



Un microlaboratoire électrophorétique pour l'étude du couplage entre transport et cinétique chimique : application à la réaction d'hybridation d'oligonucléotides

André Estévez-Torres

► To cite this version:

André Estévez-Torres. Un microlaboratoire électrophorétique pour l'étude du couplage entre transport et cinétique chimique : application à la réaction d'hybridation d'oligonucléotides. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2007. Français. NNT : . tel-00153416v2

HAL Id: tel-00153416

<https://theses.hal.science/tel-00153416v2>

Submitted on 11 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité

Chimie physique et chimie analytique

Présentée par

André ESTÉVEZ TORRES

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Un microlaboratoire électrophorétique pour l'étude
du couplage entre transport et cinétique chimique :
application à la réaction d'hybridation d'oligonucléotides

Soutenance prévue le 9 juillet 2007

devant le jury composé de :

M. Prof.	Pierre	GAREIL	
M. Dr.	Charlie	GOSSE	
M. Dr.	Hervé	ISAMBERT	Rapporteur
M. Dr.	Mathieu	JOANICOT	
M. Prof.	Ludovic	JULLIEN	Directeur de thèse
M. Prof.	Francesc	SAGUÉS	
M. Dr.	Patrick	TABELING	Rapporteur

*Al deseo,
que mueve montañas*

Table des matières

Table des matières	5
Liste des symboles	11
Prologue	14
1 Introduction générale	17
1.1 Adressage d'une espèce chimique	
dans un mélange	17
1.1.1 Notion d'adressage	17
1.1.2 Adressage en Biologie	18
1.1.3 Comment effectuer un adressage cinétique en Chimie?	22
1.2 L'électrodifusion : une méthode d'adressage reposant sur la cinétique . . .	24
1.2.1 Principe	24
1.2.2 Mise en évidence expérimentale	25
1.3 Objectifs de cette thèse	28
1.3.1 Une banque de réactifs aux propriétés cinétiques variées	28
1.3.2 Un dispositif microfluidique polyvalent pour l'adressage cinétique .	28
 I Oligonucléotides : Une plateforme à propriétés thermodynamiques et cinétiques facilement prédictibles	 31
2 Thermocinétique de la réaction d'hybridation entre deux oligonucléotides	33
2.1 Le mécanisme d'hybridation	34
2.2 Détermination de grandeurs thermodynamiques	37
2.2.1 Les expériences de dénaturation thermique	37
2.2.2 La méthode des plus proches voisins	39
2.3 Mesure de constantes cinétiques	39
2.3.1 Analyse mathématique de la cinétique d'hybridation	40
2.3.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence	42
2.3.3 Mélange rapide des réactifs par <i>stopped-flow</i>	43
2.4 Le système oligonucléotidique modèle	44
2.5 Résultats	45
2.5.1 Thermodynamique de la réaction d'hybridation	45
2.5.2 Dépendance de k_1 avec la concentration en sel	47

2.5.3	Estimation de k_2 par la méthode des plus proches voisins	48
2.5.4	Expériences contrôle	50
2.5.5	Influence des micelles de Triton-X100 sur la cinétique d'hybridation	52
2.5.6	Influence de la longueur de l'oligonucléotide complémentaire et de la nature du fluorophore sur la cinétique d'hybridation	53
2.6	Conclusion	54
3	Une sonde moléculaire à motif quadruplex pour la discrimination cinétique	57
3.1	Le motif quadruplex	58
3.2	Caractérisation du G4-MB	59
3.3	Association entre un G4-MB et une cible complémentaire	60
3.3.1	Thermodynamique de la discrimination	60
3.3.2	Discrimination par la cinétique et mécanisme d'hybridation	64
3.4	Conclusion	65
4	Article 1 : <i>Quadruplex-based molecular beacons as tunable DNA probes</i>	67
5	Article 1 : <i>Supporting information</i>	81
	Bibliographie	109
6	Réduction de la mobilité électrophorétique d'un oligonucléotide	111
6.1	Aspects théoriques sur la diffusion et la mobilité électrophorétique des polyélectrolytes	111
6.1.1	Diffusion et conformation d'un polymère	112
6.1.2	Solutions ioniques	113
6.1.3	Électrophorèse	114
6.2	Données bibliographiques sur le coefficient de diffusion et la mobilité électrophorétique de l'ADN	118
6.2.1	Coefficients de diffusion	118
6.2.2	Mobilité électrophorétique	119
6.3	Résultats : Réduction de la mobilité	120
6.3.1	Biotine–Streptavidine	121
6.3.2	Thiol–Colloïde d'or	122
6.3.3	Cholestéryl–Micelle	122
II	Un microlaboratoire utilisant la diffusion comme critère analytique	125
7	Design d'un dispositif pour le contrôle cinétique du coefficient de diffu- sion	127
7.1	Dimensionnement du dispositif	127
7.2	Discussion	130
7.3	Application au système oligonucléotidique	130

7.4	Conclusion	131
8	Construction d'un microlaboratoire d'électrophorèse 2D polyvalent	133
8.1	Mesurer la diffusion et appliquer un champ électrique dans un microsystème	134
8.1.1	Les premiers essais : Création d'une condition initiale non-stationnaire	134
8.1.2	Mesure stationnaire du coefficient de diffusion	136
8.2	Génération d'un champ électrique homogène en 2D	137
8.2.1	Éléments bibliographiques	137
8.2.2	Notre design	138
8.3	Optimisation du procédé de fabrication	142
8.4	Limitation de l'effet Joule	143
8.4.1	Le choix du tampon	143
8.4.2	Contrôle de la température	145
8.5	Observation	145
8.6	Tenue mécanique : Effet des piliers et remplissage du dispositif	146
8.6.1	Bibliographie	146
8.6.2	Résultats	147
8.7	Matrice d'analyse et suppression de l'électroosmose	149
8.7.1	Première solution : utilisation d'un gel d'agarose	150
8.7.2	La matrice définitive : le PDMA	151
8.7.3	Reproductibilité des mesures de mobilité	153
8.8	Les possibilités du microlaboratoire	155
8.8.1	Mesure de mobilités	155
8.8.2	Image de migration-diffusion stationnaire	156
8.8.3	Diffusion 1D	157
8.8.4	Électrophorèse 1D	158
8.8.5	Dispersion 1D en champ électrique alternatif	159
8.8.6	Electrodifusion quasi-stationnaire	160
8.9	Conclusion	160
9	Mesure de coefficients de diffusion	161
9.1	Généralités sur la mesure de coefficients de diffusion	161
9.1.1	La RMN	161
9.1.2	La FCS	161
9.1.3	Le FRAP	162
9.2	Mesure de coefficients de diffusion dans les microsystèmes	162
9.2.1	Dispersion de Taylor-Aris	162
9.2.2	Méthode non-stationnaire de Culbertson	162
9.2.3	Flux en cisaillement	163
9.2.4	Un dispositif stationnaire : le <i>T-sensor</i>	163
9.3	Mesure de coefficients de diffusion dans le microlaboratoire	168

10 Article 2 : <i>Fourier analysis to measure diffusion coefficients on a continuous electrophoresis chip</i>	171
10.1 Introduction	172
10.2 Theory	173
10.3 Experimental Section	175
10.3.1 Reagents and Solutions	175
10.3.2 Chip Microfabrication	176
10.3.3 Device Filling, Final Assembly, and Storage	177
10.3.4 Instrumentation	177
10.3.5 Finite Element Method Simulations	178
10.3.6 Measurement of Diffusion Coefficient	178
10.3.7 Binary Mixture Analysis	179
10.3.8 FCS Experiments	181
10.3.9 Safety Considerations	181
10.4 Results and Discussion	182
10.4.1 Velocity Homogeneity Inside the Analysis Chamber	182
10.4.2 Diffusion Coefficient Measurement	183
10.4.3 Validation Experiments	185
10.4.4 Analysis of a Binary Mixture	187
10.5 Conclusion	189
10.6 Acknowledgement	190
10.7 Supplementary Material Available	190
Bibliographie	191
11 Article 2 : <i>Supporting information</i>	195
11.1 Supporting Information	195
11.2 Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentration $F(x, y)$ with respect to y	196
11.3 PCR Protocol for Syntheses of the dsDNA Fragments	197
11.4 Detailed Microfabrication Protocol for the Bottom PDMS Layer	198
11.5 Finite Element Method Simulations	200
11.5.1 Electric Potential Computation	200
11.5.2 Concentration Profile Computation	200
11.5.3 Results and Hypothesis Evaluation	201
11.6 Measurements of Diffusion Coefficients in Time-Based Experiments	205
11.6.1 Theory	205
11.6.2 Data Acquisition	206
11.6.3 Results and Discussion	206
11.7 Correction of the Optical Pattern in the Fourier Space	208
11.7.1 Exact Theoretical Computation	208
11.7.2 Evaluation of the Zeroth Order Correction	209
11.8 Supplementary Tables	211
11.9 Supplementary Figures	212

