant et après ajout des particules NiO. (Issu de (*Chen et al*, 2013))

Cette méthode permet également la détection d'ADN. Ainsi, l'étude réalisée par Li et al consiste à immobiliser des oligonucléotides différant d'un seul nucléotide sur une surface plane recouverte d'or. Ces oligonucléotides servent de sondes pour capturer l'ADN cible. En présence de la cible, un oligonucléotide complémentaire de la cible et lié à une particule d'or va s'hybrider avec la cible. La présence de la molécule d'or va induire un décalage de l'angle SPR mesuré mettant ainsi en évidence la présence de la cible. Cette méthode permet de détecter des quantité d'ADN de l'ordre du picomolaire, de détecter les SNP et de faire du multiplexage (*Li, Y., Wark, A.W., Lee, H.J., Corn, 2006*).

La SPR est donc une technique en devenir prometteur pour réaliser du diagnostic moléculaire. Elle peut être faite avec une instrumentation simple (*Wijaya et al, 2011*) et permet l'obtention des résultats en temps réel sans marquage préalable des molécules. L'inconvénient de cette technique est qu'elle est limitée à la détection de molécules de poids moléculaire élevé. Une manière d'augmenter la sensibilité est l'utilisation de micro ou nanoparticules. Par ailleurs, la spécificité nécessite des précautions pour éviter l'adsorption non spécifique qui augmente le bruit de fond et entrave la lecture du signal lié à la reconnaissance spécifique.

> Par spectroscopie Raman exaltée par la surface(SERS)

La spectroscopie Raman est une technique de détection optique de plus en plus utilisée dans le domaine du diagnostic médical (Tu et al, 2012). La diffusion Raman sur laquelle repose cette technique est un phénomène inélastique qui a lieu lors d'un transfert d'énergie entre des photons et des molécules. Il résulte d'une modification de l'état vibrationnel des molécules lorsqu'elles sont excitées par un laser (Tu et al, 2012). Ce phénomène est rare et des techniques comme la diffusion Raman exaltée par effet de surface (SERS) sont utilisées pour amplifier le signal Raman. Pour cela, la technique exploite l'interaction entre une molécule active en Raman comme un fluorophore par exemple et une surface métallique. L'amplification du signal est principalement due à deux mécanismes physiques : l'effet du champ électromagnétique résultant de l'excitation des plasmons de surface par un laser et l'effet de transfert de charges dû à l'échange d'électrons entre la molécule et le métal (Tu et al, 2012). De cette manière, le signal peut être augmenté d'un facteur 10³ à 10¹⁴. La technique SERS peut être mise en œuvre avec des particules magnétiques mais le signal SERS dépendra alors grandement de la taille et de la composition des particules utilisées et de la distance entre le marqueur Raman et la particule métallique qui doit être très faible. Des indications sur les paramètres à prendre en compte pour avoir un signal Raman fort sont décrites dans la revue (Cialla et al, 2012). Lorsque le SERS est utilisé pour une application de diagnostic moléculaire, les particules utilisées sont souvent des nanoparticules d'or ou d'argent et la présence de la molécule cible est mise en évidence par des variations du signal Raman.

L'étude développée par Vo-Dinh utilise une détection par SERS pour mettre en évidence la présence de gènes du virus HIV-1 (*Wabuyele et al, 2005*). Dans cette étude, une sonde oligonucléotidique complémentaire de l'ADN cible est greffée sur des nanoparticules d'argent et est marquée à son extrémité par un marqueur effet Raman. En absence de la cible, la sonde forme une boucle de manière à ce que le marqueur Raman se trouve proche de la surface de la nanoparticule ce qui se traduit par un fort signal Raman. Après dénaturation et si l'ADN cible est présent, la sonde reste dans un état ouvert et le marqueur Raman est éloigné de la surface de la nanoparticule ce qui se traduit par une diminution du signal Raman (Figure 2-11 a). Le signal Raman va diminuer proportionnellement à l'augmentation de molécules cibles capturées. En utilisant cette méthode, le résultat est obtenu en moins de 2 minutes sans étapes de lavage. Elle est spécifique puisqu'elle permet de détecter des SNP et sensible (détection de l'ordre de 3.10³ amplicons). Elle est rapide et adaptable à différents essais. Des études complémentaires ont également montré que cette méthode permet de réaliser du multiplexage et de détecter simultanément deux marqueurs de cancer en 30 minutes (*Wang et al, 2009; Wabuyele et al, 2010*). Le groupe de Vo-Dinh a également montré que combinée à des dispositifs de détection SERS portable, cette méthode permet de détecter des quantités d'ARN de l'ordre du nanogramme (*Wang et al, 2013*).



Figure 2-11 : a) Schémas de la méthode de capture d'ADN couple à une détection par spectroscopie RAMAN décrite par Vo-Dinh et al. b) Signaux SERS obtenus en absence d'ADN (graphique du haut), en présence d'ADN non complémentaire (graphique du milieu) et en présence d'ADN complémentaire (graphique du bas). (Résultats issus de (*Wabuyele et al, 2005*))

La méthode de diagnostic avec une détection par spectroscopie Raman permet de détecter différentes molécules de manière simultanée et en peu de temps. Les molécules sont quantifiables et le multiplexage est facile à mettre en œuvre du fait des nombreux marqueurs Raman existants. Si la détection par spectroscopie Raman est rapide, les échantillons doivent préalablement être purifiés pour éviter que le bruit de fond ne soit trop élevé. De plus, l'interprétation du signal Raman est parfois difficile et doit être réalisée par du personnel expérimenté.

Les méthodes de détection optiques sont les plus utilisées en laboratoire d'analyse. Un grand nombre de méthode et d'outils de détection sont disponibles. De même, un nombre important de marqueurs (fluorophore...) existent, ce qui permet de marquer différemment des molécules et de réaliser du multiplexage. Ces techniques ne peuvent toutefois pas être utilisées pour faire des mesures en solution turbides et nécessitent donc un traitement préalable de l'échantillon.

Le Tableau 2-4 récapitule les performances de chaque méthode de diagnostic moléculaire utilisant la détection optique développée dans cette section. En termes de sensibilité, les méthodes qui utilisent les biocode-barres couplés à la scanométrie ou à la cytométrie sont plus sensibles que les méthodes usuelles et permettent de détecter de l'ADN non amplifié. La méthode utilisant les biocode-barres couplés à une détection par Evareader est également prometteuse puisqu'elle est plus sensible que la PCR – SSP quand elle est réalisée avec des oligonucléotides synthétiques. Les méthodes utilisant le SERS comme méthode de détection sont très sensibles pour la détection d'amplicon de PCR.

Tableau 2-4 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules associés à des méthodes de détection optiques pour la mise en évidence de biomolécules

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
UV-vis	Oligonucléotides	100 µl	1000 µl	3h30	5 min	6.10 ⁵	+	++	(Zhan et al, 2010)
DLS	Oligonucléotides	/	1500 µl	2h30	30 min	3.10 ⁹	+++ (SNP)	++	(Dai et al, 2008)
Fluorescence (Evareader) + biocode-barres	oligonucléotides	50 µl	25 μl	4h45	15 min	6.10 ⁵	+++ (SNP)	++	(Trévisan 2011; Trevisan et al. 2010)
Fluorescence + biocode-barres	oligonucléotides	100 µl	200 µl	1h30	5 min	8.10 ⁶	+++ (SNP)	++	(Xiang et al, 2011)
Fluorescence (cytométrie) + biocode-barres	ADN de pathogène	/	400 µl	2h	30 min	1,5.10 ⁵	++	++	(Li et al, 2005)
Scanométrie + biocode-barres	ADN bactérien	5 µl	50 µl	3 min	6 h	7,5.10 ⁴	/	++	(Hill et al, 2007)
SPR	Amplicons	/	/	0 min	6h	/	+++ (SNP)	+++	(Li, Y., Wark, A.W., Lee, H.J., Corn, 2006)
SERS	Amplicon	10 µl	40 µl	1 min	30 min	3.10 ³	+++ (SNP)	+++	(Wabuyele et al, 2005)(Wabuyele et al, 2010)
ELISA	Protéine	750 µl	100 µl	3h	30 min	1.10 ⁻¹¹	+++	+++	(Butler, 2000)
UV-vis	Protéine (PSA)	50 µl	950 μl	2h	5 min	8.10 ⁻⁹	/	+	(Jans et al, 2011)
DLS	IGg	20 µl	1500 µl	2h	30 min	7,5.10 ⁻¹⁰	/	++	(Liu et al, 2009)
DLS	Biomarqueurs	5 µl	1000 µl	1h	30 min	1.10 ⁻⁹	++	++	(Huo, 2010)
Scanométrie + biocode-barres	Protéine (PSA)	10 µl	60 µl	3 min	6 h	1.10 ⁻¹⁸	++	++	(Goluch et al, 2006)
SPR	Biomarqueur	100 µl	200 µl	0 min	30 min	2.10 ⁻¹¹	/	+++	(Chen et al, 2013)

D'autres méthodes de diagnostic basées sur d'autres propriétés des nanoparticules existent et sont utilisées pour réaliser des outils de diagnostic moléculaire comme c'est le cas avec le diagnostic par résonnance magnétique par exemple.

2.3.2 Diagnostic par résonance magnétique (DMR)

Le diagnostic par résonance magnétique (DMR) utilise les propriétés des particules magnétiques en solution et les propriétés de résonance magnétique nucléaires. Lorsqu'elles sont placées au contact d'un aimant, les nanoparticules magnétiques émettent un rayonnement électromagnétique qui entraîne un déphasage des spins nucléaires des molécules d'eau environnantes. Ces molécules absorbent l'énergie du rayonnement puis la relâchent lors du phénomène de relaxation (*Haun et al, 2010*). La technique de DMR est basée sur la mesure du temps de relaxation des molécules d'eau et plus particulièrement sur la mesure du temps de relaxation transversale T2. Plus la taille des particules est grande, plus le déphasage est important et plus T2 est court. Ainsi, la technique de DMR utilise des particules magnétiques fonctionnalisées qui vont former des agrégats en présence de la molécule cible induisant ainsi un changement de T2 (Figure 2-12). Ce changement peut être mesuré par des scanners IRM, des outils de spectroscopie RMN à hautes fréquences (environ 400 MHz) ou avec des prototypes de relaxomètres à basses fréquences (entre 100 kHz et 50 MHz) (*Shao et al, 2010*).

Les particules utilisées pour réaliser le technique de DMR sont des nanoparticules magnétiques de 10 nm à 1 µm. Les plus utilisées sont des particules superparamagnétiques d'oxyde de fer (SPIO) ou des nanoparticules ferromagnétiques (*Demas et al, 2011*).



Figure 2-12 : Schéma illustrant le phénomène de résonance magnétique dynamique qui mesure la diminution du temps de relaxation des molécules d'eau lors de l'agrégation des nanoparticules magnétiques (Haun et al, 2010)

La technique de diagnostic par résonance magnétique est simple, quantitative, nécessite de faibles quantités d'échantillon et peut être réalisée en temps réel même dans des solutions turbides ce qui réduit les étapes de traitement des échantillons biologiques. Appliquée au diagnostic moléculaire *in vitro*, elle permet de détecter de l'ADN (Josephson, Perez, & Weissleder, 2001), des protéines (*Colombo et al, 2009*), des biomarqueurs de cancer et des pathogènes (*Kaittanis et al, 2012*).

L'étude décrite par Josephson et al illustre bien la méthode DMR. Elle mesure les changements de T2 quand des sandwichs se forment en présence de la molécule cible. Elle utilise des particules CLIO (Cross-linked oxyde) biofonctionnalisées avec des oligonucléotides sondes. En présence de l'ADN cible, les particules forment des sandwichs les unes avec les autres. Du fait que ces agrégats ont une taille plus importante que celle des particules seules, une diminution du temps de relaxation T2 va être observée. L'essai est très rapide et a une sensibilité de 3.10¹⁰ copies d'ADN ce qui est plus élevé que ce que l'on peut détecter en PCR-SSP. De plus, le volume d'échantillon nécessaire est faible (1 µl) (*Josephson et al*, *2001*).

Une autre étude permet de la même façon de détecter la présence de télomérase, une enzyme très active dans les cellules tumorales (*Grimm et al, 2004*). La sensibilité obtenue est de 3.10⁶ copies d'ADN ce qui est proche de la sensibilité obtenue en PCR-SSP mais sans que cela ne nécessite d'étapes préalables d'amplification de l'ADN ou de lavages. L'essai est réalisé en 2h30. La détection se fait avec un scanner IRM qui est un outil coûteux et qui nécessite du personnel qualifié.

Le diagnostic par résonance magnétique est une technique simple à mettre en œuvre qui permet de réaliser des diagnostics directement avec des échantillons biologiques. Elle ne nécessite pas de marquage préalable des éléments de détection puisqu'elle utilise des particules magnétiques. De ce fait elle permet d'éviter les désagréments des méthodes de détection optiques. De plus, les particules utilisées sont peu coûteuses et biocompatibles. Par contre, les appareils de détection comme le scanner IRM ou la RMN sont coûteux et complexes. Le Tableau 2-5 récapitule les performances des outils de diagnostic par résonnance magnétique décrits dans cette section. En termes de sensibilité et de spécificité, ces méthodes ont des performances inférieures à celles de la PCR-SSP.

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
DMR	oligonucléotides	1 µl	1000 µl	1 min	30 min	3.10 ¹⁰	++	++	(Josephson et al, 2001)
DMR	Télomérase	20 µl	50 µl	15 min	2h30	6.10 ⁶	/	+++	(Grimm et al, 2004)

Tableau 2-5 : Différents outils de diagnostic *in vitro* utilisant les micro et nanoparticules associés à une détection par résonnance magnétique pour la mise en évidence de biomolécules

2.3.3 Détection basée sur l'agrégation et les changements colorimétriques visibles à l'œil nu

Afin de compléter cet état de l'art, des essais ne nécessitant pas d'appareils de détection sont décrits. Ils sont basés sur des changements colorimétriques ou de l'agrégation visible à l'œil nu. Ils sont basés sur des techniques simples, sont facilement miniaturisables et sont peu coûteux car ils nécessitent peu d'échantillons et de réactifs.

Certains de ces essais utilisent les propriétés colorimétriques des nanoparticules d'or. En effet, quand elles sont individualisées, ces particules donnent une couleur rouge à la solution dans laquelle elles se trouvent. Lorsqu'elles sont agrégées et que la distance entre les particules est inférieure à 25 nm, un changement de couleur (du rouge vers le bleu) est observé.

Un essai basé sur ces propriétés a été développé pour détecter une endonucléase (*Zhao et al, 2008*). Les nanoparticules d'or sont biofonctionnalisées avec des fragments d'ADN complémentaires. Les fragments d'ADN s'hybrident, induisant la formation d'agrégats de nanoparticules ce qui se traduit par une coloration bleue de la solution. Cette solution de nanoparticules est déposée sur un papier hydrophobique et 1 µl d'échantillon est ajouté sur chaque dépôt, si l'endonucléase est présente, elle clive les hybridations entre les brins d'ADN ce qui se traduit par une dispersion des nanoparticules d'or. Il en résulte un changement de couleur de la solution du bleu vers le rouge (Figure 2-13).



Figure 2-13 : a) Schéma de la dispersion des nanoparticules en présence de l'endonucléase se traduisant par un changement colorimétrique de la solution. b) Résultats du test sur papier et pour différentes concentration en endonucléase. (Résultats issus de(*Zhao et al, 2008*)).

Le test est performant, il permet de détecter la présence de la cible sans l'aide d'instrument extérieur et avec seulement 1 μ l d'échantillon. Toutefois, la limite de détection n'est pas très élevée (10⁹ endonucléases). De plus, la préparation des agrégats est longue et ne peut pas être réalisée à l'avance car ils ne sont pas stables en solution. Les échantillons doivent également être purifiés avant de réaliser le test pour ne pas affecter la lecture colorimétrique.

Les tests d'agglutination sont également des tests très utilisés et ne nécessitent pas d'appareil de détection. Ces tests utilisent des particules de latex biofonctionnalisées avec des anticorps ou des antigènes. En présence de la molécule cible, les particules forment des agrégats visibles à l'œil nu. Ces tests sont utilisés en laboratoire pour la détection de maladies infectieuses par exemple.

Une étude montre également comment ce test peut être utilisé comme alternative à l'électrophorèse sur gel pour la détection des amplicons de PCR (*Vollenhofer-Schrumpf et al, 2007*). Ce test utilise des particules de latex rouges de 0.3 μ m de diamètre fonctionnalisées avec des oligonucléotides spécifiques de l'ADN bactérien de *Salmonella*. En présence des amplicons de PCR, sous agitation et en 3 à 10 minutes, les particules forment des agrégats visibles à l'œil nu sinon elles restent dispersées. Le test nécessite seulement 10 μ l d'amplicons et permet de détecter 2.10⁹ amplicons. Ce test est donc moins sensible que

lorsque la détection d'amplicon est réalisée par gel d'électrophorèse. Mais elle est plus rapide et moins contraignante.

Les essais ne nécessitant pas d'appareil de détection sont intéressants car ils sont rapides, peu coûteux et peuvent être réalisés de manière simple sur un support papier. Toutefois ils ne sont pas très sensibles (Tableau 2-6).

 Tableau 2-6 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules pour la réalisation de d'outils de diagnostic basés sur l'agrégation et les changements colorimétriques visibles à l'œil nu.

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
Sans détecteur	DNAse	1 µl	2 µl	1 min	12 min	1.10 ⁹	/	+	(Zhao et al, 2008)
Sans détecteur	amplicons	46 µl	10 µl	10 min	1h30	2.10 ⁹	+++	+	(Vollenhofer- Schrumpf et al, 2007)

2.4 Laboratoires sur puce et nano dispositifs

De nos jours, nous essayons de faire des outils de diagnostic de plus en plus faciles à utiliser et peu encombrants. De ce fait, la question de la miniaturisation de l'essai est une chose à prendre en compte dès le développement du test. De nombreuses avancées ont été faites dans le domaine des laboratoires sur puce. Ces outils intègrent, sur des surfaces réduites, différentes fonctions de laboratoire pouvant aller du traitement de l'échantillon jusqu'à la détection de la molécule cible. Ils nécessitent également l'intégration de canaux microfluidiques pour faire circuler l'échantillon sur la puce et réaliser les étapes de lavage. Afin de compléter cet état de l'art, nous décrirons ici certains essais de diagnostic *in vitro* utilisant des particules et adaptés au format de laboratoire sur puce.

Un outil de diagnostic pour la détection d'immunoglobuline a été développé par Teste et al. Il utilise des particules magnétiques cœur-coquille fonctionnalisées avec des antigènes spécifiques IgE. La puce sur laquelle est réalisé l'essai est composée de deux compartiments séparés par une chambre magnétique et d'un système microfluidique. Les particules magnétiques sont préalablement mélangées avec du sérum humain et injectées dans le premier compartiment de la puce. Elles sont concentrées dans la chambre magnétique grâce à un aimant extérieur. En présence d'IgE, les particules forment des agrégats. Comme les canaux microfluidiques rétrécissent dans la chambre magnétique, les agrégats ne peuvent pas passer dans l'autre compartiment contrairement aux particules individualisées. Les agrégats sont donc concentrés dans la chambre magnétique et les particules non liées à la cible sont isolées dans le deuxième compartiment. Un anticorps secondaire marqué par un fluorophore est alors ajouté et va se fixer sur les agrégats. La fluorescence est mesurée par microscopie de fluorescence et met en évidence la présence de la cible (*Teste et al, 2011*). L'essai dure 20 minutes et nécessite seulement 20 µl de sérum. Il détecte des quantités d'IgE de l'ordre de 0,1 ng. La limite de détection est donc moins basse que pour les essais réalisés par ELISA mais le test est maniable et miniaturisé. L'essai a également été réalisé en plaque à puits et les résultats obtenus sont similaires avec la puce (Figure 2-14 c).



Figure 2-14 : A) Schéma de la puce comportant deux compartiments séparés par une chambre magnétique (5) où les particules magnétiques sont concentrées (4) B) photo de la chambre magnétique observée en microscopie. C) En haut, images de fluorescence mesurée sur la puce pour trois sérum différents. En bas, intensité de fluorescence mesurée sur la puce ou en plaque à puits pour les trois différents sérums. (Résultats issus de (*Teste et al, 2011*))

Des outils miniaturisés de diagnostic par résonance magnétique ont également été développés. La méthode par DMR a été décrite à la section 2.3.2. Lee et al ont appliqué cette méthode sur une puce en verre comportant huit canaux microfluidiques et un aimant intégré. Ainsi, le traitement, la concentration de l'échantillon et la détection de la molécule cible sont réalisés directement sur la puce. Ce système nécessite seulement 5 à 10 μ l d'échantillon et huit mesures peuvent être réalisées simultanément. Il comporte tous les avantages de la méthode de DMR mais il est également transportable, facile à utiliser et

rapide (le résultat est obtenu en 10 minutes). La sensibilité n'est toutefois pas améliorée par rapport aux essais réalisés à plus grande échelle (*Lee et al, 2008*).

Un autre biocapteur utilisant la méthode de DMR pour la détection de PSA a été développé sur une puce en poly-méthyl-méthacrylate. Ce test donne des résultats prometteurs car il permet de réaliser 18 mesures simultanées en 1h30, il ne nécessite que 6 μ l d'échantillon et a une limite de détection de 9.10⁻¹¹ g de protéines ce qui se rapproche des ordres de grandeur que l'on peut détecter par la méthode ELISA (*Cai et al, 2011*).

utilisant méthodes D'autres essais diverses de détection comme la chemiluminescence (Zhang et al, 2011) ou la scanométrie couplée à une méthode par biocode-barres (Goluch et al, 2006), par exemple, ont également été réalisés sur puce avec des résultats prometteurs. Les laboratoires sur puce vont être de plus en plus développés dans le domaine du diagnostic moléculaire in vitro. En effet tous ces tests peuvent réaliser différentes tâches de laboratoire sur des surfaces de quelques centimètres carrés et du fait de cette miniaturisation, ils nécessitent moins d'échantillon et de réactifs. Ils sont faciles d'utilisation et facilement transportables. Cependant, en amont l'élaboration des puces et de leur système microfluidique est complexe. La détection directement sur la puce nécessite des systèmes électroniques difficiles à réaliser et à intégrer sur la puce. De ce fait, pour la détection, les laboratoires sur puce sont souvent encore intégrés dans des appareils coûteux et encombrants. Les performances des laboratoires sur puce décrits dans cette section sont répertoriées dans le Tableau 2-7.

Certains outils de diagnostic moléculaire in vitro sur puce sont déjà commercialisés et des kits de particules destinées au diagnostic moléculaire sont également disponibles. Certains de ces dispositifs sont décrits dans la section suivante.
Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
Laboratoire sur puce + fluorescence	amplicons	/	15 µl	1 min	2h30	9.10 ³	++	++	(Zhang et al, 2011)
ELISA	Protéine	750 μl	100 µl	3h	30 min	1.10 ⁻¹¹	+++	+++	(Butler, 2000)
Laboratoire sur puce + DMR	Biomarqueur bactérien	/	10 µl	1 min	10 min	/	/	+	(Lee et al, 2008)
Laboratoire sur puce + DMR	Immunoglobuline	e 20 µl	100 µl	1 min	18 min	1.10 ⁻¹⁰	+	++	(Teste et al, 2011)
Laboratoire sur puce + DMR	Protéine (PSA)	10 µl	6 µl	1min 30	25 min	9.10 ⁻¹¹	/	+	(Cai et al, 2011)
Laboratoire sur puce + Scanométrie	Protéine (PSA)	10 µl	1 µl	15 min	1h	1.10 ⁻¹⁸	+++	+++	(Goluch et al, 2006)

Tableau 2-7 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules et réalisés sur puce.

2.5 Outils de diagnostic moléculaire *in vitro* commercialisés utilisant les micro et nanoparticules

Certaines compagnies commercialisent des kits pour le diagnostic moléculaire *in vitro* à base de particules. Un kit destiné à une détection par cytométrie de flux et un laboratoire sur puce utilisant la méthode des biocode-barres sont décrits ici car ce sont les systèmes auxquels notre projet pourra être comparé. Toutefois, d'autres dispositifs existent.

2.5.1 Utilisant la cytométrie en flux : Luminex[®] et Becton Dickinson[®]

Deux méthodes similaires utilisant des microparticules fonctionnalisées pour la capture de biomolécules ont été développées et commercialisées par Becton Dickinson[®] et Luminex[®]. Cela consiste à conférer une signature fluorescente unique à des microparticules en incorporant différents ratios de fluorophores dans leur masse. Les particules sont également fonctionnalisées, avec des biomolécules complémentaires de la molécule cible afin de capturer celle-ci. La présence de la molécule d'intérêt est révélée par une autre biomolécule complémentaire marquée par un fluorophore. Les molécules capturées ainsi

peuvent être des antigènes, de l'ADN, des protéines etc... (Figure 2-15 b). Les sandwichs sont ensuite analysés de manière individualisée par cytométrie en flux ou par un appareil optique similaire dans le cas de Luminex[®] (Figure 2-15 a). La mesure de plusieurs fluorescences simultanées par le cytomètre de flux permet de mesurer la présence de la cible et de la particule simultanément et donc de savoir quelle est la cible capturée. Avec cette technique il est possible de mesurer des quantités d'amplicon d'ADN de l'ordre de 0,1 femtomoles (6.10³ copies d'ADN) en 45 min à 1 h et de détecter 100 molécules différentes dans un puits d'une plaque à 96 puits (*Dunbar et al, 2003; Dunbar et al, 2006*). Cette méthode est donc rapide mais nécessite quand même une amplification préalable de l'ADN par PCR ainsi qu'un équipement coûteux. Il peut toutefois s'agir d'une bonne alternative à la détection d'amplicons de PCR par électrophorèse car elle permet le multiplexage et d'atteindre un seuil de détection plus bas (6.10³ copies d'ADN contre 4.10⁶ copies d'ADN pour une PCR-SSP).



Figure 2-15 : a) Schéma de la détection par la technologie Luminex[®]. La particule est excitée simultanément par deux lasers, la fluorescence résultante permet de dire quelle est la cible grâce à la signature spectrale de la particule et la fluorescence des biomolécules de détection met en évidence la présence de la cible [http://www.viracor.com]. B) Schéma des combinaisons possibles pour capturer différents types de biomolécules [http://www.teomed.ch].

2.5.2 Utilisant une approche par biocode-barres : Nanosphere

Nanosphere Inc est une entreprise américaine spécialisée dans le diagnostic moléculaire. Elle commercialise une puce nommée Verigene[®] permettant de réaliser différents types de diagnostic et dérivée de la méthode scanométrique couplé à l'utilisation de biocode-barres décrite par Chad Mirkin (section 2.3.1 aux paragraphes relatifs à la scanométrie et à la fluorescence).

Des particules magnétiques sont fonctionnalisées avec des oligonucléotides ou des anticorps complémentaires de la cible. Une autre particule est fonctionnalisée avec une biomolécule complémentaire de la cible et des Biocode-barres. En présence de la cible les particules forment un sandwich, les biocode-barres sont récupérés et sont hybridés sur une surface solide préalablement fonctionnalisée avec des sondes. Des sondes complémentaires liées à une particule d'or s'hybrident avec les biocode-barres présents à la surface de la puce. Les particules d'or sont révélées par un dépôt d'argent suivant un processus catalytique décrit précédemment.



Figure 2-16 : a) Schéma de la détection de protéine par le système Verigene[®], b) schéma de la détection des biocode-barres sur la puce et c) photo de la puce dans lequel l'essai est réalisé (Issus de <u>www.nanosphere.us</u>)

L'échantillon et les réactifs sont introduits dans la puce et l'essai est réalisé en 1h30 à 3h30, dans un appareil spécifique (Processor SP®). La puce est constituée de différents compartiments et de canaux microfluidiques permettant la réalisation des différentes étapes du test à savoir l'extraction de l'ADN (par sonication) et sa capture. Pour l'étape de détection la puce doit être placée dans un autre appareil (Verigene reader®). Tout le test est automatisé ce qui réduit considérablement le temps de manipulation (*Lefferts et al, 2010*). Cet essai évite l'étape d'amplification par PCR et permet le multiplexage. Des puces ont été développées pour réaliser la détection de pathogènes (*Jannetto et al, 2010*), de protéines

(*Buchan et al, 2011*), et pour le génotypage (*Lefferts et al, 2009*; *Lefferts et al, 2010*). Il s'agit d'une bonne alternative à la PCR car elle permet d'obtenir des résultats comparables en moins de temps. Cependant, la méthode nécessite un échantillon d'ADN plus concentré que pour la PCR et la réalisation du test complet nécessite deux appareils ce qui augmente son coût.

Les performances des différents outils de diagnostic utilisant des micro et nanoparticules présentés dans cette section sont résumées dans le Tableau 2-8.

Tableau 2-8 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules commercialisés

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
Luminex	amplicons	17 µl	65 µl	18 min	35 min	1,5.10 ⁶	+	+++	(Dunbar et al, 2003)
Nanosphere	ADN viral	200 μl	250 µl	1 min	3h30	/	+++ (SNP)	+++	(Jannetto et al, 2010)
Nanosphere	ADN humain	25 µl	50 µl	1 min	1h30	3.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Lefferts et al, 2009)
Nanosphere	ADN humain	1000 μl	1000 µl	1 min	3h30	/	+++ (SNP)	+++	(Buchan et al, 2011)
ELISA	Protéine	750 μl	100 µl	3h	30 min	1.10 ⁻¹¹	+++	+++	(Butler, 2000)
Luminex	Anticorps	50 µl	100 µl	18 min	3h	/	/	+++	(Dunbar et al, 2003)

Pour conclure, nous avons vu dans cet état de l'art que le marché des outils de diagnostic moléculaire *in vitro utilisant* les micro et nanoparticules est en expansion et beaucoup d'étude et de progrès sont réalisés dans ce domaine. Cet état de l'art n'est pas exhaustif mais il met l'accent sur ce qu'il est possible de faire dans ce domaine et sur les paramètres à prendre en compte pour la réalisation de tels outils de diagnostic comme les types de particules à utiliser et la méthode de détection à choisir. Cet état de l'art montre également que malgré les nombreux progrès fait dans ce domaine, l'outil de diagnostic idéal n'existe pas et que les résultats obtenus en termes de sensibilité et de spécificité dépendent grandement du type de particules utilisées, de la fonctionnalisation de surface réalisée pour capturer la molécule cible et pour amplifier le signal et de la méthode de détection choisie. L'ANNEXE A contient un tableau récapitulatif du type de particules à utiliser en fonction de la

méthode de détection choisie et des tableaux récapitulatifs des performances des différents tests décrits dans cet état de l'art. Au cours de la présentation du dispositif de détection d'ADN que nous allons décrire dans ce travail les différents paramètres à prendre en compte relevés ici seront discutés et étudiés.

La section suivante présente le modèle biologique servant de démonstrateur pour notre outil de capture d'ADN à savoir le génotypage plaquettaire. Après un descriptif des antigènes plaquettaires et de la manière de les détecter nous discuterons des enjeux de la réalisation d'un outil de diagnostic pour cette application, ainsi que des avantages de son développement.

2.6 Le génotypage plaquettaire

2.6.1 Les plaquettes et le système HPA (Human Platelet Antigen)

Les plaquettes ou thrombocytes sont des cellules sanguines anucléées de 2 à 4 µm de diamètre (Figure 2-17). Elles jouent un rôle essentiel lors de la coagulation et notamment de l'hémostase primaire qui se traduit par la formation d'un clou hémostatique le long des parois du vaisseau lésé pour éviter l'hémorragie.



Figure 2-17 : a) Schéma des trois grands types de cellules sanguines humaines [©2004 American Society of Clinical Oncology] b) Photo en microscopie d'une plaquette sanguine [©Inserm]

À leur surface, les plaquettes possèdent différentes glycoprotéines membranaires (GP) dont le rôle est de fixer et/ou activer des facteurs essentiels à la coagulation. Ces glycoprotéines portent des allo-antigènes spécifiques des plaquettes. Un allo-antigène est un antigène qui est exprimé chez certains individus d'une même espèce et non exprimé chez d'autres individus de cette même espèce. Il est caractérisé par un allo-anticorps qui lui est spécifique. Les allo-antigènes plaquettaires sont recensés dans le système HPA (Human platelet Antigen) dont la nomenclature a été créée par l'ISBT (International Society for Blood Transfusion) en 1990 (*Borne et al, 1990*). À ce jour, 33 antigènes plaquettaires localisés sur 6 complexes glycoprotéiques différents ont été répertoriés et 23 ont été caractérisés sur le plan moléculaire (*Curtis et al, 2014*)(*Bertrand et al, 2009*). Parmi eux, 12 antigènes ont été regroupés en 6 systèmes bi-alléliques (HPA-1, -2, -3, -4, -5 et -15), l'allèle « a » étant assigné à l'allèle le plus fréquemment présent dans la population mondiale et l'allèle « b » étant assigné à l'allèle le moins fréquent (*Curtis et al, 2014*). Dans tous les cas, l'antigène « a » diffère de l'antigène « b » de seulement un acide aminé, ce qui signifie que les gènes codant pour ces protéines ne diffèrent que d'un seul nucléotide (*Metcalfe et al, 2003*). Cette variation d'un seul nucléotide entre deux allèles est appelé SNP (Single Nucleotide Polymorphism). Ce polymorphisme antigénique est responsable de diverses pathologies héréditaires ou résultant d'une immunisation antiplaquettaire.

2.6.2 Intérêts du typage plaquettaire

Les maladies héréditaires liées aux antigènes plaquettaires ont souvent des origines génétiques. Elles peuvent être causées par l'absence de certaines glycoprotéines à la surface des plaquettes comme c'est le cas pour la thrombasthénie de Glanzmann se traduisant par l'absence d'expression ou par le disfonctionnement des protéines GPIIb/IIIa. Elles peuvent également résulter d'une mutation génétique comme c'est le cas pour le syndrome de Bernard-Soulier (mutation du gène GPIb α , GPIb β ou GPIX) ou pour la maladie de Von Willebrand (mutation du gène GPIb α) (*Clemetson*, 2001). Dans tous les cas, ces maladies induisent un dysfonctionnement des plaquettes (thrombopathie) ou leur pénurie (thrombopénie) favorisant les troubles de la coagulation et les risques hémorragiques.

Les maladies héréditaires liées aux plaquettes sont rares et les maladies résultant d'une immunisation envers les protéines plaquettaires sont les plus fréquentes. Parmi elles, les plus graves et les plus souvent observées sont le purpura post-transfusionnel (PPT), la thrombopénie néonatale allo-immune (TNA) et l'état réfractaire aux transfusions de plaquettes (*Bertrand et al, 2009*). Le PPT est une complication se déclarant dans les 7 à 14 jours suivant une transfusion contenant des plaquettes. Il se traduit par une thrombopénie sévère et des syndromes hémorragiques. Il survient chez des patients immunisés contre un antigène plaquettaire. Le plus souvent il s'agit de femmes s'étant immunisées durant une grossesse préalable. Dans 85% des cas, l'anticorps impliqué est l'anticorps anti-HPA-1a. Si cette complication est rare, elle peut être mortelle dans 5 à 10 % des cas (*Kroll et al, 1998; Bertrand et al, 2009*).

La TNA est la principale cause de thrombopénie chez le fœtus et le nouveau-né. Elle touche une naissance sur mille (*Strong et al, 2013*). Elle résulte d'une immunisation maternelle contre les antigènes plaquettaires du fœtus hérités du père et absents chez la mère. La mère développe des anticorps contre ces antigènes. Ils passent la barrière placentaire et détruisent les plaquettes fœtales (*Bertrand et al, 2009*), (*Arinsburg et al, 2012*). Dans les cas les plus sévères, la TNA peut causer des hémorragies intracrâniennes et le décès du fœtus. L'anticorps anti-HPA-1a est impliqué dans 80% des TNA (*Arinsburg et al, 2012*).

L'état réfractaire aux transfusions de plaquettes se traduit par l'échec de transfusions plaquettaires répétées. L'immunisation anti-HPA-5b est responsable de 80% des cas de cette pathologie.

Afin de prévenir ces pathologies ou de les diagnostiquer rapidement, il est nécessaire de pouvoir mettre en évidence la présence des anticorps et des antigènes HPA impliqués et /ou la glycoprotéine qui leur est associée. Pour cela on réalise un typage plaquettaire en utilisant diverses techniques.

2.6.3 Méthodes usuelles de typage plaquettaire : le génotypage par PCR et le phénotypage par MAIPA

Pour éviter les incompatibilités plaquettaires *a priori* ou pour en déterminer la cause *a posteriori*, il est nécessaire de réaliser un groupage plaquettaire pour mettre en évidence les antigènes présents à la surface des plaquettes. Il faut également déterminer si des anticorps dirigés contre ces antigènes sont présents dans le sang circulant du patient. Les antigènes recherchés en clinique sont les antigènes HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5, HPA-6, HPA-9 et HPA-15 sous leur forme a et b car ce sont ceux qui sont le plus souvent

impliqués dans des cas d'immunisation plaquettaire. Pour cela deux méthodes sont utilisées : le génotypage ou le phénotypage.

Actuellement, seul le génotypage permet de déterminer les antigènes présents à la surface des plaquettes. Le phénotypage ne peut pas être réalisé car les réactifs nécessaires ne sont pas disponibles. En effet, le phénotypage est une méthode sérologique basée sur la reconnaissance spécifique entre un antigène et l'anticorps qui lui est complémentaire. La détection d'antigènes par le phénotypage requiert des antisérums spécifiques contenant des anticorps monoclonaux permettant la reconnaissance d'un antigène donné. Les anticorps monoclonaux sont souvent produits de manière industrielle. Actuellement, les antisérums anti plaquettes ne sont pas disponibles pour tous les antigènes plaquettaires principalement impliqués dans les réactions immunitaires. Seuls des antisérums anti-HPA-1a et anti-HPA-5b sont disponibles, il n'existe actuellement pas d'antisérum pour la détection des autres systèmes HPA qu'il est nécessaire de rechercher pour avoir un diagnostic complet.

À défaut de pouvoir détecter de manière directe les antigènes à la surface des plaquettes, le génotypage est utilisé pour identifier les gènes codants pour les protéines de surface. Dans les cellules, lors du processus de transcription, les régions codantes de l'ADN sont transcrites en ARNm qui est traduit en acides aminés puis en protéine lors du processus de traduction de l'ARN (voir Figure 2-18). Une région d'ADN correspond donc à une protéine. Afin de déterminer les antigènes plaquettaires présents chez un individu, son ADN est étudié pour voir si la séquence codant pour la protéine qui porte cet antigène est présente. Le génotypage permet de déterminer le type d'allèle, « a » et / ou « b », que possède le patient pour chacun des groupes HPA. Pour cela, il est nécessaire d'extraire une quantité d'ADN suffisante et purifiée afin de pouvoir l'analyser. La méthode usuelle pour le génotypage est la PCR qui permet d'amplifier une région d'ADN spécifique en augmentant le nombre de copie d'ADN disponible. Les techniques de PCR les plus utilisées en laboratoire sont la PCR-SSP, la PCR-RFLP et la PCR en temps réel dont les principes ont été décrits précédemment (section 2.1.1).