Bibliographie	217
12 Article 3 : <i>Fourier transform for simple analysis of the reaction diffusion dynamics in a microsystem</i>	219
13 Article 3 : <i>Supporting information</i>	225
13.1 Supporting Information	225
13.2 Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentrations $R(x, y)$ and $P(x, y)$ with respect to y	226
13.2.1 The model	226
13.2.2 Analysis of the theoretical predictions	228
13.3 Extraction of the dynamic parameters from the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal	229
13.3.1 Theoretical expression of the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal	229
13.3.2 Extraction of the dynamic parameters	230
13.4 Oligonucleotide sequences	230
13.5 Preparation of the solutions	231
13.6 Independent extraction of the thermodynamic constant K and the rate constants k_1 and k_2 by fluorescence spectroscopy	231
13.6.1 Thermodynamic measurements	231
13.6.2 Kinetic measurements	232
Conclusion et perspectives	234
A Protocoles de mesure de constantes cinétiques d'hybridation par spectroscopie de fluorescence	237
A.1 Chemicals	237
A.2 Analysis of thermodynamic data with HyTher server	237
A.3 Absorbance measurements	238
A.4 Fluorescence Measurements	238
A.5 Analysis of Kinetic data	238
B Rappels sur le transport et le couplage avec la réaction chimique	241
B.1 Introduction	241
B.2 Flux de matière et transport	242
B.3 Étude de quelques cas concrets	243
B.3.1 Diffusion 1D	244
B.3.2 Diffusion et advection 1D	245
B.3.3 Relaxation due à la réaction chimique	245
B.3.4 Diffusion et advection 1D + réaction	246
B.3.5 Diffusion 1D + réaction	250
B.3.6 Diffusion 2D et advection 1D	251

C	Détails sur le phénomène d'électrodifusion	253
C.1	Historique	253
C.2	Analyse de l'électrodifusion en deux composantes	254
D	Construction d'un microscope d'épifluorescence	257
E	Protocole de fabrication du chip en PDMS avec un moule en époxy	261
E.1	Obtention of the PDMS master	261
E.2	Fabrication of epoxy mould	261
E.3	Use of epoxy moulds	262
F	Formules chimiques des composés utilisés	263
F.1	Bases de l'ADN	263
F.2	Fluorophores	264
F.3	Modification des oligonucléotides	264
F.4	Matrices d'analyse	265
F.5	Tampons	265
G	Séquences des oligonucléotides utilisés	267
	Bibliographie	269

Liste des symboles

Symboles mathématiques

Symbole	Description	Unité
a	Longueur d'un monomère	m
C	Concentration	mol L^{-1}
C^*	Concentration d'enchevêtrement	g L^{-1}
D	Coefficient de diffusion effectif	m^2s^{-1}
D_0	Coefficient de diffusion brownien	m^2s^{-1}
D_{disp}	Contribution dispersive au coefficient de diffusion	m^2s^{-1}
d	Diamètre d'un polymère	m
d_p	Distance moyenne entre particules dans une solution	m
E	Champ électrique	V m^{-1}
e	Charge élémentaire	C
I	Force ionique	mol L^{-1}
K	Constante thermodynamique	sans dimension
K	Constante de Mark-Houwink	L kg^{-1}
k_1	Constante cinétique d'association	$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
k_2	Constante cinétique de dissociation	s^{-1}
L_c	Longueur de contour d'un polymère	m
l	Parcours optique	m
l_B	Longueur de Bjerrum	m
l_{diff}	Distance parcourue par diffusion	m
l_K	Longueur de Kuhn	m
l_{migr}	Distance parcourue par migration	m
ℓ_x	Longueur du champ de vue de la caméra	m
ℓ_y	Largeur du champ de vue de la caméra	m
N	Nombre de monomères dans un polymère	sans dimension
Pe	Nombre de Peclet	sans dimension
pI	Point isoélectrique	sans dimension
Q	Charge totale d'une particule	C
Q	Brillance	$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
R	Constante des gaz parfaits	$\text{J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$
R	Rayon d'une particule	m
R_c	Résistance du réseau de canaux	Ω
R_{ch}	Résistance de la chambre d'analyse	Ω
R_g	Rayon de gyration d'un polymère	m

Liste des symboles

Symbole	Description	Unité
R_h	Rayon hydrodynamique	m
Re	Nombre de Reynolds	sans dimension
T	Température	K
T	Période	s
T_m	Température de fusion d'une réaction d'hybridation	K
t	Temps	s
t_{exp}	Durée de l'expérience	s
v	Vitesse	m s^{-1}
w_c	Largeur d'un canal	m
w_m	Largeur d'un mur de PDMS	m
$\bar{v}$	Vitesse moyenne d'un moteur Brownien	m s^{-1}
α	Degré d'avancement	sans dimension
ϵ	Coefficient d'absorption molaire	$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
ϵ_r	Constante diélectrique relative	sans dimension
ϵ_0	Constante diélectrique du vide	F m^{-1}
ϕ	Potentiel électrique	V
η	Viscosité	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
$[\eta]$	Viscosité intrinsèque d'une solution de polymère	L g^{-1}
κ	Inverse de la longueur de Debye	m^{-1}
κ_1	Constante cinétique apparente d'association	s^{-1}
μ	Potentiel chimique	J mol^{-1}
μ	Mobilité électrophorétique	Vm^2s^{-1}
μ_{app}	Mobilité électrophorétique apparente	Vm^2s^{-1}
μ_{EO}	Mobilité électroosmotique	Vm^2s^{-1}
μ°	Potentiel chimique standard	J mol^{-1}
ν	Exposant de Flory	sans dimension
Ψ	Débit	$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$
ξ	Coefficient de friction	kg s^{-1}
ω	Pulsation	rad s^{-1}
ρ	Resistivité	Ωm^{-1}
σ	Conductivité	$\Omega^{-1} \text{m}^{-1}$
σ^2	Variance de la distribution Gaussienne	m^2
τ	Temps de vie d'une espèce chimique	s
τ_χ	Temps de relaxation de la réaction chimique	s
θ	Angle	rad

Acronymes

Acronyme	Description
ATP	Adénosine triphosphate
bp	<i>Base-pair</i>
dsDNA	<i>double-stranded DNA</i>
FCS	<i>Fluorescence correlation spectroscopy</i>
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
G4-MB	<i>Quadruplex-based molecular beacon</i>
MB	<i>Molecular beacon</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>
RMN	Résonance magnétique nucléaire

Prologue

Lorsqu'on désire analyser la composition d'un mélange complexe, il est nécessaire de disposer d'un critère de différenciation entre les composants qui soit au plus sélectif. Dans ce travail, nous suivons une approche inspirée de la Biologie pour développer des techniques performantes d'analyse chimique. Cette approche nous a amené à considérer une espèce chimique comme une entité réactive. Son identification, au sein d'un mélange, repose sur ses propriétés dynamiques d'interaction avec une cible et non pas sur ses propriétés thermodynamiques, comme c'est le cas pour les chromatographies d'affinité.

Nous proposons une série de techniques analytiques reposant sur le couplage entre transport et dynamique chimique. Pour les mettre au point on a travaillé sur deux axes principaux. En premier lieu, on a étudié une plateforme de composés chimiques avec des cinétiques bien connues et dont les propriétés de diffusion et migration peuvent être contrôlées. En deuxième lieu, nous avons développé un microlaboratoire originel, qui remplit le cahier de charges commun aux techniques analytiques proposées : injection d'une condition initiale de concentration de l'ordre de $50\text{ }\mu\text{m}$ de largeur, application de champs électriques homogènes en deux dimensions et contrôle de température. Dans ce dispositif nous avons : i) mesuré de façon stationnaire des coefficients de diffusion d'espèces entre 10^2 et 10^6 Da de masse moléculaire, ii) analysé un mélange binaire d'espèces non-réactives et iii) déterminé des constantes thermodynamiques et des constantes cinétiques par le biais d'une différence de coefficients de diffusion entre le réactif et le produit. Enfin, le microlaboratoire réalisé devrait permettre d'effectuer des séparations électrodiffusives où le coefficient de diffusion est contrôlé par la cinétique chimique ainsi que la mesure de constantes cinétiques basée sur une différence de mobilité. Toutes ces mesures sont présentées sous un cadre théorique commun qui fournit systématiquement des solutions analytiques des équations de réaction-diffusion en utilisant la transformée de Fourier.

Le système chimique est étudié à la Partie I. Notre choix s'est porté sur la réaction d'hybridation des oligonucléotides d'ADN. Dans le Chapitre 2 nous caractérisons la thermodynamique et la cinétique de la réaction d'hybridation. Nous verrons que le système oligonucléotidique permet de prédire facilement la valeur des constantes cinétiques. Le Chapitre 3 aborde la conception de sondes oligonucléotidiques structurées visant à augmenter la sélectivité basée sur la cinétique. Ce travail a été publié à *J. Am. Chem. Soc.* et cet article et sa partie supplémentaire constituent les Chapitres 4 et 5. Les propriétés de transport de l'ADN sont étudiées au Chapitre 6 où l'on détaille une stratégie originale pour induire une différence de mobilité électrophorétique lors de l'hybridation.

La construction du microlaboratoire et l'analyse des expériences couplant transport et réaction sont exposées à la Partie II. En premier lieu, le microlaboratoire est dimensionné pour permettre l'observation du phénomène d'électrodiffusion dans le système oligonucléotidique. Le Chapitre 8 détaille la construction effective du microlaboratoire, les

différents problèmes technologiques rencontrés et les stratégies mises au point pour les résoudre. Le Chapitre 9 résume les méthodes existantes dans la littérature pour la mesure de coefficients de diffusion. Enfin, le caractère polyvalent du microlaboratoire en tant que plateforme analytique est démontré par la mesure de coefficients de diffusion (Article 2, soumis à *Anal. Chem.*), de constantes thermodynamiques et de constantes cinétiques (Article 3, soumis à *J. Am. Chem. Soc.*).

Chapitre 1

Introduction générale

1.1 Adressage d'une espèce chimique dans un mélange

1.1.1 Notion d'adressage

Historiquement la Chimie est la discipline dédiée à l'étude de la matière sur une échelle allant de l'atome au matériau. Dans ce but, deux activités principales sont apparues depuis ses origines. L'une, analytique, vise l'identification des briques élémentaires constituant un matériau ou un composé chimique existant dans la nature. L'autre, synthétique, essaie de fabriquer de nouveaux composés à partir des briques élémentaires précédentes. Si dans la première approche la nécessité d'opérations de séparation et de caractérisation apparaît évidente, elle ne l'est pas moins lors de la synthèse qui conduit, très souvent, à des mélanges de plusieurs composés.

Nous nous intéressons ici au cas d'un mélange multicomposant. C'est-à-dire, à un mélange constitué d'une grande quantité de molécules différentes à des concentrations très variées, qui est la situation retrouvée dans les échantillons d'origine biologique. Les deux caractéristiques de ce type de mélange le rendent très difficile à analyser car il faut pouvoir différencier les constituants sans noyer le signal de ceux qui sont très dilués. Il est alors nécessaire de développer des méthodes analytiques performantes.

Traditionnellement on distingue deux groupes de méthodes analytiques : celles qui reposent sur la séparation des différents constituants et celles qui permettent de les caractériser sans séparation. En réalité, les opérations de séparation et caractérisation sont toutes les deux fondées sur l'adressage sélectif d'un composé. La seule différence entre ces deux opérations est la présence d'un champ de vitesses qui met en mouvement l'espèce adressée. Nous allons donc utiliser le mot *adressage* pour désigner la façon dont une espèce chimique est identifiée dans un mélange. Le couplage entre le processus d'adressage et une propriété de transport moléculaire déterminera alors la nature séparative ou non de la technique utilisée. Dans le cas d'un mélange multicomposant, une question apparaît alors naturellement : quels sont les critères d'adressage les plus sélectifs pour une espèce chimique ?

La première approche d'adressage est de considérer les molécules comme des entités composées d'atomes différents. Le faible répertoire des atomes (environ cent) rend ce critère pauvre s'il n'est pas accompagné d'une quantification très précise, comme dans le

cas de la spectroscopie de masse. Un deuxième point de vue consiste à décrire les molécules comme constituées par des groupes fonctionnels. C'est le point de vue adopté en spectroscopie, où l'interaction du rayonnement avec la matière excite les modes normaux obéissant à des règles de sélection dépendantes de la structure ou, de manière plus simple, de la présence ou de l'absence de différents groupes fonctionnels ou chromophores. Une troisième manière d'envisager des objets moléculaires repose sur leur forme extérieure, c'est-à-dire au travers de leurs propriétés de friction en tant qu'objets hydrodynamiques lorsqu'il y a couplage avec un champ de vitesses extérieur. C'est l'approche mise en place dans certaines techniques de séparation. Enfin, nous pouvons envisager que les espèces chimiques sont fondamentalement des cibles réactives. En présence d'une molécule sonde, l'identification peut résulter des propriétés thermodynamiques (par exemple la constante d'affinité entre la cible et la sonde) ou des propriétés dynamiques¹ (les constantes cinétiques par exemple) de la réaction cible-sonde.

Il est clair que le dernier point de vue est le plus riche. Une protéine, par exemple, est composée d'un petit nombre d'atomes différents et d'une vingtaine de groupes fonctionnels. Ses propriétés de transport sont déterminées seulement par sa taille et, éventuellement, par sa charge. Par contre, considérée comme un objet réactif, le nombre de paramètres qui la définissent est aussi grand que la quantité de cibles avec lesquelles elle peut réagir. Enfin, dans ce dernier contexte, un adressage reposant sur la dynamique de la réaction apparaît *a priori* plus sélectif que celui fondé sur la thermodynamique. Ainsi, une réaction chimique élémentaire est caractérisée par une seule constante thermodynamique tandis qu'elle possède deux constantes cinétiques. De plus, si la thermodynamique est intrinsèquement indépendante du temps, la dynamique permet de mettre à profit la dimension temporelle, ce qui introduit un degré de liberté supplémentaire lors du processus d'adressage.

1.1.2 Adressage en Biologie

La cellule vivante est un très bon exemple de mélange multicomposant où environ 10^5 espèces chimiques différentes sont présentes à des concentrations très variées². Les interactions entre ces espèces doivent être finement contrôlées dans l'espace et dans le temps pour donner lieu aux comportements complexes caractéristiques de la Biologie. Dans ce sens, il demeure extrêmement intéressant autant qu'incompréhensible que l'interaction d'objets soumis aux seuls effets de la diffusion brownienne et de la réaction chimique, deux processus à caractère stochastique³, résulte en une chorégraphie aussi précise que le vivant. Il n'y a pas, bien entendu, une finalité à la justesse de la machinerie cellulaire. Elle est apparue, au cours de l'évolution, suite à des couplages fortuits entre cinétique et transport. Mais il n'est pas moins évident que l'identification de chaque molécule au sein de cette chorégraphie doit se faire de manière extrêmement sélective. Il nous semble donc pertinent de prendre la Biologie comme source d'inspiration pour l'identification de critères d'adressage performants. Dans la suite, nous présentons brièvement des compor-

¹Nous utiliserons indistinctement les termes dynamique ou cinétique chimique.

²Dans une bactérie telle que *Escherichia coli* qui a un volume de l'ordre de $10\ \mu\text{m}^3$, on peut s'attendre à une gamme de concentrations entre 10 M — la concentration de l'eau dans l'eau pure est de 55 M — et 1 nM qui correspond à une seule molécule dans le volume de la bactérie.

³On qualifie de stochastique un processus sujet aux lois de la probabilité. Au niveau moléculaire, l'acte élémentaire de la réaction chimique suit une distribution de probabilité exponentielle.

tements biologiques complexes qui suggèrent que les critères d'identification dans le vivant reposent sur la cinétique chimique et le transport (diffusion).

Le *kinetic proofreading*

Dans de nombreuses voies biosynthétiques, les étapes impliquées montrent une forte spécificité vis-à-vis du substrat. Par exemple, nous pouvons considérer la réplication de l'ADN ou la traduction de l'ARN pour la synthèse de protéines comme une suite de processus de *lecture* d'une base. Dans ces systèmes, les erreurs de lecture sont très peu fréquentes atteignant des taux entre 10^{-3} et 10^{-5} par base pour l'ADN polymérase [1]. Comment expliquer une reconnaissance moléculaire tellement performante ?

Le *kinetic proofreading* ou *kinetic amplification* est un mécanisme de vérification d'erreurs qui explique comment la spécificité d'une réaction enzyme-substrat peut être augmentée au-delà des différences d'énergie libre entre les intermédiaires réactionnels. Il a été introduit indépendamment par Hopfield en 1974 [2] et Ninio en 1975 [3] et appliqué avec succès à des réactions contrôlées par une source non-spécifique menant la réaction hors équilibre, comme l'hydrolyse de l'ATP.

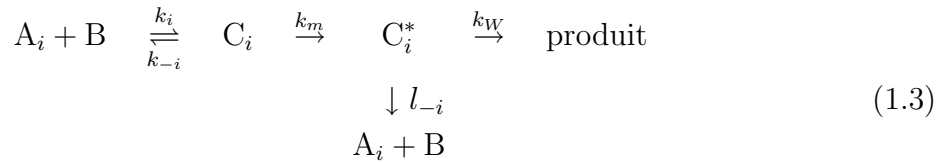
Considérons la discrimination entre les substrats A_1 et A_2 par le site de reconnaissance B, propre à A_1 . Par exemple, dans le cas de la réplication de l'ADN, A_1 serait la base correcte à rajouter, B le complexe entre l'ADN polymérase et l'ADN simple brin et A_2 une base incorrecte.

Un schéma réactionnel de type Michaelis-Menten s'écrirait :



où l'on suppose que k_W , la constante cinétique de formation du produit à partir du complexe de Michaelis, est la même pour les deux substrats. Pour simplifier les choses, on peut considérer que la discrimination a uniquement lieu lors de l'étape de dissociation⁴ et donc $k_1 = k_2$ et $k_{-1} < k_{-2}$. Ainsi, le taux d'erreurs est égal à $f_0 = K_2/K_1 = k_{-1}/k_{-2}$.

Le mécanisme de *kinetic proofreading* proposé par Hopfield est le suivant :



où un deuxième intermédiaire C_i^* a été rajouté. La réaction $C_i \rightleftharpoons C_i^*$ est hors-équilibre et très déplacée vers la droite par couplage avec une source d'énergie libre, telle l'hydrolyse de l'ATP. D'autre part, l'intermédiaire C_i^* est supposé être haut en énergie libre, ce qui amène à négliger la formation directe de C_i^* à partir des réactifs A_i et B. Si $k_m \lesssim k_i$, le principe de l'état quasi-stationnaire s'applique ; la concentration du premier intermédiaire C_i est proche de celle de l'équilibre et $[C_2]/[C_1] \simeq k_{-1}/k_{-2} = f_0$. Le résultat est que la séquence

⁴Ceci est le cas de la réaction d'hybridation entre deux petits brins d'ADN, par exemple, où les k_i dépendent peu de la séquence contrairement aux k_{-i} (cf. Chapitre 2).

réactionnelle (1.3) opère comme un mécanisme de Michaelis-Menten (1.1) dans lequel la proportion des réactifs aurait été biaisée d'un rapport f_0 , en faveur de A_1 . L'utilisation du même processus de *lecture* à deux reprises fait que, quand $k_W \lesssim l_{-i}$, le résultat net est un taux d'erreurs $f \sim k_{-1}l_{-1}/k_{-2}l_{-2}$. Dans le cas $k_{-1}/k_{-2} \sim l_{-1}/l_{-2}$ on a alors $f \sim f_0^2$, comme attendu pour une double discrimination. De cette manière, un mécanisme dirigé par une source maintenant la réaction hors équilibre et utilisant un intermédiaire de haute énergie résulte en un taux d'erreurs similaire à celui obtenu pour un mécanisme simple tel que (1.1) où les énergies libres d'interaction auraient été doublées. Nous pouvons apprécier ici comment la valeur des constantes cinétiques dans le *kinetic proofreading* est importante pour que ce principe puisse opérer.