Figure 2-18 : Schéma simplifié de la transcription et de la traduction d'un gène en protéine (© Université de Liège)

Pour certains antigènes plaquettaires, le groupage plaquettaire peut-être réalisé par phénotypage à l'aide de sérums provenant de patients immunisés. Pour cela, la technique de MAIPA (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet antigens Assay), utilisée pour la détection des anticorps anti-plaquettes, est détournée : les anticorps seront connus, ce qui permettra d'identifier les antigènes (phénotypage). Hélas, cette stratégie ne peut être appliquée en routine car trop peu de sérums de patient et seuls quelques anticorps sont disponibles (anti-HPA-1a, 1b, 5b et en moindre quantité 5a ou 3a). De ce fait, il est impossible de typer les autres systèmes de groupes plaquettaires de cette manière par manque de réactifs. Cette méthode de phénotypage pour les plaquettes servant de panel afin de détecter les anticorps anti-plaquettes. En effet, dans certains cas, il arrive que l'information génétique ne se traduise pas au niveau protéique. La technique de phénotypage dérivée de la technique MAIPA permet de s'assurer, pour certains antigènes mis en évidence par génotypage, qu'ils sont bien exprimés à la surface des plaquettes.

À l'origine, la technique MAIPA décrite par Kiefel en 1987 (*Kiefel et al, 1987*) est utilisée dans les laboratoires d'immunologie plaquettaire pour détecter les anticorps antiplaquettes. Pour cela, le sérum du patient ainsi qu'un anticorps (IgG) murin antiglycoprotéine est mis en présence de plaquettes provenant d'un panel de donneurs dont le groupage plaquettaire est connu (grâce à une détermination antérieure). S'ils sont présents, les anticorps se fixent sur les antigènes contre lesquels ils sont dirigés et forment des complexes immuns. Les plaquettes sont dénaturées afin de récupérer les complexes. Les glycoprotéines liées aux anticorps sont immobilisées sur une plaque à puits grâce à des anticorps anti-anticorps murins. Par la suite, la présence ou l'absence de l'allo-anticorps (et donc de l'antigène correspondant) est mise en évidence de manière indirecte grâce à des anticorps anti-anticorps humains marqués par une enzyme. La présence de cet anticorps secondaire est révélée par réaction enzymatique induisant une réaction colorée (*Kiefel et al*, *1987*).

Pour diagnostiquer ou prévenir les réactions immunologiques résultant d'incompatibilité HPA lors d'une grossesse ou d'une transfusion, il est nécessaire de réaliser un groupage plaquettaire pour connaître les antigènes présents à la surface des plaquettes et de déterminer si des anticorps circulants sont présents dans le sang du patient. Le groupage plaquettaire ne peut pas être réalisé par phénotypage par manque d'antisérums, il est donc réalisé par génotypage. Les techniques décrites ici ont chacune leurs avantages et leurs inconvénients.

2.6.4 Intérêts et enjeux de développer de nouvelles méthodes de génotypage

Le génotypage par PCR à l'avantage de pouvoir être réalisé avec de faibles quantités d'échantillons biologiques puisque l'ADN est amplifié par la suite. Il n'exige pas nécessairement de prélèvement sanguin (même si cela reste le moyen privilégié), l'ADN pouvant être extrait à partir d'autres fluides biologiques comme la salive par exemple, ce qui est moins traumatisant pour un patient malade. Les techniques de génotypage sont maintenant souvent automatisées et permettent de traiter plusieurs échantillons en même temps, ce qui réduit le temps d'analyse et les manipulations à réaliser. Le génotypage nécessite une infrastructure particulière pour préparer les échantillons. En effet, avant la réalisation du test lui-même, l'ADN doit être extrait et purifié. Afin de prévenir les contaminations avec de l'ADN extérieur, avec des amplicons d'une amplification précédente ou avec des nucléases, il convient de mettre en place des conditions strictes de manipulation des échantillons pour éviter les résultats erronés (*Arinsburg et al, 2012*).

Des études ont montré que, dans de rares cas, des différences entre le phénotype et le génotype peuvent être observées. En effet, dans certains cas, un gène est présent mais n'est pas ou mal transcrit. Ainsi le génotype va donner un faux positif car en fait la protéine ne sera pas présente à la surface de la cellule (*Skogen et al, 1996*). Cela a notamment été observé pour les antigènes HPA-1 et HPA-3 (*Morel-Kopp et al, 1994*). Dans certains cas rares, une mutation de l'ADN au niveau des amorces de PCR peut induire une mauvaise amplification de la séquence d'ADN d'intérêt et conduire à un faux négatif (*Bertrand et al, 2009*). Du fait de ces incohérences pouvant survenir entre le phénotype et le génotype, et le groupage plaquettaire ne pouvant pas être réalisé par phénotypage, il est intéressant de développer de nouvelles méthodes de typage.

Pour la recherche des anticorps circulants, le phénotypage par MAIPA est une technique simple à mettre en œuvre. Elle nécessite peu d'équipement, elle est automatisable et permet le multiplexage. Cependant, comme c'est aussi le cas pour la PCR, il s'agit d'une méthode comprenant de nombreuses étapes qui doivent être réalisées par un opérateur qualifié. De plus, un prélèvement sanguin doit être réalisé pour avoir le sérum du patient ce qui est un acte invasif. Le typage plaquettaire est souvent réalisé a posteriori, c'est-à-dire lorsque les symptômes d'une thrombopénie ou d'une hémorragie se déclarent suite à une transfusion ou à la naissance chez l'enfant. Il n'est pas effectué en routine à la naissance comme c'est le cas pour les antigènes érythrocytaires, car il est onéreux et long du fait des techniques utilisées (environ 81 € pour le typage de 3 antigènes par PCR selon des données de l'EFS Rhône-Alpes). L'incidence des TNA qui est de 1/1000 naissances (Strong et al, 2013), est équivalente à celle de la maladie hémolytique du nouveau-né due principalement aux antigènes rhésus (MHNRh) et notamment à l'antigène D qui est de 2/1000 naissances (Ross et al, 2013). Lors de la survenue d'une hémorragie grave due à une TNA, une transfusion du nouveau-né doit-être pratiquée. Il s'agit d'un acte invasif non anodin pouvant entraîner des complications chez le nourrisson. Il existe des traitements prophylactiques qui permettent d'éviter l'allo-immunisation de la mère et qui sont utilisés quand le risque de TNA est très élevé. L'utilisation de mesures prophylactiques dans le cas de MHNRh a permis de réduire les risques d'allo-immunisation de la mère responsable de la MHNRh de 12% à 0,1%¹. La transfusion étant un acte risqué et coûteux (200-900 €), il serait bénéfique pour le patient de réaliser le typage plaquettaire en routine. En effet, cet acte est moins contraignant pour le patient et cela permettrait de mettre en place des mesures prophylactiques. Ainsi certains cas graves liés à une immunisation plaquettaire pourrait être évités et en conséquence un acte médical lourd pour le patient et coûteux pour la société comme une transfusion serait épargné. Afin de réduire les inconvénients liés aux méthodes de typage plaquettaire décrites précédemment, il convient de développer de nouvelles méthodes comme le génotypage par puce à ADN ou micro particules qui sont en cours d'évaluation (*Bertrand et al, 2009*). De plus, le génotypage plaquettaire par PCR présente quelques limites du fait de mutations de l'ADN, ce qui encourage également l'élaboration de nouvelles méthodes de génotypage ou phénotypage afin de faire du typage plaquettaire un test de routine permettant d'éviter des accidents transfusionnels et de préserver les nouveau-nés à risques.

2.7 Conclusion générale et positionnement du projet par rapport à l'état de l'art.

La réalisation d'un typage plaquettaire afin de déterminer les antigènes plaquettaires d'un individu est essentielle pour éviter des accidents transfusionnels ou des conflits fœtomaternels. La détection des antigènes peut être réalisée par une méthode sérologique mais elle est longue et les antisérums nécessaires sont très peu disponibles. Des méthodes de génotypage par PCR sont donc préférentiellement utilisées pour réaliser le typage plaquettaire. La PCR comporte toutefois des inconvénients. Elle est longue, coûteuse et complexe à mettre en œuvre. Il est donc intéressant de développer de nouveaux outils de diagnostic plus maniables et faciles d'utilisation en alternative à la PCR. En ce sens, un certain nombre d'outils de diagnostic miniaturisés à base de particules fonctionnalisées ont vu le jour et certains sont même commercialisés. Les performances analytiques de ces tests sont grandement liées aux types de particules et à la méthode de détection utilisée. À ce jour, peu d'outils de diagnostic moléculaire peuvent être utilisés comme alternative à la PCR. Soit ils ne permettent pas d'éviter l'amplification d'ADN soit leurs performances n'ont pas

¹ © 2007, Canadian Blood Services, 4th edition, ch 12

été testés avec des échantillons biologiques. La puce développée par Nanosphere permet de détecter de l'ADN non amplifié avec une limite de détection proche de celle de la PCR SSP. Toutefois ce test n'est pas adaptable à tous les types de diagnostic et est assez coûteux.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet global qui a pour but de réaliser un outil de diagnostic *in vitro* à base de particules biofonctionnalisées appliqué au génotypage sanguin, miniaturisable et avec des performances en termes de volume d'échantillon, de temps d'analyse, de spécificité et de sensibilité de détection améliorées par rapport à celles de la PCR avec de l'ADN génomique.

Afin d'élaborer un outil miniaturisé et fonctionnel pour le diagnostic moléculaire *in vitro*, il faut considérer l'outil dans son ensemble, de l'outil de capture des biomolécules à l'outil de détection en prenant en compte les contraintes et les bénéfices de chacun pour en tirer les meilleurs performances, tout en faisant en sorte qu'ils restent adaptés aux exigences de l'utilisateur final. Nous avons vu que les particules choisies pour capturer l'ADN et la méthode de détection utilisée ont une grande importance en ce qui concerne l'obtention de bonnes performances pour le test.

Ce travail de thèse porte plus particulièrement sur l'élaboration de l'outil de capture d'ADN à base de particules fonctionnalisées et sur les méthodes de détection à lui associer pour avoir les meilleures performances possibles. Afin de réaliser cet outil de capture d'ADN, de nombreuses possibilités sont envisageables en termes de choix de particules et de méthode de détection. Des particules magnétiques et fluorescentes biofonctionnalisées ont été choisies car elles sont peu coûteuses et stables. De plus l'utilisation de particules magnétiques fonctionnalisées permet de séparer rapidement les molécules et de purifier des échantillons. La fluorescence a été retenue comme méthode de détection car elle est simple et très utilisée dans les laboratoires d'analyse médicale. L'application biologique pour valider le test est le génotypage plaquettaire.

CHAPITRE 3. CONCEPTION DU SYSTÈME SIMPLIFIÉ DE CAPTURE D'ADN

Nous avons vu dans l'état de l'art divers outils de diagnostics appliqués au diagnostic moléculaire *in vitro* et utilisant différentes méthodes de détection. Nous avons également vu que la tendance actuelle dans ce domaine est à la miniaturisation des appareils et à la simplification des méthodes.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet global dont l'objectif principal est de développer un outil de diagnostic *in vitro* complet appliqué au génotypage plaquettaire et permettant une alternative aux tests usuels tels que la PCR. En ce sens, un outil de capture d'ADN avec une approche par biocode-barres a préalablement été développé lors d'un précédent travail de thèse réalisé à l'INL par Marie Trévisan (*Trévisan, 2011*). Le projet de thèse détaillé ici consiste en la conception d'un outil de capture d'ADN simplifié basé sur le travail préalablement réalisé.

Dans ce chapitre, nous présenterons dans un premier temps les objectifs et les résultats attendus à la suite de la simplification de l'outil de capture d'ADN, ainsi que les principaux changements et améliorations réalisés par rapport à l'approche préalablement développée. Ensuite, nous décrirons les différentes étapes de la conception de l'outil de capture d'ADN, puis nous expliquerons les choix réalisés et les points critiques pour chaque étape.

3.1 Cahier des charges

L'objectif principal du projet est d'optimiser l'outil de capture d'ADN préalablement développé tout en répondant aux attentes liées aux utilisateurs finaux, les professionnels de santé, et à l'application finale, le génotypage avec détection de SNP. Le modèle biologique choisi pour valider cet outil est le génotypage plaquettaire. Les points suivants constituent donc les principaux objectifs de cette optimisation :

- Diminution du temps total d'analyse

La nouvelle méthode proposée doit permettre de réduire le nombre d'étapes nécessaires pour capturer et isoler l'ADN cible, le détecter et obtenir le résultat final.

- Simplification de la préparation du test

Dans la nouvelle approche, la préparation du test, c'est-à-dire la préparation des microparticules, doit être simplifiée afin de contenir moins d'étapes et d'utiliser moins de réactifs dans la mesure du possible.

- Maintenir la spécificité

L'outil de capture d'ADN préalablement réalisé permet la discrimination de SNP, c'est-à-dire la différence d'un nucléotide entre deux brins d'ADN. La discrimination de SNP est importante lors du génotypage et notamment dans le cas du génotypage plaquettaire, comme nous l'avons vu précédemment. Il est donc essentiel que la nouvelle approche permette de conserver cette discrimination.

- Maintenir la limite inférieure de détection (LOD)

La limite inférieure de détection correspond à la plus petite quantité d'ADN cible que l'on peut détecter de manière significative avec notre système de détection. La LOD dépend ici de la méthode de capture d'ADN choisie et de l'outil de détection de la fluorescence utilisé. Le changement de l'outil de capture d'ADN va donc influer sur la LOD. Dans la mesure du possible, il est souhaitable qu'elle soit au moins équivalente à la LOD obtenue avec le système précédent. Pour que le test puisse présenter un intérêt, la LOD doit être au moins égale à la LOD du génotypage plaquettaire classique par PCR SPP.

La section suivante présente brièvement la précédente approche de capture d'ADN et les changements effectués en tenant compte des points et des contraintes que nous venons de décrire.

3.2 Description du système simplifié de capture d'ADN à base de particules multifonctionnelles

Dans un précédent travail (*Trévisan, 2011*), la mise au point d'une méthode de génotypage plaquettaire a été faite (section 2.3.1 au paragraphe relatif à la fluorescence). Cette méthode permet d'analyser le SNP du gène codant pour l'antigène plaquettaire HPA-1a à l'aide d'une approche par biocode-barres et d'une détection de la fluorescence par un dispositif à onde évanescente, l'Evareader (Figure 3-1 B). Nous allons décrire ici précisément les différentes étapes de ce test et extrapoler les changements possibles à explorer pour le simplifier (objectif de ce travail de thèse).

• <u>Description du travail réalisé par Trévisan et al. pour la mise au point d'une méthode de</u> <u>génotypage plaquettaire utilisant les biocode-barres</u>

L'approche par biocode-barres développée par Trévisan et al. mettait en jeu la capture de l'ADN cible à l'aide d'une part de microparticules magnétiques fonctionnalisées avec des oligonucléotides sondes complémentaires de l'ADN cible et d'autre part, à l'aide de microparticules de latex portant des biocode-barres servant d'élément de détection. Le test repose donc sur la formation et la détection de sandwichs se formant entre les particules magnétiques et les particules de latex en présence d'ADN cible. Les oligonucléotides sondes greffés sur les particules magnétiques portaient la mutation qui différencie un allèle a d'un allèle b. La cible HPA-1a (ADN cible) va s'hybrider avec la sonde a qui lui est complémentaire et non avec la sonde b qui diffère d'un nucléotide (Figure 3-1 A). Les particules de latex étaient, fonctionnalisées simultanément avec deux types d'oligonucléotides : des oligonucléotides de capture complémentaires de la cible et des oligonucléotides « simple brin » complémentaires des biocode-barres. Les biocode-barres sont des courtes séquences d'oligonucléotides marquées avec une biotine et un Cy5. Une fois le sandwich formé, les biocode-barres sont hybridés avec leurs brins complémentaires si la particule de latex, c'est-à-dire la cible, est présente (Figure 3-1 B 1 et 2). La purification magnétique, permettait de ne récupérer que les particules magnétiques seules ou ayant formé un sandwich. Les particules magnétiques seules (n'ayant rien capturé) ne portaient pas de groupements fluorescents et ne produisaient pas de signal de détection. Par contre, les

sandwichs formés portaient les biocode-barres présents sur la particule de latex et ayant un groupement fluorescent. Cette technique permettait de s'assurer que la fluorescence observée était liée à la seule présence des cibles recherchées. Ces biocode-barres fluorescents étaient récupérés par dénaturation (Figure 3-1 B 3). Ils étaient alors capturés au fond d'une EVA-chip qui sert de support pour la lecture de fluorescence par un biocapteur à onde évanescente, l'Evareader (Figure 3-1 B 4). La capture de biocode-barres fluorescents étaient mise en œuvre 1) par une hybridation avec des ODN complémentaires immobilisés sur l'EVA-chip ; ou bien 2) par une complexation avec une neutravidine (le biocode-barre comportant une biotine terminale). L'Evareader permettait de mesurer en temps réel la cinétique de la capture des BCB fluorescents au fond du puits de l'EVA-chip. Par cette technique, M. Trévisan a détecté les allèles du gène HPA-1 (allèle a et allèle b) et a obtenu une limite de détection de 6.10⁵ copies d'ADN cible monocaténaire (oligonucléotide synthétique de ~84 nucléotides, correspondant à la séquence des amplicons PCR employés dans le génotypage standard par PCR). Cette quantité est inférieure à la limite de détection de la PCR (4.10⁶ copies d'ADN).

• Limitations de l'approche développée par Trévisan et al.

L'approche développée par Trévisan et al. présentait plusieurs limitations :

- La durée totale du test

La durée du test était d'environ 5 h : la formation des sandwichs et l'hybridation des biocode-barres prenaient au total 4h30, la dénaturation des biocode-barres durait 15 min et l'analyse de la fluorescence durait 15 min (Figure 3-1 B).

- Nécessité d'une double fonctionnalisation des particules de latex

Les particules de latex devaient comporter simultanément des oligonucléotides de capture, et des oligonucléotides complémentaires des biocode-barres. La maîtrise des concentrations surfaciques relatives et absolues sur ces particules était complexe et dépendait des lots de particules utilisées.



Figure 3-1 : A) Schémas de l'hybridation entre les *sondes a* et b et la cible HPA-1a. B) En présence d'ADN cible, formation de sandwichs entre une particule magnétique et une particule de latex portant des BCB. Après dénaturation, la fluorescence des BCB est détectée par un dispositif à onde évanescente. C) Nouvelle approche simplifiée basée sur la formation d'un sandwich entre des particules magnétiques et fluorescentes biofonctionnalisées en présence d'ADN cible. La fluorescence est ici détectée sur les sandwichs complets.

<u>Nouvelle stratégie proposée</u>

Afin d'optimiser l'outil de capture d'ADN, j'ai travaillé sur une nouvelle approche de capture. Cette nouvelle approche conserve le principe de formation d'un sandwich pour capturer la cible entre une particule magnétique et une particule de détection pour pouvoir réaliser des purifications par séparation magnétique et la détection par mesure de fluorescence. Plusieurs modifications ont été réalisées afin de simplifier l'outil de capture d'ADN :

1) Changement de l'élément de détection

Dans la nouvelle approche, la fluorescence servant à mettre en évidence la présence de la cible n'est plus portée par les BCB mais par la particule elle-même. En effet, une particule fluorescente est utilisée à la place de la particule de latex. La présence de la particule fluorescente atteste de la formation du sandwich et donc de la cible. C'est la fluorescence de la particule elle-même qui est détectée et non plus la présence d'éléments ajoutés au sandwich, comme c'est le cas lors de l'approche par BCB. Le sandwich entier peut-être détecté, de ce fait, les étapes d'hybridation et de dénaturation des BCB ne sont plus nécessaires (Figure 3-1 C). La suppression de ces étapes diminue directement la durée du test de 45 min, sans optimisation supplémentaire. Les optimisations possibles des étapes intermédiaires permettent d'envisager d'autres réductions de la durée totale du test. Nous verrons par la suite que plusieurs voies de formation des sandwichs peuvent être envisagées, ce qui influe également sur le temps de réalisation du test complet.

Le principal avantage de la méthode initiale de Trévisan et al. est de détecter une pluralité de biocode-barres fluorescents pour chaque cible capturée. Dans la nouvelle méthode, c'est la particule de latex fluorescente qui apporte la plus grande contribution en nombre de fluorophores détectables. Les sondes greffées sur la particule fluorescente sont également fluorescentes.

2) <u>Simplification de la fonctionnalisation des particules et changements en vue d'une</u> <u>application de multiplexage</u>

Dans l'approche initiale de Trévisan et al., les particules de latex étaient fonctionnalisées avec deux types de sondes. Des *sondes de capture* et des sondes complémentaires des BCB. Les particules fluorescentes utilisées dans la nouvelle approche sont fonctionnalisées avec un seul type de sonde permettant d'hybrider l'ADN cible. Ces sondes portent la mutation correspondant au SNP. Elles ont la même séquence que celles utilisées lors de l'approche précédente mais elles portent en plus un Cy5 pour amplifier le signal de fluorescence et une biotine pour assurer l'immobilisation de la particule au fond des EVA-chips grâce à une interaction neutravidine-biotine. Le fait de fonctionnaliser les particules avec un seul type de sonde rend la caractérisation de la fonctionnalisation plus facilement contrôlable et nécessite moins d'étapes de développement.

Dans la nouvelle approche de capture de l'ADN, les sondes oligonucléotidiques ont également été greffées différemment sur les particules. Les oligonucléotides de capture complémentaires de l'ADN cible sont maintenant greffés sur les particules magnétiques et les oligonucléotides sondes portant la mutation sont greffés sur les particules fluorescentes, contrairement à ce qui était le cas lors de l'approche précédente. Ce changement a été effectué en vue d'une future application de multiplexage utilisant des particules de fluorescence différente portant des sondes complémentaires d'ADN codant pour des allèles différents.

3) Comparaison des différentes approches de détection employées pendant la thèse

Trois méthodes de mesure de fluorescence ont été employées au cours de mon travail, afin de détecter les particules fluorescentes : un capteur de fluorescence à ondes évanescentes (l'Evareader), un scanner de fluorescence et un cytomètre de flux.

Une fois les sandwichs formés, la mesure de la fluorescence attestant de la présence de la cible est mesurée par un biocapteur innovant à onde évanescente, l'Evareader. Cette technique nécessite que les fluorophores soient proches de la surface du support d'analyse, car l'excitation des fluorophores se fait dans un champ de 200 nm au-dessus de cette surface (section 2.3.1 et ANNEXE B). Lors de l'approche par BCB, c'est la fluorescence des BCB qui est mesurée (Figure 3-1 B). Afin de les maintenir proches de la surface du support d'analyse, ils sont immobilisés grâce à une interaction neutravidine – biotine. Lors de la nouvelle approche, c'est le signal de la particule fluorescente composant le sandwich qui est détecté (Figure 3-1 C). Le sandwich doit donc être immobilisé sur le support d'analyse de manière à ce que la particule fluorescente soit proche de sa surface.

Afin d'évaluer l'outil de détection d'ADN complet (capture + détection), les résultats obtenus avec l'Evareader seront comparés avec ceux obtenus avec méthodes de détection usuelles : la cytométrie de flux et l'imagerie de fluorescence par scanner. Les principes de ces méthodes ainsi que les appareils utilisés sont décrits en ANNEXE B. Chacune de ces méthodes a des spécifications particulières résumées dans le Tableau 3-1 et dont il faut tenir compte lors de la conception du test.

	·	•		·	
Technique	Appareil	Réalisation	Spécifications	Volume d'échantillon utilisé	Temps d'analyse
Cytométrie de flux	Cytomètre BD Facs Canto II, BD Biosciences	Détection de particules individuelles en flux dans un capillaire	-Particules de taille comprise entre 500 nm et 14 μm - Source d'excitation : Laser de 633 nm	< 50 µl	< 1 min pour analyser 20 000 événements de fluorescence
Scanner de fluorescence	Scanner Innoscan 710, Innopsys	Analyse statique sur support solide (gouttes déposées et séchées sur une lame de verre)	- Source d'excitation : Laser de 532 nm ; Laser de 635 nm +	2 μl	3 min
Biocapteur à onde évanescente	Evareader, Davos Diagnostics	Analyse cinétique à l'interface liquide/solide: détection des fluorophores au voisinage de la surface	-La fluorescence est lue seulement sur une hauteur de 200 nm au-dessus du fond du puits (excitation par onde évanescente) - source d'excitation = laser à 635 nm	25-80 μl	Temps réel

Tableau 3-1 : Différentes spécifications de chaque méthode et appareils de détection de fluorescence utilisés
dans ce travail

Le principal changement dans la nouvelle approche de capture de l'ADN réside donc dans l'utilisation de particules fluorescentes comme élément de détection, ce qui permet de s'affranchir de certaines étapes du test précédemment développé. La réalisation du test complet nécessite différentes phases dont la conception est détaillée dans le paragraphe suivant.

3.3 Conception des différentes étapes de la nouvelle méthode

Les différentes phases de la réalisation de l'outil complet de capture d'ADN vont de la préparation du test jusqu'à la détection de la fluorescence (Figure 3-2). Chacune de ces étapes comporte des points critiques et peuvent être réalisées de diverses manières. Dans cette section, nous allons décrire ces étapes et expliquer les choix qui ont été faits pour les réaliser.



Figure 3-2 : Schéma des différentes étapes clefs de l'élaboration du test de capture d'ADN à base de particules biofonctionnalisées avec les points critiques pour chaque étape

3.3.1 Préparation du test

La réalisation de ce dispositif de capture d'ADN repose sur la formation de sandwichs, en présence d'ADN cible, entre différents types de particules fonctionnalisées avec des oligonucléotides complémentaires de la cible. Avant de réaliser le test, il convient de fonctionnaliser les particules. Il est donc nécessaire de définir le type de particules utilisées, la méthode de fonctionnalisation des particules, et les oligonucléotides avec lesquels elles sont fonctionnalisées.

> Choix et caractérisation des particules utilisées

Deux types de particules sont utilisés pour réaliser ce système de capture de l'ADN. Les deux types de particules sont des latex couverts de fonctions carboxyles afin de pouvoir utiliser la chimie NHS/EDC qui permet de greffer des oligonucléotides comportant une terminaison amine primaire (section 3.3.1 au paragraphe relatif à la fonctionnalisation des particules). Le premier type de particules employé sert d'élément de capture. Comme avec l'approche de Trévisan et al., des particules commerciales de latex superparamagnétiques (Sigma Aldrich) sont utilisées. Leurs propriétés magnétiques permettent de réaliser des purifications de l'échantillon à l'aide d'un aimant néodyme, ce qui est rapide et limite la perte d'échantillons aux cours des différents lavages. Elles ont une taille de 1 µm afin de pouvoir être visibles en cytométrie de flux pour l'analyse des sandwichs complets. Elles ne doivent pas présenter de fluorescence afin de ne pas interférer avec le signal des autres particules servant d'éléments de détection.

Les résultats de caractérisation des particules magnétiques en UV-vis, en fluorescence et en cytométrie de flux sont présentés à l'ANNEXE C.

Le deuxième type de particules utilisé sert d'élément de détection. Dans la nouvelle approche, l'élément portant la fluorescence est la particule elle-même et non plus un élément ajouté à la particule.

La particule servant à la détection est une particule de latex fluorescente (λ exc = 625 nm et λ ém = 645 nm) commerciale (Life Technologies) comportant des fonctions carboxyles en surface pour pouvoir être fonctionnalisée et ayant une taille de 1 µm. La fluorescence de la particule a été choisie en fonction des spécifications des appareils de détection envisagés pour le projet. Tous possèdent un laser à 635 nm et l'Evareader est un appareil qui ne peut pas exciter un fluorophore à d'autres longueurs d'onde. Les particules fluorescentes choisies doivent donc pouvoir être excitées à 635 nm. La taille des particules a également été choisie en fonction des appareils de détection de fluorescence utilisée. De par le fonctionnement de l'Evareader (section 2.3.1.3), il serait intéressant d'utiliser des particules fluorescence possible. Toutefois, un des objectifs de ce travail de thèse est de comparer la détection de fluorescence par Evareader avec une méthode de détection usuelle, la cytométrie de flux. Cette méthode ne permet pas de détecter des particules de taille inférieure ou égale à 500 nm. Un compromis a été de prendre des particules de 1 µm de diamètre qui peuvent être analysées avec les deux types de système.

Les résultats de caractérisation des particules fluorescentes en UV-vis, en fluorescence et en cytométrie de flux sont présentés à l'ANNEXE C

70

Les caractéristiques des deux types de particules utilisées sont résumées dans le Tableau 3-2.

Particules	Fournisseur	Diamètre (µm)	Fonctions de surface	Longueur d'onde de fluorescence (λexc – λém) (nm)	% solide (w/v)
Particules d'oxyde de fer magnétiques	Fluka (sigma aldrich)	1	соон	/	2
Particules de latex fluorescentes	Life Technologies	1	соон	(625-645)	2

Tableau 3-2 : Caractéristiques des particules utilisées pour le test de capture d'ADN

Fonctionnalisation des particules avec les séquences d'ODN

La fonctionnalisation des particules se fait par immobilisation de séquences oligonucléotidiques à leur surface. Diverses méthodes ont été développées pour immobiliser des biomolécules sur une surface (*Sperling et al, 2010; Sapsford et al, 2013*). Quatre stratégies se dégagent de ces méthodes :

- L'immobilisation par liaison covalente entre un groupement de la biomolécule et la surface directe de la particule (chemisorption thiol-or par exemple).

- L'immobilisation par liaison covalente entre des groupements de la biomolécule et des groupements ajoutés à la surface de la particule (groupements –COOH ou –NH₂ par exemple).

- L'immobilisation électrostatique entre une biomolécule et une particule de charge opposée.

-L'immobilisation non covalente par affinité entre un récepteur et un ligand comme l'avidine et la biotine par exemple.

Pour notre application, une immobilisation covalente ou non covalente peut être envisagée. Toutefois, pour une analyse par Evareader, une immobilisation de la particule fluorescente au fond du support de mesure (EVA-chip) est nécessaire. Cette immobilisation peut se faire :

- soit par interaction ODN-ODN en greffant des oligonucléotides au fond de l'EVA-chip ce qui implique que la particule fluorescente doit porter des oligonucléotides spécifiques pour s'ancrer au fond du puits par hybridation.

- soit par interaction neutravidine/biotine, ce qui implique la présence de groupement biotine sur les oligonucléotides portés par la particule fluorescente tandis que le fond du puits de l'EVA-chip est fonctionnalisé à la neutravidine. Le travail de thèse de Marie Trévisan a montré que les deux méthodes sont faisables mais que l'approche par neutravidine-biotine est plus reproductible et moins complexe à mettre en œuvre que l'approche ODN-ODN (Trévisan, 2011). En effet, l'approche ODN-ODN repose sur une hybridation et les conditions du milieu (salinité, température, pH...) sont donc des paramètres importants à maîtriser car elles vont influer sur la spécificité et le rendement d'hybridation et donc la sensibilité du test. L'approche par interaction neutravidine/biotine repose sur l'affinité des biomolécules l'une pour l'autre et permet de s'affranchir du milieu de réaction, de plus, elle est moins complexe à élaborer. De ce fait, nous souhaitons conserver cette approche pour immobiliser les particules fluorescentes au fond des EVA-chip. Cette approche ne peut donc pas être appliquée pour immobiliser les oligonucléotides sur les particules. En effet, les ODN doivent être immobilisés sur les particules par leur extrémité 3' pour pouvoir capturer la cible. L'immobilisation des ODN sur les particules par interaction neutravidine biotine nécessiterait qu'ils possèdent une biotine à leur extrémité 3', or nous souhaitons qu'ils aient une biotine à leur extrémité 5' pour être immobilisés au fond des puits. Afin que les ODN puissent être immobilisés par interaction neutravidine / biotine au fond des puits et qu'ils soient correctement orientés sur les particules, une autre méthode doit être utilisée pour les immobiliser sur les particules.

Les oligonucléotides sont donc immobilisés de manière covalente sur les particules en reprenant la technique de greffage chimique classique NHS/carbodiimide utilisée lors de la précédente approche.

Lors de cette réaction chimique, l'EDCI (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide), un carbodiimide soluble dans l'eau, réagit avec des fonctions carboxyliques pour former un intermédiaire réactif, l'O-acylurée. Celui-ci réagit avec le NHS (N-Hydroxysuccinimide) pour donner un ester activé. Après cette étape d'activation, l'ester réagit avec une fonction amine de la biomolécule pour former une fonction amide et ainsi lier la biomolécule sur la surface (*Staros et al, 1986*).

L'immobilisation covalente d'ADN simple brin à la surface des particules par une chimie EDC/NHS est un processus complexe qui comprend différentes étapes critiques. En

72

effet, la formation de la liaison covalente dépend de l'étape d'activation des COOH et de l'étape de couplage entre le NHS-ester et la fonction amine primaire de la biomolécule.

Le rendement de l'étape d'activation des COOH dépend de la quantité de réactifs introduits, et plus particulièrement de la quantité de NHS et d'EDC utilisée (*Sam et al, 2010*), du tampon utilisé pour faire la réaction et de la durée de l'étape (*Palazon et al, 2014*). En effet, des études ont montré que l'O-acylurée formée suite à la réaction entre le carbodiimide et des fonctions -COOH est instable en solution aqueuse. Il peut s'hydrolyser pour donner des produits dérivés comme un N-acylurée ou se régénérer en acide carboxylique. La présence de NHS permet de former un NHS-ester qui est un intermédiaire plus stable. Toutefois, suivant le temps d'activation et le tampon dans lequel cette étape est réalisée, la formation de dérivés de l'O-acylurée peut être favorisée ou non (*Palazon et al, 2014*).

Dans certains protocoles (*Staros et al, 1986*; *Trévisan, 2011*), des lavages sont effectués entre l'étape d'activation et l'étape de couplage et d'autres protocoles (*Sam et al, 2010*; *Yang, 2012*; *Palazon et al, 2014*) n'effectuent pas de lavages entre ces étapes. Il conviendra donc de déterminer les paramètres s'appliquant le mieux à la fonctionnalisation que nous souhaitons réaliser.

De ce fait, les paramètres décrits ci-dessus (quantité de réactifs, temps d'activation et méthodes de lavages) ont été pris en compte et étudiés. Les résultats obtenus afin de mettre au point un protocole adapté à l'immobilisation des ODN sur les particules que nous utilisons sont décrits dans le chapitre 4 (section 4.1) et le protocole final est décrit à l'ANNEXE D. Outre le choix des particules, le choix des ODN est également important pour pouvoir réaliser au mieux la fonctionnalisation. Nous allons l'expliciter dans la section suivante.

Choix et caractérisation des oligonucléotides utilisés

Le modèle biologique utilisé pour valider ce test de capture d'ADN est le génotypage plaquettaire et plus particulièrement le typage du système bi-allélique HPA-1a et HPA-1b. Les séquences d'oligonucléotides utilisées ici sont les mêmes que celles utilisées lors de l'approche précédente et sont décrites dans le Tableau 3-3.

Oligonucléotides	Nb de bases	Séquence (5' -> 3')		
<i>Sonde a</i> (complémentaire HPA-1a)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCCAGAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂		
<i>Sonde b</i> (complémentaire HPA-1b)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCC <u>G</u> GAGGCAGGGCCT–C ₆ –NH ₂		
<i>Sonde de capture</i> (complémentaire HPA-1)	36	NH ₂ –C ₆ –GGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCC		
Cible a (oligonucléotide HPA-1a)	83	Cy3 -GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAA GGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA		

Tableau 3-3 : Séquences d'oligonucléotides utilisés. Les modifications sont en gras et les SNP sont en gras et soulignés.

Les sondes portant la mutation différenciant l'*allèle a* de l'*allèle b* ainsi que la *sonde de capture* possèdent une fonction amine primaire respectivement en 3' et en 5' pour pouvoir réagir avec les fonctions carboxyles des particules (après activation sous forme de NHS ester). Cette amine primaire est espacée du reste de l'oligonucléotide par une séquence de six carbones pour éviter que le groupe fonctionnel n'influe sur les mécanismes d'hybridation.

Les sondes portant la mutation font 36 nucléotides de long et sont immobilisées sur les particules fluorescentes. La base mutante permettant de différencier l'allèle a de l'allèle b est située au centre des sondes. Elles sont marquées avec un Cy5 (λ exc = 649 nm / λ ém = 670 nm) et une biotine, tous les deux situés en 5'. Le Cy5 est un fluorophore dont les spectres d'excitation et d'émission sont similaires à ceux des particules fluorescentes (Figure 3-3). Il est excité par les appareils de mesure à 635 nm. L'émission de fluorescence des Cy5 greffés sur les particules via les sondes devrait amplifier le signal de fluorescence. La biotine portée par les sondes sert d'élément d'accrochage de la particule au fond des puits des EVA-chip lors de l'analyse par Evareader comme nous l'avons expliqué précédemment. Afin d'éviter un encombrement stérique pouvant affecter l'hybridation, une séquence de plusieurs bases T a été ajoutée pour espacer le Cy5 et la biotine du reste de la séquence oligonucléotidique.

Les sondes de capture font 36 nucléotides de long. Elles ne sont pas marquées et sont immobilisées sur les particules magnétiques. La longueur des *sondes de capture* et des sondes portant la mutation est égale afin que leur température d'hybridation avec la cible soient les plus proches possible, ce qui permettra à terme d'hybrider la cible simultanément avec les deux types de particules fonctionnalisées.

Afin de valider le test de capture d'ADN, un oligonucléotide cible est utilisé dans un premier temps. Il s'agit d'un oligonucléotide de 83 nucléotides dont la séquence est celle du gène codant pour HPA-1a (situé sur le chromosome 17). Cette séquence a été déterminée en fonction des amorces de PCR disponibles dans les laboratoires afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux de la PCR. La base mutante qui différencie la séquence HPA-1a de la séquence HPA-1b est située aux deux tiers de la cible. De ce fait, un certain nombre de bases sont disponibles avant et après la mutation afin que l'hybridation soit suffisamment stable. Cet oligonucléotide est marqué avec un Cy3 (λ exc = 550 nm / λ ém = 570 nm). La fluorescence du Cy3 permet de s'assurer que la *cible a* bien été capturée et donc de valider le test. Le Cy3 a un spectre d'excitation différent de ceux du Crimson et du Cy5 (Figure 3-3). Il n'interférera donc pas dans le signal de fluorescence mesuré à la fin du test.

Les résultats de caractérisation des différents oligonucléotides en UV-vis et en fluorescence sont présentés à l'ANNEXE C.