Moteurs moléculaires

Il existe des protéines ou complexes protéiques dont le rôle est de générer une force dans une direction précise afin, par exemple, de réaliser un transport de matière d'un endroit à l'autre de la cellule. Leur mouvement a la caractéristique d'être *orienté* dans l'espace et il s'effectue sur un polymère qui sert de rail. C'est le cas de la myosine se déplaçant sur des filaments d'actine ou de la kinésine sur les microtubules [4, 5]. On appelle ces molécules des moteurs moléculaires et l'interprétation du phénomène sous-jacent pose la question de l'obtention d'un mouvement orienté par dissipation d'énergie chimique, par essence isotrope. L'interprétation actuelle considère une particule brownienne en échange entre deux états



où A et B ne présentent pas le même couplage avec un potentiel spatial périodique dissymétrique, par exemple, de nature électrique (Figure 1.1) [6, 7].

Pour que le moteur fonctionne, un certain nombre de contraintes sont nécessaires. Outre la nécessité de maintenir le système chimique hors équilibre, ces contraintes sont liées à la fois à l'amplitude $\Delta\phi$ de la barrière de potentiel, à la forme du potentiel (distances l_{diff} et l_{migr} , Figure 1.1) et à la dynamique du système chimique. Cette dernière est déterminée par les durées de vie moyennes des deux états de la molécule ($\tau_A = 1/k_1$ et $\tau_B = 1/k_2$), leurs coefficients de diffusion (D_A et D_B) et leurs mobilité électrophorétiques (μ_A et μ_B).

Supposons par exemple que A soit neutre et B chargé. Pour que l'état B reste piégé, la barrière de potentiel $\Delta\phi$ doit être significative devant la diffusion, ce qui impose que la distance parcourue par migration soit grande par rapport à la distance moyenne de diffusion pendant sa durée de vie τ_B ,

$$\Delta\phi \gg \frac{2D_B}{\mu_B}. \quad (1.5)$$

Les longueurs l_{diff} et l_{migr} sont définies respectivement comme la distance moyenne parcourue par diffusion par A et l'extension de la migration électrophorétique de B pendant leurs durées de vie moyennes τ_A et τ_B ,

$$l_{diff}^2 = \frac{2D_A}{k_1} \quad \text{et} \quad l_{migr}^2 = \frac{\mu_B \Delta\phi}{k_2}. \quad (1.6)$$

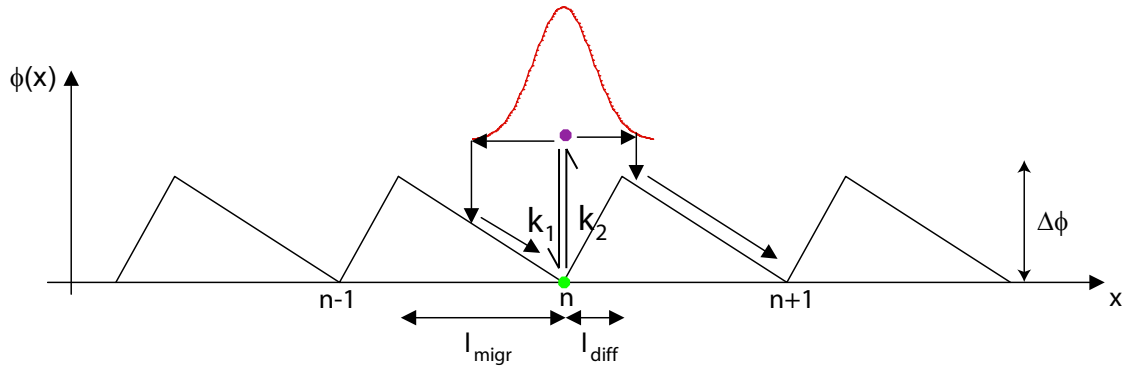


FIG. 1.1 – Introduisons une molécule dans un potentiel électrique stationnaire $\phi(x)$, de période spatiale $L = l_{migr} + l_{diff}$. Considérons deux états A et B de cette molécule qui ne présentent pas le même couplage avec le potentiel $\phi(x)$. Ces états sont en échange sous l'action d'une réaction chimique de constantes cinétiques k_1 et k_2 maintenue hors équilibre afin que le système chimique ne relaxe pas dans le potentiel imposé [8]. Pendant sa durée de vie moyenne τ_B , l'état B de la molécule, supposé chargé, reste piégé dans le puits de potentiel n . Après passage de la molécule sous sa forme A, supposée non chargée, la densité de probabilité de trouver la molécule à une distance x de sa position de départ varie selon une loi de diffusion de variance $\langle \sigma^2 \rangle = \sqrt{2D_A t}$, où D_A est le coefficient de diffusion de A. Si la durée de vie moyenne de l'état A, τ_A , est telle que la molécule a le temps de franchir l_{diff} et non l_{migr} par diffusion alors, du fait du retour à la forme chargée B, elle aura une probabilité non nulle de descendre, sous l'effet du potentiel électrique, dans le puits $n + 1$; le temps de diffusion étant trop court pour lui permettre d'atteindre le puits $n - 1$. On peut ainsi trouver une condition optimale, condition de résonance (1.6), telle que l'on obtienne un flux net de gauche à droite avec une sélectivité liée aux temps de vie associés aux différents états de l'espèce d'intérêt.

La vitesse moyenne $\bar{v}$ de déplacement de la molécule dans le potentiel prend la forme d'une expression analytique approchée à une constante numérique α près dépendant de la forme du potentiel électrique [8] :

$$\bar{v} = \alpha \frac{l_{diff} + l_{migr}}{1/k_1 + 1/k_2} = \alpha \frac{k_2 v_1 + k_1 v_2}{k_1 + k_2}, \quad (1.7)$$

avec

$$v_1 = \sqrt{2D_A k_1} \quad \text{et} \quad v_2 = \sqrt{\mu_B \Delta \phi k_2}. \quad (1.8)$$

L'adressage de la molécule se fait ici clairement par des critères cinétiques. Seules les espèces dont les constantes cinétiques vérifient la condition (1.6) auront une vitesse moyenne non nulle.

1.1.3 Comment effectuer un adressage cinétique en Chimie ?

Nous venons de voir deux exemples dans lesquels la dynamique chimique joue un rôle majeur dans l'adressage d'une molécule. Cependant, en Biologie, ces sélections par la cinétique sont souvent couplées à une source d'énergie libre, c'est-à-dire à une réaction maintenue hors équilibre. Le maintien d'un système chimique hors équilibre à l'état stationnaire implique l'apport continu de réactifs, par transport ou par synthèse chimique *in situ*, et pose des problèmes expérimentaux majeurs⁵.

Si une situation hors équilibre stationnaire est difficile à réaliser, il est relativement aisé de porter un système chimique hors équilibre de manière périodique : il suffit d'y introduire une excitation périodique qui modifie la position de l'équilibre. Dans ce cas, la dynamique du système est révélée par le couplage entre la réaction chimique et l'excitation, la réponse à l'excitation variant selon la fréquence de cette dernière [11, 12].

Suivant cette démarche, on a développé, au sein du laboratoire, une collection de procédures qui révèlent la dynamique d'une réaction. Dans tous les cas il s'agit d'imposer une perturbation périodique de façon à « exciter » sélectivement les fréquences moyennes (les constantes cinétiques k_1 et k_2) d'une réaction chimique telle que (1.4). Nous avons déjà présenté le principe des moteurs moléculaires dans lesquels la perturbation prend la forme d'un potentiel électrique périodique dans l'espace pour induire le mouvement orienté d'une espèce sélectionnée par sa dynamique [8, 13].

Une deuxième stratégie, l'électrodifusion, utilise l'action d'un champ électrique périodique dans le temps pour augmenter sélectivement le coefficient de diffusion d'une espèce engagée dans la réaction (1.4) [14–16]. Lorsque le réactif et le produit présentent des mobilités électrophorétiques distinctes, le couplage entre un processus déterministe, ici le changement de direction du champ électrique, et un processus de nature stochastique, la réaction chimique, introduit un terme de dispersion qui peut être assimilé à un coefficient de diffusion. Ce terme est maximal pour la dynamique chimique qui est en résonance avec la fréquence du champ électrique.

Dans la troisième procédure, un système réactif est soumis à la double modulation périodique d'un champ électrique et de la température avec une relation de phase précise. Le couplage avec le champ électrique se réalise par une différence de mobilité électrophorétique entre réactifs et produits tandis que le couplage avec la modulation en température provient d'une enthalpie de réaction non-nulle. Dans ce cas, un mouvement orienté peut être induit [17] et, lorsque les fréquences de deux excitations sont en résonance avec la dynamique chimique, la vitesse est maximale.

Ces trois exemples présentent deux points communs. En premier lieu, la réponse du système⁶ est toujours maximale pour un couple unique de valeurs des constantes cinétiques de la réaction⁷. Plaçons nous dans un contexte séparatif. Dans les méthodes classiques reposant sur la thermodynamique, tels que la chromatographie d'affinité, la position d'un analyte dans le chromatogramme dépend de la constante d'affinité entre l'analyte et le mi-

⁵Récemment des systèmes microfluidiques permettent la création de profils de concentration stationnaires [9, 10]. Une synthèse chimique *in situ* pourrait aussi être envisagée par des méthodes photo ou électrochimiques.

⁶La vitesse moyenne dans le cas des moteurs moléculaires ou de la double modulation et le coefficient de diffusion effectif pour l'électrodifusion.

⁷Dans le cas de la double modulation de champ électrique et de température, l'unicité est seulement garantie si les enthalpies des réactions sont égales [17].

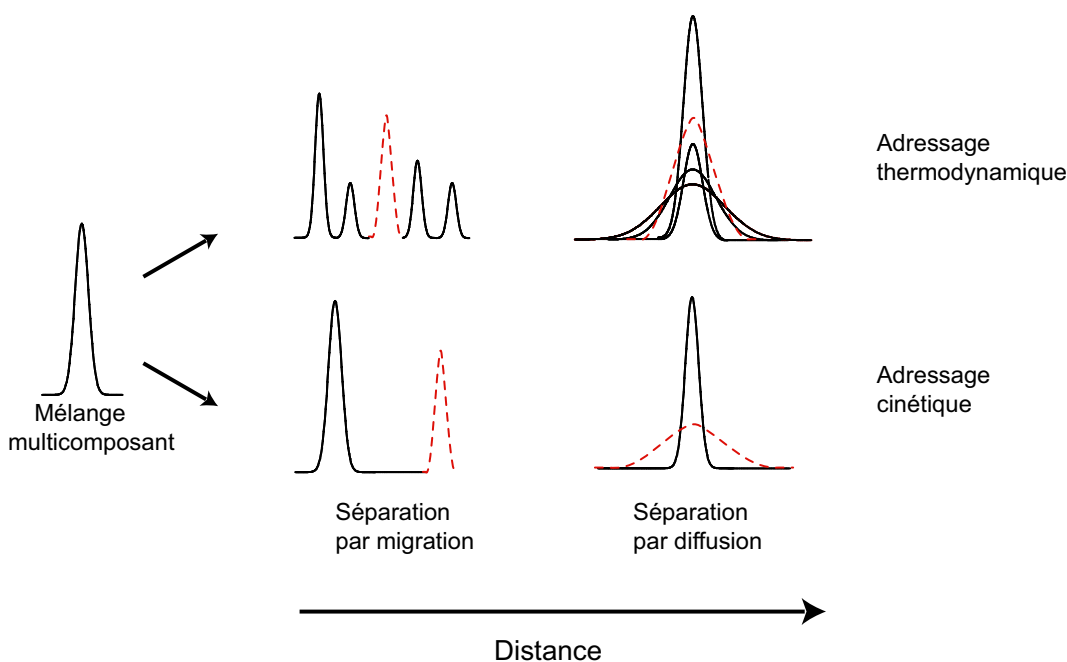


FIG. 1.2 – Illustration de la différence entre une séparation reposant sur un adressage thermodynamique ou cinétique. Dans un premier temps, toutes les espèces du mélange multicomposant sont localisées au même endroit (pic de gauche). La séparation peut se réaliser en mettant en œuvre un mouvement orienté (migration) ou isotrope (diffusion). Lorsque l'adressage est cinétique, le composé d'intérêt (en pointillés) est celui qui migre ou diffuse le plus.

lieu chromatographique (Figure 1.2). Si on s'intéresse à un seul produit dans un mélange multicomposant, il n'est pas possible de prévoir *a priori* sa position dans le chromatogramme. Par contre, dans les méthodes d'adressage cinétique énoncées, le composé choisi sera celui qui se déplace le plus vite possible, ce déplacement pouvant prendre la forme d'une migration ou d'une diffusion. L'adressage cinétique devient ainsi très séduisant lorsque l'on s'intéresse à la présence d'un seul analyte dans un mélange multicomposant (Figure 1.2). Il n'est plus nécessaire de séparer tous les analytes le plus possible les uns des autres, mais seulement de séparer l'espèce choisie *a priori* de toutes les autres. Le gain de temps est ainsi considérable. Le deuxième point commun est la nécessité d'un couplage entre l'excitation et la réaction. Pour que l'adressage cinétique ait lieu, les deux états de la réaction chimique (1.4) doivent interagir de façon distincte avec l'excitation. Par exemple, dans le cas d'un champ électrique, les deux états doivent avoir une mobilité électrophorétique différente et pour une modulation thermique, l'enthalpie de la réaction doit être non nulle.

L'implémentation expérimentale de ces approches nécessite un bon contrôle dans l'espace et dans le temps des différentes perturbations (température et champ électrique) ainsi que des profils initiaux de concentration de chaque espèce. Nous allons décrire plus en détail le phénomène d'électrodifusion et la mise en évidence expérimentale qui a eu lieu dans notre laboratoire préalablement à ce travail. Nous verrons que la considération des contraintes que nous venons d'évoquer ainsi que l'application à des systèmes chimiques plus rapides nous amènent naturellement vers les microsystèmes.

1.2 L'électrodifusion : une méthode d'adressage reposant sur la cinétique

L'électrodifusion⁸ en champ électrique alternatif a fait l'objet d'une étude détaillée dans notre équipe et a été proposée comme une méthode d'adressage et de séparation sur critères cinétiques [14]. Nous présentons ici son principe ainsi que la première démonstration expérimentale, réalisée dans notre laboratoire.

1.2.1 Principe

Considérons un mélange d'espèces chargées A_i qui réagissent avec la même espèce B pour donner les produits de réaction C_i , eux-mêmes chargés :



où k_1^i et k_2^i sont, respectivement, les constantes cinétiques d'association et de dissociation de l'espèce i . On peut considérer, par exemple, que B est une protéine et A_i une banque de cibles à tester. On suppose que l'espèce B est introduite en excès et que sa concentration, B [mol L⁻¹], est constante et uniforme. Le mécanisme (1.9) devient alors



où $\kappa_1^i = k_1^i B$ [s⁻¹] et (1.10) est analogue à (1.4). Le système ci-dessus est soumis à un champ électrique $E(t) = E \sin(\omega t)$, d'amplitude E [V m⁻¹] et oscillant à la pulsation ω [rads⁻¹]. On suppose que tous les réactifs A_i ont les mêmes coefficients de diffusion et mobilités électrophorétiques, ainsi que tous les produits. On note ces quantités D_A [m²s⁻¹], μ_A [m²V⁻¹s⁻¹], D_C et μ_C respectivement. Si on s'intéresse à des temps plus longs que le temps de relaxation de la réaction chimique $\tau_\chi = (\kappa_1 + k_2)^{-1}$ [s], on peut considérer l'espèce moyenne $\{A_i, C_i\}$ dont le coefficient de diffusion effectif sera

$$D^i = D_0^i + D_{disp}^i, \quad (1.11)$$

où

$$D_0^i = \frac{k_2^i}{\kappa_1^i + k_2^i} D_A + \frac{\kappa_1^i}{\kappa_1^i + k_2^i} D_C \quad (1.12)$$

est le coefficient de diffusion de l'espèce moyenne en l'absence de champ électrique et

$$D_{disp}^i = E^2 (\mu_A - \mu_C)^2 \frac{\kappa_1^i k_2^i}{(\kappa_1^i + k_2^i)^3} \left[\frac{1}{2(1 + \frac{\omega^2}{(\kappa_1^i + k_2^i)^2})} \right], \quad (1.13)$$

est un terme dispersif résultant du couplage entre la réaction chimique et le champ électrique alternatif, non-nul si $\mu_A \neq \mu_C$.

Dans la perspective d'utiliser l'électrodifusion comme une méthode d'adressage basée sur la cinétique, il est utile de représenter D_{disp} comme une fonction des constantes

⁸Un point de vue historique de l'électrodifusion est présenté dans l'Annexe C.

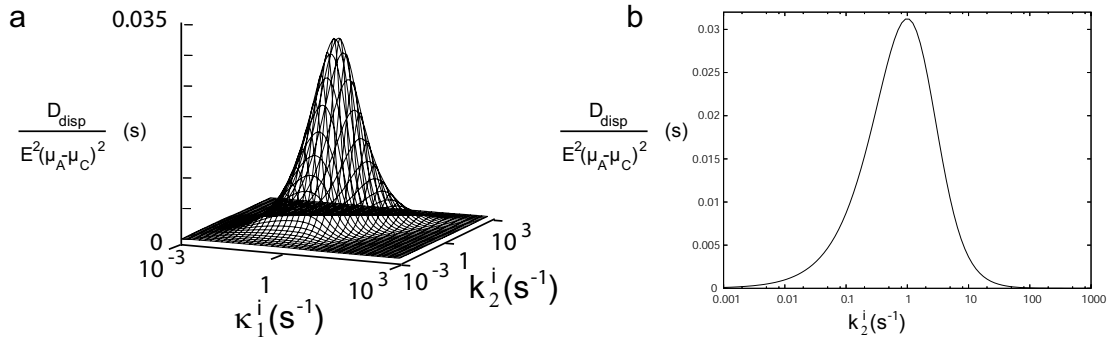


FIG. 1.3 – (a) Représentation en fonction de κ_1^i et k_2^i de la valeur D_{disp} normalisée par l'amplitude du champ électrique, E , et par la différence des mobilités électrophorétiques μ_i . (b) Profil à $\kappa_1^i = \omega/2$ de (a). Les courbes ont été calculées d'après (1.13) avec $\omega = 2 \text{ rad s}^{-1}$ et donc le maximum correspond à $\kappa_1^i = k_2^i = 1 \text{ s}^{-1}$.

cinétiques κ_1^i et k_2^i . La Figure 1.3 montre que la fonction $D_{disp}(\kappa_1^i, k_2^i)$ a un seul maximum à la position

$$\kappa_1^R = k_2^R = \frac{\omega}{2}. \quad (1.14)$$

Dans un mélange d'espèces réactives tel que (1.9), seul le couple $\{A_R, C_R\}$ vérifiant (1.14), dit couple résonant, aura un coefficient de dispersion maximum. Ainsi, dans le cas où l'électrodifusion contrôle la diffusion ($D_{disp} > D_0$), pour identifier l'espèce A_R , caractérisée par k_1^R et k_2^R , dans un mélange d'espèces A_i , nous fixons la concentration en espèce B et la pulsation du champ électrique alternatif aux valeurs

$$B = \frac{k_2^R}{k_1^R} \quad \text{et} \quad \omega = 2k_2^R \quad (1.15)$$

et nous mesurons le coefficient de diffusion. Si nous trouvons la valeur maximale, l'espèce A_R est présente dans le mélange.