Figure 3-3 : Spectres d'excitation (trait en pointillé) et d'émission (trait plein) des fluorophores Cy3, Cy5, et Crimson (pour les particules fluorescentes) (issu de www.lifetechnologies.com ; www.enzosciences.com)

3.3.2 Formation des sandwichs

Une fois les particules fonctionnalisées, il convient de réaliser l'hybridation entre les sondes et la cible pour former les sandwichs.

Dans cette section nous verrons quelles sont les stratégies de formation des sandwichs possibles et laquelle a été retenue, puis nous expliquerons le choix des différentes conditions d'hybridation.

> Nombre d'étapes et ordre d'introduction des particules

La formation des sandwichs dépend de l'ordre d'introduction des réactifs et des conditions d'hybridation. Dans un premier temps, nous allons nous intéresser aux différentes stratégies de formation des sandwichs possibles pour réaliser la capture d'ADN.

Après l'introduction de particules fonctionnalisées et d'ADN cible en solution, et après le processus de formation des sandwichs, différentes configurations peuvent être obtenues (Figure 3-4).



Figure 3-4 : Différentes configurations pouvant être présentes dans la solution après le processus de formation des sandwichs. A) particules magnétiques (BM) seules ne s'étant pas hybridées avec l'ADN cible ; B) particules fluorescentes (BF) seules ne s'étant pas hybridées avec l'ADN cible, C) ADN cible ne s'étant pas hybridé sur les particules, D) ADN cible hybridé avec une BM mais pas de BF, E) ADN cible hybridé avec une BF mais pas de BM, F) BF ayant formé des sandwichs avec plusieurs BM, G) BM ayant formé des sandwichs avec plusieurs BF.

Si on se place dans le cas de la détection de *cible a* avec des particules fonctionnalisées avec des sondes complémentaires de la *cible a*, plusieurs cas de figure peuvent être observés. En effet, des particules magnétiques et/ou fluorescentes peuvent ne pas s'être hybridées avec l'ADN cible (Figure 3-4 A et B) et par conséquent, des brins d'ADN

cible sont libres dans la solution (Figure 3-4 C). De même, on peut retrouver des demisandwichs dans les cas où l'ADN s'est hybridé avec les sondes d'une des particules mais pas avec celles de l'autre particule (Figure 3-4 D et E).

Dans ces cinq cas, l'ADN n'est pas détecté car le sandwich n'est pas formé en entier. De ce fait, la séparation magnétique finale permettra de récupérer les particules magnétiques avec ou sans cible mais la particule fluorescente nécessaire à la mise en évidence de la présence de la cible ne sera pas présente. Ces configurations ne devraient pas être prédominantes dans la solution finale et sont à éviter.

Lorsque les sandwichs sont entièrement formés, deux configurations peuvent également apparaître. Dans un cas, plusieurs particules magnétiques vont former un sandwich avec la même particule fluorescente via plusieurs cibles (Figure 3-4 F). De ce fait, au lieu d'avoir plusieurs éléments de reconnaissance fluorescents pour une cible, il y a un élément de reconnaissance pour plusieurs cibles, ce qui est une configuration à éviter car le test perd de la sensibilité. Dans le deuxième cas, une particule magnétique capture plusieurs cibles et chaque cible s'hybride avec les sondes d'une particule fluorescente (Figure 3-4 G). Dans ce cas, il y a bien un élément de reconnaissance pour chaque cible. C'est la configuration que nous cherchons à privilégier.

La configuration qui va prédominer après le processus de formation des sandwichs dépend de l'ordre d'introduction des réactifs (particules fonctionnalisées et cible) et des conditions d'hybridation choisies, à savoir le temps et la température d'hybridation ou le tampon choisi. Pour l'ordre d'introduction des réactifs, il existe également plusieurs voies possibles (Figure 3-5).



Figure 3-5 : Différentes voies possibles de formation des sandwichs. A) formation des sandwichs en une étape avec une hybridation simultanée des particules magnétiques (BM) et des particules fluorescentes (BF) avec l'ADN cible ; B) Formation des sandwichs en deux étapes successives, les BM sont dans un premier temps hybridées avec l'ADN cible puis les BF sont rajoutées ; C) Formation des sandwichs en deux étapes, les BM sont hybridées avec l'ADN cible puis une purification et des lavages sont réalisés pour retirer l'excès de cible non hybridée et les BF sont rajoutées.

Un des processus pour former les sandwichs consiste à introduire simultanément tous les réactifs et à réaliser en même temps l'hybridation de la cible avec les sondes des particules magnétiques et fluorescentes (Figure 3-5 A). Pour cela il faut que les conditions requises pour l'hybridation de la cible avec la *sonde de capture* et avec la sonde portant la mutation soient similaires et compatibles (température proche, ...). Cela devrait être le cas puisque les sondes ont des longueurs égales. La réalisation en une seule étape de la formation des sandwichs permettrait de réduire le temps d'analyse et le nombre de manipulations requises pour le test. Toutefois, l'introduction simultanée des particules fonctionnalisées pourrait favoriser les configurations A à F (Figure 3-4) que l'on souhaite éviter et donc diminuer la sensibilité du test.

Une autre voie de formation des sandwichs est d'introduire dans un premiers temps les particules magnétiques et la cible et d'ajouter les particules fluorescentes plus tard au cours de l'hybridation (Figure 3-5 B). Suivant ce processus, l'hybridation de la cible se fait d'abord préférentiellement avec les particules magnétiques puis avec les particules fluorescentes. De ce fait, certaines configurations sont moins favorisées (Figure 3-4 A, C et E) et la durée du test n'est pas allongée par rapport au processus réalisé en une étape.

La troisième voie de formation des sandwichs permet de mieux contrôler chaque étape du dispositif de capture d'ADN. Elle consiste à hybrider dans un premier temps la cible

avec les *sondes de capture* des particules magnétiques. L'excès de cible non hybridée est enlevé par purification et lavage des demi-sandwichs par séparation magnétique. Les particules fluorescentes sont ensuite ajoutées et une deuxième hybridation se fait entre la cible et les sondes immobilisées sur les particules fluorescentes. De cette manière, la configuration G (Figure 3-4) devrait être favorisée et il y a bien plusieurs éléments de détection pour une cible. De plus, des caractérisations intermédiaires peuvent être réalisées pour mieux comprendre comment les sandwichs se forment et quelle quantité de cible est capturée. Cette voie est deux fois plus longue que les autres car elle requiert deux étapes d'hybridation et une étape de lavage. Lors de l'approche par biocode-barres, les sandwichs sont formés en deux étapes. Afin de pouvoir comparer la nouvelle approche de capture d'ADN avec l'approche précédente et afin de mieux en caractériser les différentes étapes, la formation des sandwichs se fera en deux étapes avec une étape de lavage (Figure 3-5 C). Une fois le dispositif de capture d'ADN validé et caractérisé, il pourra être intéressant d'explorer les autres voies de formation des sandwichs.

Conditions d'hybridation

L'outil de capture d'ADN décrit ici repose sur l'hybridation de l'ADN cible avec des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur des particules. L'efficacité de la capture de l'ADN cible est donc liée à la qualité de l'hybridation entre l'ADN et les sondes. Cette hybridation dépend de plusieurs facteurs dont la température d'hybridation, la longueur des fragments à hybrider et la concentration en sel du tampon. Avant de décrire comment les paramètres d'hybridation ont été déterminés, nous allons brièvement décrire comment ces facteurs influent sur les mécanismes d'hybridation.

L'hybridation entre deux brins d'ADN résulte de la formation de liaisons hydrogène entre des bases azotées. Une augmentation de température casse les liaisons hydrogène entre les bases azotées et l'ADN double brin s'ouvre pour donner deux ADN simple brin (dénaturation). Les bases A et T sont appariées grâce à deux ponts hydrogène et les bases C et G sont appariées par trois ponts hydrogène, de ce fait, il faut une température ou un temps de chauffage plus important pour dénaturer un ADN riche en bases C et G. La dénaturation est réversible en fonction de la température. La température pour laquelle 50 % de l'ADN est dénaturé est appelée température de fusion de l'ADN : Tm. Lorsqu'on veut réaliser une hybridation comme c'est le cas ici, on se place à une température inférieure à la Tm. Cette Tm est influencée par :

-le nombre de liaisons hydrogènes et donc la composition et la longueur des séquences à hybrider. Plus les séquences sont longues et riches en bases G et C, plus la Tm sera élevée.

- La composition du tampon d'hybridation. Plus la concentration en cations du tampon est grande, plus la Tm est élevée. En effet, les cations neutralisent les charges négatives de l'ADN et rendent la molécule plus stable et donc moins facile à dénaturer. Contrairement à cela, certains composés comme le formamide vont favoriser la dénaturation et diminuer la Tm.

- Le pH. Plus il est basique, plus les phosphates des bases azotées s'ionisent et plus la dénaturation est favorisée.

- Les mésappariements. Les liaisons hydrogènes ne se forment pas au niveau des parties non complémentaires d'une séquence d'ADN. De ce fait, la Tm de deux brins d'ADN avec des mésappariements est plus faible que celle de deux brins d'ADN parfaitement complémentaires.

Dans le cas du dispositif de capture de l'ADN que nous souhaitons réaliser, il faut donc définir la température à appliquer pour que l'hybridation se fasse au mieux entre l'ADN cible et les sondes immobilisées sur les particules. La température de fusion Tm entre deux brins d'ADN peut être déterminée par mesure UV à 260 nm ou peut être simulée grâce à des outils permettant de prédire le pourcentage d'hybridation en fonction de la température. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser le logiciel DINAMelt pour évaluer la Tm des différentes sondes avec l'ADN cible. DINAMelt calcule entre autres une estimation des concentrations en dimères (ADN double brin) et en monomères (ADN simple brin) en fonction de la température, ce qui permet de déterminer la Tm. Pour cela, il convient de définir *a posteriori* les séquences d'ADN, la salinité du tampon et les concentrations en ADN dans la solution. Une fois ces paramètres fixés, les simulations sont réalisées à partir de la méthodologie décrite par Dimitrov et Zuker (*Dimitrov et al, 2004*). Il est à noter que DINAMELT est avant tout conçu pour modéliser le comportement d'hybridation d'acides nucléiques en solution, les valeurs calculées avec le logiciel sont donc interprétées comme des ordres de grandeur.

Pour notre système de capture de l'ADN, l'hybridation se fait en deux temps. Dans un premier temps, on souhaite favoriser l'hybridation entre la sonde de capture et la cible puis entre la cible et la sonde portant la mutation. De cette manière, une grande quantité de cible est capturée et des sandwichs sont formés entre les différentes particules. Afin de déterminer la température à laquelle réaliser l'hybridation pour avoir le maximum d'appariement entre la cible a et les différentes sondes, des simulations ont été réalisées avec le logiciel DINAMelt (Figure 3-6). Des essais réalisés dans ce travail de thèse montrent que le tampon d'hybridation le plus approprié est le PBS 0,3X (résultats CHAPITRE 4). Les paramètres de simulations relatifs au tampon sont donc ceux du PBS 0,3X à savoir une concentration en cations et plus particulièrement en Na⁺ de 43,8 mM. Les concentrations en cibles et en sondes sont estimées équivalentes, en faisant l'hypothèse que chaque sonde capture une cible. Les Tm obtenues pour les différentes hybridations sont comprises entre 60 et 70 °C. Pour chaque hybridation, le pourcentage de duplex formés entre la cible a et les sondes diminue fortement entre 40°C et 75°C. Afin d'avoir une hybridation optimale pour chaque type de duplex, nous allons nous placer à 45°C car le pourcentage d'hybridation entre la cible et les sondes à cette température est proche de 100 %. Nous faisons donc l'estimation qu'à cette température, un maximum de sandwichs est formé entre les particules magnétiques et les particules fluorescentes en présence de la cible.



Figure 3-6 : Simulations réalisées avec le logiciel DINAMelt de l'hybridation en fonction de la température de la *cible a* avec la *sonde de capture* (complémentaire) et les *sondes a* (complémentaire) et b (1 mésappariement) dans le PBS 0.3X

Dans un deuxième temps, nous souhaitons favoriser l'hybridation spécifique entre les brins complémentaires (*sonde a* avec *cible a* et *sonde de capture* avec *cible a*) et limiter les interactions non spécifiques entre la *cible a* et la *sonde b*. Afin d'augmenter la sélectivité de l'hybridation (stringence), la concentration en sels du tampon est diminuée. On choisit une concentration en Na⁺ de 10 mM, ce qui correspond à du PBS 0,07X. Les simulations d'hybridation sont alors réalisées sur DINAMelt en changeant les paramètres du tampon et en prenant des concentrations en cibles et en sondes estimées comme équivalentes (Figure 3-7).


Figure 3-7 : Simulations réalisées avec le logiciel DINAMelt de l'hybridation en fonction de la température de la *cible a* avec la *sonde de capture* (complémentaire) et les *sondes a* (complémentaire) et b (1 mésappariement) dans le PBS 0.07X.

Le but n'est alors plus d'avoir 100 % de duplex formés entre la cible et les sondes mais de favoriser les duplex complémentaires. Comme attendu, la Tm est plus élevée lorsque l'hybridation est parfaitement complémentaire (Sonde a / cible a, Tm = $\sim 60^{\circ}$ C) que lorsque la sonde comporte un mésappariement (Sonde b / cible a, Tm = \sim 56°C). La courbe en pointillés jaunes (Figure 3-7) montre la différence entre la quantité de duplex complémentaires présents et la quantité de duplex mésappariés. Cette différence est maximale à 58°C. Cela signifie qu'à cette température, il y a plus de duplex formés entre la sonde a et la cible a (70% de duplex à 58°C) qu'entre la sonde b et la cible a (28% de duplex à 58°C). De ce fait, les sandwichs formés entre les particules magnétiques et les particules fluorescentes fonctionnalisées avec les sondes a sont favorisées. Dans ces conditions, théoriquement, le système de capture de l'ADN doit permettre de bien différencier spécifiquement un allèle a d'un allèle b. Toutefois, en se plaçant à 58°C, l'hybridation entre la cible et la sonde de capture (Figure 3-7 courbe en trait plein vert) est aussi défavorisée. En effet, à 58°C, il n'y a plus que 5% de duplex formés entre la sonde de capture et la cible a. Cette hybridation est importante car elle permet de réaliser la séparation magnétique finale avant l'analyse de fluorescence afin d'enlever les particules fluorescentes non capturées. Le fait que cette hybridation soit faible peut faire perdre du signal de fluorescence. La Figure 3-8 montre le pourcentage de formation des sandwichs spécifiques et non spécifiques en fonction de la température (Figure 3-8 A) ainsi que le rendement de formation des sandwichs spécifiques par rapport aux sandwichs non spécifiques (Figure 3-8 B). À 58°C, le rendement de formation de sandwichs spécifiques (3,5%) est 2,5 fois supérieur à celui de la formation des sandwichs non spécifiques (1,4%). La spécificité de formation des sandwichs est maximale aux alentours de 66°C (Figure 3-8 B) mais très peu de sandwichs sont formés à cette température (< 1%). Le signal de fluorescence serait alors trop faible pour être détecté. En effet, le nombre théorique de particules fluorescentes capturées suite au processus de formation des sandwichs complet est estimé par le calcul (F-7) décrit à l'ANNEXE F. Ces estimations montrent qu'environ 10⁹ particules devraient être capturées lors de la formation des sandwichs spécifiques et 4.10⁸ particules devraient être capturées lors de la formation des sandwichs non spécifiques lorsque les sandwichs sont réalisés à 58°C (Figure 3-8 A). Si on se place à 66°C, les nombres théoriques de particules capturées ne sont plus que de 10⁵ particules pour les sandwichs spécifiques et de 2.10⁴ particules pour les sandwichs non spécifiques.

Le choix est donc fait de réaliser la sélectivité à 58°C afin de favoriser la formation des sandwichs spécifiques et de voir si le signal de fluorescence obtenu est suffisant pour voir la spécificité du dispositif de capture d'ADN. De plus, nous avons choisi de garder les séquences définies dans les travaux précédents de manière à pouvoir comparer nos résultats avec ces travaux.



Figure 3-8 : A) Pourcentage de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X B) Simulation du rendement d'hybridation de la *sonde a* avec la *cible a* par rapport à celui de la *sonde b* avec la *cible a* dans le PBS 0.07X. Ce rendement est optimal aux alentours de 66°C mais le nombre de sandwichs formés est alors faible (<1%).

La stratégie choisie pour l'hybridation est donc de réaliser la formation des sandwichs dans le PBS 0,3X à 45°C pour favoriser la capture de l'ADN et former le plus de sandwichs possibles entre les particules magnétiques et fluorescentes, puis de réaliser les lavages à 58°C dans un tampon dont la concentration en sels est abaissée afin de maintenir les sandwichs spécifiques (*sonde a* / cible a) et de déstabiliser les sandwichs non spécifiques (*sonde b* / cible a) comme cela est résumé dans la Figure 3-9.



Figure 3-9 : Schéma de la stratégie de formation des sandwichs retenue

Une fois la capture de l'ADN réalisée, la présence de la cible est mise en évidence par analyse du signal de fluorescence.

3.3.3 Analyse de la fluorescence

Une fois les sandwichs formés avec l'ADN cible, la présence de la cible est mise en évidence par l'analyse de la fluorescence du système. En effet, si la cible est présente, des sandwichs sont formés entre les particules magnétiques et les particules fluorescentes fonctionnalisées avec la sonde complémentaire de l'allèle recherché. Si la cible n'est pas présente ou si la cible capturée n'est pas complémentaire des sondes portées par les particules fluorescentes, les sandwichs ne se forment pas avec les particules fluorescentes et aucun signal de fluorescence n'est mesuré.

Afin de mesurer ce signal de fluorescence, deux aspects sont à considérer :

- La forme sous laquelle le système est analysé, c'est-à-dire est-ce que l'analyse de fluorescence est réalisée sur le système complet ou uniquement sur la particule fluorescente.

- Les appareils de mesure de fluorescence utilisés.

Méthodes d'analyse

Comme nous l'avons vu précédemment, la fluorescence est mesurée à 635 nm par des méthodes usuelles, la cytométrie en flux et le scanner de fluorescence, ainsi que par une méthode innovante, la détection par onde évanescente avec un Evareader. Toutes ces méthodes reposent sur des principes différents, comme cela est décrit à l'ANNEXE B.

La cytométrie de flux est une analyse dynamique puisqu'elle mesure la fluorescence d'éléments en solution passant dans un flux continu devant un laser. L'analyse par scanner de fluorescence est statique, elle mesure la fluorescence de particules fixées sur une lame par séchage. La détection de fluorescence par ces deux méthodes va permettre de comparer les résultats obtenus avec l'Evareader à des mesures de références. En effet, la mesure de fluorescence par Evareader est, elle, à la fois dynamique et statique car elle permet l'analyse en temps réel de la fluorescence de particules en solution qui viennent s'immobiliser sur une surface.

La sensibilité du test dépend de l'intensité de fluorescence mesurée. La détection du signal de fluorescence dépend donc des performances de l'appareil de mesure et de leurs spécifications (décrites dans le Tableau 3-1) mais également de la façon dont l'élément fluorescent est mesuré et de son environnement. De ce fait, il convient de prendre en compte la forme sous laquelle le système est analysé.

Forme d'analyse du système

À la suite de la capture de l'ADN cible, le sandwich complet est formé de trois éléments : les particules magnétiques, l'ADN et les particules fluorescentes. Le signal de fluorescence qui est mesuré à 635 nm provient de la fluorescence de ces particules et des Cy5 greffés sur les sondes qu'elles portent. Le signal de fluorescence peut être mesuré sur le système complet ou sur la particule fluorescente uniquement après la dénaturation des sandwichs, comme cela est illustré sur la Figure 3-10 dans le cas de la mesure par Evareader par exemple.



Figure 3-10 : Conformations possibles pour l'analyse de fluorescence par Evareader

Les deux approches ont leurs avantages et leurs inconvénients. L'analyse du sandwich complet limite les étapes mais la présence de la particule magnétique, qui est de taille équivalente à celle de la particule fluorescente, peut masquer le signal de fluorescence de celle-ci ou causer une extinction partielle de fluorescence. De plus, lors de l'analyse par Evareader, la fluorescence est mesurée dans un espace de 200 nm au-dessus de la surface de la barrette de mesure. Il faut donc s'assurer que les particules fluorescentes se trouvent dans cette zone. L'accrochage des particules fluorescentes au fond de la barrette de l'Evareader est assuré par une interaction neutravidine / biotine grâce à des biotines portées par les sondes greffées sur les particules fluorescentes. La présence de particules magnétiques peut éventuellement défavoriser cet accrochage et donc diminuer le signal de fluorescence mesuré.

L'analyse des particules fluorescentes seules implique une étape de dénaturation des sandwichs et de purification de l'échantillon, avec un risque de perte de matière et donc du signal de fluorescence.

En réalité, comme nous l'avons vu précédemment, les conditions d'hybridation font que la solution finale devrait-être composée de sandwichs complets et de sandwichs partiellement dénaturés (section 3.3.2 au paragraphe relatif aux conditions d'hybridation). Les simulations réalisées avec les conditions d'hybridation que nous appliquons nous permettent d'estimer le pourcentage de sandwichs complets dans la solution finale à 3,5% à la fin des processus de lavage. Afin de limiter les étapes, et parce qu'il est difficile de s'assurer qu'il n'y a qu'une seule conformation présente dans la solution, nous avons choisi d'analyser la solution au terme du processus de formation des sandwichs et donc d'analyser à la fois des sandwichs complets et des particules seules. Nous avons dans ce travail utilisé des séquences définies dans des travaux précédents. Dans le futur, les séquences d'oligonucoléotides de capture et les sondes devraient être modifiées de façon à obtenir un meilleur rendement global de formation de sandwichs. Ceci permettra, à terme, d'améliorer à la fois la spécificité et le seuil inférieur de détection de notre méthode.

3.4 Conclusion

Afin de simplifier l'outil de capture d'ADN préalablement développé par l'INL et l'EFS, nous avons choisi une approche fondée sur la formation de sandwichs entre des particules magnétiques et des particules fluorescentes biofonctionnalisées lorsque l'ADN cible est présent. Le principal changement de cette approche réside dans l'utilisation d'une particule fluorescente comme élément de détection et sur la fonctionnalisation de ces particules avec des sondes marquées avec des Cy5 pour amplifier le signal. Ainsi, le sandwich complet peut être détecté, ce qui évite des étapes de dénaturation ou d'hybridation supplémentaires, ce qui était le cas lors de l'approche précédente. La durée du test est de ce fait réduite d'au moins 45 min, et cela limite les manipulations.

La réalisation de ce nouvel outil de capture d'ADN se découpe en trois phases principales : la préparation du test, la capture de l'ADN proprement dite par formation de sandwichs entre des particules fonctionnalisées en présence de la cible, et l'analyse de la fluorescence du système pour mettre en évidence la formation des sandwichs. Nous avons vu dans ce chapitre que chacune de ces phases comporte un certain nombre d'étapes qui peuvent être réalisées selon différentes voies. Les voies choisies ont été explicitées et sont récapitulées dans la Figure 3-11. Le protocole complet de formation des sandwichs est détaillé en ANNEXE D.



Figure 3-11 : Schéma des différents choix fait pour la réalisation des étapes clefs de l'élaboration du test de capture d'ADN à base de particules biofonctionnalisées

Pour chacune de ces étapes, des essais ont été réalisés afin de déterminer les meilleures conditions de leur réalisation. En effet, le choix des tampons de réactions, des méthodes de lavages, du protocole d'activation et des conditions d'hybridation est crucial pour la réalisation du test complet. Le prochain chapitre présente les essais réalisés pour mettre au point ces paramètres ainsi que les résultats obtenus lors de la mise en œuvre du test en fonction des différentes méthodes d'analyse utilisées.

CHAPITRE 4. RÉALISATION DU SYSTÈME SIMPLIFIÉ DE CAPTURE D'ADN

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la réalisation de l'outil de capture d'ADN se découpe en trois étapes : la préparation du test, la formation des sandwichs et l'analyse de la fluorescence. Pour chaque étape, différentes stratégies peuvent être utilisées et les choix réalisés ont été explicités.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les expérimentations réalisées en vue de réaliser la capture d'ADN. Dans un premier temps nous verrons les expériences menées afin de définir les conditions de fonctionnalisation des particules. Puis nous examinerons les résultats obtenus lors de la réalisation de la capture d'ADN par formation de sandwichs avec les particules fonctionnalisées. Enfin, nous discuterons des résultats obtenus avec les différentes méthodes de détection de la fluorescence.

4.1 Préparation du test : fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes

Afin de préparer le test de capture d'ADN, il convient de fonctionnaliser les particules avec les oligonucléotides complémentaires de l'ADN à capturer. Comme cela a été expliqué précédemment (CHAPITRE 3), nous avons choisi d'immobiliser de manière covalente les ODN sur les particules de carboxylatex via une voie chimique utilisant l'EDCI et le NHS. Cette méthode est largement utilisée pour l'immobilisation de biomolécules sur des surfaces. Toutefois, les conditions d'immobilisation varient d'une étude à l'autre (*Lahiri et al, 1999; Singh et al, 2011; Sapsford et al, 2013; Bañuls et al, 2013*).

Dans cette section, nous montrons comment nous avons identifié expérimentalement les conditions de fonctionnalisation qui conviennent le mieux à l'immobilisation des ODN sur les particules utilisées et notamment celles qui concernent les quantités de réactifs et le temps de réaction ainsi que les étapes de lavage et de purification des particules.

4.1.1 Lavages et purifications des particules

Problématique de lavage des particules

Pour la fonctionnalisation des particules, il est important de contrôler le milieu dans lequel elles se trouvent. Ainsi les particules sont lavées une première fois avant l'étape de fonctionnalisation pour enlever le tampon de stockage dans lequel elles sont fournies et dont la composition est mal connue. Elles sont également lavées après l'étape de fonctionnalisation pour enlever l'excès de solution d'activation et les ODN non immobilisés sur les particules. Elles sont ensuite reprises dans un tampon de stockage adéquat pour réaliser le test de capture d'ADN. Ces étapes de lavage sont nécessaires mais longues et il y a un risque de perte et/ou d'altération des particules. Il est donc nécessaire d'optimiser ces étapes afin de préserver l'intégrité des particules.

Nous utilisons ici des particules de latex magnétiques (oxyde de fer, Sigma Aldrich) et des particules de latex fluorescentes non magnétiques (Molecular Probes, Invitrogen) de 1 μm de diamètre. Le lavage et la purification sont spécifiques à chaque type de particule.

Pour les particules magnétiques, les étapes de lavage sont réalisées à l'aide d'un portoir adapté sur un aimant néodyme. Les particules contenues dans les tubes Eppendorf sont attirées contre la paroi de celui-ci grâce à l'aimant, et le surnageant peut ainsi facilement être retiré et changé. De ce fait, il n'y a pas ou peu de pertes de particules et leur intégrité est préservée.

La séparation magnétique ne peut pas être utilisée pour le lavage des particules de latex fluorescentes non magnétiques, mais elles peuvent être lavées de différentes manières (centrifugation, filtration, dialyse ...). Afin d'établir un protocole de lavage des particules fluorescentes, deux méthodes sont testées : la centrifugation et la filtration.

Après la centrifugation des tubes dans lesquels elles se trouvent, les particules forment un culot contre la paroi du tube. Le surnageant est alors facilement retiré par pipetage et les particules sont reprises dans le volume désiré de tampon. Toutefois, les paramètres de centrifugation doivent être correctement ajustés. En effet, si la vitesse de centrifugation est trop faible ou si le temps de centrifugation est trop court, le culot se remet facilement en suspension et des particules sont retirées avec le surnageant. Si la vitesse de centrifugation est trop forte, il y a un risque d'agrégation irréversible des particules et celles-ci peuvent être endommagées.

La filtration est une alternative à la centrifugation. Elle consiste à faire passer la solution contenant les particules à travers un filtre qui retient les particules. Elles sont reprises dans le tampon voulu par filtration inverse. Les particules subissent ainsi moins de contraintes mécaniques que lors de la centrifugation mais le volume dans lequel elles sont reprises est moins facilement contrôlé.

Évaluation du lavage des particules fluorescentes par centrifugation et par filtration

Afin de déterminer la méthode de lavage la plus adaptée pour les particules fluorescentes utilisées, plusieurs conditions de lavages sont testées. Dans la première méthode, les lavages sont réalisés par centrifugation à la vitesse maximale de centrifugation de la centrifugeuse, soit 17 000 \vec{g} . La deuxième méthode consiste à centrifuger les particules à une vitesse calculée en fonction de la loi de Stokes. Cette loi permet d'estimer la vitesse de chute d'une particule dans un liquide. Le calcul est détaillé à l'ANNEXE E et indique qu'il faut appliquer une vitesse de centrifugation de 2000 \vec{g} pendant 10 min.

La troisième méthode de lavage consiste à filtrer la solution de particules à travers un filtre aqueux de 0,45 μ m à l'aide d'une seringue.

Ces techniques de lavages (filtration et centrifugation à différentes vitesses) sont comparées en termes de perte de particules au bout du processus complet de fonctionnalisation et en termes de détérioration des particules. Pour cela, la concentration en particules est évaluée à la fin du processus de greffage par spectroscopie d'absorption UV-visible. Nous nous appuyons sur une courbe d'étalonnage préalablement réalisée à 425 nm, longueur caractéristique du latex des particules (ANNEXE C). L'aspect des particules est analysé par microscopie électronique à balayage (MEB). Les particules sont d'abord lavées dans l'eau puis sont mises en suspension dans un tampon (le PBS 1X) pour se mettre dans les conditions de réalisation du test final.

➢ Résultats

Les dosages spectrophotométriques réalisés à 425 nm permettent d'estimer les pourcentages de perte en particules après le processus de lavage (Tableau 4-1). Lorsque les lavages sont réalisés par centrifugation à 17 000 \vec{g} (méthode 1), le pourcentage de perte est de 70 % et il est de 75 % quand les lavages sont réalisés par centrifugation à 2 000 \vec{g} (méthode 2). Lorsque les différents lavages sont réalisés par filtration, le taux de perte en particules est de seulement 50%.

 Tableau 4-1 : Pourcentage de perte en particules fluorescentes à la fin du processus de fonctionnalisation

 suivant les différentes techniques de lavage

Méthodes de lavages	Pourcentage de pertes de particules
Méthode 1 : centrifugation à 17000 $ec{g}$	70%
Méthode 2 : centrifugation à 2000 $ec{g}$	75%
Méthode 3 : filtration (filtre 0,45 μm)	50%

Des analyses sont également réalisées en microscopie électronique à balayage (MEB) pour analyser l'aspect des particules après les cycles de lavage (Figure 4-1). La Figure 4-1 a montre les particules fluorescentes dans l'eau avant les étapes de lavage et constitue le témoin de référence. Les particules sont sphériques, individualisées et assez monodisperses en taille avec un diamètre d'environ 1 μ m. Après les lavages par filtration, les particules sont toujours monodisperses et sphériques (Figure 4-1 b). Elles n'ont pas été altérées par les étapes de lavages et ne sont pas agrégées. Les cristaux observés proviennent du tampon. Après lavages par centrifugation, les particules sont toujours sphériques mais elles sont agrégées. Cette agrégation est légère dans le cas où les centrifugations ont été réalisées à 2 000 \vec{g} mais très importante quand les centrifugations ont été réalisées à 17 000 \vec{g} (Figure 4-2 c et d). La centrifugation a donc bien une influence sur l'aspect des particules.



Figure 4-1 : Images MEB de particules fluorescentes : a) dans l'eau avant traitement (témoin négatif), b) dans le PBS 1X après lavages par filtration à travers un filtre aqueux de 0,45 μm, c) après lavages par centrifugations à 2000 g, d) après lavages par centrifugations à 17 000 g

Discussion et conclusion

Lors des lavages par centrifugation, il y a une perte de 70 à 75 % des particules au cours des retraits des surnageants. Cela peut être dû au fait que les particules ont une densité similaire à celle du PBS 1X (environ 1,05 g/cm³), ce qui ne favorise pas la formation du culot. Le pourcentage de perte plus élevé quand les particules sont centrifugées à 2000 \vec{g} au lieu de 17 000 \vec{g} s'explique par le fait que pour une vitesse plus faible, le culot formé est moins stable.

La perte observée suite aux lavages par filtration est de 50 % et relève de l'adhérence des particules au filtre.

Le pourcentage de perte n'est pas le seul paramètre à considérer, l'aspect des particules après le processus de lavage est également à prendre en compte. Les observations

faites au MEB montrent qu'après les lavages par centrifugation, les particules sont plus ou moins agrégées.

Lorsque les particules sont agrégées, leur surface, et donc les fonctions carboxyles nécessaires à l'immobilisation des ODN sur les particules, sont moins accessibles. La méthode de lavage par centrifugation à 17 000 \vec{g} n'est donc pas retenue car les particules sont fortement agrégées après les différentes centrifugations.

La méthode de lavage par filtration présente le plus faible pourcentage de perte et les particules sont encore assez individualisées après les lavages. Toutefois, par cette méthode, le volume final est difficilement contrôlable. En effet, la seringue et le filtre possèdent un volume mort important (entre 50 μ l et 100 μ l). À la fin de l'étape de fonctionnalisation, les particules sont concentrées dans un faible volume d'une dizaine de microlitres pour avoir la concentration en particules adéquates pour réaliser le test final. Il est difficile d'obtenir un volume de quelques microlitres assez précis avec le protocole de lavage par filtration.

En tenant compte à la fois du volume final récupéré, du taux de perte des particules et des phénomènes d'agrégation, nous faisons donc le choix de réaliser les lavages par centrifugation à 2 000 \vec{g} .

4.1.2 Détermination des conditions de fonctionnalisation

Nous présentons ci-dessous le principe de la biofonctionnalisation (greffage d'acides nucléiques) des carboxylatex, la comparaison de différents protocoles de fonctionnalisation puis la caractérisation et l'évaluation du taux de fonctionnalisation des différentes particules.

Principe de fonctionnalisation des particules

L'immobilisation des ODN sur les particules magnétiques et sur les particules fluorescentes est réalisée par liaison covalente entre une fonction amine (porté par l'ODN) et une fonction carboxylique (portée par les particules). Pour cela, une chimie EDCI / NHS est utilisée. Elle comporte deux étapes : l'activation des surfaces et la formation de la liaison covalente (Figure 4-2). L'activation consiste à former un NHS-ester par réaction d'un carbodiimide (EDCI) et d'un N-hydroxysuccinimide (NHS) avec des fonctions carboxyliques. Dans un premier temps, cela donne la formation d'un O-acylurée qui réagit avec le NHS pour donner un ester activé. Cet ester réagit ensuite avec une amine primaire pour former la liaison covalente (réaction chimique en ANNEXE D). Cette méthode est une technique courante d'immobilisation de biomolécules mais les conditions de réaction, notamment en termes de concentration en réactifs et de temps de réaction, varient beaucoup d'une étude à l'autre.



Figure 4-2 : Schéma simplifié de la fonctionnalisation de particules par voie chimique utilisant l'EDCI et le NHS. (Staros et al, 1986; Trévisan, 2011; Palazon et al, 2014)

Évaluation de différents protocoles de fonctionnalisation

La fonctionnalisation des particules est testée selon trois protocoles différents dont les paramètres sont décrits dans le Tableau 4-2.

Le protocole 1 correspond à celui utilisé dans l'approche par BCB précédemment mise au point (*Trévisan, 2011*). Dans ce protocole, l'activation est réalisée dans le PBS 1X pendant 2 h puis la solution d'activation est retirée et les particules sont lavées avec du PBS 1X avant ajout des ODN. La phase d'immobilisation des ODN dure environ 15 h. Des ODN correspondant à la séquence HPA-1a et marqués avec un Cy5 sont utilisés pour fonctionnaliser les particules.

Dans le protocole 2, inspiré de celui décrit par Zhugen Yang dans son travail de thèse (*Yang, 2012*), les concentrations en NHS et EDCI sont augmentées par rapport au protocole 1 et sont alors de 1 M pour le NHS et de 0,5 M pour l'EDCI. Des travaux ont montrés qu'avec ces concentrations en réactifs, la formation de l'ester activé est optimale dans la première demi-heure de réaction puis l'ester activé commence à s'hydrolyser (*Palazon et al, 2014*). L'étape d'activation a donc été réduite à 30 min pour avoir les meilleures conditions de réaction. De même, l'étape de formation de la liaison covalente est réduite à 4 h. Il n'y a plus de lavages avant l'ajout des ODN afin de limiter la perte en particules lors des lavages.

Le protocole 3 est similaire au protocole 2, mais la réaction est réalisée dans le PBS 0,3X afin que la salinité du tampon soit adaptée aux particules et la quantité d'ODN dans la solution est de 15 μ M au lieu de 2,5 μ M.

Les mêmes protocoles sont utilisés pour la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes.

	Protocole 1	Protocole 2	Protocole 3	
Tampon d'activation	PBS 1X	PBS 1X	PBS 0.3X	
Concentration en NHS / EDCI (M/M)	NHS 0,03 M / EDCI 0,01 M (3/1)	NHS 1 M / EDCI 0,5 M (2/1)	NHS 1 M / EDCI 0,5 M (2/1)	
Temps d'activation	2 h	30 min	30 min	
Température d'activation	25°C	25°C	25°C	
Lavages entre l'activation et l'ajout des ODN	3 lavages avec du PBS 1X	Pas de lavages	Pas de lavages	
Concentration en ODN dans la solution finale	2,5 μΜ	2,5 μM	15 μΜ	
Temps de fonctionnalisation	Une nuit (~ 15 h)	4 h	4 h	
Température lors de la fonctionnalisation	25°C	25°C	25°C	

Tableau 4-2 : Différents protocoles testés pour l'activation et la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes

Méthode de caractérisation et d'évaluation du taux de fonctionnalisation par imagerie de fluorescence

Afin d'estimer la quantité d'ODN immobilisée sur les particules, les surnageants contenant les ODN non greffés sur les particules sont analysés par imagerie de fluorescence grâce à un scanner après le processus de fonctionnalisation (les détails du protocole sont expliqués en ANNEXE D). Afin de différencier l'adsorption non spécifique des ODN sur les particules de leur immobilisation covalente, deux échantillons sont réalisés. Un échantillon est composé de particules non activées et mises en présence d'ODN (donc pas de greffage chimique). Le deuxième échantillon est composé de particules activées par la chimie EDCI / NHS et mises en présence d'ODN (Figure 4-3 A). Les ODN utilisés sont marqués avec un Cy5 pour pouvoir être analysés en imagerie de fluorescence.

Les particules sont isolées par séparation magnétique et les surnageants contenant les ODN non greffés (ou non adsorbés) sont récupérés (Figure 4-3 A). Afin de pouvoir quantifier ces ODN, un échantillon témoin contenant une quantité d'ODN bien contrôlée dans le tampon est également réalisé. Sa concentration exacte est déterminée en UV-vis grâce à une droite d'étalonnage préalablement réalisée (ANNEXE C).

Après l'étape de biofonctionnalisation, la fluorescence de la solution témoin et des surnageants est analysée par imagerie de fluorescence à 635 nm grâce à un scanner de fluorescence selon le protocole décrit en ANNEXE D section D.6. La quantité d'ODN présente dans les surnageants est estimée en comparant leur fluorescence à celle de la solution témoin contenant 100% de la quantité d'ODN introduite (Figure 4-6). La quantité d'ODN immobilisée sur les particules est déduite de la quantité d'ODN restante dans les surnageants.



Figure 4-3 : A) Schéma des échantillons analysés ; B) Schéma de l'analyse des surnageants contenant les ODN non immobilisés sur les particules suite au processus de biofonctionnalisation des particules

> Résultats

Les résultats de mesure des surnageants par imagerie de fluorescence sont présentés sur la Figure 4-4.

Pour le protocole 1, en gris clair, les surnageants issus des échantillons 1 et 2 ont des concentrations en ODN inférieures à celle du témoin. Ces résultats sont les mêmes, que les surnageants aient été en contact avec les particules fluorescentes (Figure 4-4 A,) ou magnétiques (Figure 4-4 B). Cela indique qu'une partie des ODN est bien présente sur les particules. Toutefois, dans les deux cas, les surnageants issus des échantillons 1 et 2 ont des concentrations équivalentes (Tableau 4-3).

Pour le protocole 2, les résultats de l'analyse de fluorescence des surnageants sont représentés en gris rayé sur la Figure 4-4. Dans le cas des particules magnétiques (Figure 4-4 D) et des particules fluorescentes (Figure 4-4 C), la fluorescence des surnageants issus de l'échantillon 2 est nettement plus basse que celle des surnageants issus de l'échantillon 1, ce qui traduit un greffage covalent des ODN sur les particules.

Après la réalisation du protocole 3 (Figure 4-4 E et F), la fluorescence des surnageants issus de l'échantillon 2 est nettement plus basse que celle des surnageants issus de l'échantillon 1, mais les quantités d'ODN greffés sur les particules sont plus importantes car la concentration en ODN dans la solution au moment du greffage est de 15 μ M au lieu de 2,5 μ M lors du protocole 2.



Figure 4-4 : Résultats de mesure de fluorescence des surnageants suite à différents protocoles de fonctionnalisation des particules. Échantillon 1 : particules non activées ; Échantillon 2 : particules activées. En gris clair, Protocole1, fonctionnalisation en deux étapes avec EDCI/NHS 0,01/0,03M et ODN = 2, 5 μM ; En rayé, protocole 2, fonctionnalisation en 1 étape avec EDCI / NHS 0,5/1 M et ODN = 2,5 μM ; En quadrillage, protocole 3, fonctionnalisation en 1 étape avec EDCI / NHS 0,5/1 M et ODN = 15 μM. A, C et E) pour les particules fluorescentes ; B, D et F) pour les particules magnétiques.

> Interprétation

Afin de quantifier le greffage des ODN sur les particules, le pourcentage d'ODN immobilisé sur les particules et le pourcentage de COOH ayant greffé un ODN ont été déterminés de la manière suivante :

% d'ODN immobilisés sur les particules =
$$\frac{N_{ODN}}{N_{ODN introduits}} * 100$$
 (4-1)

% de COOH greffés avec un ODN =
$$\left(\left(\frac{N_{ODN}}{N_{part}}\right)/(N_{COOH})\right) * 100$$
 (4-2)

Où N_{ODN} est le nombre d'ODN sur les particules (déterminé par imagerie de fluorescence), $N_{ODN introduits}$ est le nombre d'ODN introduits (déterminé par UV-Vis), N_{part} est le nombre de particules (déterminé par UV-Vis), et N_{COOH} est le nombre de COOH par particule (donné par le fournisseur).

Les résultats quantitatifs sont repris dans le Tableau 4-3.

Avec le protocole 1, le taux d'adsorption des ODN sur les particules magnétiques non activées (échantillon 1) est de ~25 % et le pourcentage d'ODN immobilisé sur les particules activées (échantillon 2) est de ~28 % ce qui est similaire et indique qu'il n'y a pas eu ou peu de greffage covalent. Le pourcentage de greffage des COOH est de ~0,6 %, ce qui est très faible. Le taux d'adsorption des ODN sur les particules fluorescentes après fonctionnalisation avec le protocole 1 est de ~10% et le pourcentage d'ODN immobilisé sur les particules fluorescentes activées est de ~45 %. Toutefois, le taux de greffage des COOH est de ~1 % ce qui reste très bas et indique que la fonctionnalisation n'a pas eu lieu ou est très faible. Les taux de greffage obtenus pour les deux types de particules étant similaire, cela laisse penser que l'absence ou la très faible biofonctionnalisation est due au procédé de greffage utilisé.

Avec le protocole 2, le taux d'adsorption des ODN sur les particules magnétiques est de ~54 % et le pourcentage d'ODN immobilisé sur les particules activées est de ~97 % ce qui est supérieur aux résultats obtenus avec le protocole 1. Le taux de greffage des COOH est de ~2 % ce qui est 4 fois supérieur à celui obtenu avec le protocole 1. Pour les particules fluorescentes, le taux d'adsorption est de ~40 % et le pourcentage d'ODN immobilisé sur les particules est de ~98 %. Le taux de greffage des COOH est de 2 % ce qui est 2 fois plus important que le taux obtenu avec le protocole 1. Ces résultats montrent qu'avec le protocole 2, il y a bien un greffage covalent des ODN sur les particules, ce qui n'est pas le cas lorsque la fonctionnalisation est réalisée avec le protocole 1. Toutefois, le taux de fonctionnalisation des particules reste bas, puisqu'en moyenne seulement ~2 % des COOH présents sur les particules sont fonctionnalisés avec un ODN.

Dans le protocole 3, les particules sont mises en présence de 6 fois plus d'ODN que dans les protocoles précédents (la concentration finale en ODN est de 15 µM au lieu de 2,5 µM). Quand 15 µM d'ODN sont introduits, le taux d'adsorption des ODN sur les particules magnétiques est de ~20 % et le pourcentage d'ODN immobilisés sur les particules activées et de ~54 %. Le taux de fonctionnalisation des COOH est de ~9 % soit 3,5 fois plus que lorsque seulement 2,5 μ M d'ODN sont introduits. Sur les particules fluorescentes, le taux d'adsorption est de ~17 % et le taux de fonctionnalisation des COOH est de ~6 % soit 2,5 fois plus que lorsque seulement 2,5 μ M d'ODN sont introduits. Les résultats montrent que l'augmentation du taux de fonctionnalisation n'est pas linéaire avec la concentration en ODN introduite. En effet, pour une augmentation de la concentration en ODN d'un facteur 6, le taux de fonctionnalisation des particules n'augmente que d'un facteur 2,5 à 3,5. Afin d'avoir un taux de fonctionnalisation correct sans trop augmenter le coût de préparation du test (les ODN étant des produits onéreux), nous avons choisi de fonctionnaliser les particules en introduisant une concentration en ODN de 15 µM dans un premier temps. Dans ces conditions de greffage, la densité surfacique d'ODN détectés par particule est évalué à 10⁸ ODN /particule dans le cas des particules magnétiques et à 3.10⁶ ODN/particule dans le cas des particules fluorescentes. Ces densités sont élevées au regard de ce qui est décrit dans la littérature. En effet les densités surfaciques sont de quelques 10¹¹ ODN/cm² (Dugas et al, 2004) ce qui dans notre cas se traduirait par une densité surfacique d'environ 3000 ODN/particule. Nos résultats de greffage seront donc à confirmer.

Protocole	Échantillon	Conc ODN Surnageant (µM)	Nb ODN sur particules	Nb particules †	COOH /particule ††	% d'ODN immobilisés sur les particules	% de COOH greffés avec un ODN	Nb d'ODN / particule
Protocole 1	Témoin ODN	2,1 ± 0,06	/	/	/	/	/	/
	BM Échantillon 1	1,6 ± 0,2	$1,6.10^{14}$ $\pm 6.10^{13}$	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	25 ± 9	1	8.10⁶ ± 3.10 ⁶
	BM Échantillon 2	1,6 ± 0,3	1,8.10 ¹⁴ ± 9.10 ¹³	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	28 ± 10	0,6 ± 0,3	9.10⁶ ± 4.10 ⁶
	BF Échantillon 1	1,9 ± 0,04	6,6.10 ¹³ ± 1.10 ¹³	7,1.10 ⁸ ± 3.10 ⁷	6,1.10 ⁷	10 ± 2	/	9.10⁴ ± 2.10 ⁴
	BF Échantillon 2	1,2 ± 0,05	2,9.10 ¹⁴ ± 2.10 ¹³	6,8.10 ⁸ ± 9.10 ⁶	6,1.10 ⁷	45 ± 2	0,7 ± 0,004	4.10⁵ ± 2.10⁴
	Témoin ODN	2,4 ± 0,05	/	/	/	/	/	/
Protocole 2	BM Échantillon 1	1,1 ± 0,3	3,9.10 ¹⁴ ± 9.10 ¹³	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	$\textbf{54}\pm10$	1	2.10⁷ ± 4.10 ⁶
	BM Échantillon 2	0,1 ± 0,002	7,1.10 ¹⁴ ± 7.10 ¹¹	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	97 ± 0,09	2 ± 0,002	4.10⁷ ± 3.10 ⁴
	BF Échantillon 1	1,4 ± 0,53	2,9.10 ¹⁴ ± 2.10 ¹⁴	5,1.10 ⁸ ± 5.10 ⁶	6,1.10 ⁷	40 ± 20	/	6.10⁵ ± 3.10⁵
	BF Échantillon 2	0,1±0,008	7,1.10 ¹⁴ ± 2.10 ¹²	5,2.10 ⁸ ± 6.10 ⁶	6,1.10 ⁷	98 ± 0,3	2 ± 0,007	1.10⁶ ± 4.10 ³
Protocole 3	Témoin ODN	15,5 ± 0,3	/	/	/	/	/	/
	BM Échantillon 1	12,4 ± 3	9,3.10 ¹⁴ ± 9.10 ¹⁴	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	20 ± 20	/	5.10⁷ ± 4.10 ⁷
	BM Échantillon 2	7,2 ± 3	2,5.10 ¹⁵ ± 1.10 ¹⁵	2.10 ⁷	1,5.10 ⁹	54 ± 20	9 ± 3	1.10⁸ ± 4.10 ⁷
	BF Échantillon 1	12,8 ± 3	$8,1.10^{14}$ $\pm 9.10^{14}$	5,4.10 ⁸ ± 1.10 ⁸	6,1.10 ⁷	17 ± 20	/	2.10⁶ ± 1.10 ⁶
	BF Échantillon 2	8,5 ± 1	$2,1.10^{15}$ $\pm 4.10^{14}$	6,1.10 ⁸ ± 2.10 ⁷	6,1.10 ⁷	45 ± 9	6 ± 1	3.10⁶ ± 7.10 ⁵

Tableau 4-3 : Résultats obtenus pour chaque échantillon et détermination du pourcentage de fonctionnalisation correspondant au pourcentage de COOH ayant greffés un ODN

[†] Le nombre de particules magnétiques est évalué d'après les données du fournisseur et le nombre de particules fluorescentes est évalué par mesure UV-Vis

^{††} Données du fournisseurs

Discussion et conclusion

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Notamment, les travaux de Francisco Palazon (*Palazon et al, 2014*) montrent qu'en milieu aqueux et pour une concentration en EDC/NHS d'environ 20 mM comme c'est le cas dans le protocole 1, l'étape d'activation des COOH a lieu dans les 30 min suivants l'introduction de la solution d'EDC et NHS, puis la concentration en esters activés diminue fortement, car ils s'hydrolysent pour redonner des COOH. Dans le protocole 1, l'étape d'activation dure 2 h. Les résultats présentés dans l'article laissent penser qu'après ce temps, une grande partie des esters activés ayant pu être formés s'est hydrolysée en COOH et n'est plus disponible pour former la liaison covalente avec les amines primaires portées par les ODN. Cela pourrait expliquer le fait que la fonctionnalisation est faible dans ces conditions. Dans le protocole 2, l'étape d'activation dure 30 min. Selon l'article, le taux de NHS-ester disponibles après 30 min est encore élevé, ce qui peut expliquer que le taux de fonctionnalisation est plus élevé lors de la réalisation du protocole 2. De plus, dans le protocole 2, les étapes de lavages entre l'étape d'activation et l'ajout des ODN ont été supprimées. Il y a donc moins de perte de matière et cela peut aussi expliquer le meilleur rendement de fonctionnalisation obtenu.

Une autre hypothèse pouvant expliquer les difficultés de fonctionnalisation des particules provient des particules elles-mêmes. En effet, les particules utilisées sont des particules commerciales. Elles sont fournies dans un tampon de stockage qui est élaboré par le fabricant et qui contient souvent des surfactants, afin de maintenir les particules individualisées. Ces surfactants peuvent affecter l'état de surface des particules et donc limiter leur fonctionnalisation. Comme il est difficile de connaître la composition exacte des tampons de stockage et des particules elles-mêmes, il est difficile de contrôler les paramètres pouvant influencer la fonctionnalisation de ces particules. Au cours des diverses expériences réalisées, nous avons pu constater des changements de résultats sur la fonctionnalisation des particules en fonction des fournisseurs et des lots utilisées. Le fait que les particules utilisées dans notre approche ne sont pas les mêmes que celles utilisées lors de l'approche de Trévisan et al. peut aussi expliquer que les taux de fonctionnalisation soient différents.

La préparation des particules est une étape importante pour réaliser le test de capture d'ADN. Nous avons vu dans cette section que le choix de la méthode de lavage des particules ainsi que les paramètres utilisés pour réaliser la fonctionnalisation sont des éléments importants à prendre en compte. Les paramètres de fonctionnalisation des particules retenus sont résumés dans le Tableau 4-4.

Tableau 4-4 : Paramètres retenus pour l'activation et la fonctionnalisation des particules magnétiques etfluorescentes

	Protocole final
Tampon d'activation	PBS 0,3X
Concentration en NHS / EDCI (M/M)	NHS 1 M / EDCI 0,5 M (2/1)
Temps d'activation	30 min
Température d'activation	25°C
Lavages entre l'activation et l'ajout des ODN	Pas de lavages
Concentration en ODN dans la solution finale	15 μΜ
Temps de fonctionnalisation	4 h
Température lors de la fonctionnalisation	25°C

Dans la section suivante, nous allons dans un premier temps définir les conditions de réalisation de la capture d'ADN par formation de sandwichs avec des particules fonctionnalisées. Ensuite nous donnerons les résultats obtenus lors de la réalisation du test de capture d'ADN et nous discuterons des résultats obtenus avec les différentes méthodes de détection de la fluorescence.

4.2 Formation des sandwichs en présence d'ADN cible

4.2.1 Rappel des conditions de formation des sandwichs

Les sandwichs entre les particules magnétiques et les particules fluorescentes fonctionnalisées sont réalisés en deux étapes. Dans un premier temps, la cible est hybridée avec les particules magnétiques, puis l'excès de cibles est retiré, et les particules fluorescentes sont ajoutées. Après hybridation avec les particules fluorescentes, des lavages sont réalisés avec un tampon de stringence plus élevée à 58°C pour défavoriser les hybridations non spécifiques. Après retrait de l'excès de particules fluorescentes, la fluorescence des échantillons est analysée par cytométrie en flux, Evareader et scanner de fluorescence. Le protocole complet de formation des sandwichs est décrit à l'ANNEXE D section D.4. Dans un premier temps, les sandwichs sont réalisés en présence d'une cible oligonucléotidique marquée avec un Cy3 et dont la séquence est celle du gène HPA-1a.

4.2.2 Tampon de réaction

Problématique liée au tampon de réaction

Le tampon dans lequel la capture d'ADN est réalisée est important. En effet, la composition, et plus particulièrement la salinité du tampon, peut avoir des effets sur les particules et/ou sur l'hybridation de la cible avec les sondes. Afin de déterminer le tampon dans lequel le maximum de cibles est capturé, plusieurs tampons sont testés.

> Méthode d'évaluation du tampon de réaction

Il est courant dans les protocoles de l'équipe d'utiliser le SSC 5X (Saline Sodium Citrate) comme tampon d'hybridation sur puce à ADN. La sélectivité est ensuite obtenue en lavant les puces avec un tampon de plus grande stringence (ex : SSC 0, 2X). Toutefois, le fournisseur de nos particules préconise d'utiliser un tampon de force ionique inférieure à 100 mM. Travailler à des concentrations salines plus élevées peut dégrader les particules de latex. Afin de voir quel tampon permet de capturer le plus de cibles, la réaction d'hybridation de la cible avec les *sondes de capture* portées par les particules magnétiques est évaluée dans trois tampons :

- Le SSC 5X, qui est un tampon de citrate de sodium très utilisé en biologie moléculaire et dans lequel le test avec une approche par biocode-barres a été réalisé (*Trévisan*, *2011*). Ce tampon a une force ionique de 5,7 M.

- Le PBS 1X, qui est un tampon phosphate couramment utilisé en biochimie. Il s'agit d'un tampon de référence non toxique et isotonique dont la force ionique est de 211 mM.

- Le PBS 0,3X, qui est un tampon dont la force ionique est de 95 mM, et correspond le mieux à la recommandation de notre fournisseur de particules pour garantir leur stabilité.

Tampon	[NaCI] (mM)	[Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇] (mM)	[KCI] (mM)	[Na ₂ HPO ₄] (mM)	[KH₂PO4] (mM)	Force ionique (mM)
SSC 5X	750	75	/	/	/	5700
PBS 1X	138	/	2,7	10	1,8	211
PBS 0,3X	41,4	1	0,8	3	0,5	95

Tableau 4-5 : Composition ionique des tampons et formule de calcul de la force ionique FI

Afin d'évaluer la capture de la cible par les *sondes de capture* portées par les particules magnétiques, un oligonucléotide cible de 83 nucléotides dont la séquence correspond au gène HPA-1a est utilisé. Cet ODN est marqué avec un Cy3 dont la fluorescence est mesurée par imagerie de fluorescence à 532 nm (les conditions de mesure sont décrites à l'ANNEXE D). Afin de différencier l'adsorption non spécifique de la cible sur les particules de son hybridation effective avec les sondes, la cible est mise en présence de particules magnétiques non fonctionnalisées (BMt-) et en présence de particules fonctionnalisées (BMg). La concentration en cibles introduite dans la solution est de 2,5 µM. Après le processus d'hybridation de la cible avec les sondes portées par les particules, le surnageant contenant les cibles non hybridées est retiré par séparation magnétique et les particules sont reprises dans le tampon voulu et analysées par fluorescence.

Résultats

Les mesures de fluorescence réalisées à 532 nm montrent qu'avant la mise en présence de la cible, les particules magnétiques témoins et les particules magnétiques fonctionnalisées ne présentent pas de fluorescence quel que soit le tampon dans lequel elles se trouvent (Figure 4-5 A).

Après avoir été mises en présence de la cible marquée avec un Cy3, les particules témoins (BMt- c) présentent une faible fluorescence à 532 nm (Figure 4-5 B(c)) quel que soit le tampon dans lequel elles se trouvent. En effet la fluorescence de ces particules passe d'une intensité de fluorescence de 8.10^5 (+/- 5.10^5) avant hybridation avec la cible à une intensité de fluorescence de 3.10^6 (+/- 2.10^6) après hybridation avec la cible. La fluorescence

après hybridation est donc environ 4 fois plus élevée. Cela traduit une faible adsorption de la cible sur les particules non fonctionnalisées.

Lorsque les particules magnétiques fonctionnalisées sont mises en présence de la cible marquée Cy3 (BMg c), on observe une forte augmentation de la fluorescence à 532 nm pour les particules présentes dans le PBS 1X et le PBS 0,3X. Cette fluorescence est respectivement 180 et 196 fois supérieure à la fluorescence des particules avant l'ajout de la cible. Pour les particules fonctionnalisées se trouvant dans le SSC 5X, la fluorescence observée à 532 nm reste faible et n'est qu'1,5 fois supérieure à celle observée avant l'ajout de la cible. La cible s'est donc hybridée avec les sondes portées par les particules contenues dans le PBS, et non avec celles portées par les particules se trouvant dans le SSC 5X.





Interprétation et conclusion

Les résultats montrent que la capture des cibles sur les particules magnétiques biofonctionnalisées est très faible dans le SSC 5X. Elle est beaucoup plus importante dans le PBS 1X et le PBS 0,3X. Nous avons vérifié que le SSC 5 X n'altère pas le Cy3, donc le peu de fluorescence observée est bien dû au fait que la cible n'a pas été capturée. La force ionique du tampon SSC 5X est de 5,7 M alors que la force ionique recommandée pour l'utilisation des particules est de 100 mM. Comme l'indique le fournisseur, il est hautement probable que les particules se soient dégradées et/ou agrégées dans le SSC5X, et soient incapables de conserver des sondes greffées de manière correcte. Le PBS 1X et le PBS 0,3X ont respectivement des forces ioniques de 200 et 100 mM qui correspondent à des forces ioniques supportées par les particules. Les performances de capture dans PBS 0,3 X sont plus efficaces. Nous choisissons donc de faire l'essai de formation des sandwichs dans le PBS 0,3X afin de préserver les particules et d'avoir un meilleur taux effectif de capture de la cible.

4.2.3 Caractérisation de l'hybridation de la cible par imagerie de fluorescence

Le système complet de capture d'ADN repose sur l'obtention de sandwichs formés d'une part de l'hybridation de la cible avec des sondes portées par les particules magnétiques et d'autre part de l'hybridation de l'autre bout de la cible avec les particules fluorescentes. Dans un premier temps, nous allons nous assurer que la cible s'hybride bien avec les *sondes de capture* greffées sur les particules magnétiques. Pour cela, le taux de capture de la cible est évalué par imagerie de fluorescence et les rendements d'hybridation entre la cible et les sondes disponibles sont calculés.

Méthode de mise en évidence de la capture de la cible

Afin d'évaluer le rendement d'hybridation de la cible avec les différentes sondes, des particules magnétiques sont fonctionnalisées avec des sondes de capture, des *sondes a* ou des *sondes b* selon le protocole de fonctionnalisation décrit à l'ANNEXE D. La cible utilisée est un oligonucléotide marqué avec un Cy3 correspondant à la séquence HPA-1a. Cette *cible a* est complémentaire des *sondes de capture* et des *sondes a* et présente un mésappariement (Single Nucleotide Polymorphism ou SNP) avec les *sondes b*. L'hybridation entre la cible et les sondes est effectuée pendant 2h sous agitation, à 45°C selon le protocole décrit à l'ANNEXE D. À cette température, nous avons estimé par modélisation que les trois sondes s'hybrident totalement avec la cible (Voir CHAPITRE 3). La quantité en cible introduite est de 2,5 μ M (soit 7,5.10¹³ cibles).

Afin de différencier l'adsorption non spécifique des cibles sur des particules qui ne sont pas fonctionnalisées correctement de leur hybridation effective avec les sondes greffées de manière covalente sur les particules, deux échantillons sont réalisés :

- Un échantillon composé de particules comportant uniquement des sondes adsorbées à leur surface (pas de greffage chimique) et mises en présence de cibles.

- Le deuxième échantillon composé de particules fonctionnalisées mises en présence de cibles (Figure 4-6 A).

Enfin, un témoin comprenant uniquement des cibles dans le tampon est également réalisé. Il contient la même quantité en cible que les autres échantillons. Sa concentration exacte est déterminée en UV-vis grâce à une droite d'étalonnage préalablement réalisée (ANNEXE C). Après le processus d'hybridation, les particules sont isolées par séparation magnétique et les surnageants contenant les cibles non hybridées sont récupérés (Figure 4-6 A). Par la suite, la fluorescence de la solution témoin et des surnageants est analysée par imagerie de fluorescence à 532 nm grâce à un scanner de fluorescence (les détails du protocole sont expliqués en ANNEXE D section D.5). La quantité de cibles présentes dans les surnageants est estimée en comparant leur fluorescence à celle de la solution témoin contenant 100% de la quantité de cibles introduites (Figure 4-6). La quantité de cibles immobilisées sur les particules est déduite de la quantité de cibles restantes dans les surnageants.



Figure 4-6 : A) Schéma des échantillons analysés ; B) Schéma de l'analyse des surnageants contenant les cibles non hybridées suite au processus d'hybridation pour les différents échantillons.

Résultats et interprétation

Les résultats de mesure des surnageants de cibles par imagerie de fluorescence sont présentés sur la Figure 4-7.

Quelle que soit la fonctionnalisation des particules avec lesquelles la *cible a* été introduite, les surnageants issus des échantillons 1 ont une concentration en cible équivalente à celle du témoin, ce qui indique que la cible est adsorbée en petite quantité et de manière non spécifique sur les particules. La concentration en cible du surnageant de l'échantillon 2 issu des particules magnétiques portant les *sondes de capture* (en rayé) est 7 fois plus basse que celle du témoin. Lorsque les particules magnétiques sont fonctionnalisées avec les *sondes a* (quadrillage) cette concentration est 50 fois plus faible que celle du témoin et elle est 100 fois plus faible quand les particules sont fonctionnalisées avec les *sondes b* (en gris).

Ces résultats montrent qu'il y a bien une hybridation spécifique entre la cible et les sondes.



Figure 4-7 : Mesures de fluorescence à 532 nm des surnageants contenant la *cible a* marquée avec un Cy3 dans le PBS 0,3X après l'étape d'hybridation avec les particules magnétiques fonctionnalisées avec les sondes de capture, les *sondes a* ou les *sondes b* et purification magnétique. La concentration en cible introduite est de 2,5 μM. Échantillon 1) Surnageant contenant la cible mise en présence de particules magnétiques non fonctionnalisées; Échantillon 2) Surnageant contenant la cible mise en présence de particules magnétiques fonctionnalisées.

Le rendement d'hybridation de la cible avec les sondes disponibles et le pourcentage de cibles capturées sont calculés grâce aux formules suivantes :

% de sondes hybridées avec une cible =
$$\left(\left(\frac{C_{cible} * A}{N_{part}}\right)/(N_{sondes})\right) * 100$$
 (4-3)

% de cibles immobilisées sur les particules $= \frac{N_{cible}}{N_{cible introduite}} * 100$ (4-4)

où C_{cible} est la concentration en cibles sur les particules en moles (mesurée par UV-vis), A est le nombre d'Avogadro en moles⁻¹, N_{part} est le nombre de particules (mesurée par UV-vis), N_{sondes} est le nombre de sondes par particule (déterminé par imagerie de fluorescence), N_{cible} est le nombre de cibles sur les particules (déterminé par imagerie de fluorescence) et N_{cible introduite} est le nombre de cibles introduites soit 7,5.10¹³ cibles (déterminé par UV-vis).

Les résultats quantitatifs obtenus sont repris dans le Tableau 4-6.

Tableau 4-6 : Analyse de l'hybridation de la cible avec des sondes portées par des particules magnétiques. L'hybridation est réalisée à 45°C avec une concentration initiale en cible de 2,5 μM dans le PBS 0,3X.

Protocole	Échantillon	Conc en cible dans Surnageant (μΜ)	Nb de cibles capturées	Nb particules†	sondes/ particule	Nb total de sondes	Nb de cibles introduites	% de cible immobilisée sur les particules	% de sondes hybridées avec une cible
	Témoin Cible a	2,50 ± 0,03	/	/	/	/	/	/	/
Hyb. cible a /	Échantillon 1	2,02 ± 0,2	$1,4.10^{13}$ $\pm 7.10^{12}$	2.10 ⁶	$4.6.10^{7} \pm 4.10^{7}$	9,3.10 ¹³ ± 1.10 ¹³	$7,5.10^{13}$ $\pm 8.10^{12}$	19 ± 9	/
de capture	Échantillon 2	0,34 ± 0,09	6,5.10 ¹³ ± 3.10 ¹²	2.10 ⁶	1,3.10 ⁸ ± 4.10 ⁷	2.5.10 ¹⁴ ± 8.10 ¹³	$7,5.10^{13}$ $\pm 8.10^{12}$	86 ± 3	26 ± 1
Hyb. <i>cible a /</i> sondes a	Échantillon 1	2,43 ± 0,14	$2,1.10^{12} \pm 4.10^{12}$	2.10 ⁶	$4.6.10^{7} \pm 4.10^{7}$	9,3.10 ¹³ ± 1.10 ¹³	$7,5.10^{13} \pm 8.10^{12}$	3 ± 6	/
	Échantillon 2	0,05 ± 0,004	7,4.10 ¹³ ± 1.10 ¹¹	2.10 ⁶	1,3.10 ⁸ ± 4.10 ⁷	2.5.10 ¹⁴ ± 8.10 ¹³	7,5.10 ¹³ ± 8.10 ¹²	98 ± 0,2	30 ± 0,05
Hyb. <i>cible a </i> sondes b	Échantillon 1	2,40 ± 0,08	3,1.10 ¹² ± 2.10 ¹²	2.10 ⁶	$4.6.10^{7} \pm 4.10^{7}$	9,3.10 ¹³ ± 1.10 ¹³	7,5.10 ¹³ ± 8.10 ¹²	4 ± 3	/
	Échantillon 2	0,02 ± 0,01	7,5.10 ¹³ ± 2.10 ¹¹	2.10 ⁶	$1,3.10^{8}$ $\pm 4.10^{7}$	2.5.10 ¹⁴ ± 8.10 ¹³	$7,5.10^{13}$ $\pm 8.10^{12}$	99 ± 0,2	30 ± 0,07

[†] Le nombre de particules magnétiques est évalué d'après les données du fournisseur

Après le processus d'hybridation à 45°C, environ 19% des cibles introduites sont adsorbées non spécifiquement sur les particules magnétiques témoins (Échantillon 1). 86 % des cibles introduites sont hybridées avec les *sondes de capture* portées par les particules magnétiques. Le pourcentage de *sondes de capture* ayant capturé une cible est de l'ordre de 26 %.

En ce qui concerne les particules magnétiques fonctionnalisées avec les sondes a, seulement 3% des cibles introduites s'adsorbent non spécifiquement sur les particules et 98% de cibles s'hybrident avec les *sondes a*. Le pourcentage de *sondes a* ayant capturé une cible est de 30 %.

Lorsque les particules magnétiques sont fonctionnalisées avec les *sondes b* et que l'hybridation est réalisée à 45°C pendant 2h, 4 % des cibles introduites s'adsorbent non spécifiquement sur les particules et environ 99 % de la cible semble s'être hybridé avec les *sondes b*. Le pourcentage de *sondes b* hybridées avec une cible est de 30 %.

Discussion et conclusion

Les résultats obtenus montrent que la cible s'hybride bien avec les sondes utilisées. Un faible pourcentage de cibles (4 à 19 %) s'adsorbe non spécifiquement sur les particules lorsque celles-ci ne sont pas fonctionnalisées. Lorsque les particules magnétiques sont fonctionnalisées, et quelle que soit la sonde qu'elles portent, environ 80 à 99% de la quantité de cibles introduites (7,5.10¹³ cibles) est capturée, soit 6.10¹³ à 7,4.10¹³ cibles. Les conditions d'hybridation, à savoir une hybridation dans le PBS 0,3X à 45°C, ont été choisies après des simulations, de manière à ce que l'hybridation de la cible avec les trois types de sondes soit maximale. Les résultats expérimentaux obtenus montrent qu'une majorité de la cible est en effet hybridée avec les sondes dans ces conditions (CHAPITRE 3).

Quel que soit le type de sonde immobilisée sur les particules, environ 30% des sondes disponibles à la surface des particules capturent une cible.

Ces résultats montrent que l'hybridation entre la cible et les sondes est bien effective dans les conditions choisies pour l'essai, en termes de température et de temps d'hybridation.
4.3 Détection de la formation des sandwichs par divers instruments de mesures de la fluorescence

Une fois le protocole de formation des sandwichs complet réalisé, la fluorescence des échantillons est analysée par différentes méthodes. La fluorescence atteste que des sandwichs se sont formés entre les particules magnétiques et fluorescentes et donc que la cible est présente.

Les méthodes de détection de la fluorescence utilisées sont deux techniques usuelles, l'imagerie de fluorescence par scanner et la cytométrie en flux, et une méthode innovante, la détection de fluorescence par onde évanescente grâce à un Evareader.

Dans cette section, nous présentons l'évaluation des performances de ces techniques vis-à-vis des particules fluorescentes puis nous analysons les résultats obtenus pour chaque échantillon après analyses de la fluorescence par chacune de ces trois techniques.

4.3.1 Caractérisation des différents appareils de mesure visà-vis des particules fluorescentes fonctionnalisées

Afin d'avoir une idée des performances analytiques des techniques de détection de fluorescence utilisées, des courbes d'étalonnage sont réalisées afin de déterminer la limite inférieure de détection (LOD) de chaque technique vis-à-vis des particules fluorescentes fonctionnalisées.

Élaboration des droites d'étalonnage

Les courbes d'étalonnage sont réalisées avec des solutions étalons de particules fonctionnalisées avec la *sonde a* dans le PBS 0,07X. La gamme de concentration s'étend de 1.10^6 particules / ml à 5.10^8 particules / ml et comprend six concentrations différentes. Les mesures de fluorescence sont réalisées avec les différentes techniques, comme cela est décrit à l'ANNEXE D section D.6, et trois mesures par points sont réalisées.

Pour déterminer la limite inférieure de détection (LOD) théorique de chaque méthode, on définit le point à partir duquel, le signal de fluorescence ne varie plus significativement quelle que soit la concentration en particules. La LOD est estimée comme étant la valeur de ce point plus trois fois son écart type (σ).

Les LOD déterminées avec notre méthode devront toutefois être évaluées avec précaution car pour être plus robustes, les mesures devraient être réalisées avec plus d'échantillons, ce que nous n'avons pu faire faute de temps. Toutefois, les valeurs obtenues ici nous permettent d'avoir une idée des limites des différents appareils.

> Droite d'étalonnage obtenue avec le scanner de fluorescence

Lors des mesures par imagerie de fluorescence par scanner, la solution étalon est diluée au 1/10 dans du PBS 0,07X + SDS 0.6 % afin d'éviter la saturation du signal et d'être dans les mêmes conditions que lors de l'analyse des sandwichs. 1 µl de ces dilutions est déposé sur une lame et est analysé (protocole en ANNEXE D section D.6.1). Après dilution, la gamme de concentrations en termes de nombre de particules analysées est comprise entre 1.10^5 particules / ml et 5.10^7 particules / ml soit 1.10^2 particules et 5.10^4 particules.



Figure 4-8 : Courbe de calibration par imagerie de fluorescence à 635 nm des particules fluorescentes fonctionnalisées avec des sondes marquées avec un Cy5 dans le PBS 0,07X.

La droite d'étalonnage est déterminée sur les points représentés en noir sur la Figure 4-8 et la limite de détection est déterminée comme cela est schématisé dans l'insert de la Figure 4-8. La limite de détection est estimée pour une intensité de fluorescence de 1.10⁶, ce qui correspond à une concentration de 2.10⁶ particules / ml, soit 2.10³ particules.

> Droite d'étalonnage obtenue avec l'Evareader

Lors des mesures par Evareader, 25 μ l de chaque solution étalon sont introduits dans les puits d'une EVA-chip dont le fond est préalablement recouvert de neutravidine (protocole en ANNEXE D section D.6.3). L'analyse est réalisée pendant 15 min et les pentes des cinétiques de fluorescence obtenues sont analysées entre 0 et 200 secondes. La gamme de concentration analysée en termes de nombre de particules est comprise entre 2.10⁴ et 1.10⁷ particules.



Figure 4-9 : Courbe de calibration par Evareader à 635 nm des particules fluorescentes fonctionnalisées avec des sondes marquées avec un Cy5 dans le PBS 0,07X.

La droite d'étalonnage est déterminée sur les points représentés en noir sur la Figure 4-9 et la limite de détection est déterminée comme cela est schématisé dans l'insert de la Figure 4-9.

La limite de détection est estimée pour des valeurs de pente de cinétique de fluorescence de l'ordre de 1000 unités/s, ce qui correspond à une concentration d'environ 1.10^7 particules / ml, soit 2,5.10⁵ particules.

> Droite d'étalonnage obtenue avec la cytométrie en flux

La droite d'étalonnage en fluorescence par cytométrie en flux ne peut pas donner de résultats pouvant être comparés avec les droites d'étalonnage précédentes.

En effet, lors d'une analyse par cytométrie en flux, le nombre de particules analysées est fixé par l'utilisateur lors de la mesure, et la mesure s'arrête quand le nombre d'éléments demandés est acquis (20 000 éléments dans notre cas). De ce fait, la concentration en particules dans la solution n'a pas une forte influence sur les valeurs de fluorescence relative totale mesurée par cytométrie en flux. La fluorescence relative mesurée permet de distinguer des éléments ayant des fluorescences d'intensité différentes, mais les particules fluorescentes utilisées dans notre cas ont sensiblement la même fluorescence.

La droite d'étalonnage en fluorescence ne peut donc pas être réalisée en cytométrie de flux et la limite inférieure de détection ne peut pas être déterminée expérimentalement de cette manière. Toutefois, les mesures réalisées montrent que les particules fluorescentes sont très faiblement détectées lorsque la concentration en particules est de 1.10⁶ particules / ml (Figure 4-10 c). En-dessous de cette concentration, le cytomètre ne permet pas de distinguer significativement les particules fluorescentes des événements constituant le « bruit de fond » (poussières et autres objets présents dans le liquide analysé). Le volume prélevé pour la mesure étant d'environ 50 µl, cela correspond à environ 5.10⁴ particules.



Figure 4-10 : Mesure de fluorescence à 633 nm par cytométrie de flux : (a) du tampon PBS 0,07X, (b) de particules fluorescentes à une concentration de 3,6.10⁶ particules / ml, et (c) de particules fluorescentes fonctionnalisées à une concentration de 1.10⁶ particules /ml.

D'un point de vue théorique et d'après les spécifications du fournisseur, la limite de détection de la cytométrie en flux devrait être de 1 particule. Toutefois, cela dépend de la pureté du tampon utilisé. À partir de nos résultats, nous supposons donc que la limite inférieure de détection du cytomètre de flux pour nos particules est aux alentours de 5.10⁴ particules fluorescentes fonctionnalisées avec la *sonde a*.

Discussion

Les ordres de grandeur des limites de détection des trois méthodes de mesure de fluorescence doivent être évalués avec précaution pour deux raisons. D'une part, seulement six concentrations différentes ont été employées pour établir les courbes de calibration. Faute de temps nous avons choisi de tester la répétabilité des mesures pour chaque concentration, plutôt que de diversifier les concentrations à employer. L'interprétation des courbes serait toutefois plus robuste avec un nombre de points plus important, notamment dans les régions au voisinage des seuils inférieurs de détection que nous avons tenté de déterminer.

D'autre part, les trois modalités de mesure reposent sur des mécanismes très différents ; la comparaison de leurs performances analytiques est donc complexe et nécessite de prendre en compte les spécificités de chaque méthode de mesure.