Pour évaluer la sélectivité de la méthode il faut calculer le coefficient de dispersion pour des espèces ayant des constantes cinétiques proches de la condition de résonance (1.14). Considérons par exemple une espèce i ayant $\kappa_1^i = \kappa_1^R$. La Figure 1.3 montre la contribution dispersive d'une telle espèce en fonction de la constante cinétique de dissociation k_2^i . Nous pouvons apprécier que toutes les espèces vérifiant $0.1k_2^i \leq k_2^R \leq 10k_2^i$ ont un coefficient de dispersion trois fois moins important que l'espèce vérifiant (1.14). Une telle différence dans le coefficient de diffusion est très facile à mesurer expérimentalement (*cf.* Chapitre 9).

1.2.2 Mise en évidence expérimentale

L'électrodifusion en champ électrique alternatif a été observée pour la première fois dans notre laboratoire [15, 16]. La réaction chimique choisie pour illustrer le phénomène a été l'inclusion d'un colorant diazoïque dans la cavité d'une α -cyclodextrine (Figure 1.4a). Le Tableau 1.1 présente les constantes cinétiques et coefficients de diffusion browniens du système étudié. Conçu pour des constantes cinétiques d'échange entre 10^{-2} et 10^{-1} s^{-1} , le dispositif expérimental était un constitué d'un capillaire de verre de $1 \times 1 \text{ mm}^2$ de section

et 3 cm de longueur (Figure 1.4b). Il était rempli d'un gel d'agarose pour empêcher les écoulements dus à l'électroosmose et les sources de dispersion sous-jacentes. La condition initiale du profil de concentration était de type marche (Heavyside) : l'analyte était amené avec un champ électrique constant depuis un réservoir jusqu'au centre du capillaire où l'on réalisait l'observation (Figure 1.4 b). Au début de l'expérience, la condition initiale avait une largeur d'environ 5 mm (Figure 1.4 c). Dans ce système, il était possible d'appliquer des champs électriques de 3000 V m^{-1} à des fréquences typiques de 0.1 Hz. Les expériences avaient une durée typique d'une heure. L'observation se réalisait par transmission, car l'espèce chimique utilisée absorbait dans le visible.

Une expérience démonstrative du phénomène d'électrodifusion a été réalisée. La pulsation du champ électrique a été fixée à $\omega = 2k_2$, puis l'expérience d'électrodifusion a été menée à différentes valeurs de $\kappa_1 = k_1 B$ en faisant varier la concentration en α -cyclodextrine (ici l'espèce B). Le coefficient de diffusion effectif D a été mesuré à chaque fois et des augmentations jusqu'à un facteur 3 ont été observées (Figure 1.4 d). Cependant, la mise en évidence d'une séparation basée sur l'électrodifusion n'a pas été réalisée.

TAB. 1.1 – Constantes cinétiques d'association, k_1 , et dissociation, k_2 , pour la réaction entre le colorant diazoïque étudié (Figure 1.4) et l' α -cyclodextrine et coefficients de diffusion mesurés en absence de champ électrique pour le colorant (espèce A) et pour le complexe colorant-cyclodextrine (espèce C). Valeurs à 25° C .

k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_2 (s^{-1})	D_A ($10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$)	D_C ($10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$)
6	$3,5 \cdot 10^{-2}$	4 ± 1	2 ± 1

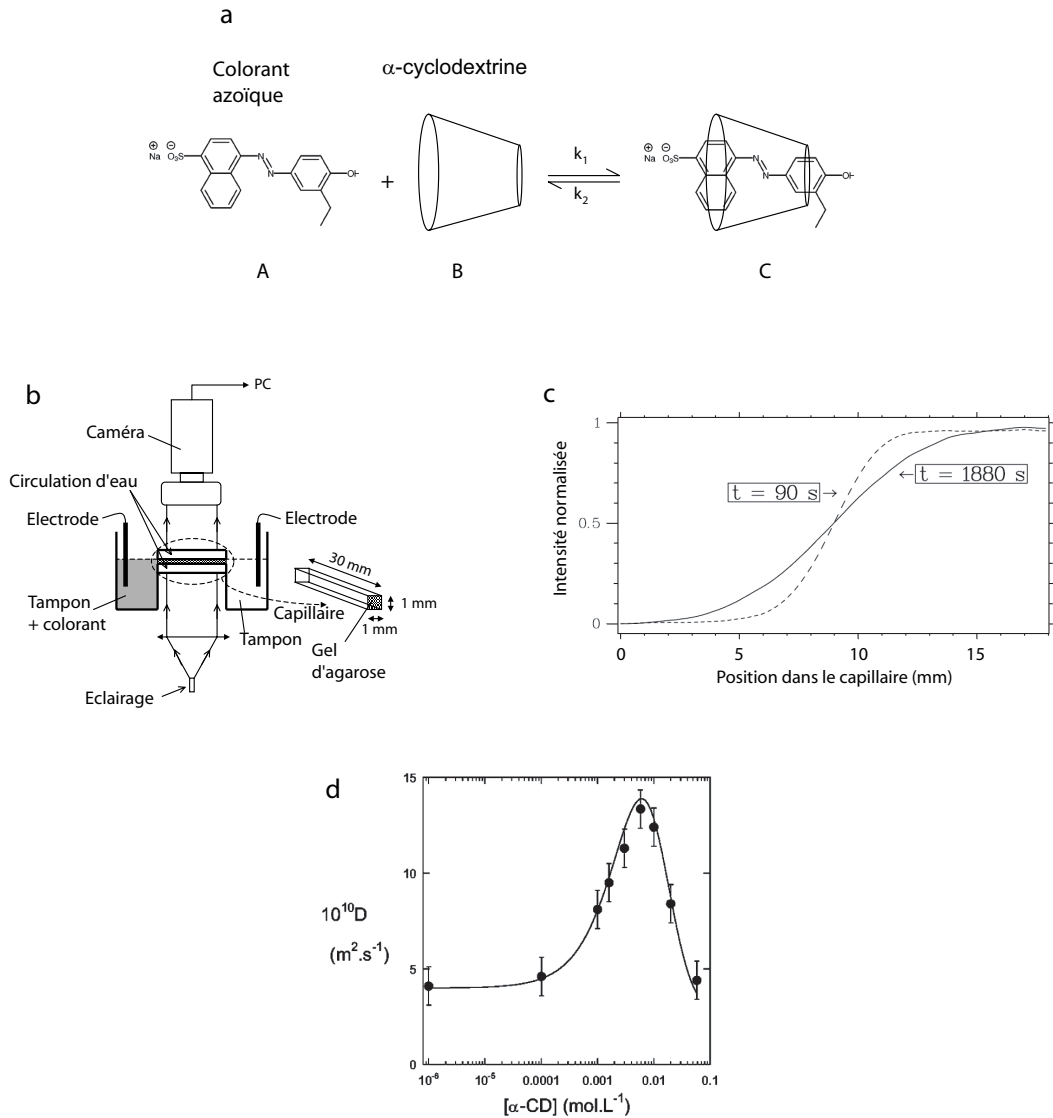


FIG. 1.4 – (a) Réaction chimique d'association entre un colorant diazoïque et l' α -cyclodextrine utilisée dans notre laboratoire pour la démonstration expérimentale du phénomène d'électrodifusion en champ électrique alternatif. (b) Dispositif expérimental utilisé. Le colorant, dans le réservoir de gauche, est introduit dans le capillaire rempli d'agarose, à l'aide d'un champ électrique, jusqu'à la zone d'observation. Ensuite, le champ alternatif est mis en place à la fréquence choisie et l'évolution de ce profil est suivie par imagerie de transmission. (c) Intensité normalisée du profil de concentration initial ($t = 90 \text{ s}$) et final ($t = 1440 \text{ s}$) d'une expérience typique d'électrodifusion. La largeur de la condition initiale est d'environ 5 mm. (d) Coefficient de diffusion effectif mesuré lorsque l'expérience d'électrodifusion est réalisée en présence d'un champ électrique d'amplitude 3000 V m^{-1} et de pulsation $\omega = 2k_2 = 0.07 \text{ rad s}^{-1}$ en fonction de la concentration en α -cyclodextrine. Les cercles correspondent aux points expérimentaux et les lignes résultent d'un ajustement par l'expression (1.11). Figures extraites de [15].

1.3 Objectifs de cette thèse

1.3.1 Une banque de réactifs aux propriétés cinétiques variées

Nous avons exposé une série de méthodes analytiques reposant sur l'adressage cinétique d'une espèce chimique. Leur démonstration expérimentale nécessite d'une banque de réactions chimiques aux dynamiques variées. L'idéal serait de disposer d'une série de composés dont les constantes cinétiques de réaction avec une cible peuvent être prévues à l'avance. Deux types de réactions d'association répondent à ce critère : i) les réactions acide-base et ii) les réactions d'association entre deux petits brins d'ADN pour donner un double brin. Dans le premier cas, un répertoire de constantes thermodynamiques K existe dans la littérature et dans le deuxième cas, celles-ci peuvent être calculées en fonction de la structure par des méthodes semi-empiriques. Dans ces deux situations, la constante cinétique d'association k_1 est indépendante de la structure. Pour les réactions acide-base, k_1 est en général limitée par la diffusion⁹ et vaut environ $k_1 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans les solvants ordinaires à température ambiante, tandis que pour l'hybridation de l'ADN k_1 est fixée par les conditions salines et vaut environ $k_1 \sim 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Dans les deux cas, la constante cinétique de dissociation peut être estimée *a priori* comme $k_2 = K/k_1$. Dans ce travail, nous avons choisi de travailler avec la réaction d'hybridation de l'ADN et la Partie I de ce document est consacrée à la caractérisation des propriétés dynamiques et de transport de ce système.