Le scanner de fluorescence mesure l'émission de fluorescence de l'ensemble des fluorophores déposés sur la lame. On suppose que l'auto-extinction du fluorophore au voisinage de la lame est négligeable, ce qui est réaliste pour des Cy5. La limite de détection de la méthode dépend grandement de la qualité du support qui doit avoir un signal de fluorescence nulle. Dans notre méthode de mesure par imagerie de fluorescence, la préparation des échantillons est une étape critique car elle nécessite plusieurs manipulations ce qui peut affecter la reproductibilité du test.

L'Evareader mesure seulement la fluorescence des molécules qui sont localisées dans les 200 premiers nanomètres au-dessus de la surface d'un puits. Les molécules fluorescentes qui sont immobilisées à la surface du puits, par interaction neutravidine/biotine, sont celles qui contribuent majoritairement au signal mesuré. Par ailleurs, la valeur absolue de fluorescence mesurée avec l'Evareader peut varier d'une EVA-chip à une autre à cause de variations dans les propriétés optiques du plastique, ou à cause de la variabilité dans le rendement de recouvrement de la surface des puits par la neutravidine ce qui va affecter l'immobilisation des particules au fond du puits. Il est donc plus pertinent de prendre comme indicateur la pente du signal de fluorescence (variation de fluorescence entre un temps initial et un temps final). En effet, plus la concentration en particules dans la solution sera importante, plus l'immobilisation au fond du puits sera rapide et plus la pente de la cinétique de fluorescence sera importante, indépendamment de la valeur absolue de fluorescence mesurée. Par conséquent, alors que le scanner de fluorescence donne une information statique, l'Evareader indique une information cinétique reliée à la fois à l'affinité des particules avec la surface de l'EVA-chip (via l'interaction neutravidine / biotine) et à leur concentration. Comme l'interaction employée (neutravidine / biotine) est toujours la même et que les mesures sont réalisées de manière non compétitive, les différentes mesures cinétiques de l'Evareader peuvent être comparées, et interprétées en termes de concentration, en posant l'hypothèse que les particules sont fonctionnalisées de manière uniforme avec les sondes –Cy5 et donc que leur marquage est homogène.

Enfin, le cytomètre de flux est conçu pour détecter des particules individualisées. Toutefois, l'information réellement exploitable provient de l'analyse statistique de 20 000 éléments mesurés consécutivement. C'est en comparant le comportement moyen de particules fluorescentes avec le comportement moyen de 20 000 autres objets non fluorescents, qu'on peut extraire de manière absolue le signal de fluorescence. La mesure des objets non fluorescents permet d'évaluer le bruit de fond de fluorescence du détecteur et de mettre en évidence les populations de particules réellement fluorescentes. La cytométrie de flux permet d'obtenir des informations statistiques sur les différentes populations d'objets présents dans un même échantillon.

Tout en tenant compte des limitations présentées ci-dessus, nous avons évalué que la LOD de l'imagerie de fluorescence est d'environ 1.10³ particules fluorescentes, la LOD de la cytométrie est environ de 5.10⁴ particules, et la LOD de l'Evareader est d'environ 2,5.10⁵ particules.

L'imagerie de fluorescence semble donc être la méthode la plus sensible. Toutefois l'Evareader présente l'avantage de ne mesurer que la fluorescence provenant des particules correctement biofonctionnalisées. L'Evareader nécessite en effet l'interaction neutravidine/biotine pour qu'une fluorescence soit mesurée. Cette méthode gagne donc en robustesse ce qu'elle perd en limite inférieure de détection.

Il convient maintenant de voir la performance des appareils pour la détection des sandwichs formés.

4.3.2 Échantillons préparés

De manière à évaluer le système de capture d'ADN développé, plusieurs échantillons sont réalisés et correspondent à différents cas de figure.

Pour évaluer son adsorption sur les particules, la cible est mise en présence de particules avec des sondes qui sont adsorbées à leur surface au lieu d'être greffées de manière covalente. Cela permet aussi d'évaluer le comportement du système si les particules ne sont pas correctement fonctionnalisées (Figure 4-11 A).

Pour estimer l'adsorption non spécifique des particules entre elles, des particules magnétiques fonctionnalisées sont mises en présence de particules fluorescentes fonctionnalisées, mais sans que la cible ne soit présente (Figure 4-11 B).

Enfin, le dernier cas de figure consiste à évaluer la formation des sandwichs quand les particules fonctionnalisées sont effectivement en présence de la cible complémentaire (Figure 4-11 C).

De manière à déterminer la spécificité de la capture de la cible, les échantillons sont réalisés avec des particules fluorescentes fonctionnalisées avec des *sondes a* (complémentaires de la cible a) et des *sondes b* (avec un mésappariement avec la cible a).

La fluorescence des échantillons est mesurée à chaque étape du test par imagerie de fluorescence par scanner et les échantillons finaux sont également analysés par Evareader et cytométrie en flux.



Figure 4-11 : Schémas des différents échantillons préparés

4.3.3 Mesures de fluorescences des sandwichs obtenues avec le scanner de fluorescence

> Principe

Le scanner de fluorescence possède un laser à 532 nm et un laser à 635 nm, ce qui permet de mesurer la fluorescence des particules fluorescentes (excitées par le laser à 635 nm) et la fluorescence de la cible marquée avec un Cy3 (excité par le laser à 532 nm). Les échantillons sont analysés selon le protocole décrit à l'ANNEXE D section D.6.1 avant le début du test (Figure 4-12 A et Figure 4-13 A), après l'hybridation des particules magnétiques avec la cible (Figure 4-12 B et Figure 4-13 B) et après le processus complet de formation des sandwichs (Figure 4-12 C et Figure 4-13 C).

➢ Résultats

<u>Mise en évidence de la cible marquée Cy3</u>

Les résultats des mesures de fluorescence réalisée à 532 nm montrent que les particules magnétiques ne présentent pas de fluorescence et n'interfèrent donc pas avec le signal de fluorescence de la cible (Figure 4-12 A).

Après l'étape d'hybridation de la cible sur les particules magnétiques et le retrait de l'excès de cibles (Figure 4-12 B), la fluorescence à 532 nm n'augmente pas significativement

lorsque la cible est en présence de particules non fonctionnalisées (Figure 4-12 B c), ce qui indique qu'elle n'est pas adsorbée sur les particules.

Après l'hybridation de la *cible a* avec les particules magnétiques fonctionnalisées, la fluorescence mesurée à 532 nm est 119 fois plus importante qu'avant l'hybridation, ce qui indique que la cible est hybridée avec les sondes greffées sur les particules (Figure 4-12 B e).

Ces résultats sont en accord avec les résultats de mesure des surnageants décrits dans la section 4.2.3. Cette fluorescence diminue après le processus complet de formation des sandwichs (Figure 4-12 C).



Figure 4-12 : Mesures de fluorescence à 532 nm des particules au cours des différentes étapes de la formation des sandwichs : (A) avant l'hybridation avec la cible (particules dans le PBS 0.3X), (B) Après ajout de 2,5 µM de cibles, hybridation et retrait de l'excès de cible par purification magnétique (dans le PBS 0.3X) et (C) après le processus complet de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X.

<u>Mise en évidence de la présence des particules fluorescentes</u>

L'analyse de la fluorescence à 635 nm permet de mettre en évidence la présence des particules fluorescentes. Les résultats montrent que les particules magnétiques et la cible ont une fluorescence négligeable à cette longueur d'onde et n'interfèrent pas avec le signal obtenu pour les particules fluorescentes (Figure 4-13 A et B). Après le processus complet de formation des sandwichs, la fluorescence reste faible lorsque la cible est mise en présence de particules non fonctionnalisées. Ceci montre que les particules fluorescentes ne sont pas adsorbées sur les particules magnétiques (Figure 4-13 C f). Le signal de fluorescence observé lorsque les particules fonctionnalisées ne sont pas en présence de cible est élevé (que les particules soit fonctionnalisées avec la *sonde a* ou avec la sonde b), contrairement à ce qui est attendu (Figure 4-13 C g). Lorsque la *cible a* est mise en présence de particules fonctionnalisées avec la *sonde a* (Figure 4-13 C h vert), le signal de fluorescence observé est environ 2 fois plus important que celui observé si la cible est mise en présence de particules fluorescentes fonctionnalisées avec la *sonde b* (Figure 4-13 C h violet). De plus, lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées avec la sonde *b* (Figure 4-13 C h violet). De plus, lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées avec la sonde *b* (Figure 4-13 C h violet). De plus, lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées avec la sonde *b*, le signal de fluorescence obtenu est similaire à celui obtenu pour le témoins négatifs (Figure 4-13 C f et g violet).



Figure 4-13 : Mesures de fluorescence par scanner à 635 nm des particules au cours des différentes étapes de la formation des sandwichs : (A) avant l'hybridation avec la cible (particules dans le PBS 0.3X), (B) Après ajout de 2,5 μM de cibles, hybridation et retrait de l'excès de cibles par purification magnétique (dans le PBS 0.3X) et (C) après le processus complet de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X.

Interprétation et discussion

• En ce qui concerne la capture de la cible

La cible est capturée spécifiquement par les particules magnétiques fonctionnalisées et il y a peu d'adsorption non spécifique de la cible sur les particules non fonctionnalisées (comparaison f et h). Après le processus complet de formation des sandwichs, le signal de fluorescence attribué à la cible diminue. Ceci peut s'expliquer de deux manières. L'hybridation entre la cible et les *sondes de capture* portées par les particules magnétiques s'est en partie dénaturée lors des lavages à 58°C. En effet, dans le CHAPITRE 3, nous avons vu que le rendement d'hybridation entre les *sondes de capture* et la cible à cette température est faible (5% de duplex formés, section 3.3.2 au paragraphe relatif aux conditions d'hybridation). Une autre hypothèse pouvant expliquer cette diminution de signal est qu'il y a un quenching du signal du Cy3 par le signal de fluorescence émis par les particules fluorescentes. Les résultats obtenus ici ne permettent pas de favoriser une hypothèse plutôt qu'une autre. De plus, la diminution du signal observé résulte sûrement d'une combinaison des deux hypothèses.

• En ce qui concerne la formation des sandwichs

Les résultats des mesures de fluorescence à 635 nm montrent qu'il y a peu d'adsorption non spécifique entre les particules lorsqu'elles ne sont pas fonctionnalisées. Lorsque la *cible a* est mise en présence de particules fluorescentes fonctionnalisées avec la sonde a, le signal de fluorescence obtenu est plus élevé que si les particules ajoutées sont fonctionnalisées avec la sonde b. Cela indique qu'il y a bien formation de sandwichs spécifiques (sonde a / cible a). La réalisation d'une analyse de variance (ANOVA) montre que le signal obtenu lors de la formation de sandwichs spécifiques est significativement différent à 90% de celui obtenu dans le cas où la cible a est mise en présence de particules fonctionnalisées avec la sonde b. De ce point de vue, le test permet de distinguer un allèle a d'un allèle b, qui différent entre eux d'un nucléotide. Toutefois, le signal de fluorescence attribué à la formation de sandwichs spécifiques n'est que 2,5 fois plus élevé que celui obtenu lors de la formation des sandwichs non spécifiques. Ce résultat est en accord avec ce qui est prédit par les modélisations réalisées au chapitre 3 et cela montre que les conditions de spécificité ne sont pas encore optimales. De plus, le signal de fluorescence obtenu lorsque les particules fonctionnalisées ne sont pas mises en présence de cible est élevé. Cela traduit une adsorption non spécifique ou une agrégation entre les particules. Le signal de fluorescence obtenu dans ce cas n'est pas significativement différent de celui obtenu lorsque les sandwichs spécifiques sont formés. Afin de savoir si ce résultat provient du système de capture d'ADN lui-même ou de la méthode de mesure, il est comparé par la suite aux résultats obtenus avec les autres méthodes de mesure de la fluorescence.

4.3.4 Mesures de fluorescence des sandwichs obtenues avec l'Evareader

> Principe

L'Evareader permet de mesurer la fluorescence des particules se trouvant proches de la surface des EVA-chip. Les échantillons sont analysés selon le protocole décrit à l'ANNEXE D section D.6.3 après le processus complet de formation des sandwichs.

Les mesures sont réalisées pendant 900 secondes et les pentes des courbes de cinétique obtenues sont analysées entre 0 et 200 secondes.

➢ Résultats

• Impact de la présence de la cible et de la spécificité sur la cinétique de fluorescence

L'Evareader permet d'obtenir en temps réel la cinétique de fluorescence des particules, ce qui correspond à la quantité de particules immobilisées au fond de l'EVA-chip en fonction du temps. Seules les particules fluorescentes émettent un signal quand elles sont excitées à 635 nm, celles-ci sont les seules à être fonctionnalisées avec des sondes biotinylées qui vont permettent l'immobilisation des particules au fond de l'EVA-chip par interaction neutravidine/biotine. Les cinétiques de fluorescence représentées sur la Figure 4-14 A correspondent donc à la cinétique d'immobilisation des particules fluorescentes au fond de l'EVA-Chip pour chaque échantillon. La cinétique de fluorescence est liée à la concentration en particules dans la solution et à l'affinité des particules au fond de l'EVAchip. Dans notre cas, seule la concentration en particules varie et va influer sur la cinétique de fluorescence observée. Plus la concentration en particules dans l'échantillon est importante, plus la surface du puits de l'EVA-chip est saturée rapidement et plus la pente de la cinétique mesurée est importante.

Afin d'évaluer la présence des particules fluorescentes pour chaque échantillon, cette pente est analysée entre 0 et 200 secondes, comme cela est représenté sur la Figure 4-14 B dans le cas de la formation de sandwichs spécifiques (*sonde a* / cible a) et non spécifiques (*sonde b* / cible a). Le rapport entre les pentes est plus important entre 0 et 40 sec mais la pente est alors calculée sur seulement deux points ce qui n'est pas assez précis. Nous avons choisi d'analyser les pentes entre 0 et 200 sec de manière à prendre en compte plus de

points. La Figure 4-14 B montre que dans le cas où la cible et les sondes sont complémentaires (*sonde a* / cible a), la pente de cinétique de fluorescence mesurée est plus importante que celle observée dans le cas où il y a un mésappariement entre la cible et la sonde (*sonde b* / cible a). Cela traduit que plus de particules fluorescentes ont été capturées dans le cas de la formation des sandwichs spécifiques que dans le cas de la formation des sandwichs non spécifiques. L'analyse des pentes mesurées pour chaque échantillon (Figure 4-15) permet de comparer les valeurs de pente entre elles en fonction de la présence de la cible et de la spécificité du système.



Figure 4-14 : Mesure par l'Evareader de la cinétique de fluorescence des essais de formation des sandwichs [BMg-cible-BFg] ayant été réalisés dans le PBS 0,07X en présence de 2,5 μM de cible : A) Mesures de cinétique de fluorescence réalisées entre 0 et 900 sec B) Évaluation des pentes issues des cinétiques de fluorescence mesurées pour les sandwichs [*sonde a* / cible a] et [*sonde b* / cible a] entre 0 et 200 sec.

Impact de la présence de la cible et de la spécificité sur les pentes issues de la cinétique de fluorescence

L'histogramme de la Figure 4-15 représente les valeurs de pentes mesurées entre 0 et 200 secondes pour chaque échantillon.

Les solutions d'ODN sont les témoins permettant de vérifier si la fonctionnalisation de la surface des puits par la neutravidine est correctement réalisée. Les ODN utilisés sont marqués avec un Cy5. La pente issue de la cinétique de fluorescence pour la solution contenant des ODN biotinylés est environ 20 fois plus importante que celle obtenue pour la solution contenant des ODN non biotinylés Figure 4-15 (a). Cela indique que les puits sont bien recouverts de neutravidine et que l'interaction neutravidine/biotine est bien effective.

Lorsque les particules sont fonctionnalisées avec des sondes a, les pentes observées pour les échantillons témoins (Figure 4-15 b et c) sont significativement inférieures à la pente observée lorsque les sandwichs sont formés (Figure 4-15 d). Lorsque les particules fluorescentes sont fonctionnalisées avec des *sondes b* (non complémentaires de la cible), la pente observée lorsque les sandwichs non spécifiques se forment (Figure 4-15 d rayé) n'est pas significativement différente des pentes observées pour les témoins (Figure 4-15 b et c rayé). La pente observée pour l'échantillon où la *cible a* été mise en présence de particules non fonctionnalisées est élevée (Figure 4-15 b rayé). Toutefois, l'écart type observé pour ce point est conséquent et laisse penser qu'il s'agit d'un point aberrant.

La pente observée lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées avec la *sonde b* (Figure 4-15 d rayé) est 2,6 inférieure à celle observée lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées avec la *sonde a* (Figure 4-15 d).



Figure 4-15 : Pentes moyennes résultant de la mesure de la cinétique de fluorescence à 635 nm entre 0 et 200 secondes. (a) Témoins ODN (sans particules et marqués avec un Cy5) : ODN sans biotine à une concentration de 0,1 μM qui constitue le témoin négatif puisqu'il n'est pas immobilisé au fond du puits ; et ODN avec biotine à une concentration de 0,1 μM qui constitue le témoin positif car il va venir s'immobiliser au fond du puits par interaction avec la neutravidine ; (b) Particules non fonctionnalisées mises en présence de cible, (c) particules fonctionnalisées sans cible, et (d) sandwichs [BMg-cible-BFg] complet.

Interprétation et discussion

Les résultats obtenus par analyse des échantillons à l'Evareader sont en accord avec ceux obtenus par scanner de fluorescence. Ils montrent qu'il y a peu d'adsorption non spécifique entre les particules. De plus, les résultats montrent que le test couplé à l'analyse par Evareader permet de discriminer l'allèle a de l'allèle b du gène HPA-1. En effet, la réalisation d'une analyse de variance (ANOVA) montre que la pente résultant de la cinétique de fluorescence obtenue lors de la formation de sandwichs spécifiques est significativement différente et plus élevée (à 90%) que celle obtenue dans le cas où la *cible a* est mise en présence de particules fonctionnalisées avec la *sonde b*. Toutefois, la pente observée lors de la formation des sandwichs spécifiques n'est que 2,6 fois supérieure à celle observée lorsque les sandwichs non spécifiques sont formés. Cela est en accord avec ce que prédisent les simulations réalisées avec DINAMelt décrites à la section 3.3.2 au paragraphe relatif aux conditions d'hybridation. Cela montre que les conditions de formation des sandwichs ne sont pas encore suffisamment spécifiques. L'analyse par Evareader semble être une méthode appropriée pour détecter en temps réel la présence de l'ADN cible. Cette méthode est rapide, ne nécessite pas trop de préparation. Toutefois, les conditions de spécificité de formation des sandwichs ne sont pas encore assez robustes pour que les résultats obtenus avec l'Evareader permettent de discriminer correctement la présence de la cible spécifique ou non. De plus, les résultats de pente obtenus ici sont bas (inférieurs à 1000 unités / secondes). Deux hypothèses peuvent expliquer cela :

1. Peu de particules fluorescentes ont été capturées lors de la formation des sandwichs du fait des faibles rendements de formation des sandwichs dans les conditions d'hybridation choisies. En effet, nous avons vu que seulement 3,5% de sandwichs spécifiques sont formés dans ces conditions (section 3.3.2 au paragraphe relatif aux conditions d'hybridation).

2. Le choix a été fait d'analyser les sandwichs complets afin de limiter les manipulations et de ne pas allonger le temps d'analyse. De ce fait, il est possible que la présence des particules magnétiques gène l'interaction neutravidine/biotine entre la surface de l'EVA-chip et les particules fluorescentes, ce qui peut fausser et abaisser le signal.

Cette analyse et les résultats obtenus avec l'Evareader sont à comparer avec les résultats obtenus avec les autres méthodes de détection de la fluorescence.

4.3.5 Mesures de fluorescence des sandwichs obtenues par cytométrie en flux

Principe

La cytométrie en flux permet de mesurer des événements passant de manière individualisée devant un faisceau laser. Les solutions sont injectées dans le cytomètre et les analyses sont faites sur 20 000 événements. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes de fluorescence, afin de visualiser les différents événements.

> Résultats

• Analyse de la formation des sandwichs et de leur spécificité par cytométrie en flux

La Figure 4-16 montre les histogrammes de fluorescence obtenus après l'analyse des différents échantillons par cytométrie en flux.

Les témoins montrent que le tampon et les particules magnétiques ont peu de contribution de fluorescence (Figure 4-16 a et c). Cette contribution correspond au bruit de fond du test et est délimitée par le marqueur M1 (intensité de fluorescence comprise entre 1 et 10 U.A.). Les particules fluorescentes fonctionnalisées ont une intensité de fluorescence importante située entre 330 et 10 000 U.A. Dans cette plage d'intensité de fluorescence, plusieurs pics sont observés. Un pic est bien marqué aux alentours de 400 U.A. et est représenté par le marqueur M3, et des pics plus petits sont présents entre 650 et 10 000 U.A. et sont représentés par le marqueur M4. Ce qui indique que les particules ont des intensités de fluorescence légèrement différentes.

Lors de la réalisation des essais, les populations correspondant aux particules non fluorescentes (M1) et aux particules fluorescentes libres (M3) sont présentes dans chaque échantillon avec des intensités différentes.

Après le processus de formation de sandwichs où la *cible a* est mise en présence de particules fluorescentes fonctionnalisées avec la sonde a, une nouvelle population de particules, dont l'intensité de fluorescence est comprise entre 10 et 330 U.A., apparait. Elle est délimitée par le marqueur M2. Cette population n'est pas présente sur les histogrammes de fluorescence des témoins ni sur les histogrammes de fluorescence observée pour les autres échantillons. De ce fait, cette population est attribuée à la formation de sandwichs spécifiques entre les particules magnétiques et fluorescentes en présence de la cible.

Afin de mieux comprendre la contribution de chaque population observée pour chaque échantillon, un histogramme de fluorescence est établi (Figure 4-17 A).



Figure 4-16 : Histogrammes de fluorescence obtenus par mesures de cytométrie en flux à 633 nm.

<u>Analyse de la contribution de chaque population à la fluorescence totale observée</u>

L'histogramme d'intensité de fluorescence est établi en suivant la formule suivante :

Fluorescence totale =
$$\sum_{10}^{0} (N * I) + \sum_{330}^{10} (N * I) + \sum_{650}^{330} (N * I) + \sum_{10000}^{650} (N * I)$$
 (4-5)

où *N* est le nombre de particules détectées et *I* est l'intensité de fluorescence en unité arbitraire (U.A.).

En considérant l'intensité de fluorescence totale, et lorsque les échantillons sont réalisés avec des particules fluorescentes fonctionnalisées avec les *sondes a* (complémentaire de la cible), l'intensité de fluorescence observée dans le cas où les sandwichs se sont formés (Figure 4-17 A c) est 8,8 fois plus importante que celle des échantillons témoins (Figure 4-17 A a et b).

Lorsque les échantillons sont réalisés avec les particules fluorescentes fonctionnalisées avec des *sondes b* (non complémentaire de la cible, en rayé sur l'histogramme), l'intensité de fluorescence observée lorsque la *cible a* est mise en présence des particules fonctionnalisées (Figure 4-17 A c rayé) n'est pas significativement différente de celle observée lorsque la cible n'est pas présente dans l'échantillon (Figure 4-17 A b rayé). Toutefois, l'intensité de fluorescence observée pour l'échantillon où la *cible a* été mise en présence de particules non fonctionnalisées est élevée (Figure 4-17 A a rayé), mais présente un écart-type important. Cela laisse penser qu'il s'agit d'un point aberrant, comme cela est également observé lors de l'analyse par Evareader.

Si on analyse la fluorescence totale des échantillons, le signal observé lorsque les sandwichs spécifiques sont formés (Figure 4-17 A (c)) est 3 fois plus importante que celle observée lorsque les sandwichs non spécifiques sont formés (Figure 4-17 A (c) rayé).

En ce qui concerne les contributions de chaque population à l'intensité de fluorescence des échantillons, les populations délimitées par les marqueurs M3 et M4 ont les plus fortes contributions, puisqu'elles correspondent aux particules fluorescentes individualisées. La population délimitée par le marqueur M3 (en vert) a une contribution non négligeable pour l'échantillon où la cible est mise en présence de particules fonctionnalisées avec la sonde a, et semble correspondre à la formation des sandwichs spécifiques. La Figure 4-17 B montre l'histogramme d'intensité de fluorescence de cette population pour les différents échantillons.



Figure 4-17 : Histogrammes de fluorescence issus des mesures de cytométrie suite au processus complet de formation des sandwichs en présence de 2,5 μM de *cible a*. A) Contribution de chaque population fluorescente au signal de fluorescence total. B) Fluorescence attribuée à la population de particules délimitée par le marqueur 2 (entre 10 et 330 U.A.) pour chaque échantillon.

• Analyse de la fluorescence attribuée à la formation des sandwichs (marqueur M2)

La Figure 4-17 B montre que lorsque la population délimitée par le marqueur 2 est isolée, l'intensité de fluorescence observée lorsque les sandwichs spécifiques sont formés (Figure 4-17 B c sonde a) est significativement plus élevée que celle observée pour tous les autres échantillons. Cette intensité de fluorescence est environ 15 fois plus élevée que celle observée lorsque les sandwichs non spécifiques sont formés (Figure 4-17 B c sonde b).

Interprétation et discussion

La cytométrie en flux permet de mesurer la fluorescence d'éléments passant de manière individualisée devant un faisceau laser. Elle permet de différencier plusieurs populations d'éléments en fonction de leur intensité de fluorescence. Les histogrammes de fluorescence permettent de visualiser une population de particules de faible intensité de fluorescence correspondant aux particules magnétiques seules (M1). Les particules fluorescentes fonctionnalisées seules présentent deux populations de particules avec une forte intensité de fluorescence (M3 et M4).

Tous les échantillons contiennent des particules magnétiques seules et des particules fluorescentes seules, puisque les pics caractéristiques de ces populations sont présents sur les histogrammes de fluorescence de chacun des échantillons.

Dans le cas de l'échantillon où les sandwichs spécifiques sont formés, une nouvelle population de particules apparaît. Cette population est attribuée aux sandwichs formés entre les particules magnétiques et fluorescentes en présence de la cible, car son intensité de fluorescence est située entre les intensités de fluorescence attribuées à ces deux types de particules. De plus, cette population n'apparaît pour aucun autre échantillon.

L'analyse du signal de fluorescence total de chaque échantillon montre que les résultats obtenus par cytométrie en flux sont en accord avec ceux obtenus avec l'Evareader et par imagerie de fluorescence. L'analyse de ces résultats montre qu'il y a peu d'adsorption non spécifique entre les particules. Le signal de fluorescence obtenue lorsque les sandwichs spécifiques sont formés est 3 fois supérieur en intensité à celui observé en présence de sandwichs non spécifiques. Ce ratio est légèrement supérieur à celui estimé par les simulations (ratio de 2,5) et également observé par Evareader et imagerie de fluorescence. Cela laisse penser que la cytométrie permet de mieux discriminer les signaux de fluorescence et donc la spécificité des sandwichs.

L'analyse de la population fluorescente représentée par le marqueur M2 présente un signal très élevé quand les sandwichs spécifiques sont formés, contrairement aux autres échantillons. Une analyse ANOVA montre que le signal de fluorescence obtenu lorsque les sandwichs spécifiques sont formés est significativement différent à 99,9% du signal observé lorsque la *cible a* est mise en présence de particules fonctionnalisées avec la *sonde b*. Le signal observé en présence de sandwichs spécifiques est 15 fois plus élevé que celui observé

en présence de sandwichs non spécifiques. Ce ratio est 5 fois plus important que celui observé lors de l'analyse du signal total de fluorescence.

L'outil de capture d'ADN couplé à une analyse par cytométrie en flux et une extraction du signal correspondant aux sandwichs permet donc de discriminer l'allèle a de l'allèle b du gène HPA-1.

La cytométrie en flux est un outil qui permet de mieux comprendre ce qui se passe pour chaque échantillon et quelles sont les populations présentes dans chacun d'eux. Une analyse du signal a posteriori permet également d'isoler les populations d'intérêt pour diminuer le bruit de fond du test.

4.3.6 Comparaison des différentes techniques de détection de la fluorescence

• <u>Conclusion sur les LOD des appareils vis-à-vis des particules fluorescentes</u> <u>fonctionnalisées</u>

La limite de détection vis-à-vis des particules fluorescentes fonctionnalisées est analysée selon les conditions de mesure décrites à l'ANNEXE D (section D.6) pour chaque méthode de détection utilisée.

La limite de détection en fluorescence par cytométrie en flux n'a pas pu être réalisée du fait du fonctionnement de la méthode. En effet, l'analyse en fluorescence est réalisée sur un nombre d'éléments fixe et permet de discriminer les éléments en fonction de leur intensité de fluorescence, mais pas en fonction du nombre de particules présentes dans la solution. La limite de détection en cytométrie est en théorie la détection de la particule unique. Elle dépend en réalité du bruit de fond du test dû au tampon utilisé ou aux autres particules présentes. Nous estimons que la LOD pour la cytométrie en flux est inférieure à 5.10⁴ particules fluorescentes fonctionnalisées.

La limite de détection obtenue par imagerie de fluorescence est de 2.10³ particules fluorescentes, ce qui est assez bas. La limite de détection obtenue pour l'Evareader est de 2,5.10⁵ particules. Cette LOD est la plus élevée des trois méthodes testées, mais elle est convenable, étant donné que les particules fluorescentes sont introduites en excès lors de la réalisation de l'essai à une concentration de 1,2.10⁸ particules.

• <u>Conclusion sur l'analyse de la fluorescence après le test complet de formation des</u> <u>sandwichs</u>

Les résultats obtenus montrent qu'après le processus de formation des sandwichs, les mesures de fluorescence réalisées avec le scanner de fluorescence et l'Evareader permettent de discriminer le signal de fluorescence des sandwichs spécifiques (*sonde a* / cible a) de celui des sandwichs non spécifiques (*sonde b* / cible a) à 90 % et la cytométrie permet de discriminer ce signal à 99,9%. La cytométrie a donc une meilleure sensibilité vis-àvis du test que les autres méthodes de détection testées. De même, le ratio de signal [sandwichs spécifiques / sandwichs non spécifiques] est de trois lors des mesures par cytométrie en flux alors qu'il est de 2,5 lors des mesures par Evareader et imagerie de fluorescence.

Lors de l'analyse par imagerie de fluorescence et par Evareader, la totalité des éléments fluorescents présents dans l'échantillon est analysée. La cytométrie de flux permet de différencier les différentes populations présentes dans les échantillons, à savoir des particules magnétiques, des particules fluorescentes et des sandwichs, s'ils sont formés. Cela permet d'isoler la population d'intérêt et ainsi d'obtenir un signal plus net et de diminuer le bruit de fond. De ce fait, la cytométrie de flux est plus discriminante que les autres méthodes de détection puisqu'elle permet de distinguer le contenu du signal effectivement imputable aux sandwichs spécifiques des autres signaux mesurés. Cette spécificité pourrait être améliorée sur l'Evareader en enlevant les particules magnétiques qui peuvent gêner l'immobilisation des particules fluorescentes au moment de l'analyse.

<u>Comparaison des différents systèmes de mesure de la fluorescence testés</u>

La détection par cytométrie en flux semble être la méthode la plus sensible et la mieux adaptée pour détecter la fluorescence liée à la formation des sandwichs. Toutefois, cela nécessite un traitement du signal obtenu *a posteriori*. De plus, le cytomètre utilisé ici est un modèle encombrant et coûteux. Il existe des cytomètres miniaturisés, mais les contraintes en termes de mesure ne sont pas les mêmes.

La détection par imagerie de fluorescence par scanner nécessite un appareillage moins encombrant, et la limite de détection de l'appareil vis-à-vis des particules est très basse. Le signal obtenu peut être interprété directement après la mesure. Toutefois, dans notre cas, la méthode par imagerie de fluorescence est la plus contraignante en matière de préparation d'échantillon (nécessité d'une dilution préalable), en termes de manipulation, et de temps d'analyse (dépôts et temps de séchage des dépôts).

L'Evareader est une méthode intéressante puisqu'elle permet d'obtenir les résultats en temps réel, et que l'appareil de mesure est peu encombrant, facile d'utilisation et est peu coûteux.

En l'état actuel du test, la cytométrie est la méthode de détection la plus sensible mais la sensibilité de l'Evareader vis-à-vis du test peut être améliorée en concentrant les échantillons de manière à avoir plus de sandwichs dans le volume analysé. Ceci peut également être amélioré en effectuant des changements sur la sonde de capture, de manière à augmenter son pourcentage de capture vis-à-vis de la cible à 58°C. La présence des particules magnétiques dans l'échantillon est également un élément qui peut perturber la détection du signal.

Le Tableau 4-7 compare les trois méthodes de détection en fonction de différents critères. Cette comparaison montre que la cytométrie en flux et l'Evareader paraissent être les méthodes les plus appropriées pour détecter la fluorescence des sandwichs, tout en prenant en compte des paramètres de facilité d'utilisation. Toutefois, la sensibilité de détection de l'Evareader vis-à-vis du test est faible, mais peut surement être améliorée en modifiant le design du test et les volumes finaux et d'analyse de l'échantillon.

	Evareader	Scanner de fluorescence	Cytométrie en flux
Sensibilité	*	***	***
Discrimination des SNP	**	**	***
Facilité d'utilisation	***	*	***
Faible temps d'analyse	***	*	**
Faible volume d'analyse	**	***	**
Facilité de préparation des échantillons	***	*	***
Faible encombrement de l'appareil	***	**	*
Faible coût	***	**	*

 Tableau 4-7 : Comparaison entre elles des trois méthodes de détection de la fluorescence testés pour mettre en évidence la présence de sandwichs spécifiques en présence de la cible

Après ces essais, quelques perspectives d'amélioration émergent et des tests complémentaires seront à réaliser pour compléter ce comparatif.

4.4 Conclusion

Dans un premier temps, nous avons déterminé et fixé les paramètres qui influent sur la biofonctionnalisation des différents types de particules avec des sondes oligonucléotidiques et sur la formation des sandwichs puis, l'efficacité de la biofonctionnalisation et de la capture de la cible ont été validées par imagerie de fluorescence. Dans un deuxième temps, la détection d'ADN par formation de sandwichs entre des particules magnétiques et des particules fluorescentes biofonctionnalisées en présence d'ADN *cible a* été réalisée en deux étapes avec une cible oligonucléotidique représentant le modèle biologique choisi (le système plaquettaire HPA-1a) et la fluorescence du système a été analysée par trois méthodes différentes : l'imagerie de fluorescence par scanner, la cytométrie en flux et l'Evareader.

Les résultats de mesure de la fluorescence des sandwichs obtenus avec les différents appareils de détection sont concordants. Ils montrent qu'il y a peu d'adsorption non spécifique entre les particules et que la cible est bien capturée spécifiquement grâce aux sandwichs.

En comparaison avec le système utilisant les biocode-barres développé précédemment dans la thèse de Marie Trévisan (*Trévisan, 2011*), le système de capture d'ADN présenté ici ainsi que sa préparation sont simplifiés. Les performances des deux systèmes ont été confrontés afin d'évaluer les perspectives d'amélioration :

1. Le temps de réalisation du test est amélioré de 45 minutes et le test complet ne nécessite plus que deux étapes au lieu de trois dans les conditions dans lesquelles la nouvelle approche de capture d'ADN a été réalisée. Toutefois, la stratégie de réalisation du test peut encore être améliorée en diminuant le nombre d'étapes et en diminuant les temps d'hybridation de la cible avec les ODN immobilisés sur les particules.

2. La spécificité du test est maintenue mais à améliorer. En effet, les conditions de capture d'ADN ne sont pas encore optimales pour détecter le polymorphisme mononucléotidique (SNP). En effet, le rapport de signal observé pour les sandwichs spécifiques par rapport à celui des sandwichs non spécifiques n'est que d'un facteur de 2,5 à 3 ce qui n'est pas

suffisant pour assurer la fiabilité d'un test. Cela est en accord avec les simulations préalablement réalisées et résulte probablement du faible rendement de formation des sandwichs dans les conditions testées. Ce rendement peut être amélioré en allongeant la *sonde de capture* et en optimisant les conditions d'hybridation.

3. La limite de détection n'a pas été déterminée expérimentalement, toutefois, d'un point de vue théorique, chaque cible pourrait capturer une particule fluorescente. De ce fait, la limite de détection du système développé dans des conditions optimales serait la limite de détection (LOD) de l'appareil de mesure vis-à-vis des particules fluorescentes fonctionnalisées. Cette LOD a été estimée à $2,5.10^5$ particules pour notre Evareader et nos particules fluorescentes (1 µm de diamètre). Ceci indique que dans des conditions optimales de capture d'ADN et de détection, la LOD du test pourrait atteindre $2,5.10^5$ copies d'ADN ce qui est du même ordre de grandeur que lors de l'approche par BCB où la LOD est de 6.10^5 copies soit 2 fM (*Trévisan, 2011*). En se basant sur l'estimation du nombre de particules capturées établie grâce aux calculs basés sur les rendements d'hybridation décrits en ANNEXE F, nous pouvons estimer que la LOD du test de capture d'ADN dans nos conditions expérimentales actuelles serait de 1,7 µM. Cette LOD est élevée mais pourrait être améliorée de plusieurs manières, comme décrits dans le tableau ci-dessous.

Voies générales d'amélioration	Détails
Augmenter les performances de	- Modifier les séquences (oligonucléotide de capture, sondes)
conture d'ADN du tect	- Optimiser les conditions d'hybridation (température,
capture u ADN du test	composition des tampons)
	- Déterminer s'il est adapté 1) d'analyser les sandwichs complets,
Ontimicar las conducishs nour mosurar	ou 2) de séparer les sandwichs et d'analyser les particules
	fluorescentes seules
le meilleur signal de fluorescence	- Choisir le diamètre des particules fluorescentes pour maximiser
	le signal dans l'Evareader avec l'onde évanescente
	- Réduire le nombre et la durée des étapes (hybridations et
Simplifier la mise en œuvre du test	nombre de lavages)
	- Optimiser les volumes de travail
Autres développements	- Intégrer le pré-traitement de vrais échantillons biologiques
	- Mesure de fluorescence avec outils de détection miniaturisés

Tableau 4-8 : Voies d'améliorations	s générales du	ı système de	e capture d'ADN
-------------------------------------	----------------	--------------	-----------------

Ces pistes d'améliorations sont décrites plus en détail dans le paragraphe « perspectives » ci-dessous.

4.5 Perspectives

4.5.1 Augmenter les performances de capture d'ADN du test

Le test complet de capture d'ADN pourrait être modifié en augmentant les concentrations initiales de particules fonctionnalisées et de cibles afin de disposer dans un premier temps d'un nombre de sandwichs plus important et donc plus facile à analyser.

Le test devra également être optimisé pour augmenter la spécificité et le nombre de particules capturées. Pour cela, plusieurs approches pourront être testées et combinées :

-Modification de la sonde de capture et des conditions d'hybridation

À 58°C, la sonde de capture a un rendement d'hybridation avec la cible estimé à 5 %, ce qui se traduit par des rendements de formation des sandwichs faibles : 3,5 % pour les sandwichs spécifiques et 1,4% pour les sandwichs non spécifiques. L'augmentation de la longueur de la sonde de capture peut permettre d'augmenter le rendement d'hybridation avec la cible. En effet, l'allongement de l'oligonucléotide de capture permettra de stabiliser les duplex entre la sonde de capture et la cible et par conséquent, plus de sandwichs seront récupérés.

La séquence de la *sonde de capture* peut être allongée à son extrémité 5' et son extrémité 3' de manière à capturer la cible sur une plus grande longueur. Des simulations faites récemment sur DINAMelt avec les nouvelles séquences (décrites dans le **Erreur ! ource du renvoi introuvable.**) et dans les mêmes conditions de salinité que précédemment montrent que la *sonde de capture* allongée, le rendement de formation des sandwichs spécifiques à 58°C serait de 60 % et le rendement de formation de sandwichs non spécifiques serait de 27%.

Tableau 4-9 : Séquences d'oligonucléotides envisagées pour améliorer les performances du test de capture
d'ADN. Les nucléotides ajouter à la séquence initiale sont en rouge.

Oligonucléotides	Nb de bases	Séquence (5' -> 3')
Sonde de capture 2 (complémentaire HPA-1)	46	ATCTGGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCCTTCAGGTCACAG
<i>Cible a</i> 2 (oligonucléotide HPA-1a)	86	GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAAGGA GAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA <mark>GAT</mark>

Il devrait donc bien y avoir plus de sandwichs formés dans ces conditions. Le rapport entre le nombre de sandwichs spécifiques et non spécifiques à 58 °C serait toujours le même (2,5). Par contre, si on se place à 61°C, ce rapport serait de 4 et la quantité de sandwichs spécifiques serait de 20 % ce qui est 6 fois plus important que le rendement obtenu avec les sondes initiales. Dans ces conditions, le nombre de particules fluorescentes capturées serait également augmenté d'un facteur 10 par rapport au test initial.



Figure 4-18 : Pourcentage de formation des sandwichs dans le PBS 0.07X avec les séquences envisagées pour améliorer les performances de l'outil de capture d'ADN.

Ces simulations montrent qu'en allongeant la *sonde de capture* et en changeant la température d'hybridation, le rendement de formation des sandwichs ainsi que la spécificité

du test peuvent être améliorés. La spécificité du test pourrait également être améliorée en diminuant encore la salinité du tampon. Ces conditions devront être testées et des simulations complémentaires pourront être réalisées afin de déterminer la longueur de la *sonde de capture* la plus optimale pour le test.

4.5.2 Optimisation de la mesure du signal de fluorescence en optimisant les sandwichs

- Changement de la forme d'analyse du système

Dans l'essai présenté, nous avons choisi d'analyser les échantillons contenant les sandwichs complets, c'est-à-dire à la fois des particules magnétiques et des particules fluorescentes. Seules les particules fluorescentes peuvent être immobilisées au fond des EVA-chips par interaction neutravidine/biotine, mais la présence des particules magnétiques peut gêner cette interaction. Il serait donc intéressant de tester l'influence de la présence de particules magnétiques sur l'immobilisation des particules fluorescentes au fond des puits de l'EVA-chip. Il faudrait peut-être changer la configuration d'analyse de l'échantillon et réaliser une étape supplémentaire pour dénaturer les sandwichs et analyser les particules fluorescentes seules. De même, il sera intéressant de voir si le fait d'enlever les particules magnétiques lors de l'analyse influe sur les résultats obtenus par imagerie de fluorescence et par cytométrie en flux.

- Changement du diamètre des particules fluorescentes pour maximiser le signal de fluorescence mesurée par l'Evareader

Les particules fluorescentes utilisées pour le test ont un diamètre de 1 µm or seuls les éléments se trouvant dans un champ de 200 nm au-dessus de la surface des puits d'analyse sont excités par l'onde évanescente de l'Evareader. La particule fluorescente n'est donc pas excitée dans sa totalité et l'utilisation de particules de diamètre plus petit pourrait permettre d'optimiser le signal collecté. Il sera donc intéressant de tester le signal de fluorescence collecté avec des particules fluorescentes de diamètres différents pour déterminer quel sera le diamètre optimal pour avoir le maximum de signal fluorescent.

4.5.3 Simplification de la mise en œuvre du test

- Réduction du nombre et de la durée des étapes

Une fois le test validé lors de la formation des sandwichs en deux étapes, l'étape d'hybridation de la cible avec les particules magnétiques et fluorescentes pourra être réalisée en une seule fois, en veillant à ce que les performances du test ne soient pas altérées. La stratégie schématisée sur la Figure 4-19 par exemple permettrait de diminuer le temps de réalisation du test de 2 h en supprimant une étape de lavage et en réduisant les temps d'hybridation de la cible avec les sondes portées par les particules.



Figure 4-19 : A) Approche actuelle de formation des sandwichs entre des particules magnétiques et des particules fluorescentes pour la capture d'ADN ; B) Approche proposée à tester pour réduire le nombre d'étapes et le temps total de réalisation du test

- Optimisation des volumes de travail

Les échantillons peuvent être concentrés en diminuant le volume final du test de 200 μ l à 100 μ l, ce qui correspond au volume nécessaire pour réaliser quatre mesures avec le volume minimal d'analyse de l'Evareader. Nous avions fait le choix de reprendre les sandwichs dans un volume de 200 μ l pour pouvoir réaliser toutes les mesures sur le même échantillon et pour limiter l'agrégation des particules entre elles.

L'Evareader peut mesurer des volumes d'échantillon allant de 25 μ l à 80 μ l. Nous avons choisi de faire l'analyse sur un volume de 25 μ l, mais ce volume peut être changé pour augmenter le nombre de particules introduites dans le puits d'analyse.

Le fait de concentrer les échantillons devrait également améliorer les résultats obtenus par imagerie de fluorescence et par cytométrie en flux.

4.5.4 Autres développements

- Réalisation du test avec de l'ADN issu d'échantillons biologiques

Une fois la réalisation du test validée avec la cible oligonucléotidique, il pourra être testé avec de l'ADN biologique issu d'échantillon sanguin, avec ce que cela comprend en termes d'extraction de l'ADN et de préparation de l'échantillon.

- Mesures de la fluorescence du test avec des outils de détection miniaturisés

Une fois la réalisation du test validée avec la cible oligonucléotidique et l'Evareader ou la cytométrie en flux, la détection de la fluorescence pourra être faite avec des outils miniaturisés de détection afin de se rapprocher du dispositif final souhaité.

CHAPITRE 5. TRAVAUX EXPLORATOIRES

Le chapitre 5 présente deux approches qui ont complété et enrichi les résultats des chapitre 3 et 4.

Tout d'abord, lors de la mise au point du test de capture d'ADN, nous avons utilisé des techniques de détection non miniaturisées pour pouvoir les intégrer dans des systèmes de type laboratoire sur puce. Nous présentons ici l'étude d'un détecteur optoélectronique miniaturisé, développé avec l'Université de Sherbrooke, et que nous avons testé pour détecter des particules fluorescentes. Ce détecteur miniaturisé est constitué de quatre jonctions enterrées (Buried Quad Junction) fabriquées par la société Teledyne Dalsa, et pourrait à terme être employé pour détecter simultanément des particules émettant dans différentes longueurs d'ondes. Cela permettrait de faire du multiplexage et de détecter plusieurs allèles du gène HPA-1 en même temps afin de connaître le profil allélique d'un patient.

D'autre part, la mise au point du test de capture d'ADN a été faite avec des séquences synthétiques (oligonucléotides). Pour valider complétement le test, il est impératif d'utiliser des échantillons sanguins réels. Nous présentons donc des essais de pré-traitement d'échantillons biologiques nécessaires en vue d'appliquer notre système de capture d'ADN à des échantillons sanguins réels.

5.1 Photodétecteur miniaturisé

5.1.1 Contexte

Le photodétecteur miniaturisé présenté ci-dessous est le fruit d'une collaboration entre la société Teledyne Dalsa, l'Université de Sherbrooke (via le laboratoire de Biophotonique et d'Optoélectronique dirigé par Paul Charette, et l'UMI LN2), et l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (via l'équipe de conception de systèmes hétérogènes avec Guo-Neng Lu et Patrick Pittet). Les travaux sur ce photodétecteur ont fait l'objet des thèses de doctorat de Charles Richard et Thierry Courcier (*Richard, 2012; Courcier, 2014*). Ces travaux étaient centrés sur la technologie du photodétecteur, et sa mise en œuvre (filtres optiques intégrés). Dans ces travaux, le photodétecteur n'avait pas été testé pour des applications biologiques concrètes. Durant cette présente thèse, nous avons testé ce photodétecteur pour mettre en évidence des particules fluorescentes telles que celles mises en œuvre dans notre test de capture d'ADN.

5.1.2 Présentation du photodétecteur BQJ

> Description générale du dispositif

Le dispositif intégré de photodétection que nous avons utilisé est un dispositif CMOS à forte tension comprenant un photodétecteur à quatre jonctions enterrées (Buried Quad Junction – BQJ) et des préamplificateurs de charge pour traiter simultanément quatre sorties de ce photodétecteur. Nous parlerons dans la suite du chapitre de photodétecteur BQJ, ou simplement de BQJ. Le photodétecteur BQJ est capable de mesurer simultanément quatre rayonnements de longueurs d'onde différentes, dans la gamme 400-1100 nm et de déterminer la contribution de chacun. Chaque jonction enterrée est sensible à un domaine de longueur d'onde, selon sa profondeur dans le substrat. Quand une lumière composée de quatre longueurs d'ondes distinctes est détectée par le système, la comparaison des courants mesurés au niveau des quatre jonctions enterrées permet, après traitement du signal, de reconstruire les spectres de chaque rayonnement et d'estimer la contribution de chacun au signal global obtenu. Le signal émis par la source est mesuré en même temps que les différents rayonnements et est pris pour référence. Le photodétecteur permet ainsi de s'affranchir des variations de la source et donc de faire des mesures plus sensibles puisque le signal peut être traité indépendamment des variations de cette source.

Le photodétecteur est un dispositif miniaturisé ayant une surface de 200 x 200 μ m² intégré sur une puce CMOS de quelques centimètres.

La description du photodétecteur et de ses performances est détaillée dans les travaux suivants (*Richard*, 2012; *Richard et al*, 2012; *Courcier*, 2014)


Figure 5-1 : Exemple de reconstruction de spectre de fluorescence de deux populations de quantum dots en milieu liquide, avec les mesures de BQJ (pointillés bleus clairs). Le spectre de fluorescence mesuré avec un spectrophotomètre classique est indiqué en rouge. (issu de (*Courcier et al*, 2014))

Dans le présent travail de thèse, le photodétecteur BQJ a été essentiellement employé comme spectrophotomètre miniaturisé (cf Figure 5-1 ci-dessus), même si le traitement des signaux des BQJ est complètement différent du mode opératoire classiquement employé avec des spectrophotomètres classiques.

Perspectives d'utilisation dans notre projet

La capacité du photodétecteur à détecter simultanément plusieurs sources lumineuses, ainsi que le fait qu'il soit miniaturisé sont intéressants pour des applications biomédicales et pour le développement d'outils de diagnostic. En effet, la discrimination spectrale permet d'envisager la détection de différentes particules fluorescences contenues dans une même solution et de réaliser du multiplexage en longueur d'onde. Le fait que le dispositif soit miniaturisé permettrait de l'intégrer à des dispositifs de type laboratoire sur puce et de réduire la quantité d'échantillon nécessaire à l'analyse.

Dans notre application pour le génotypage plaquettaire, il est important de pouvoir différencier deux allèles d'un même gène. Avec le photodétecteur BQJ, nous pouvons imaginer de discriminer ces deux allèles simultanément en utilisant des particules de fluorescence différente, l'une étant fonctionnalisée avec des sondes complémentaires de l'allèle a et l'autre avec des sondes complémentaires de l'allèle b. En mettant les deux types de particules dans la même solution et en appliquant le processus de capture d'ADN que nous avons décrit, la détection par le photodétecteur BQJ mettra en évidence les particules capturées et donc le ou les allèles présents.

C'est dans cet état d'esprit que les études préliminaires avec le photodétecteur BQJ ont été réalisées en utilisant des particules fluorescentes commerciales.

5.1.3 Études préliminaires réalisées

Dans un premier temps, la détection de la fluorescence des particules par le photodétecteur BQJ est comparée avec la détection par spectrofluorimétrie classique, et une courbe de calibration est établie. Par la suite, la capacité du photodétecteur à discriminer la fluorescence de deux populations de particules différentes en solution est évaluée. Ces travaux ont été menés avec l'aide de Thierry Courcier, qui a pris en charge les questions d'instrumentation et de mesure physique.

Particules et source lumineuse utilisées

Les particules fluorescentes utilisées doivent pouvoir être excitées par une même source monochromatique de faible longueur d'onde et dont les spectres d'émission sont assez éloignés pour pouvoir les différencier plus facilement. Nous utilisons donc des particules de carboxylatex commerciales (Bangs Laboratories) de 0,9 µm de diamètre et émettant respectivement à 480 nm (EstaporX, λ_{exc} = 460 nm ; $\lambda_{ém}$ = 480 nm) et à 690 nm (Flash Red, λ_{exc} = 660 nm ; $\lambda_{ém}$ = 690 nm). La source d'excitation est une LED émettant dans le proche UV et dont l'émission est centrée sur 365 nm.

Comparaison avec la spectrofluorimétrie

Mise en œuvre du test

Afin d'évaluer si le signal du photodétecteur peut être relié aux concentrations en particules dans la solution, sa réponse spectrale est comparée à celle obtenue par spectrofluorimétrie pour différentes concentration en particules. Ce test est réalisé seulement avec les particules Flash Red émettant à 690 nm. Le montage ci-dessous (Figure 5-2) est effectué de manière à réaliser les mesures de fluorescence dans les mêmes conditions avec le photodétecteur BQJ et avec le spectrofluorimètre. Des indications complémentaires sur le montage sont rapportées dans le manuscrit de thèse de Thierry Courcier (*Courcier, 2014*).

156



Figure 5-2 : Schéma du montage optique réalisé pour mesurer la fluorescence des échantillons avec le photodétecteur BQJ et le spectrofluorimètre dans les mêmes conditions

L'intensité de fluorescence qui atteint le photodétecteur est comparée à l'intensité mesurée avec le spectrophotomètre à 690 nm. Les mesures sont effectuées sur une gamme de concentration allant de 1.10⁵ particules/ml à 1.10⁸ particules/ml.

Pour la mesure, 400 μ l de la solution est placée dans une cuve en quartz. Le volume excité dans la cuvette est estimé à 40 μ l (volume du faisceau de la lumière incidente passant dans la cuve) tandis que l'émission de fluorescence collectée (vers le BQJ et vers le spectrophotomètre) correspond à un volume estimé à 10 μ l.

• <u>Résultats</u>

Les spectres obtenus présentent tous un pic centré autour de 685 nm. Les intensités de fluorescence mesurée par chaque appareil en fonction du nombre de particules excitées sont représentées sur la Figure 5-3. Les résultats obtenus avec le spectrophotomètre (carrés bleus) et avec le photodétecteur BQJ (carrés noirs) présentent un comportement similaire. Pour chaque concentration, 3 points de mesures ont été effectués (écart-type non visible sur le graphe). Toutefois, les intensités de fluorescence collectées pour les solutions dont la concentration en particules est inférieure à 2.10⁵ particules sont sensiblement les mêmes. Ceci est dû au fait que dans ces cas-là, la proportion du signal provenant de la source et collectée par les appareils de mesure est prépondérante par rapport au signal généré par les particules. Les données obtenues avec le spectrofluorimètre sont corrigées en soustrayant le spectre de la source aux spectres des différentes solutions de particules.



Figure 5-3 : Comparaison de la détection de particules fluorescentes Flash Red avec le photodétecteur BQJ et le spectrophotomètre (d'après Courcier et al., à soumettre).

Ces résultats montrent que la fluorescence collectée par le photodétecteur BQJ est bien fonction de la concentration en particules dans la solution, comme attendu. La limite de détection du photodétecteur BQJ vis-à-vis des particules fluorescentes Flash Red dans les conditions de mesure décrites ici et en absence d'atténuation de la source est d'environ de 2.10⁵ particules.

> Discrimination de fluorescences différentes

<u>Mise en œuvre du test</u>

Afin d'évaluer la capacité du photodétecteur BQJ à discriminer des particules fluorescentes différentes en solution, un autre montage optique est réalisé (Figure 5-4). La source d'excitation (LED à 395 nm) est focalisée sur une goutte d'échantillon déposée sur un support opaque. Le signal de fluorescence émis par les particules présentes dans la goutte est collecté à 90° et focalisé dans une fibre optique dont l'extrémité est déposée sur le photodétecteur BQJ. Un filtre en nitrure est déposé sur le BQJ pour limiter l'intensité de la source d'excitation qui arrive sur le photodétecteur. Les détails du montage optique sont décrits dans le manuscrit de thèse de Thierry Courcier (*Courcier, 2014*).



Figure 5-4 : Montage expérimental pour la discrimination de fluorescence en solution par le photodétecteur BQJ (image issue de (*Courcier*, 2014))

Une goutte de 20 µl de solution est déposée sur le portoir. Les solutions mesurées contiennent les particules Flash Red seules (λ_{exc} = 660 nm ; $\lambda_{ém}$ = 690 nm), les particules EstaporX seules (λ_{exc} = 460 nm ; $\lambda_{ém}$ = 480 nm) ou un mélange de particules dans un rapport 1:1. Les solutions sont analysées aléatoirement sans connaissance de leur composition *à priori*. Les particules Flash Red ont un signal fluorescent plus faible que les particules EstaporX lorsqu'elles sont excitées à 395 nm. Les concentrations en particules utilisées sont donc différentes pour avoir un niveau de signal équivalent : C₆₉₀ = 1.10⁸ particules / ml et C₄₈₀ = 1.10⁷ particules / ml. Avec chaque type de particules, on effectue une mesure de référence afin de déterminer, pour chacune, la réponse du spectrophotomètre en termes de ratio de courant mesuré.

<u>Résultats</u>

La Figure 5-5 présente les proportions d'intensité de fluorescence à 690 nm et 480 nm mesurée pour chaque échantillon. Le tampon ne génère aucune contribution de fluorescence (points en noirs).



Figure 5-5 : Contribution de fluorescence à 470 nm et à 690 nm pour des solutions contenant du tampon seul, des particules fluorescentes émettant à 470 nm (BF470) et ou des particules fluorescentes émettant à 690 nm (BF690).Les mélanges sont réalisés avec un rapport 1:1 (V/V). (Graphique issu de (*Courcier*, 2014))

Les solutions contenant les particules EstaporX seules (BF480, points en bleu) ont une intensité de fluorescence qui varie de 75% à 140% de la mesure de référence du fluorophore à 480 nm, et qui reste en dessous de 25 % de la mesure de référence à 690 nm.

Les solutions contenant les particules Flash Red seules (BF690, points en rouge) ont une intensité de fluorescence qui varie entre 70% et 120% de la mesure de référence du fluorophore à 690 nm et qui reste en dessous de 10% de la mesure de référence à 480 nm.

Ces résultats montrent que dans ces conditions de mesure, le photodétecteur BQJ permet de déterminer quelles particules se trouvent en solution. Les variations d'intensité par rapport aux mesures de fluorescence de référence (valant 1 sur les axes) s'expliquent en partie par de la sédimentation au sein de la goutte, ainsi que par les légères variations d'efficacité d'excitation entre les échantillons, probablement dues à un déplacement sur le banc de mesure.

Les solutions contenant un mélange de particules ont une intensité de fluorescence située entre 20% et 60% des mesures de référence pour chaque type de particules.

Dans les conditions de mesures décrites ici, les mesures de fluorescence par le photodétecteur BQJ ne nécessitent que 20 µl de solution et durent environ cinq minutes. Ce

système d'analyse est donc intéressant car il est miniaturisé, rapide et nécessite peu d'échantillon. Toutefois, la limite de détection de l'appareil vis-à-vis des différentes particules devra être déterminée. En effet, l'essai de discrimination de la fluorescence a été réalisé avec des concentrations de 2.10⁶ particules fluorescentes à 690 nm et de 2.10⁵ particules fluorescentes à 480 nm. D'après les résultats obtenus avec le dispositif de capture d'ADN actuel, ces concentrations en particules peuvent être atteintes mais avec une quantité de cibles importante.

Le photodétecteur BQJ permet bien de discriminer deux types de particules fluorescentes présentes dans une solution. Toutefois ces expériences ont été réalisées dans des conditions encore imparfaites, et ne constituent qu'un résultat préliminaire, pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, l'emploi d'une source unique avec des particules comportant des fluorophores organiques était pratique à mettre en œuvre, mais ne constitue pas une solution idéale. On peut envisager, à terme, plusieurs approches pour trouver une solution pratique :

 i) utiliser plusieurs sources d'excitation, utilisées alternativement; ceci est techniquement réalisable mais complexifierait le système optique, ce qui est peu souhaitable dans un microsystème analytique;

 ii) employer des quantum dots plutôt que des particules comportant des fluorophores organiques – mais il serait alors nécessaire de requalifier tout le kit de capture d'ADN avec les quantum dots, ce qui était inenvisageable pendant cette thèse.

iii) employer des particules avec des charges en fluorophores très différentes (10 fois moins de fluorophores pour les particules les plus excitées par la source lumineuse). Si cela peut être possible commercialement ou via des partenariats, il restera à vérifier les limites de détection pour les particules faiblement chargées en fluorophores organiques.

161

5.1.4 Conclusion

Nous avons exploré comment le photodétecteur BQJ peut être appliqué à notre problématique de détection de particules fluorescentes, en vue d'un génotypage sanguin. Nous avons testé un système de mesure technologiquement simple (une seule source d'excitation, optique à base de filtres nitrures simples) et potentiellement compatible, à terme, avec une intégration sous forme de microsystème bioanalytique.

Les premiers tests préliminaires, montrent que, dans nos conditions de mesures, le BQJ peut détecter environ 5.10⁴ particules fluorescentes d'un même type. Ceci se situe entre les seuils de détection de l'Evareader et du scanner de fluorescence que nous avons employés dans le chapitre 4.

Par ailleurs, le BQJ a permis de discriminer deux populations de particules fluorescentes présentes en solution lorsqu'elles sont excitées par une source monochromatique proche de l'UV.

L'utilisation d'un tel photodétecteur couplé à l'outil de capture d'ADN que nous avons précédemment décrit pourrait permettre de réaliser du multiplexage en longueur d'onde et de déterminer les allèles d'un gène plaquettaire porté par un patient en un seul test. En effet, les particules fluorescentes peuvent être fonctionnalisées avec des sondes complémentaires de l'allèle a ou de l'allèle b suivant le fluorophore qu'elles contiennent. Le test peut ensuite être réalisé en introduisant les deux types de particules dans la solution. Une analyse de la fluorescence par le photodétecteur BQJ permettrait de déterminer quelles particules sont capturées et donc de déterminer si le patient possède l'allèle a du gène (homozygote a), l'allèle b (homozygote b) ou les deux (hétérozygote ab).

Le photodétecteur BQJ est donc un outil de détection prometteur qui, couplé à l'outil de capture d'ADN développé, a le potentiel de faire de la discrimination allélique pour le génotypage plaquettaire. Des mesures complémentaires doivent être réalisées pour déterminer la limite de détection du photodétecteur vis-à-vis des particules fluorescentes et pour détecter la fluorescence des particules après le processus de capture d'ADN.

5.2 Vers des échantillons biologiques

L'outil de capture d'ADN développé devra, à terme, être testé avec de l'ADN issu d'échantillons biologiques. Les échantillons biologiques sont en général des milieux complexes composés de toute sorte de biomolécules différentes. Les échantillons de sang total, sont composés, quant à eux, à 55% de plasma et à 45% d'éléments figurés, à savoir les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Afin de capturer l'ADN présent, il convient donc au préalable de l'isoler des autres biomolécules. Les questions d'extraction de l'ADN et de traitement de l'échantillon devront donc être abordées.

Une réflexion a été menée sur les différents paramètres à prendre en compte, les différentes techniques, disponibles et applicables au test, d'extraction et de préparation de l'échantillon.

5.2.1 Extraction et purification de l'ADN

Différentes étapes

Lorsque les échantillons biologiques sont des échantillons sanguins, l'ADN est extrait du noyau des leucocytes, les autres cellules étant anucléées. Il existe différentes méthodes d'extraction d'ADN, mais dans l'ensemble, chacune comprend les mêmes étapes :

- Isolement et lyse des leucocytes

Les leucocytes sont isolés des autres biomolécules par centrifugation, puis leur membrane et leur noyau sont lysés à l'aide de détergents et des chélateurs afin de libérer l'ADN dans le milieu.

- Extraction de l'ADN proprement dite

L'extraction proprement dite de l'ADN consiste à isoler l'ADN de toutes les protéines et autres organites parasites libérés lors de la lyse des cellules. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées.

- Précipitation de l'ADN

Après extraction, l'ADN est précipité par ajout d'éthanol froid. Il en résulte la formation d'une méduse d'ADN. Cette méduse est ensuite solubilisée dans de l'eau distillée et peut être conservée congelée jusqu'à 1 an.

> Différentes méthodes d'extraction

Il existe différentes méthodes d'extraction de l'ADN dont la méthode d'extraction au phénol/chloroforme, la méthode par relargage au sel (salting-out), les méthodes basées sur l'utilisation de colonne de résines échangeuses d'ion (*Bienvenu et al, 1999*), l'extraction d'ADN avec des cartes FTA[™], grâce à des kits utilisant des particules magnétiques ou à des automates d'extraction.

Les méthodes d'extraction au phénol/chloroforme ou par relargage de sels consistent à isoler l'ADN de manière sélective par solubilisation des protéines dans un solvant dans lequel l'ADN est insoluble (phénol) ou par précipitation sélective des protéines grâce à une solution saline (salting-out). La méthode utilisant des colonnes de résines échangeuses d'ions est basée sur l'adsorption sélective de l'ADN sur des résines de silice en fonction de leur charge.

La méthode d'extraction par carte FTA[™] utilise des papiers de cellulose contenant des réactifs qui permettent la lyse des cellules, l'extraction de l'ADN et sa protection contre les nucléases et les bactéries. L'ADN peut ainsi être stocké sur le papier pendant plusieurs années. Une goutte de sang total est déposée sur la carte et les cellules sont lysées. L'ADN libéré est capturé entre les fibres de cellulose de la carte (*Butler, 2005*).

Des kits d'extraction utilisent des particules magnétiques recouvertes de silica sur lesquels l'ADN s'adsorbe sélectivement. L'ADN est ensuite séparé du reste des organites par séparation magnétique puis est détaché des particules magnétiques par changement de conditions du milieu (chauffage, variation de pH...).

Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients et leurs performances en termes de temps de réalisation, de rendement et de coût sont décrites dans le Tableau 5-1. Les méthodes usuelles permettent d'obtenir de l'ADN assez pur et sont peu coûteuses mais elles sont longues et nécessitent un volume important d'échantillon. L'extraction d'ADN sur résine échangeuse d'ion est plus rapide, mais le rendement est plus faible que les méthodes précédentes. La carte FTA[™] permet d'extraire l'ADN d'un faible échantillon sanguin rapidement et de l'utiliser *in situ* pour réaliser des tests biologiques, mais l'ADN peut être endommagé sur la carte, donc de moins bonne qualité. Les méthodes qui font intervenir des particules magnétiques permettent d'utiliser moins d'échantillon et sont plus rapides que les autres méthodes présentées. L'extraction d'ADN peut également être réalisé de manière automatisée ce qui permet de gagner du temps car plusieurs échantillons peuvent être traités en même temps et cela limite les manipulations par l'opérateur. Par exemple, l'automate Forensic AutoMate Express de Life Technologies couplé à une méthode d'extraction utilisant les particules magnétiques permet de traiter 13 échantillons en 30 min. Toutefois, ces automates sont assez coûteux.

Méthodes	Extraction avec des solvants organiques	Extraction avec des solvants organiques	Colonnes de résines échangeuses d'ions	Extraction sur carte	Méthodes utilisant des particules magnétiques Pourcentage de pertes de particules			
	Phénol / chloroforme	Salting - out	Qiagen Blood kit Maxi® et Nucléospin Blood®	Cartes FTA ™	NucliSENS® (silica)	PrepFiler™ (polymère ionique)		
Volume de	10 ml	10 ml	5 ml	2 ul	100 ul	2 ul		
sang total	20	20	0	- ~-	200 p.	- p.		
Nombre de copies d'ADN moyen	5.10 ⁷	5.10 ⁷	2,5.10 ⁷	1.10 ⁴	5.10 ⁵	1.10 ⁴		
Temps total d'extraction	6 h	4 – 5 h	30 min à 2h 30	30 – 60 min	40 – 60 min	60 – 90 min (13 échantillons en 30 min si automatisée)		
Rendement	+ +	+ +	+	+ +	+ + +	+ + +		
Pureté	+++	+++	+++	++	+ +	++		
Coût	+ +	+	+ +	++	+++	+++		
Réf.	(Bienvenu et al, 1999)	(Grody et al, 2009)	(Bienvenu et al, 1999)	www.whatman.com (<i>Butler, 2005</i>)	www.biomerieux- diagnostics.com	www.invitrogen.com (Brevnov et al, 2009)		

Րableau 5-1 ։ Tableau comparati	f de différentes	méthodes d'	extraction d'ADN
---------------------------------	------------------	-------------	------------------

Pour être capturé par les particules magnétiques et pour que les sandwichs se forment, l'ADN doit être assez pur de manière à ce que l'hybridation soit optimale. À terme, il serait intéressant que l'extraction d'ADN soit intégrée au dispositif de diagnostic. La méthode d'extraction qui sera retenue devra tenir compte de ces contraintes. Une fois l'ADN extrait, il devra être purifié et traité pour pouvoir être hybridé sur le système de capture d'ADN développé.

5.2.2 Coupure de l'ADN par enzymes de restrictions

Une fois purifié et récolté, l'ADN peut être découpé de manière à obtenir un fragment contenant la séquence HPA-1a qui s'hybridera correctement avec les sondes portées par les particules formant le système de capture d'ADN. Dans cette thèse, nous avons choisi de voir comment générer un fragment d'ADN de longueur similaire à celle à l'oligonucléotide synthétique que nous avons utilisé pour valider le système de capture d'ADN de manière à pouvoir comparer les résultats qui seront obtenus par la suite. Ainsi, les fragments d'ADN d'intérêt comportant la séquence du gène HPA-1, doivent avoir une longueur d'environ 83 nucléotides et porter la mutation allélique environ aux 2/3 de l'extrémité 3' du fragment.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour couper l'ADN, comme les ultra-sons ou les enzymes de restriction. Les ultrasons coupent l'ADN de manière statistique, alors que les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques. De ce fait, c'est plutôt cette approche que nous retenons. La carte de restriction présentée ci-dessous (Figure 5-6) montre que les enzymes Nlalv et BSeSI permettent d'obtenir un fragment d'ADN de 77 nucléotides ayant des caractéristiques similaires aux cibles déjà testées dans notre travail.



Figure 5-6 : Carte de restriction de l'ADN sur le gène HPA1a

Des essais ont été réalisés pour tester la digestion enzymatique. L'ADN a été extrait à partir de sang total par la méthode de salting-out puis a été digéré par les enzymes Nlalv et

BSeSI. Ensuite, les fragments d'ADN ont été révélés par électrophorèse sur gel d'agarose avec un colorant bleu (xylène cyanol). L'analyse UV du gel (Figure 5-7) ne permet pas de détecter la présence des fragments de 77 nucléotides probablement par manque de sensibilité. Toutefois, les bandes correspondant à l'ADN non digéré (T+, cercle rouge) sont beaucoup moins marquées pour les échantillons dont l'ADN a été digéré par les enzymes. Cela laisse penser que l'ADN a quand même été digéré. Pour confirmer cela, il faudrait refaire le test avec une quantité d'ADN plus importante ou avec un marqueur plus sensible, comme le SYBR Green.



Figure 5-7 : Photo représentant les bandes d'ADN après migration sur gel d'agarose avec du BET. MT correspond au marqueur de taille en Kpb, T- correspond à un échantillon sans ADN, T+ correspond à un échantillon d'ADN non digéré et les autres échantillons ont été digérés par les enzymes de restriction. Les cercles rouges correspondent à l'ADN non digérés et le cercle vert correspond à l'endroit où devrait se trouver la bande de l'ADN digéré.

Il sera également important d'optimiser le protocole de digestion enzymatique pour que cela soit le plus rapide et simple possible. Le dispositif de capture d'ADN pourra ensuite être revalidé avec cet ADN génomique coupé.

5.2.3 Conclusion

L'extraction d'ADN à partir de l'échantillon biologique et le traitement de l'échantillon pour pouvoir réaliser le test de capture d'ADN sont des questions à prendre en compte. En effet, il s'agit d'étapes non négligeables qui peuvent influer sur le bon

fonctionnement du test et sur la durée et le coût du test total. En effet, plus l'ADN sera purifié et en bon état, plus la sensibilité du test sera bonne.

À terme, le dispositif de diagnostic final devrait intégrer l'extraction et le traitement de l'échantillon. Il est donc intéressant de considérer les différentes méthodes d'extraction existantes pour déterminer lesquelles seraient les plus adaptées.

CHAPITRE 6. CONCLUSION GÉNÉRALE

Ce projet de doctorat s'inscrit dans un projet global ayant pour objectif l'élaboration d'un dispositif d'identification d'une mutation génétique (SNP) en utilisant des particules fonctionnalisées, avec une application au génotypage plaquettaire. Cet outil doit réaliser trois étapes principales : l'extraction de l'ADN à partir de l'échantillon sanguin, la capture de l'ADN et la détection du signal de fluorescence.

Le projet de doctorat présenté dans ce manuscrit porte sur l'élaboration d'un outil de capture d'ADN grâce à la formation de sandwichs avec des particules biofonctionnalisées, couplée à une détection de la fluorescence par imagerie de fluorescence, cytométrie en flux et par un biocapteur à ondes évanescentes.

Le principal objectif de ce travail de thèse consistait à optimiser un outil de capture d'ADN et à déterminer ses performances en termes de limite de détection et de détection des SNP.

La conception et les stratégies choisies pour réaliser l'outil de capture d'ADN ont été décrites au chapitre 3. L'approche retenue est basée sur la formation de sandwichs entre des particules magnétiques et des particules fluorescentes biofonctionnalisées lorsque l'ADN cible est présent. Dans notre approche, la détection de la cible est induite par la présence ou non des particules fluorescentes fonctionnalisées. Chaque étape du test pouvait être réalisée selon différentes voies. Il a été choisi d'utiliser des particules biofonctionnalisées de manière covalente pour réaliser la capture d'ADN cible en deux étapes, et en faisant varier les conditions d'hybridation de manière à garantir la spécificité du test. Le système de capture d'ADN a été validé avec un oligonucléotide de séquence HPA-1a correspondant à l'allèle a du gène plaquettaire biallélique HPA-1.

La réalisation du test est décrite dans le chapitre 4. Dans un premier temps, des tests de caractérisation montrent que les particules ont bien été biofonctionnalisées et que la *cible a* bien été capturée par les particules magnétiques fonctionnalisées.

Par la suite, nous avons montré que l'outil de capture d'ADN développé permettait de capturer la cible synthétique HPA-1 en réduisant le temps d'analyse de 45 min. Les essais ont été réalisés avec une quantité importante de cibles pour valider le test et le nombre de cibles capturées dans ces conditions est de 6,5.10¹³ cibles. La limite de détection n'a pas pu être évaluée à ce stade. Dans nos conditions, le test permet de discriminer l'allèle a de l'allèle b du gène HPA-1 qui ne diffère que d'un nucléotide. Le rapport des signaux de fluorescence issus du sandwich spécifique et du sandwich non spécifique est d'environ 2,5 à 3. Ce rapport devra être amélioré par la suite, en optimisant les conditions de formation des sandwichs.

La détection de la fluorescence des sandwichs a été réalisée par trois méthodes : la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et l'Evareader (détection par ondes évanescentes). Dans nos conditions de mesure, la limite de détection vis-à-vis des particules fluorescentes fonctionnalisées obtenue par imagerie de fluorescence est de 3.10³ particules fluorescentes et celle obtenue avec l'Evareader est de 2,5.10⁵ particules. La limite de détection de la cytométrie de flux est évaluée à environ 5.10⁴ particules.

Lors des analyses de fluorescence des sandwichs par ces trois méthodes, nous avons montré que tous les systèmes de détection testés permettent de discriminer le signal de fluorescence provenant de la formation de sandwichs spécifiques en présence de cible du signal obtenu lorsque des sandwichs non spécifiques se forment.

La détection par cytométrie en flux permet d'analyser les différentes populations contenues dans un échantillon et d'isoler le signal provenant des populations d'intérêt, contrairement aux autres méthodes de détection testées qui analysent la fluorescence de l'échantillon complet. De ce fait, la cytométrie a constitué un moyen puissant pour mieux discriminer les différentes populations de particules dans un même échantillon. Ceci nous a été précieux pour interpréter les signaux de nos autres méthodes de détection. Toutefois, cela nécessite un traitement du signal obtenu *a posteriori* et l'appareillage nécessaire est encombrant et coûteux.

La détection de fluorescence par imagerie de fluorescence par scanner présente une limite de détection plus faible mais elle est plus contraignante en termes de réalisation.

L'Evareader est une méthode intéressante puisqu'elle permet d'obtenir les résultats en temps réel et que l'appareil de mesure est peu encombrant, facile d'utilisation et permet de mettre en évidence la présence des sandwichs spécifiques. De plus, jusqu'à huit échantillons peuvent être analysés lors de la même mesure. L'Evareader mesure la fluorescence totale de l'échantillon et les sandwichs sont analysés en entier, de ce fait, il se peut que la présence des particules magnétiques gêne la mesure du signal. Des améliorations sont donc à réaliser pour que la mesure par Evareader gagne en sensibilité et que le système de capture d'ADN gagne en spécificité.

Plusieurs pistes d'amélioration du test ont été suggérées :

À court terme, le système de capture d'ADN devra être optimisé afin de gagner en spécificité et de capturer plus de particules fluorescentes. Ces paramètres peuvent être modifiés en influant sur des facteurs tels que la longueur de la sonde de capture, la température d'hybridation et la salinité du tampon comme cela est expliqué dans le chapitre 4.

À moyen terme, il faudra déterminer expérimentalement la limite de détection du test en termes de nombre de cibles capturées. Une fois le système de capture d'ADN validé, les différentes étapes du test pourront encore être optimisées de manière à réduire le temps total d'analyse.

À long terme, le test devra être réalisé avec de l'ADN issu d'échantillons biologiques en prenant en compte les aspects de préparation des échantillons qui ont été abordés au chapitre 5. Enfin, l'analyse de fluorescence du test pourra être réalisée avec un outil de détection miniaturisé (comme le photodétecteur BQJ décrit au chapitre 5 par exemple) afin de se rapprocher de l'objectif du projet global, à savoir l'élaboration d'un outil de diagnostic miniaturisé permettant de détecter des mutations génétiques sur de l'ADN non amplifié avec une application au génotypage plaquettaire.