1.3.2 Un dispositif microfluidique polyvalent pour l'adressage cinétique

Le montage expérimental d'électrodifusion en champ électrique alternatif que nous venons d'exposer a effectivement permis l'observation du phénomène d'électrodifusion d'une espèce pure. Cependant, il ne permet pas de mettre au point un protocole de séparation reposant sur ce phénomène. En effet, la création de la condition initiale ne se réalise pas au point d'observation. Le mélange est amené jusqu'au point d'observation par l'application d'un champ électrique constant. Comme les mobilités électrophorétiques des espèces moyennes $\{A_i, C_i\}$ sont différentes, il est difficile de différencier la séparation due à l'électrodifusion de celle occasionnée par l'électrophorèse.

Dans la Partie II de ce travail nous proposons un nouveau montage expérimental qui résout ce problème. Les techniques de microfabrication utilisées ont permis de construire un dispositif où la condition initiale se réalise au point d'observation. D'autre part, l'observation est effectuée par fluorescence, et deux produits marqués avec des fluorophores distincts peuvent être aisément différenciés pour mettre en évidence la séparation.

Enfin, nous verrons que le dispositif proposé, conçu pour l'expérience d'électrodifusion, permet d'étudier une série de phénomènes qui couplent transport et réaction chimique. Nous profiterons de la simplicité des équations décrivant ces phénomènes, résultant d'un profil de vitesses extrêmement simple, pour proposer une analyse des données dans l'espace de Fourier. Cette analyse nous a permis de mesurer des coefficients de diffusion d'une

⁹On distingue deux étapes lors d'une réaction chimique élémentaire. Une étape de diffusion dans laquelle les deux réactifs entrent en contact et une autre de réaction. Si la probabilité de cette dernière est proche de un, on dit que la réaction est limitée par la diffusion

espèce pure, de cribler une série d'analytes vis-à-vis de leur affinité par cible et de mesurer des constantes cinétiques.

Première partie

Oligonucléotides : Une plateforme à
propriétés thermodynamiques et
cinétiques facilement prédictibles

Chapitre 2

Thermocinétique de la réaction d'hybridation entre deux oligonucléotides

Pour la mise au point de techniques analytiques reposant sur la cinétique, nous avons besoin d'un système chimique réagissant avec une cinétique bien connue. Nous avons choisi de travailler avec un système obéissant au mécanisme $A + B \rightleftharpoons C$, caractérisé par les constantes cinétiques d'association k_1 et de dissociation k_2 . Un tel mécanisme fait ressortir deux temps caractéristiques : $\tau_1 \sim (k_1 B)^{-1}$ et $\tau_2 \sim (k_2)^{-1}$, relatifs à l'association et à la dissociation, respectivement. τ_1 peut alors être ajusté en fonction de la concentration de l'espèce B, notée ici B , ce qui introduit un degré de liberté supplémentaire.

Le système idéal présenterait des cinétiques facilement prévisibles d'après la structure moléculaire. Dans le cas contraire, une importante étape de criblage des composés par leurs constantes cinétiques serait nécessaire avant de pouvoir réaliser les différentes expériences. Le choix du système chimique a ainsi répondu aux critères suivants :

- Facilité de synthèse de différents composés avec des cinétiques variées.
- Prévision aisée des constantes cinétiques de la réaction en fonction de la structure et des conditions expérimentales.
- Intérêt du système pour des applications pratiques au delà de la mise en évidence d'un phénomène tel que l'électrodifusion.

Nous avons alors choisi de travailler avec la réaction d'hybridation entre oligonucléotides. Ces petits brins d'ADN peuvent être facilement obtenus commercialement avec des séquences variées et des longueurs jusqu'à une centaine de bases. Ils sont aussi disponibles marqués par des fluorophores pour leur observation en microscopie. Mais surtout, la constante thermodynamique et les constantes cinétiques de la réaction d'hybridation peuvent être facilement estimées *a priori* avec une précision d'un ordre de grandeur. Enfin, ce système a des implications biologiques importantes et nous verrons que les techniques développées dans la Partie II peuvent être appliquées à la détection de mutations dans l'ADN.

2.1 Le mécanisme d’hybridation

Dans son état natif, l’ADN est un polymère composé de deux brins associés par des interactions non-covalentes. Les monomères constituant chacun des brins s’appellent nucléotides. Un nucléotide est formé par une pentose, un phosphate et un hétérocycle aromatique appelé base. Une liaison phosphodiester relie les pentoses de deux nucléotides différents tandis que les bases sont directement liées aux pentoses. Les quatre bases trouvées dans l’ADN sont l’adénine (A), la cytosine (C), la guanine (G) et la thymine (T). Les bases des brins opposés s’arrangent de manière précise : chaque type de base d’un brin est lié avec un seul type de base de l’autre brin. Ainsi, A est appariée à T par deux liaisons hydrogène tandis que G est appariée à C par trois liaisons hydrogène. Cet arrangement est appelé appariement complémentaire et a été proposé pour la première fois par Watson et Crick [18].

Peu après la première description de la double hélice, il a été montré que les deux brins d’ADN pouvaient être séparés par chauffage. En effet, lorsque l’on augmente la température, l’ADN double brin se dissocie en deux molécules simple brin ; on dit qu’il fond. Le premier modèle théorique complet essayant d’expliquer cette transition est dû à Zimm [19], puis à Applequist et Damle [20] ; tandis que la première étude expérimentale a été décrite par Marmur et Doty en 1961 [21]. Ces expériences de dénaturation thermique permettent d’étudier la thermodynamique de la réaction d’hybridation. Il est ainsi bien établi que l’empilement π^1 des bases de l’ADN et la formation des liaisons hydrogène entre nucléotides complémentaires contribuent de façon similaire à la stabilisation de la structure en double hélice [22]. D’autre part, les bases de données construites à partir de ces expériences ont conduit à la réalisation de tables d’incrément permettant de prédire les grandeurs thermodynamiques relatives à l’hybridation de tout couple de simples brins complémentaires [23, 24].

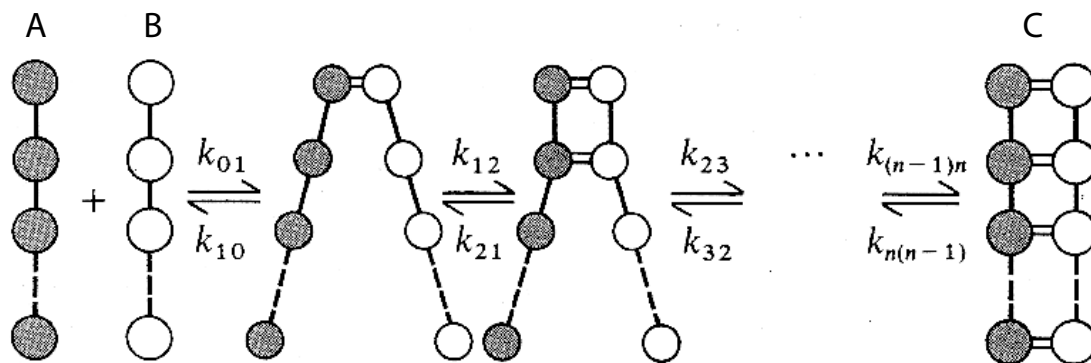


FIG. 2.1 – Mécanisme général pour la réaction d’hybridation entre deux oligonucléotides simple brin A et B pour former un double brin C. Une paire de bases est formée à chaque étape élémentaire. Figure extraite de [22].

Parallèlement, la mise au point de techniques de relaxation pour l’étude de la cinétique

¹Dans l’ADN, l’empilement π (π stacking) est une interaction non-covalente entre des bases azotées adjacentes. Ces cycles aromatiques sont arrangés de façon parallèle les uns aux autres dans le double brin. Cette conformation permet aux bases de participer dans des interactions aromatiques ce qui augmente la stabilité de la structure moléculaire.

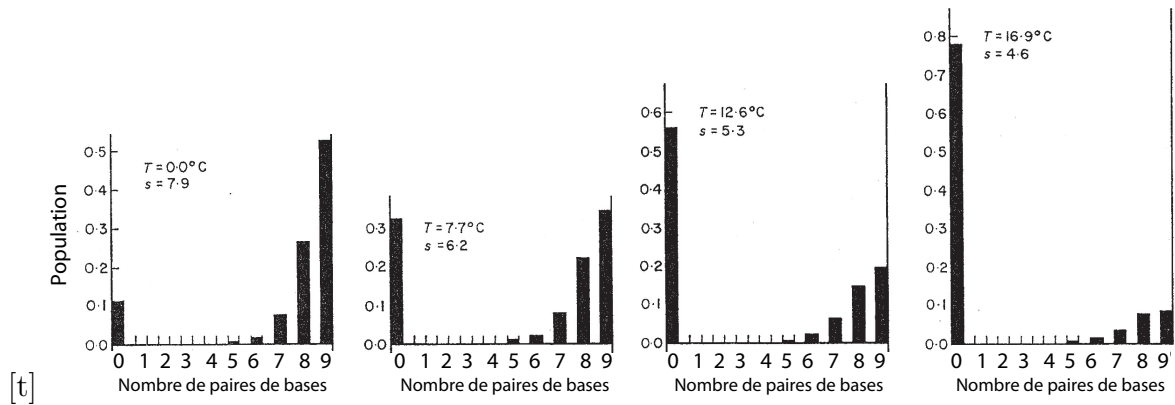


FIG. 2.2 – Populations relatives, à différentes températures, des espèces hélicoïdales à l'équilibre en fonction du nombre de paires de bases formées entre deux ARN 9-mères. Figure extraite de [28].

chimique a permis l'accès à une fenêtre de temps compatible avec l'hybridation de l'ADN [11]. Au début des années soixante, les premières expériences se sont centrées dans l'étude de la cinétique d'hybridation d'ADN génomique [25, 26]. Cependant, le grand nombre de bases impliquées lors de l'appariement rendait les résultats difficiles à interpréter. En conséquence, le mécanisme d'hybridation a été dérivé de la réaction entre petits brins d'ARN (6 à 20 bases), appelés oligonucléotides.