ANNEXES

ANNEXE A PERFORMANCES D'OUTILS DE DIAGNOSTIC UTILISANT DES PARTICULES

• Association du type de particules et du mode de détection

	Particules magnétiques	Particules d'or	Particules d'argent	Particules inorganiques marquées		
Optique		*	*	*		
DMR	*					
Sans détecteur		*		*		

Outils de diagnostics moléculaires *in vitro* utilisant des particules pour la détection de protéines

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (g de protéine)	Spécificité	coût	Réf
ELISA	Protéine	750 µl	100 µl	3h	30 min	1.10 ⁻¹¹	+++	+++	(Butler, 2000)
UV-vis	Protéine (PSA)	50 µl	950 μl	2h	5 min	8.10 ⁻⁹	/	+	(Jans et al, 2011)
DLS	lGg	20 µl	1500 µl	2h	30 min	7,5.10 ⁻¹⁰	/	++	(Liu et al, 2009)
DLS	Biomarqueurs	5 µl	1000 µl	1h	30 min	1.10 ⁻⁹	++	++	(Huo, 2010)
Scanométrie + biocode- barres	Protéine (PSA)	10 µl	60 µl	3 min	6 h	1.10 ⁻¹⁸	++	++	(Goluch et al, 2006)
SPR	Biomarqueur	100 µl	200 µl	0 min	30 min	2.10 ⁻¹¹	/	+++	(Chen et al, 2013)
Laboratoire sur puce + DMR	Biomarqueur bactérien	/	10 µl	1 min	10 min	/	/	+	(Lee et al, 2008)
Laboratoire sur puce + DMR	Immunoglobuline	20 µl	100 µl	1 min	18 min	1.10 ⁻¹⁰	+	++	(Teste et al, 2011)
Laboratoire sur puce + DMR	Protéine (PSA)	10 µl	6 µl	1min 30	25 min	9.10 ⁻¹¹	/	+	(Cai et al, 2011)
Laboratoire sur puce + Scanométrie	Protéine (PSA)	10 µl	1 µl	15 min	1h	1.10 ⁻¹⁸	+++	+++	(Goluch et al, 2006)
Luminex	Anticorps	50 µl	100 µl	18 min	3h	/	/	+++	(Dunbar et al, 2003)

 Tableau A-6-1 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules associés à diverses

 méthodes de détection pour la mise en évidence de biomolécules

Outils de diagnostics moléculaires in vitro utilisant des particules pour la détection

<u>d'ADN</u>

Méthode	Biomolécule recherchée	V. éch.	V. analyse.	Tps analyse	Tps de détection	LOD (nb de copies détectées)	Spécificité	coût	Réf
PCR-SSP + gel d'électrophorèse	ADN fragmenté et amplifié = amplicon	750 μL	10 µl	3h	1h30	4.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Shyamala et al, 1989; Hurd et al, 2002), (Cavanagh et al, 1997)
UV-vis	Oligonucléotides	100 µl	1000 µl	3h30	5 min	6.10 ⁵	+	++	(Zhan et al, 2010)
DLS	Oligonucléotides	/	1500 µl	2h30	30 min	3.10 ⁹	+++ (SNP)	++	(Dai et al, 2008)
Fluorescence (Evareader) + biocode-barres	oligonucléotides	50 µl	25 μl	4h45	15 min	6.10 ⁵	+++ (SNP)	++	(Trévisan 2011; Trevisan et al. 2010)
Fluorescence + biocode-barres	oligonucléotides	100 µl	200 µl	1h30	5 min	8.10 ⁶	+++ (SNP)	++	(Xiang et al, 2011)
Fluorescence (cytométrie) + biocode-barres	ADN de pathogène	/	400 µl	2h	30 min	1,5.10 ⁵	++	++	(Li et al, 2005)
Scanométrie + biocode-barres	ADN bactérien	5 μΙ	50 µl	3 min	6 h	7,5.10 ⁴	/	++	(Hill et al, 2007)
SPR	Amplicons	/	/	0 min	6h	/	+++ (SNP)	+++	(Li, Y., Wark, A.W., Lee, H.J., Corn, 2006)
SERS	Amplicon	10 µl	40 µl	1 min	30 min	3.10 ³	+++ (SNP)	+++	(Wabuyele et al, 2005)(Wabuyele et al, 2010)
DMR	oligonucléotides	1 µl	1000 µl	1 min	30 min	3.10 ¹⁰	++	++	(Josephson et al, 2001)
DMR	Télomérase	20 µl	50 µl	15 min	2h30	6.10 ⁶	/	+++	(Grimm et al, 2004)
Sans détecteur	DNAse	1 µl	2 µl	1 min	12 min	1.10 ⁹	/	+	(Zhao et al, 2008)
Sans détecteur	amplicons	46 µl	10 µl	10 min	1h30	2.10 ⁹	+++	+	(Vollenhofer-Schrumpf et al, 2007)
Laboratoire sur puce + fluorescence	amplicons	/	15 μl	1 min	2h30	9.10 ³	++	++	(Zhang et al, 2011)
Luminex	amplicons	17 µl	65 µl	18 min	35 min	1,5.10 ⁶	+	+++	(Dunbar et al, 2003)
Nanosphere	ADN viral	200 µl	250 μl	1 min	3h30	/	+++ (SNP)	+++	(Jannetto et al, 2010)
Nanosphere	ADN humain	25 µl	50 µl	1 min	1h30	3.10 ⁶	+++ (SNP)	+++	(Lefferts et al, 2009)
Nanosphere	ADN humain	1000 μl	1000 µl	1 min	3h30	/	+++ (SNP)	+++	(Buchan et al, 2011)

 Tableau A-6-2 : Différents outils de diagnostic in vitro utilisant les micro et nanoparticules associés à diverses

 méthodes de détection pour la mise en évidence de séquence d'ADN

ANNEXE B MÉTHODES DE DÉTECTION DE FLUORESCENCE UTILISÉES POUR LE PROJET

B.1 Principes de la fluorescence

Lorsqu'une molécule est portée dans un état excité suite à une friction, une réaction chimique ou l'absorption de photon, elle tend à revenir à son état fondamental en retransmettant l'énergie qu'elle a reçu par divers mécanismes décrits dans la Figure B-6-1.



Figure B-6-1: Processus de restitution d'énergie lors du retour à l'état fondamental d'une molécule excitée par un photon (*Valeur, 2004*)

La fluorescence est une des voies par laquelle la molécule peut retrouver son état fondamental. Elle est le résultat de la libération d'énergie radiative consécutivement à l'excitation de la molécule par un photon. Lorsque le photon frappe la molécule, il libère une énergie qui fait passer un des deux électrons de spin opposé d'une orbitale moléculaire à une orbitale plus élevée que celle sur laquelle il se trouve. Ce transfert d'électron correspondant à l'absorption de la lumière est très rapide, environ 10⁻¹⁵ s. C'est une transition dite verticale dont l'état résultant est appelé état de Franck-Condon. Selon le principe de Franck-Condon, une transition verticale est plus susceptible de se produire sans changement de position des noyaux dans l'entité moléculaire et son environnement. Il en

résulte une probabilité d'absorption et une probabilité d'émission de fluorescence qui varient en fonction de la longueur d'onde λ incidente (*Valeur, 2004*).

Après avoir absorbé l'énergie, la molécule excitée retourne vers son état fondamental par relaxation vibrationnelle de l'électron excité qui retourne vers une orbitale moléculaire de plus faible énergie.

Le diagramme de Jablonski (Figure B-6-2) montre le processus d'absorption, de relaxation et d'émission de fluorescence d'une molécule.



Figure B-6-2 : Diagramme de Jablonski [www.olympusmicro.com]

L'état S₀ correspond à l'état fondamental et les états S₁ et S₂ correspondent aux états excités. Lorsque la molécule absorbe la lumière, elle passe de l'état S₀ à S₁ par exemple puis il s'en suit une relaxation vibrationnelle dans l'état S₁ puis une émission de fluorescence quand la molécule revient vers l'état fondamental (S₁-> S₀). Du fait de la perte d'énergie par relaxation vibrationnelle, l'énergie restituée est plus basse et donc, le spectre de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus élevées que le spectre d'excitation (spectre d'absorption). L'écart entre le maximum d'absorption et le maximum d'émission est appelé déplacement de Stokes (Figure B-6-3).



Figure B-6-3 : Illustration du déplacement de Stokes à travers les spectres d'absorption et d'émission de la quinine [www.olympusmicro.com]

Plus le déplacement de stokes est grand, plus l'émission de fluorescence sera facile à observer car il y a moins de bruit de fond dû au chevauchement du spectre d'absorption avec le spectre d'émission. Au cours du temps, l'émission de fluorescence décroît de façon exponentielle jusqu'à son extinction. Le temps de déclin de fluorescence est caractéristique de chaque molécule fluorescente (*Valeur, 2004*). L'excitation de molécule fluorescente peut se faire de manière répétée tant que le fluorophore n'est pas altéré. Lorsque le fluorophore est altéré suite à son exposition à la lumière, on parle de photoblanchiment. Cela induit un déclin du signal de fluorescence observé jusqu'à son extinction. D'autres phénomènes que le photoblanchiment peuvent entrer en jeu et rendre l'émission de fluorescence du fait des conditions environnementales comme la force ionique et le pH du tampon, la composition des solvants ou la présence d'autres fluorophores. Contrairement au photoblanchiment, le « quenching » est un phénomène réversible.

L'intensité de fluorescence mesurée dépend de la molécule analysée et de sa quantité mais également de l'appareil utilisé pour réaliser la mesure. Dans la plupart des cas, l'excitation de la molécule conduisant à l'émission de fluorescence se fait par un laser à une longueur d'onde donnée. Les outils utilisés pour mesurer la fluorescence dans le travail présenté ici sont décrits dans la section suivante.

V

B.2 Outils de détection de fluorescence utilisés pour ce projet

B.2.1. Détection par cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une méthode usuelle pour mesurer la fluorescence d'un échantillon. Elle permet l'analyse des propriétés optiques d'éléments individualisés en suspension lorsqu'ils passent à travers un rayon laser. L'appareil utilisé est un cytomètre de flux et comporte trois parties (Figure B-6-4). La partie fluidique comprend une buse dans laquelle est injecté un liquide de gaine qui crée un canal fluidique sans paroi rigide dans lequel passe l'échantillon. La taille de ce canal peut être ajustée de manière à être comparable à celle des éléments à analyser contenus dans l'échantillon (dans notre cas des particules individualisées ou des sandwichs). La partie optique du cytomètre de flux comporte un ou plusieurs lasers qui sont focalisés en un point de la buse grâce à un réseau de lentilles et de prismes. Lorsque les particules passent de manière individualisée devant le faisceau laser, une partie de la lumière diffusée est récoltée dans l'axe du laser par une photodiode ce qui permet d'obtenir des informations sur la taille et la forme de la particule (réseau en bleu sur la Figure B-6-4). Le paramètre ainsi collecté est appelé Forward Scattered Light (FSC). Une autre partie de la lumière est collectée à 90° par rapport au faisceau laser et est relayée vers un réseau de photodétecteurs et de photomultiplicateurs (réseau en jaune sur la Figure B-6-4). Cela permet de collecter des données sur la granularité interne et externe des particules (SSC pour Side Scattered Light) et sur leur fluorescence. Les données récoltées sont ensuite traitées informatiquement puis représentées sous forme de nuage de points ou d'histogramme d'intensité de fluorescence. De cette manière, il est possible de différencier plusieurs populations dans un même échantillon. Certains cytomètres sont équipés d'une fonction de tri qui récolte séparément différentes populations contenues dans un échantillon afin de les purifier ou de les concentrer. Le tri se fait par polarisation de la goutte suivant les paramètres optiques mesurés. La goutte a alors une charge positive ou négative et un champ magnétique la dévie vers un tube ou un autre suivant sa polarité (voir Figure B-6-4) (Ronot et al, 2006).



Figure B-6-4: représentation schématique d'un cytomètre de flux, [http://www.ifr87.cnrsgif.fr/pbc/equipement/cytometre.html]

La cytométrie de flux permet d'analyser des échantillons de manière dynamique (en flux). Suivant le type d'appareil utilisé, il est possible de lire jusqu'à trois fluorescences simultanées. C'est un outil de choix pour la détection multiple de molécules et pour compter ou trier des particules. De plus, la cytométrie est une méthode rapide et utilise peu d'échantillon. L'analyse est toutefois limitée à des particules dont la taille est comprise entre 500 nm et 14 μ m. De plus, l'échantillon analysé doit contenir peu d'impureté pour limiter le bruit de fond.

La cytométrie de flux est très utilisée pour le diagnostic hématologique car elle permet de séparer facilement les différentes populations de leucocytes. Elle est également très utilisée en biologie pour l'analyse de cellules.

Dans notre projet, la cytométrie de flux est utilisée comme méthode de détection de référence. La fluorescence des sandwichs formés en présence d'ADN cible entre la particule magnétique et la particule fluorescente est mesurée par cette méthode. Le cytomètre de flux utilisé est un cytomètre BD Facs Canto II de la marque Becton Dickinson situé à l'Établissement Français du sang Rhône-Alpes au site de Gerland à Lyon. Ce cytomètre comporte un laser à 488 nm et un laser à 633 nm et à une résolution de 1 μ m en FSC (taille) et de 0,5 μ m en SSC (granularité). La vitesse du flux appliquée peut varier entre 10 μ l / min

et 120 μ l / min. Le volume mort du système de fluidique est de 30 μ l. Environ 50 μ l de solution sont nécessaire pour analyser nos échantillons. Nous faisons les mesures sur l'acquisition de 20 000 éléments ce qui dure moins de 30 sec pour les échantillons que nous analysons. Les résultats obtenus sont analysé avec le logiciel BD Facs Diva software 4-2-2 de Becton Dickinson et le logiciel FSC Express 4 Flow Research Edition de De Novo.

B.2.2. Détection par Scanner de fluorescence

Les scanners de fluorescence sont équipés de lasers qui balaient la surface d'un support transparent sur lequel se trouve le dépôt sec d'une solution contenant les fluorophore.

Pour les mesures de fluorescence de nos échantillons, nous utilisons le scanner Innoscan 710 de la société Innopsys. Il s'agit d'un scanner à détection confocale. Il est équipé de deux photomultiplicateurs très sensibles et d'un autofocus dynamique qui lui permet de s'ajuster en fonction des changements (thermiques, mécaniques...) qui peuvent causer des fluctuations du signal (Figure B-6-5). Cela permet de réduire le bruit de fond et d'avoir une homogénéité de lecture sur toute la surface du substrat. Le scanner possède deux lasers : un laser à 532 nm et un laser à 635 nm. La lame peut être scannée simultanément ou de manière séquentielle avec ces deux lasers. Le signal de fluorescence obtenu est traité grâce au logiciel Mapix 4Go.

Pour la mesure de nos échantillons, un volume de 1µl de solution préalablement diluée est déposé sur une lame de verre et séché à l'air libre. L'analyse est faite de manière séquentielle et prend environ trois minutes par lame.



Figure B-6-5 : Schéma de fonctionnement d'un scanner de fluorescence à détection confocale. (www.arrayit.com)

B.2.3. Détection par un biocapteur à onde évanescente, l'Evareader

L'Evareader est un biocapteur développé par Davos Diagnostics dont le principe est basé sur l'excitation par ondes évanescentes de fluorophores proches de la surface d'un prisme ou lié à celle-ci. La réaction se passe dans une barrette appelée EVA-chip (Figure B-6-6 A). Il s'agit d'une barrette en polystyrène composée de deux parties : une partie supérieure comportant les puits dans lesquels seront introduits l'échantillon et une partie inférieure composée d'un prisme optique. Une EVA-chip comporte huit puits. Pour réaliser la détection de fluorescence, l'EVA-chip est introduite dans un Evareader (Figure B-6-6 B) qui est composé entre autre d'un laser à une longueur d'onde de 635 nm. Lorsque le faisceau laser frappe l'interface entre le liquide contenu dans le puits et le prisme, sa lumière est diffusée dans une autre direction. Quelques photons issus du faisceau laser pénètrent dans la couche liquide du puits formant un champ évanescent de 200 nm au-dessus de l'interface entre le liquide et le prisme (Figure B-6-6 C). Si des fluorophores se trouvent dans ce champ évanescent, ils sont excités par les photons du laser et émettent à leur tour des photons qui sont détectés par un détecteur placé sous le prisme. Afin d'avoir le maximum de fluorophores dans le champ évanescent, la surface du prisme est biofonctionnalisée de manière à immobiliser les fluorophores au fond du puits de l'EVA-chip grâce à des interactions biologiques (de type neutravidine-biotine, antigène anticorps...). Lors de la mesure de fluorescence par l'Evareader, la barrette se déplace et chaque puits est analysé cycliquement à raison d'une seconde par puits. Au cours du temps, de plus en plus de fluorophores sont immobilisés au fond du puits et la cinétique de fluorescence (et donc de l'immobilisation des fluorophores) est mesurée en temps réelle pour chaque puits. Les résultats sont présentés sous la forme de graphiques représentant l'intensité de fluorescence en fonction du temps. En moyenne, une analyse dure de 10 min à 15 min. Un volume d'échantillon de 25 µl minimum et 80 µl maximum est nécessaire pour l'analyse. L'Evareader a l'avantage de réduire les étapes de manipulations, de purifications et de lavages souvent nécessaires avant la détection avec d'autres types de méthodes.



Figure B-6-6 : A) Photos des EVA-chip servant de support pour l'analyse ; B) Evareader, support dans lequel sont introduites les EVA-chip et où la fluorescence pourra être lue en temps réel (© Davos Diagnostics) ; C) Schéma de la détection de la technique de détection de fluorescence dans un puits d'une EVA-chip (©Davos Diagnostics).

UTILISÉS

ANNEXE C RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES UTILISÉS

C.1 Caractérisation des particules

C.1.1. Particules fluorescentes

• Spectre UV-vis des particules fluorescentes

Le spectre UV des particules fluorescentes est réalisé avec un spectrophotomètre UVvis SAFAS MONACO entre 250 nm et 800 nm dans une microcuve en quartz de 1 mm (5µl de solution) de trajet optique et un pas de 5 nm. Le spectre présenté ici (Figure C-6-7) correspond à une solution ayant une concentration de 8.10^8 Particules / ml soit 4.10^6 particules dans la cuve.





Le maximum d'absorbance de la solution est observé à 425 nm. Une courbe de calibration est réalisée à cette longueur d'onde (425 nm) pour pouvoir par la suite évaluer la concentration en particules dans les échantillons après les étapes de lavage et de fonctionnalisation.





D'après la courbe de calibration (Figure C-6-8) et la loi de Beer-Lambert (C-6) on en déduit que le coefficient d'extinction molaire des particules est de $5,6.10^{12}$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ (C-7).

$$A_{\lambda} = \varepsilon C l \tag{C-6}$$

Où A_{λ} est l'absorbance, ϵ est le coefficient d'extinction molaire en L.mol⁻¹.cm⁻¹, C est la concentration en mol.L⁻¹, et l est la longueur de la cuve en cm.

$$\varepsilon = a/l$$
 (C-7)

Où a est la pente de la courbe de calibration.

Par la suite, la concentration en particules dans la solution pourra être déduite grâce à la relation suivante :

$$C = \frac{A_{\lambda}}{\varepsilon l} \tag{C-8}$$

• Mesures de fluorescence à 635 nm et 532 nm des particules fluorescentes

Les mesures de fluorescence sont réalisées à 635 nm et 532 nm avec un scanner de fluorescence Innoscan (Innopsys). 1µl de solution de particules fluorescentes est déposé sur une lame de verre préalablement lavée. Le dépôt sèche à l'air libre puis la lame est scannée. Les gains sont de 1 pour les différents PMT, la puissance du laser est basse, la vitesse de scan est de 35 et la résolution est de 40 μ m.



Figure C-6-9 : Mesures de la fluorescence du tampon (PBS 03X) et des particules fluorescentes au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nm.

Les résultats obtenus au scanner de fluorescence montrent que le tampon n'a pas de contribution de fluorescence et que les particules ont bien une fluorescence à 635 nm et ne présentent pas de fluorescence significative à 532 nm.

• Mesures de cytométrie des particules fluorescentes

Les particules fluorescentes sont analysées en cytométrie sur un cytomètre BD Facs Canto II (Becton Dickinson). L'analyse est faite sur 20 000 éléments avec un voltage de 435 pour le canal SSC qui permet de discriminer la taille des particules, 484 pour le canal FSC qui permet de discriminer leur fluorescence et 319 pour le canal FL4 qui permet de discriminer leur fluorescence à 633 nm.

ANNEXE C : RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES

UTILISÉS



Figure C-6-10 : Mesure de cytométrie du tampon PBS 0.3X et des particules fluorescentes. A) Mesures en fonction de la taille et de la granularité, B) Mesures en fonction de la fluorescence et de la granularité et C) Histogrammes de fluorescence avec le pourcentage de particules détectées.

Les résultats de caractérisation en cytométrie de flux montrent que le tampon n'a pas de contribution que l'analyse soit faite en taille ou en fluorescence. Les particules fluorescentes sont légèrement polydisperses en taille et en fluorescence. Elles sont bien visibles en fluorescence à 633 nm comme attendu.

C.1.2. Particules magnétiques

<u>Spectre UV-vis des particules magnétiques</u>

Le spectre UV des particules magnétiques a été réalisé avec un spectrophotomètre UV-vis SAFAS MONACO entre 250 nm et 800 nm dans une microcuve en quartz de 1 mm (5µl de solution) de trajet optique et un pas de 5 nm. Le spectre présenté ici (Figure C-6-11) correspond à une solution ayant une concentration de 2.10^7 Particules / ml soit 1.10^5 particules dans la cuve.
ANNEXE C : RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES

UTILISÉS



Figure C-6-11 : Spectre UV d'une solution de particules magnétiques à 2.10⁷ particules / ml dans le PBS réalisé avec 5 µl de solution dans une microcuve en quartz ayant un trajet optique de 1 mm.

Le maximum d'absorbance de la solution est observé à 400 nm.

• Mesures de fluorescence à 635 nm et 532 nm des particules magnétiques

Les mesures de fluorescence sont réalisées à 635 nm et 532 nm avec un scanner de fluorescence Innoscan (Innopsys). 1µl de solution de particules magnétiques est déposé sur une lame de verre préalablement lavée. Le dépôt sèche à l'air libre puis la lame est scannée. Les gains sont de 1 pour les différents PMT, la puissance du laser est basse, la vitesse de scan est de 35 et la résolution est de 40 µm.



Figure C-6-12 : Mesures de la fluorescence du tampon (PBS 03X) et des particules magnétiques au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nm.

Les résultats obtenus au scanner de fluorescence montrent que le tampon n'a pas de contribution de fluorescence et que les particules n'ont pas de fluorescence significative à 635 nm et à 532 nm.

Mesures de cytométrie des particules magnétiques

Les particules magnétiques sont analysées en cytométrie sur un cytomètre BD Facs Canto II (Becton Dickinson). L'analyse est faite sur 20 000 éléments avec un voltage de 435 pour le canal SSC qui permet de discriminer la taille des particules, 484 pour le canal FSC qui permet de discriminer leur fluorescence et 319 pour le canal FL4 qui permet de discriminer leur fluorescence à 633 nm.



Figure C-6-13 : Mesure de cytométrie du tampon PBS 0.3X et des particules magnétiques. A) Mesures en fonction de la taille et de la granularité, B) Mesures en fonction de la fluorescence et de la granularité et C) Histogrammes de fluorescence avec le pourcentage de particules détectées.

Les résultats de caractérisation en cytométrie de flux montrent que le tampon n'a pas de contribution que l'analyse soit faite en taille ou en fluorescence. Les particules UTILISÉS

magnétiques sont légèrement polydisperses en taille et ne présentent pas de fluorescence à 633 nm.

C.2 Caractérisation des oligonucléotides (ODN)

Les oligonucléotides utilisés sont les suivants :

Oligonucléotides	Nb de bases	Séquence (5' -> 3')	
<i>Sonde a</i> (complémentaire HPA-1a)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCCAGGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂	
Sonde b (complémentaire HPA-1b)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCC <u>G</u> GAGGCAGGGCCT –C₆–NH 2	
<i>Sonde de capture</i> (complémentaire HPA-1)	36	NH₂–C ₆ –GGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCC	
Cible a (oligonucléotide HPA-1a)	83	Cy3 -GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAA GGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA	

• Spectre UV-vis des ODN

Les spectres UV des ODN ont été réalisés avec un spectrophotomètre UV-vis SAFAS MONACO entre 200 nm et 800 nm dans une microcuve en quartz de 1 mm (5µl de solution) de trajet optique et un pas de 5 nm. Les spectres présentés ici (Figure C-6-14) correspondent à une solution ayant une concentration de 15 µM ou 2,5 µM.

ANNEXE C : RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES

UTILISÉS



Figure C-6-14 : Spectre UV de solutions d'ODN dans le PBS 0.3X réalisé avec 5 µl de solution dans une microcuve en quartz ayant un trajet optique de 1 mm.

Un maximum d'absorbance est observé pour chaque ODN à 260 nm, il s'agit de l'absorbance caractéristique de l'ADN. Pour la *sonde a* et la sonde b, un pic est observé aux alentours de 650 nm qui correspond au Cy5. Pour la cible, un pic est observé aux alentours de 550 nm ce qui correspond au Cy3. Des courbes de calibration sont réalisées pour les *sondes a* et b et la cible à 260 nm (Figure C-6-15) pour pouvoir par la suite évaluer la concentration en ODN dans les témoins après les étapes de fonctionnalisation et de formation des sandwichs.

ANNEXE C : RÉSULTATS DE CARACTÉRISATION DES PARTICULES ET DES OLIGONUCLÉOTIDES

UTILISÉS



Figure C-6-15 : Courbe de calibration des ODN dans le PBS en UV-vis à 260 nm.

Mesures de fluorescence à 635 nm et 532 nm des ODN

Les mesures de fluorescence sont réalisées à 635 nm et 532 nm avec un scanner de fluorescence Innoscan (Innopsys). 1 μ I de solution d'ODN sont déposés sur une lame de verre préalablement lavées. Le dépôt séche à l'air libre puis la lame est scannée. Les gains sont de 1 pour les différents PMT, la puissance du laser est basse, la vitesse de scan est de 35 et la résolution est de 40 μ m.



Figure C-6-16 : Mesures de la fluorescence des ODN au scanner de fluorescence à 532 nm et 635 nm.

Les résultats obtenus au scanner de fluorescence montrent que la *sonde de capture* n'est pas fluorescente. Les *sondes a* et b présentent une fluorescence à 635 nm et la cible présente une fluorescence à 532 nm comme attendu.

ANNEXE D PROTOCOLE COMPLET DE CAPTURE D'ADN À L'AIDE DE PARTICULES FONCTIONNALISÉES

D.1 Matériels

Tampons :

PBS 1X (0.01M, NaCl = 0.138M, KCl = 0.0027M, pH = 7.4; Sigma, France); SSC 20 x $(Na_3C_6H_5O_7 = 0.3 \text{ M}, NaCl = 3M, pH = 7; Sigma, France)$

Tous les tampons et toutes les solutions ont été préparés avec de l'eau ultra pure (18.2 MΩ.cm) purifiée par le système Purelab ultra.

<u> Réactifs :</u>

N-Hydroxysuccinimide (NHS, pur à 97%, PM = 115.09 g/mol ; Sigma, France) ; 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDCI, PM = 297.18 g/mol ; Sigma, France) ; Bovin Serum Albumine (BSA, pH = 7 ; Sigma, France) ; Tween[®] 20 (Roth, France) ; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, pur à 96 %, PM = 288.38 g/ mol ; Sigma, France)

Particules :

Particules magnétiques (1 μ m, 20 mg /ml, 2.10⁹ particules / ml, 4.8 μ mol COOH / ml ; Sigma, France) ; particules fluorescentes (1 μ m, % solide = 2, 3,6.10¹⁰ particules / ml, 3,63 μ mol COOH / ml ; Molecular Probes[®] - Life Technologies)

Oligonucléotides :

Tous les oligonucléotides proviennent de chez Eurogentec, Belgique.

Oligonucléotides	Nb de bases	Séquence (5' -> 3')
<i>Sonde a</i> (complémentaire HPA-1a)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCC <u>A</u> GAGGCAGGGCCT–C ₆ –NH ₂
Sonde b (complémentaire HPA-1b)	36	Biotine-Cy5-TTTTTCGAGGTGAGCCC <u>G</u> GAGGCAGGGCCT -C₆-NH 2
<i>Sonde de capture</i> (complémentaire HPA-1)	36	NH₂-C ₆ -GGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCC
Cible a (oligonucléotide HPA-1a)	83	Cy3- GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGTGACCTGAA GGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA

Matériel :

Thermomixer (Thermomixer Comfort 1.5 ml; Eppendorf); Scanner de fluorescence (Innoscan 710; Innopsys); Spectrophotomètre UV (Spectrophotomètre UV mc²; Safas – Monaco); Centrifugeuse (Centrifugeuse Sigma 2-16pk; Sigma, France); Evareader (Davos Diagnostics, Suisse); Aimant néodyme (NdFeB, 1T); Cytomètre de flux (Facs Canto II, Becton Dickinson).

D.2 Préparation des tubes Eppendorf

Afin de limiter l'adsorption des réactifs (particules et oligonucléotides) sur les parois des tubes de réaction ou de stockage, ceux-ci sont préalablement bloqués avec de la BSA. Une solution de BSA à 4% (m/v) et 0,2 % (v/v) en Tween 20 est préparée dans du PBS 1X (pH 7,4). Les tubes Eppendorf de 2 ml nécessaires à la réalisation de la réaction sont remplis avec la solution de BSA et sont incubés pendant au moins 2h à 37°C. Ensuite les tubes sont vidés, rincés avec du PBS 0.3X et séchés avant utilisation.

D.3 Fonctionnalisation des particules magnétiques et des particules fluorescentes

La fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes se fait par greffage covalent d'ODN à la surface des particules via une chimie NHS / EDCI dont la réaction est écrite ci-dessous :



FONCTIONNALISÉES

Figure D-6-17 :Réaction chimique de la fonctionnalisation des particules magnétiques et fluorescentes avec des ODN par voie chimique utilisant l'EDCI et le NHS.

Le protocole de fonctionnalisation pour chaque particule est décrit ci-après.

• Pour les particules magnétiques :

- Introduire 10 μ l de la solution commerciale (soit environ 2.10⁷ particules) dans un tube Eppendorf bloqué à la BSA et contenant 490 μ L d'eau ultra pure.

- Réaliser une séparation magnétique avec aimant néodyme, enlever le surnageant et resuspendre les particules dans 500 μl d'eau ultra pure. La procédure de lavage est répétée trois fois.

- Après le dernier lavage, les particules sont reprises dans 382,5 µL de PBS 0,3X.

- Caractérisation des particules par analyse au scanner fluorescence

- Ajouter 42.5 μl d'une solution d'EDCI / NHS (0.5/1 ; M/M) dans du PBS 0,3X préparée extemporanément et laisser incuber 30 min sous agitation de 550 rpm à 25°C dans un thermomixer.

- Au bout de 30 min ajouter 75 μ l de solution d'ODN de capture à 100 μ M dans du PBS 0,3X dans les tubes de réaction. La concentration finale en ODN dans le tube est de 15 μ M. Laisser incuber 4h sous agitation de 550 rpm à 25°C dans un thermomixer.

Réaliser une séparation magnétique avec aimant néodyme, enlever le surnageant et le conserver pour l'analyser au scanner de fluorescence. Resuspendre les particules dans 500 μl de PBS 0,3X. La procédure de lavage est répétée trois fois.

- Après le dernier lavage, les particules sont reprises dans 500 μL de PBS 0,3X.

- Caractérisation des particules par analyse au scanner fluorescence

- Évaluation du taux de greffage par analyse de la fluorescence des surnageants (voir D.5)

• Pour les particules fluorescentes :

- Introduire 20 μ l de la solution commerciale (soit environ 7,2.10⁸ particules) dans un tube Eppendorf bloqué à la BSA et contenant 980 μ L d'eau ultra pure.

- Centrifuger pendant 10 min à 2000 \vec{g} , enlever le surnageant et resuspendre les particules dans 500 μ l d'eau ultra pure. La procédure de lavage est répétée trois fois.

- Après le dernier lavage, les particules sont reprises dans 382,5 μL de PBS 0,3X.

- Mesures de la concentration en particules par analyse UV à 425 nm

- Caractérisation des particules par analyse au scanner fluorescence

- Ajouter 42.5 μl d'une solution d'EDCI / NHS (0.5/1 ; M/M) dans du PBS 0,3X préparée extemporanément et laisser incuber 30 min sous agitation de 550 rpm à 25°C dans un thermomixer.

- Au bout de 30 min ajouter 75 μ l de solution d'ODN de capture à 100 μ M dans du PBS 0,3X dans les tubes de réaction. La concentration finale en ODN dans le tube est de 15 μ M. Laisser incuber 4h sous agitation de 550 rpm à 25°C dans un thermomixer.

- Centrifuger pendant 10 min à 2000 \vec{g} , enlever le surnageant et le conserver pour l'analyser au scanner de fluorescence. Resuspendre les particules dans 500 μ l de PBS 0,3X. La procédure de lavage est répétée trois fois.

- Après le dernier lavage, les particules sont reprises dans 500 µL de PBS 0,3X.

- Mesures de la concentration en particules par analyse UV à 425 nm

- Centrifuger pendant 10 min à 2000 \vec{g} et reprendre les particules dans le tampon de manière à avoir 1,29.10⁸ particules dans 20 µl.

- Caractérisation des particules par analyse au scanner fluorescence

- Évaluation du taux de greffage par analyse de la fluorescence des surnageants (voir D.5)

D.4 Formation des sandwichs

- Introduire 2.10⁶ BM fonctionnalisées dans le PBS 0,3X avec les ODN de capture dans un tube Eppendorf préalablement bloqué à la BSA

- Ajuster le volume à 45 μl

- + 5 μ L de *cible a* à 25 μ M (Concentration finale en cible dans le tube = 2,5 μ M) dans le PBS 0,3X

- Hybrider sous agitation à 550 rpm pendant 2h à 45°C dans un thermomixer

- Attirer les demi-sandwichs formés avec un aimant néodyme , retirer le surnageant pour enlever les cibles en excès et le conserver pour l'analyser au scanner de fluorescence

- Faire le lavage suivant :

- + 100 μL de PBS 0,3X , séparation magnétique et retrait du surnageant

- Ajouter 30 μL de PBS 0,3X

- Caractérisation des demi-sandwichs par analyse au scanner fluorescence

- + 20 μL de BF (soit 1,29.10⁸ particules) dans le PBS 0,3X

- Hybrider sous agitation à 550 rpm pendant 2h à 45°C dans un thermomixer

- Attirer les sandwichs formés avec un aimant et retirer le surnageant pour enlever les BF en excès

- Faire les lavages suivants :

- + 100 μL de tampon PBS 0,07X

- Agitation à 550 rpm pendant 10 min à 58°C dans un thermomixer, séparation magnétique et retrait du surnageant

- + 100 μL de tampon PBS 0,07X

- Agitation à 550 rpm pendant 10 min à 58°C dans un thermomixer, séparation magnétique et retrait du surnageant

- Ajouter 200µL de tampon PBS 0,07X

- Transférer la solution de sandwichs dans un nouveau tube Eppendorf bloqué et entouré d'aluminium

- - Caractérisation des sandwichs par analyse au scanner fluorescence

- Mesures à l'Evareader

- Mesures en cytométrie de flux

D.5 Caractérisation de la fonctionnalisation / de l'hybridation

Le taux de greffage des ODN suite à la fonctionnalisation des surnageants ainsi que la quantité de cible hybridée lors de la formation des sandwichs sont estimés par analyse de fluorescence des surnageants. La Figure D-6-18 schématise la démarche utilisée.

Dans chaque cas, la solution d'ODN est préparée dans le tampon de réaction. La solution d'ODN est introduite dans les tubes contenant les particules et un témoin comprenant uniquement des ODN dans le tampon est réalisé. La concentration en ODN de ce témoin est mesurée par UV-vis grâce aux courbes de calibration préalablement réalisées (voir ANNEXE C). Après le processus de fonctionnalisation ou d'hybridation, les surnageants contenant les ODN non fixés sur les particules sont récupérés et analysés.

Comme au cours du greffage ou de l'hybridation les ODN sont mis en présence de solution complexes contenant divers réactifs ayant une contribution optique en UV (solution d'activation, etc...) la concentration en ODN dans le surnageant ne peut pas être mesuré par UV. Les ODN sondes sont marqués avec un fluorophore Cy5 et la cible est marquée avec un Cy3. La concentration en ODN dans les surnageants peut donc être évaluée par mesure de fluorescence à 635 nm pour les sondes et à 532 nm pour la cible. Le témoin dont on connait la concentration et les surnageants sont déposés sur une lame de verre et la fluorescence est analysée par scanner de fluorescence. L'estimation est faite que la fluorescence obtenue est proportionnelle à la quantité d'ODN présente dans la solution analysée. On en déduit la concentration en ODN sur les particules. La Figure D-6-18 illustre cette façon de procéder lors du greffage des sondes sur les particules. Le processus est le même pour l'estimation de l'hybridation de la cible avec les particules.

XXVI

Afin de différencier l'adsorption non spécifique des sondes sur les particules de leur greffage covalent, deux échantillons sont réalisés. Un échantillon sert de témoin négatif et est seulement traité au tampon PBS puis mis en contact avec des ODN sondes (pas de greffage chimique, adsorption non spécifique). Le deuxième échantillon est fonctionnalisé de manière covalente avec les sondes. Lors de l'hybridation de la cible un échantillon est réalisé avec les particules témoins et un échantillon est réalisé avec les particules fonctionnalisées.



Figure D-6-18 : Évaluation du greffage des ODN-cy5 sur les particules par UV-visible et mesures de la fluorescence des surnageants. La concentration introduite (témoin = ODN-cy5 dans le tampon) est déterminée par UV-vis. Le témoin et les surnageants d'ODN-cy5 sont déposés sur une lame de verre et la fluorescence est mesurée par un scanner de fluorescence à 635 nm. On estime que la fluorescence est proportionnelle aux nombres d'ODN-cy5 présents dans la solution. On en déduit ainsi le nombre d'ODN dans les surnageants et donc le nombre d'ODN sur les particules.

Les particules magnétiques sont normalement fonctionnalisées avec des ODN de capture qui ne sont pas fluorescents. Afin d'évaluer le taux de greffage des ODN sur les particules magnétiques, celles-ci ont été greffées avec des ODN fluorescents (sonde a).

D.6 Analyse de la fluorescence

D.6.1. Par scanner de fluorescence

Avant le dépôt des solutions à analyser, les lames de verre sont lavées à l'acétone, l'éthanol et l'eau DI puis séchées à l'azote. Leur fluorescence propre est mesurée à 635 nm et 532 nm avec les mêmes paramètres que ceux utilisés lors de l'analyse des solutions afin d'évaluer le bruit de fond.

Afin de ne pas saturer le signal et d'avoir un séchage uniforme des solutions contenant les particules sur les lames, celles-ci sont préalablement diluées de la manière suivante en mélangeant 1,85 μ l de l'échantillon avec 1, 35 μ l de SDS 8% et 14,8 μ l de tampon. 1 μ l de ces dilutions sont déposés en triplicata sur les lames. Lorsque les dépôts sont secs, les lames sont analysées au scanner de fluorescence Innoscan 710 (Innopsys) avec les paramètres décrits dans le Tableau D-6-3.

Tableau D-6-3 : Paramètres de mesures de la fluorescence avec le scanner Innoscan 710

Paramètres	Laser à 532 nm	Laser à 635 nm	
Puissance	basse	Basse	
Gain	1	1	
Résolution	40 μm		
Vitesse	35		
Focus	Focus manuel = 0		
Acquisition	séqu	entielle	

Les résultats sont analysés grâce au logiciel Mapix 4Go. La fluorescence de chaque dépôt est analysée de la manière suivante pour chaque longueur d'onde :

Fluorescence corrigée = Intensité de fluorescence totale du dépôt Intensité de fluorescence totale de la lame avant le dépôt

D.6.2. Par cytométrie de flux

Les mesures de cytométrie sont réalisées avec un cytomètre BD Facs Canto II de situé à l'Établissement Français du Sang site de Gerland à Lyon. Les échantillons sont transférés dans des tubes en polypropylène adaptés au cytomètre. La mesure est réalisée selon les paramètres du Tableau D-6-4. Les résultats sont analysés avec le logiciel BD Facs Diva Software de Becton Dickinson et le logiciel FSC Express 4 Flow Research Edition de De Novo.

Paramètres	SSC	FSC	FL4
Nombre d'éléments acquis		20 000	
Voltage	435	484	319
Ligne de base		200	
Unités		Log /log	

Tableau D-6-4 : Paramètres de mesures en cytométrie de flux

D.6.3. Par Evareader

Les mesures se font avec des barrettes appelées EVA-chip. Avant de réaliser la mesure et afin d'assurer l'immobilisation des particules au fond des EVA-chips, il est d'abord nécessaire de les fonctionnaliser avec de la neutravidine.

Les puits des EVA-chips sont remplis avec 50 μ l de neutravidine à 10 μ g / ml dans du PBS 1X. Les EVA-chips sont incubées pendant 1 nuit à température ambiante avec la neutravidine. Ensuite les EVA-chip sont lavées quatre fois avec du PBS 1X puis elles sont remplies avec 80 μ l d'une solution de BSA 1% + Tween 20 0.25% dans du PBS 1X et elles sont incubées pendant 1h à température ambiante. Les EVA-Chips sont ensuite lavées deux fois avec du PBS 1X puis deux fois avec une solution de sucrose 1%. Elles sont ensuite prêtes à être utilisées.

Les EVA-chip contiennent 8 puits. Les deux premiers puits sont remplis avec 25 μ l d'une solution d'ODN à 0, 05 μ M et d'ODN-biotine à 0,05 μ M qui servent respectivement de témoin négatif et de témoin positif afin d'évaluer la fonctionnalisation des barrettes. Dans les autres puits, 25 μ l d'échantillons sont introduits et la mesure est faite instantanément pendant 15 minutes. Les résultats sont ensuite analysés dans un tableur Excel.

ANNEXE E CALCUL DE LA VITESSE DE CENTRIFUGATION SELON LA LOI DE STOKES

La loi de Stokes est une loi physique permettant de calculer la vitesse de chute v_{chute} (en cm/sec) d'un objet dans un liquide, ici l'eau. Elle est représentée par l'équation suivante :

$$v_{\rm chute} = \frac{2r^2 \vec{g} \Delta(\rho)}{9\eta}$$
(E-9)

Où r est le rayon de l'objet en cm (ici 5.10⁻⁵ cm), \vec{g} est l'accélération de la pesanteur soit 980 cm/sec², $\Delta(\rho)$ est la différence de masse volumique entre la particule (ps=1.05 g/cm3) et le liquide (ici on estime que ρ l=1 g / cm3) et η est la viscosité dynamique du liquide soit 0.01 poise.

On a donc dans notre cas :

$$v_{\rm chute} = 2,77.10^{-6} \, cm/sec$$
 (E-10)

C'est-à-dire que sans centrifugation, une particule de 1 μ m de diamètre chute de 2,77.10⁻⁶ cm / sec dans l'eau. Pour calculer la vitesse de centrifugation v on utilise la formule suivante :

$$v = v_{\text{chute}} * G \tag{E-11}$$

Ou G est la force centrifuge soit le multiple l'accélération de la pesanteur \vec{g} .

Notre tube est rempli sur une hauteur de 2 cm et l'on souhaite réaliser la centrifugation pendant 10 min pour ne pas abimer les particules et qu'elles se déposent lentement sans trop augmenter le temps de l'essai. On souhaite donc que la particule chute selon une vitesse v de 3,33.10⁻³ cm/sec. A partir de l'équation (E-7) on en déduit la force centrifuge à appliquer qui est de 1223 \vec{g} . Ces calculs sont des indications sur les vitesses de centrifugation à utiliser et ne prennent pas en compte le mouvement brownien des particules ni leur concentration qui peuvent affecter la sédimentation des particules lors de la centrifugation. Afin d'être sûr d'avoir un culot de particules acceptable qui ne se redisperse pas trop vite et afin de ne pas trop affecter les particules nous nous placerons à 2000 \vec{g} .

ANALYSÉES

ANNEXE F CALCUL DU NOMBRE DE PARTICULES FLUORESCENTES CAPTURÉES ET ANALYSÉES

• <u>Calcul théorique du nombre de particules capturées suite au processus de formation</u> <u>des sandwichs</u>

$$P = \left[\frac{(N_{cible int} * R_{sandw45}) * R_{sanwd58}}{N_{sondes th}}\right]$$
(F-12)

Où *P* est le nombre de particules fluorescentes capturées suite au processus de formation des sandwichs, $N_{cible int}$ est le nombre de cible introduite (soit 7,5.10¹³ cibles), $R_{sandw45}$ et $R_{sandw58}$ sont respectivement les rendements de formation des sandwichs à 45°C et à 58°C déterminés par les simulations réalisées avec DINAMelt, $N_{sondes th}$ est le nombre théorique de sondes immobilisées à la surface des particules (soit 2500 sondes si on considère que le taux de greffage des particules est de 10¹¹ sondes / cm² (*Dugas et al, 2004*)).

<u>Calcul du nombre de particules capturées suite au processus de formation des</u> <u>sandwichs</u>

$$P = \left[\frac{N_{cible} * R_{sanwd58}}{N_{sondes}}\right]$$
(F-13)

$$P_{anal} = P * \frac{V_{anal}}{V_{sol}}$$
(F-14)

Où *P* est le nombre de particules fluorescentes capturées suite au processus de formation des sandwichs, N_{cible} est le nombre de cible capturée par les *sondes de capture* déterminé expérimentalement (voir chapitre 4), $R_{sandw58}$ est le rendement de formation des sandwichs à 58°C déterminé par les simulations réalisées avec DINAMelt (voir chapitre 3), N_{sondes} est le nombre de sondes immobilisées à la surface des particules déterminé de manière expérimentale (voir Chapitre 4), P_{anal} est le nombre de particules analysée, V_{anal} est le

volume nécessaire lors de l'analyse de l'échantillon et V_{sol} est le volume de solution finale après le processus de formation des sandwichs.

Les différents paramètres en fonction de la méthode d'analyse utilisée sont détaillés dans les tableaux suivants :

Tableau F-6-5 : Paramètres nécessaires au calcul du nombre de particules fluorescentes capturées suite au processus de formation des sandwichs

Méthode d'analyse	N _{cible}	R _{capt}	R sonde a	R sonde b	N sonde	V _{sol} (μl)	V _{anal} (μl)
Cytométrie de flux		5,04%	65,3%	28,5%	3,44.10 ⁶	200	50
Scanner de fluorescence	6,5.10 ¹³						0,1
Evareader							25

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ahmad F, Hashsham SA, (2012), *Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point*of-care diagnostics: a review. Analytica chimica acta 733:1–15. doi: 10.1016/j.aca.2012.04.031
- Arinsburg SA, Shaz BH, Westhoff C, Cushing MM, (2012), *Determination of human platelet antigen typing by molecular methods: Importance in diagnosis and early treatment of neonatal alloimmune thrombocytopenia.* American journal of hematology 87:525–8.
- Azzazy HME, Mansour MMH, (2009), *In vitro diagnostic prospects of nanoparticles*. Clinica Chimica Acta 403:1–8. doi: 10.1016/j.cca.2009.01.016
- Azzazy HME, Mansour MMH, Samir TM, Franco R, (2012), *Gold nanoparticles in the clinical laboratory: principles of preparation and applications.* Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC 50:193–209. doi: 10.1515/CCLM.2011.732
- Balasubramaniam S, Pothayee N, Lin Y, et al, (2011), *Poly(N-isopropylacrylamide)-Coated* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Relaxometric and Fluorescence Behavior Correlate to Temperature-Dependent Aggregation. CHEMISTRY OF MATERIALS 23:3348–3356.
- Bañuls M-J, Puchades R, Maquieira Á, (2013), *Chemical surface modifications for the development of silicon-based label-free integrated optical (IO) biosensors: a review.* Analytica chimica acta 777:1–16. doi: 10.1016/j.aca.2013.01.025
- Bertrand G, Kaplan C, (2009), *Génotypage en immunologie plaquettaire : quand ? Comment ? Limites*. Transfusion Clinique et Biologique 16:164.
- Bienvenu T, Meunier C, Bousquet S, et al, (1999), *Les techniques d'extraction de l'ADN à partir d'un échantillon sanguin*. Annales de Biologie Clinique 57:77–84.
- Borne AEG, Décary F, (1990), *ICSH/ISBT Working Party on Platelet Serology*. Vox Sanguinis 58:176–176. doi: 10.1111/j.1423-0410.1990.tb02085.x
- Brevnov MG, Pawar HS, Mundt J, et al, (2009), *Developmental validation of the PrepFiler Forensic* DNA Extraction Kit for extraction of genomic DNA from biological samples. Journal of forensic sciences 54:599–607. doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01013.x
- Brown L, Westby M, Souberbielle BE, et al, (1997), *Optimisation of a peptide-based indirect ELISA for the detection of antibody in the serum of HIV-1 seropositive patients*. Journal of Immunological Methods 200:79–88.
- Buchan BW, Peterson JF, Cogbill CH, et al, (2011), *Evaluation of a microarray-based genotyping assay for the rapid detection of cytochrome P450 2C19 *2 and *3 polymorphisms from whole blood using nanoparticle probes.* American journal of clinical pathology 136:604–8. doi: 10.1309/AJCPCPU9Q2IRNYXC

Butler JE, (2000), *Enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of Immunoassay 21:165–209.

Butler JM, (2005), Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 688.

- Cai S, Liang G, Zhang P, et al, (2011), A miniature chip for protein detection based on magnetic relaxation switches. Biosensors & Bioelectronics 26:2258–2263.
- Cavanagh G, Dunn AN, Chapman CE, Metcalfe P, (1997), *HPA genotyping by PCR sequence-specific priming (PCR-SSP): a streamlined method for rapid routine investigations*. Transfusion Medicine 7:41–45. doi: 10.1046/j.1365-3148.1997.d01-72.x

Cesar Andrade MDO, (2011), Biosensors for Health, Environment and Biosecurity. doi: 10.5772/928

- Chang H-K, Ishikawa FN, Zhang R, et al, (2011), *Rapid, label-free, electrical whole blood bioassay based on nanobiosensor systems.* ACS nano 5:9883–91. doi: 10.1021/nn2035796
- Chen H, Liu F, Koh K, et al, (2013), Sensitive detection of tuberculosis using nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance. Microchimica Acta 180:431–436. doi: 10.1007/s00604-013-0943-5
- Cialla D, März A, Böhme R, et al, (2012), *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends*. Analytical and bioanalytical chemistry 403:27–54. doi: 10.1007/s00216-011-5631-x
- Clemetson KJ, (2001), *Platelet glycoproteins and their role in diseases*. Transfusion Clinique et Biologique 8:155–162. doi: 10.1016/S1246-7820(01)00184-7
- Cloarec JP, Chevolot Y, Laurenceau E, et al, (2008), A multidisciplinary approach for molecular diagnostics based on biosensors and microarrays. Irbm 29:105–127.
- Colombo M, Ronchi S, Monti D, et al, (2009), *Femtomolar detection of autoantibodies by magnetic relaxation nanosensors*. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 392:96–102.
- Convert L, Girard-Baril F, Renaudin A, et al, (2011), *High efficiency microfluidic beta detector for pharmacokinetic studies in small animals*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment 652:735–738. doi: 10.1016/j.nima.2010.09.111
- Courcier T, (2014), Développement d'un dispositif intégré de photodétection de grande sensibilité avec discrimination spectrale pour les laboratoires sur puce. Lyon 1
- Courcier T, Goulart M, Pittet P, et al, (2014), *CMOS BQJ detector chip with integrated chargeamplifiers for fluorescence measurements*. Sensors and Actuators B: Chemical 190:288–294. doi: 10.1016/j.snb.2013.08.021
- Curtis BR, McFarland JG, (2014), Human platelet antigens 2013. Vox sanguinis 106:93–102. doi: 10.1111/vox.12085
- Dai Q, Liu X, Coutts J, et al, (2008), A one-step highly sensitive method for DNA detection using dynamic light scattering. Journal Of The American Chemical Society 130:8138–+.
- Demas V, Lowery TJ, (2011), Magnetic resonance for in vitro medical diagnostics: superparamagnetic nanoparticle-based magnetic relaxation switches. New Journal of Physics 13:025005. doi: 10.1088/1367-2630/13/2/025005

- Dimitrov RA, Zuker M, (2004), *Prediction of hybridization and melting for double-stranded nucleic acids*. Biophysical journal 87:215–26. doi: 10.1529/biophysj.103.020743
- Driskell JD, (2011), One-step assay for detecting influenza virus using dynamic light scattering and gold nanoparticles. ANALYST 136:3083–3090.
- Dugas V, Depret G, Chevalier Y, et al, (2004), *Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption?* Sensors and Actuators B: Chemical 101:112–121. doi: 10.1016/j.snb.2004.02.041
- Dunbar S a., Vander Zee C a., Oliver KG, et al, (2003), *Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAPâ,, ¢ system*. Journal of Microbiological Methods 53:245. doi: 10.1016/S0167-7012(03)00028-9
- Dunbar S a, Sherry A D, (2006), *Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry 363:71–82. doi: 10.1016/j.cccn.2005.06.023
- Engvall E, Perlmann P, (1972), *Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.* Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 109:129–35.
- Frimpong RA, Hilt JZ, (2010), *Magnetic nanoparticles in biomedicine: synthesis, functionalization and applications.* Nanomedicine (London, England) 5:1401–14. doi: 10.2217/nnm.10.114
- Goluch ED, Nam JM, Georganopoulou DG, et al, (2006), *A bio-barcode assay for on-chip attomolar*sensitivity protein detection. Lab On A Chip 6:1293–1299.
- Grimm J, Perez JM, Josephson L, Weissleder R, (2004), *Novel nanosensors for rapid analysis of telomerase activity*. Cancer Research 64:639–643.
- Grody WW, Nakamura RM, Kiechle FL, Storm C, (2009), *Molecular Diagnostics: Techniques and Applications for the Clinical Laboratory*. 2009:736.
- Haddour N, Chevolot Y, Trévisan M, et al, (2010), *Use of magnetic field for addressing, grafting onto support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection*. Journal of Materials Chemistry 20:8266. doi: 10.1039/b920460a
- Hahm J, Lieber CM, (2004), Direct Ultrasensitive Electrical Detection of DNA and DNA Sequence Variations Using Nanowire Nanosensors. Nano Letters 4:51–54. doi: 10.1021/nl034853b
- Hainque B, Baudin B, Lefebvre P, (2008), *Appareils et méthodes en biochimie et biologie moléculaire*. 449.
- Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R, (2010), *Magnetic nanoparticle biosensors*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine And Nanobiotechnology 2:291–304.
- Hill HD, Vega RA, Mirkin CA, (2007), Nonenzymatic Detection of Bacterial Genomic DNA Using the Bio Bar Code Assay DNA. These blockers bind to specific regions of the target rehybridizing, which allows the particle probes to bind. Society 79:9218–9223.

- Hnasko R, Lin A, McGarvey JA, Stanker LH, (2011), *A rapid method to improve protein detection by indirect ELISA*. Biochemical and Biophysical Research Communications 410:726–731.
- Huo Q, (2010), Protein complexes/aggregates as potential cancer biomarkers revealed by a nanoparticle aggregation immunoassay. Colloids And Surfaces B-Biointerfaces 78:259–265.
- Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, et al, (2002), *Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms*. Vox Sanguinis 83:1–12. doi: 10.1046/j.1423-0410.2002.00187.x
- Hutchings GH, Ferris NP, (2006), Indirect sandwich ELISA for antigen detection of African swine fever virus: Comparison of polyclonal and monoclonal antibodies. Journal of Virological Methods 131:213–217.
- J.C. Kaplan, M. Delpech, (2007), Biologie moléculaire et médecine, édition 3. 815.
- Jain KK, (2005), *Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics*. Clinica Chimica Acta 358:37–54. doi: 10.1016/j.cccn.2005.03.014
- Jannetto PJ, Buchan BW, Vaughan KA, et al, (2010), *Real-Time Detection of Influenza A, Influenza B, and Respiratory Syncytial Virus A and B in Respiratory Specimens by Use of Nanoparticle Probes.* Journal Of Clinical Microbiology 48:3997–4002.
- Jans H, Jans K, Demeyer P-J, et al, (2011), A simple double-bead sandwich assay for protein detection in serum using UV-vis spectroscopy. Talanta 83:1580–5. doi: 10.1016/j.talanta.2010.11.057
- Josephson L, Perez JM, Weissleder R, (2001), *Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences*. Angewandte Chemie-International Edition 40:3204-+.
- Kaittanis C, Boukhriss H, Santra S, et al, (2012), *Rapid and sensitive detection of an intracellular pathogen in human peripheral leukocytes with hybridizing magnetic relaxation nanosensors*. PloS one 7:e35326. doi: 10.1371/journal.pone.0035326
- Kalorama Information, (2011), *The World Market for Molecular Diagnostics, 4th. Edition (Infectious Disease, Oncology, Blood Screening, Pre-Natal and Other Areas): Potential and Reality, What's Hot and What's Not : Kalorama Information.* 550.
- Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C, (1987), *Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies*. Blood 70:1722–1726.
- Krishhan VV, Khan IH, Luciw PA, (2009), *Multiplexed microbead immunoassays by flow cytometry for molecular profiling: Basic concepts and proteomics applications*. Critical Reviews in Biotechnology 29:29.
- Kroll H, Kiefel V, Santoso S, (1998), *Clinical Aspects and Typing of Platelet Alloantigens*. Vox Sanguinis 74:345–354. doi: 10.1111/j.1423-0410.1998.tb05441.x
- Kurkina T, Balasubramanian K, (2012), *Towards in vitro molecular diagnostics using nanostructures*. Cellular And Molecular Life Sciences 69:373–388.

- Lahiri J, Isaacs L, Tien J, Whitesides GM, (1999), A Strategy for the Generation of Surfaces Presenting Ligands for Studies of Binding Based on an Active Ester as a Common Reactive Intermediate: A Surface Plasmon Resonance Study. Analytical Chemistry 71:777–790. doi: 10.1021/ac980959t
- Lee H, Sun E, Ham D, Weissleder R, (2008), *Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis* of cells. Nature Medicine 14:869–874.
- Lefferts JA, Jannetto P, Tsongalis GJ, (2009), *Evaluation of the Nanosphere Verigene (R) System and the Verigene (R) F5/F2/MTHFR Nucleic Acid Tests*. Experimental And Molecular Pathology 87:105–108.
- Lefferts JA, Schwab MC, Dandamudi UB, et al, (2010), *Warfarin genotyping using three different platforms*. American journal of translational research 2:441–446.
- Li YG, Cu YTH, Luo D, (2005), Multiplexed detection of pathogen DNA with DNA-based fluorescence nanobarcodes. Nature Biotechnology 23:885–889.
- Li, Y., Wark, A.W., Lee, H.J., Corn RM, (2006), *Single-nucleotide polymorphism genotyping by nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging measurements of surface ligation reactions*. Analytical Chemistry 78:3158–3164.
- Liu X, Huo Q, (2009), A washing-free and amplification-free one-step homogeneous assay for protein detection using gold nanoparticle probes and dynamic light scattering. Journal of Immunological Methods 349:38–44.
- Liu Y-J, Yao D-J, Chang H-Y, et al, (2008), *Magnetic bead-based DNA detection with multi-layers quantum dots labeling for rapid detection of Escherichia coli O157:H7*. Biosensors & Bioelectronics 24:558–565.
- Lizard G, Monier S, Prunet C, et al, (2004), *Microspheres, nanospheres and flow cytometry: from cellular to molecular analysis*. Annales De Biologie Clinique 62:47–52.
- Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, et al, (2003), *Nomenclature of human platelet antigens*. Vox Sanguinis 85:240–245. doi: 10.1046/j.1423-0410.2003.00331.x
- Monteiro F, Tavares G, Ferreira M, et al, (2011), *Technologies involved in molecular blood group genotyping*. ISBT Science Series 6:1–6.
- Morel-Kopp M-C, Clemenceau S, Aurousseau M-H, et al, (1994), *Human platelet alloantigen typing: PCR analysis is not a substitute for serological methods*. Transfusion Medicine 4:9–14. doi: 10.1111/j.1365-3148.1994.tb00237.x
- Nam J-M, Thaxton CS, Mirkin CA, (2003), *Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins*. Science (New York, NY) 301:1884–6. doi: 10.1126/science.1088755
- Palazon F, Benavides CM, Léonard D, et al, (2014), *Carbodiimide/NHS derivatization of COOHterminated SAMs: activation or byproduct formation?* Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 30:4545–50. doi: 10.1021/la5004269

- Pei X, Zhang B, Tang J, et al, (2013), Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. Analytica chimica acta 758:1–18. doi: 10.1016/j.aca.2012.10.060
- Phillips DJ, League SC, Weinstein P, Hooper WC, (2006), *Interference in microsphere flow cytometric multiplexed immunoassays for human cytokine estimation*. Cytokine 36:180–188.
- Probst J, Dembski S, Milde M, Rupp S, (2012), *Luminescent nanoparticles and their use for in vitro and in vivo diagnostics*. EXPERT REVIEW OF MOLECULAR DIAGNOSTICS 12:49–64.
- Richard C, (2012), Développement de briques technologiques pour la détection de fluorescence dans une plateforme de type laboratoire sur puce.
- Richard C, Courcier T, Pittet P, et al, (2012), CMOS buried quad p-n junction photodetector for multiwavelength analysis. Optics express 20:2053–61. doi: 10.1364/OE.20.002053
- Ronot X, Grunwald D, Mayol J-F, Boutonnat J, (2006), La cytométrie en flux, Lavoisiers. 456.
- Ross MB, de Alarcon P, (2013), *Hemolytic Disease of the Fetus and Newborn*. NeoReviews 14:e83–e88. doi: 10.1542/neo.14-2-e83
- Saha K, Agasti SS, Kim C, et al, (2012), *Gold nanoparticles in chemical and biological sensing*. Chemical reviews 112:2739–79. doi: 10.1021/cr2001178
- Sam S, Touahir L, Salvador Andresa J, et al, (2010), *Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids 26:809–14. doi: 10.1021/la902220a
- Sapsford KE, Algar WR, Berti L, et al, (2013), Functionalizing nanoparticles with biological molecules: developing chemistries that facilitate nanotechnology. Chemical reviews 113:1904–2074. doi: 10.1021/cr300143v
- Schasfoort RB, Tudos AJ, (2008), Handbook of Surface Plasmon Resonance. 403.
- Shao H, Yoon T-J, Liong M, et al, (2010), *Magnetic nanoparticles for biomedical NMR-based diagnostics*. Beilstein Journal of Nanotechnology 1:142–154.
- Shinkai M, Ito A, (2002), *Functional magnetic particles for medical application*. JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING 94:606–613.
- Shyamala V, Ames GF-L, (1989), *Genome walking by single-specific-primer polymerase chain reaction: SSP-PCR.* Gene 84:1–8.
- Singh V, Zharnikov M, Gulino A, Gupta T, (2011), DNA immobilization, delivery and cleavage on solid supports. Journal of Materials Chemistry 21:10602. doi: 10.1039/c0jm04359a
- Skogen B, Wang R, McFarland JG, Newman PJ, (1996), A dinucleotide deletion in exon 4 of the Pl(A2) allelic form of glycoprotein IIIa: Implications for the correlation of serologic versus genotypic analysis of human platelet alloantigens. Blood 88:3831–3836.

- Slyadnev MN, (2013), *Microchip-based systems for molecular genetic analysis*. Russian Journal of General Chemistry 82:2154–2169. doi: 10.1134/S1070363212120353
- Sperling RA, Parak WJ, (2010), *Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles.* Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences 368:1333–83. doi: 10.1098/rsta.2009.0273
- Spiro A, Lowe M, Brown D, (2000), A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry. Applied And Environmental Microbiology 66:4258–4265.
- Staros JV, Wright RW, Swingle DM, (1986), Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of watersoluble carbodiimide-mediated coupling reactions. Analytical Biochemistry 156:220–222. doi: 10.1016/0003-2697(86)90176-4
- Strong NK, Eddleman KA, (2013), *Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia in pregnancy*. Clinics in laboratory medicine 33:311–25. doi: 10.1016/j.cll.2013.03.024
- Taton TA, Mirkin CA, Letsinger RL, (2000), *Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes*. Science 289:1757–1760.
- Teste B, Malloggi F, Siaugue J-M, et al, (2011), *Microchip integrating magnetic nanoparticles for allergy diagnosis*. Lab On A Chip 11:4207–4213.
- Trevisan M, Schawaller M, Quapil G, et al, (2010), *Evanescent wave fluorescence biosensor combined* with DNA bio-barcode assay for platelet genotyping. Biosensors & Bioelectronics 26:1631–1637.
- Trévisan M, (2011), Biofonctionnalisation, caractérisation et mise en oeuvre de particules magnétiques sur biocapteurs : application au génotypage plaquettaire. 217.
- Tu Q, Chang C, (2012), *Diagnostic applications of Raman spectroscopy*. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine 8:545–58. doi: 10.1016/j.nano.2011.09.013
- United Nations, (2013), World population aging report.
- Valeur B, (2004), Invitation à la fluorescence moléculaire, De Boeck. 201.
- Valizadeh A, Mikaeili H, Samiei M, et al, (2012), *Quantum dots: synthesis, bioapplications, and toxicity*. Nanoscale Research letters 7:480–480.
- Vollenhofer-Schrumpf S, Buresch R, Schinkinger M, (2007), A simple nucleic acid hybridization/latex agglutination assay for the rapid detection of polymerase chain reaction amplicons. JOURNAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS 68:568–576.
- Wabuyele MB, Vo-Dinh T, (2005), *Detection of human immunodeficiency virus type 1 DNA sequence using plasmonics nanoprobes.* Analytical chemistry 77:7810–5. doi: 10.1021/ac0514671

- Wabuyele MB, Yan F, Vo-Dinh T, (2010), *Plasmonics nanoprobes: detection of single-nucleotide polymorphisms in the breast cancer BRCA1 gene.* Analytical and bioanalytical chemistry 398:729–36. doi: 10.1007/s00216-010-3992-1
- Wanekaya AK, Chen W, Myung NV, Mulchandani A, (2006), *Nanowire-Based Electrochemical Biosensors*. Electroanalysis 18:533–550. doi: 10.1002/elan.200503449
- Wang H-N, Fales AM, Zaas AK, et al, (2013), *Surface-enhanced Raman scattering molecular sentinel nanoprobes for viral infection diagnostics*. Analytica Chimica Acta 786:153–158.
- Wang H-N, Vo-Dinh T, (2009), *Multiplex detection of breast cancer biomarkers using plasmonic molecular sentinel nanoprobes.* Nanotechnology 20:065101. doi: 10.1088/0957-4484/20/6/065101
- Wijaya E, Lenaerts C, Maricot S, et al, (2011), *Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies*. Current Opinion in Solid State and Materials Science 15:208–224. doi: 10.1016/j.cossms.2011.05.001
- Xiang DS, Zeng GP, He ZK, (2011), *Magnetic microparticle-based multiplexed DNA detection with biobarcoded quantum dot probes*. Biosensors & Bioelectronics 26:4405–4410.
- Yang Z, (2012), 3D-Microstructured Protein Chip for Cancer Diagnosis. 193.
- Zhan Z, Cao C, Sim SJ, (2010), *Quantitative detection of DNA by autocatalytic enlargement of hybridized gold nanoprobes*. Biosensors & Bioelectronics 26:511–516.
- Zhang C, Hu J, (2010), *Single quantum dot-based nanosensor for multiple DNA detection*. Analytical chemistry 82:1921–7. doi: 10.1021/ac9026675
- Zhang H, Liu L, Li C-W, et al, (2011), *Multienzyme-nanoparticles amplification for sensitive virus* genotyping in microfluidic microbeads array using Au nanoparticle probes and quantum dots as labels. Biosensors and Bioelectronics 29:89.
- Zhao W, Ali MM, Aguirre SD, et al, (2008), *Paper-Based Bioassays Using Gold Nanoparticle Colorimetric Probes*. Analytical Chemistry 80:8431–8437.

Amandine Cornillon

14 rue des tuileries, 69009 Lyon 06 59 50 42 00 Amandine.cornillon@outlook.fr 27 ans Française Permis B



	EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES			
2011-2014 : 2011-2014 : 2011-	Gestion d'un projet de R&D multidisciplinaire et international en nanobiotechnologies à l'École Centrale de Lyon – 3 ans Institut des Nanotechnologies de Lyon (2ans) et Université de Sherbrooke (Canada, 1 an) Collaborations internationales et avec l'Établissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes « Élaboration d'un outil de diagnostic <i>in vitro</i> à base de microparticules appliqué au génotypage plaquettaire » PCR, cytométrie de flux, fluorescence, HPLC, mise au point de protocoles et de méthodologies, veille technologique, organisation et animation de réunions, rédactions de rapports et participation à			
2011 : SANOFI 2010 :	Gestion d'un projet de R&D en formulation pharmaceutique à Sanofi-Aventis – Vitry – 6 mois Compétences techniques (caractérisation physico-chimique, formulation de comprimé, lyophilisation), mise au point de protocoles, travail en milieu industriel, réunions d'avancement Technicienne assurance qualité à CEVA Santé Animale – Libourne – 5 mois Qualification d'équipement de conditionnement (QI, QO, QP) et validation de procédure de nettoyage selon les bonnes pratiques de fabrication et de protocoles d'AQ, coordination entre les différents services de l'entreprise rédaction de rapports			
2009 : IND INFORMATION INDER STATES AND	Mission d'étude en génétique appliqué au paludisme à l'IRD – Montpellier – 2 mois Techniques de biologie moléculaire, analyse et comparaison de résultat par méthodes statistiques Technicienne de laboratoire au Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire -Lyon – 3 mois Western Blot, culture cellulaire, immunofluorescence indirecte, travail sur virus			
FORMATION				
2014 :	Doctorat en chimie et nanobiotechnologies délivré par l'École Centrale de Lyon (69) Doctorat en génie électrique délivré par l'Université de Sherbrooke (QC, Canada)			
2007-2011 :	Licence et Master I ngénierie de la Santé à IUP - Faculté de pharmacie de Montpellier (34) Spécialtés Médicaments, Polymères d'intérêt thérapeutiques et management de projet			

- 2007 : **DUT** de **Génie Biologique** à l'Université Claude Bernard Lyon 1 (69) Spécialité analyses biologiques et biochimiques
- Langues : Anglais courant ; Allemand réactivable

Informatique : Word, Excel, Power Point, Origin Lab, logiciels de cytométrie en flux

CENTRES D'INTÉRET

Sport : Course à pieds, randonnées

Associatif: 2008 : Action humanitaire au Bénin (organisation de collectes, élaboration de dossiers de financement, animation pour enfants dans une structure SOS Village d'Enfant)–2 mois 2009 : Secrétaire de l'association humanitaire de l'IUP – 1 an

Voyages : Canada, Grèce, Malte, Tunisie, Maroc, Allemagne, Espagne

Communications orales

11 au 15 juin 2012 : Colloque de Recherche Inter Ecole Centrale 2012 (CRIEC), Ecole Centrale de Marseille, Marseille (France)

A. Cornillon, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, V.Monnier, P. Charette et E. Souteyrand

"Tests biologiques in vitro à base de nanoparticules fonctionnalisées pour le génotypage sanguin"

17 au 18 octobre 2013 : Journée des doctorants de l'INL, INSA et École Centrale de Lyon, Lyon (France)

A. Cornillon, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, P. Charette et E. Souteyrand

"DNA capture system based on biofunctionnalised microparticles with fluorescence detection for blood platelet genotyping"

Conférence invitée

23 au 26 octobre 2012 : **Congrès international** de la Société de BioChromatographie et Nanoseparations 2012 sur la « bioseparation & charactérisation », Université de Bordeaux 2, Bordeaux (France)

A.Cornillon, Y. Mérieux, V.Monnier, P. Charrette, J-P.Cloarec et E. Souteyrand

"Separation and analysis of multifunctionnal particles by flow cytometry for blood platelet genotyping"

Posters

15 au 19 juillet 2012 : **Colloque international** inaugurale de l'UMI-LN2, Orford (Québec, **Canada**) <u>A. Cornillon</u>, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, V. Monnier, P. Charette et E. Souteyrand "Génotypage sanguin in vitro à base de nanoparticules fonctionnalisées"

6 au 7 mai 2013 : Congrès de l'Acfas 2013, participation au Colloque nanoparticules et nanomatériaux pour la médecine, Université Laval, Québec (Québec, **Canada**)

A. Cornillon, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, V.Monnier, P. Charette et E. Souteyrand

« Système de capture d'ADN à base de particules magnétiques et fluorescentes multifonctionnelles couplé à la cytométrie de flux pour le génotypage sanguin »

25 au 26 novembre 2013 : Entretiens Jacques Cartier : « Santé, Biologie, Micronanosystèmes », INSA de Lyon, Lyon (France)

A. Cornillon, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, P. Charette et E. Souteyrand

« Platelet genotyping in vitro test using magnetic separation and flow cytometry analysis of biofunctionnalised microparticles »

27 au 30 mai 2014 : Congrès international Biosensors 2014, Melbourne (Australie)

A. Cornillon, Y. Mérieux, P. Charette, J-P.Cloarec et E. Souteyrand

« In vitro diagnostic test based on biofunctionnalised microparticles and fluorescence detection for platelet genotyping»

9 au 10 juillet 2014 : Colloque international de l'UMI-LN2, Allevard -les-Bains, (France)

A. Cornillon, Y. Mérieux, P. Charette, E. Souteyrand et J-P. Cloarec

« Test de génotypage plaquettaire in vitro à base de microparticules biofonctionnalisées et couple à la cytométrie de flux»

dernière page de la thèse

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande des Directeurs de Thèse

Monsieur J-P. CLOAREC, Mme E. SOUTEYRAND et M. P. CHARRETTE

et les rapports de

Madame C. MENAGER Professeur - Laboratoire physicochimie des électrolytes colloïdes et sciences analytiques (PECSA) UMR 7195 - Université Pierre et Marie Curie - Campus Jussieu Bât. F (74) - 5ème étage porte 543 4 place Jussieu - 75252 PARIS cedex 05

Et de

Monsieur D. BOUDREAU Professeur - Faculté de Sciences et de Génie - Département de Chimie - Université de Laval 2325 rue de l'Université - Québec (QC) G1V 0A6 - CANADA

Mademoiselle CORNILLON Amandine

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de DOCTEUR

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 17 décembre 2014

P/Le directeur de l'E.C.L. La directrice des Etudes

NTRAL SemiAegad AND Scolarité

Auteur : Amandine CORNILLON

Année : 2014

Résumé : Cette thèse porte sur l'élaboration d'un outil de capture d'ADN permettant d'identifier une mutation génétique (SNP) grâce à la formation de sandwichs avec des particules de carboxylatex biofonctionnalisées avec des oligonucléotides couplée à une détection de la fluorescence. Le modèle biologique choisi pour ce projet est le génotypage plaquettaire et plus particulièrement la recherche du gène biallélique HPA-1.

Le principal objectif de ce travail a été d'optimiser un outil de capture préalablement développé dans l'équipe (*Trévisan, 2011*) afin de réduire le nombre d'étapes et de simplifier la mise en œuvre globale du test en modifiant les interactions moléculaires utilisée pour capturer l'ADN cible et en utilisant des particules fluorescentes comme élément de détection. En présence d'ADN cible, des sandwichs sont formés entre les particules fluorescentes et les particules magnétiques biofonctionnalisées. Ces sandwichs sont purifiés par séparation magnétique et la fluorescence est détectée par trois méthodes : la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et l'Evareader (détection par ondes évanescentes).

Dans un premier temps, les paramètres de fonctionnalisation chimique et biologique des différentes particules (magnétiques et fluorescentes) ont été déterminés et optimisés ainsi que les conditions d'hybridation pour la capture de l'ADN cible.

Ensuite, la formation des sandwichs et leur détection ont été suivies par des mesures de fluorescence en utilisant trois méthodes différentes : la cytométrie en flux, l'imagerie de fluorescence et l'Evareader (capteur à ondes évanescentes). Les résultats obtenus avec les différentes méthodes de détection sont concordants et montrent que l'outil de capture d'ADN développé permet de capturer la cible synthétique (oligonucléotide) HPA-1 en réduisant le temps d'analyse de 45 min. Dans nos conditions, le test permet de discriminer l'allèle a de l'allèle b du gène HPA-1 qui ne diffère que d'un nucléotide. Le rapport des signaux de fluorescence issus du sandwich spécifique et du sandwich non spécifique est d'environ 2,5 à 3. Ce rapport devra être amélioré par la suite, en optimisant les conditions de formation des sandwichs.

La prochaine étape consistera à optimiser le système de capture d'ADN développé pour gagner en spécificité et déterminer la limite de détection du test. Ce test devra également être validé avec des échantillons biologiques.

A plus long terme, la fluorescence pourra être détectée par un photodétecteur miniaturisé actuellement développé à l'Université de Sherbrooke. Des études préliminaires présentées dans ce manuscrit montrent les potentialités de ce nouveau transducteur.

Mots – clefs : Microparticules magnétiques, microparticules fluorescentes, sandwichs, génotypage plaquettaire, capteur à ondes évanescentes, cytométrie en flux, oligonucléotide