Dans ces systèmes, le mécanisme général postulé au niveau microscopique est une succession d'étapes élémentaires, chacune consistant en la formation d'une seule paire de bases [27] (Figure 2.1). Des preuves expérimentales [28–30] ont suggéré que le mécanisme général de la Figure 2.1 pouvait être réduit à un modèle de tout-ou-rien pour lequel l'étape cinétiquement déterminante est la formation d'un noyau de 2 à 4 paires de bases. Une fois ce noyau initial formé, la double hélice se forme comme une fermeture éclair et l'appariement des bases restantes est rapide. De manière symétrique, l'étape cinétiquement déterminante de la réaction de dissociation est la rupture de toutes les paires de bases jusqu'à arriver à un nombre de paires de bases inférieur à celui du noyau. Le noyau est ainsi défini comme l'espèce dont la formation d'une paire de bases supplémentaire est plus rapide que la rupture. Le modèle tout-ou-rien s'écrit alors comme



où A et B représentent les deux oligonucléotides simple brin et C le double brin, k_1 et k_2 sont les constantes cinétiques d'association et de dissociation, respectivement, et $K = k_1/k_2$ la constante thermodynamique.

Pour illustrer la pertinence du modèle tout-ou-rien, Pörschke et collaborateurs [28] ont calculé la concentration relative à l'équilibre des espèces hélicoïdales partiellement hybridées. Dans la Figure 2.2, cette analyse a été effectuée pour un 9-mère à différentes températures. Dans tous les cas, la concentration des hélices ayant entre une et six paires de bases peut être négligées, ce qui justifie le modèle de tout-ou-rien. Ce comportement s'explique parce que la constante thermodynamique associée à chaque étape élémentaire est sensiblement supérieure à un.

Le nombre de paires de bases n présentes dans le noyau peut être calculé en reliant le modèle de tout-ou-rien (2.1) au mécanisme microscopique indiqué à la Figure 2.1. L’énergie d’activation $E_{a,1}$ mesurée expérimentalement pour la réaction d’association peut alors s’écrire

$$E_{a,1} = \Delta_r H^\circ_{n-1} + E_{a,n-1 \rightarrow n}, \quad (2.2)$$

où $\Delta_r H^\circ_{n-1}$ est l’enthalpie standard de réaction associée à la formation de l’intermédiaire à $n-1$ bases adjacentes et $E_{a,n-1 \rightarrow n}$ est l’énergie d’activation correspondant à la formation d’une paire de bases². Les travaux pionniers de Pörschke et Craig [28, 29] ont porté sur le réaction d’hybridation entre petits brins d’ARN. La valeur de l’énergie d’activation $E_{a,1}$ pour ces systèmes est corrélée à la séquence. Elle prend des valeurs négatives (-15 à -35 kJ mol⁻¹) quand les paires AU sont les seules présentes [28, 29], nulles quand des paires GC isolées sont présentes et positives ($+20$ à $+35$ kJ mol⁻¹) quand au moins deux paires GC sont en position adjacente [30]. Ainsi, pour les ribo-oligonucléotides, la présence de paires GC détermine fortement le nombre de paires de bases n présentes dans le noyau. Cependant, cette tendance n’est pas aussi claire lors de l’hybridation de petits brins d’ADN [33]. Pour ces systèmes, les énergies d’activation ne sont pas corrélées avec la séquence³ et varient entre 0 et -35 kJ mol⁻¹. Ces valeurs permettent d’estimer la longueur du noyau entre 2 et 4 paires de bases pour l’ADN.

En définitive, la réaction d’association entre brins d’ADN passe par la formation d’un noyau stable de longueur fixe relié à une énergie d’activation faiblement négative. Ainsi, la valeur de la constante cinétique d’association k_1 mesurée expérimentalement dépend faiblement de la séquence et de la température. Symétriquement, les énergies d’activation $E_{a,2}$ associées à la réaction de dissociation sont très positives et fortement dépendantes de la séquence ce qui rend les constantes cinétiques k_2 correspondantes très dépendantes de la température et de la séquence.

La concentration en cations dans la solution est aussi un paramètre important dans la réaction d’hybridation. En effet, les brins d’ADN sont des objets fortement chargés et les cations s’y condensent réduisant la densité de charge. De plus, la formation du double brin implique une augmentation du nombre de cations condensés par unité phosphate. Il a été montré que k_1 dépend fortement de la concentration en cations tandis que k_2 est beaucoup moins dépendante [34, 35]. Grossièrement, k_1 augmente d’un ordre de grandeur lorsque la concentration en Na⁺ passe de 10 mM à 1 M ou lorsque la concentration en Mg²⁺ augmente de 1 à 10 mM. Dans ces mêmes conditions, la valeur de k_2 diminue typiquement d’un facteur deux.

Les oligonucléotides constituent ainsi un système idéal pour nos études car la valeur des constantes cinétiques peut être estimée *a priori*. La valeur de k_1 est principalement fixée par la concentration en sel et vaut entre 1×10^4 et 5×10^6 M⁻¹s⁻¹, tandis que k_2 dépend essentiellement de la séquence et de la température avec un domaine de valeurs très large, allant de 10^2 à 10^{-10} s⁻¹. Pour une séquence et une température donnée, la constante de dissociation peut être estimée en fonction de la constante thermodynamique K et de la valeur de k_1 pour une séquence modèle comme $k_2 = K/k_1$.

²Pour la formation d’une paire de bases, l’énergie d’activation peut être identifiée à celle du *stacking* d’une base dans l’ADN simple brin. Elle vaut typiquement $E_{a,n-1 \rightarrow n} \simeq 20$ kJ mol⁻¹ [31, 32].

³En effet, la différence en stabilité entre les paires A·T et G·C dans l’ADN n’est pas aussi grande que pour l’ARN.

2.2 Détermination de grandeurs thermodynamiques

2.2.1 Les expériences de dénaturation thermique

Les expériences de dénaturation thermique constituent la méthode la plus utilisée pour déterminer la thermodynamique d'hybridation de l'ADN. Dans ces expériences, le degré d'avancement de la réaction d'association α est enregistré en fonction de la température, ce qui permet de calculer la constante thermodynamique K pour chaque température, et de remonter à l'enthalpie et à l'entropie standard de réaction, $\Delta_r H^\circ$ [J mol^{-1}] et $\Delta_r S^\circ$ [$\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$], respectivement.

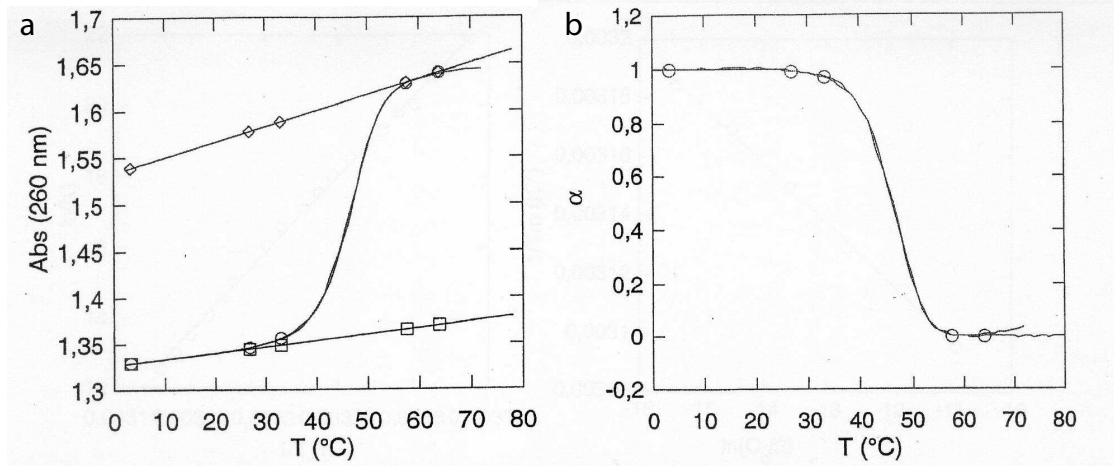


FIG. 2.3 – (a) Exemple d'une courbe de dénaturation thermique où l'absorbance à 260 nm est mesurée en fonction de la température pour la réaction d'hybridation entre deux oligonucléotides 13mères (TGT13+ACA13, cf. Figure 2.6) à $16 \mu\text{M}$. La ligne de base haute correspond à $lA_0\epsilon_{sb}(T)$ et la basse à $lA_0\epsilon_{db}(T)$. (b) Degré d'avancement de la réaction calculé à partir de (a) et (2.7). Tampon 0.1 M NaCl, 0.01 M cacodylate pH 7.

Considérons un mélange stœchiométrique de deux simples brins de concentration A_0 . Dans le cadre d'un modèle de tout ou rien, le degré d'avancement de la réaction (2.1) est

$$\alpha = \frac{C}{A_0} \quad (2.3)$$

où C est la concentration du double brin à l'équilibre. La constante thermodynamique associée à la réaction (2.1) est alors

$$K(T) = \frac{\alpha(T)}{A_0(1 - \alpha(T))^2}, \quad (2.4)$$

ce qui permet de calculer la valeur de K à toute température à partir de la mesure de $\alpha(T)$. Enfin, $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ sont extraits par ajustement de la droite

$$\ln K = -\frac{\Delta_r H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta_r S^\circ}{R} \quad (2.5)$$

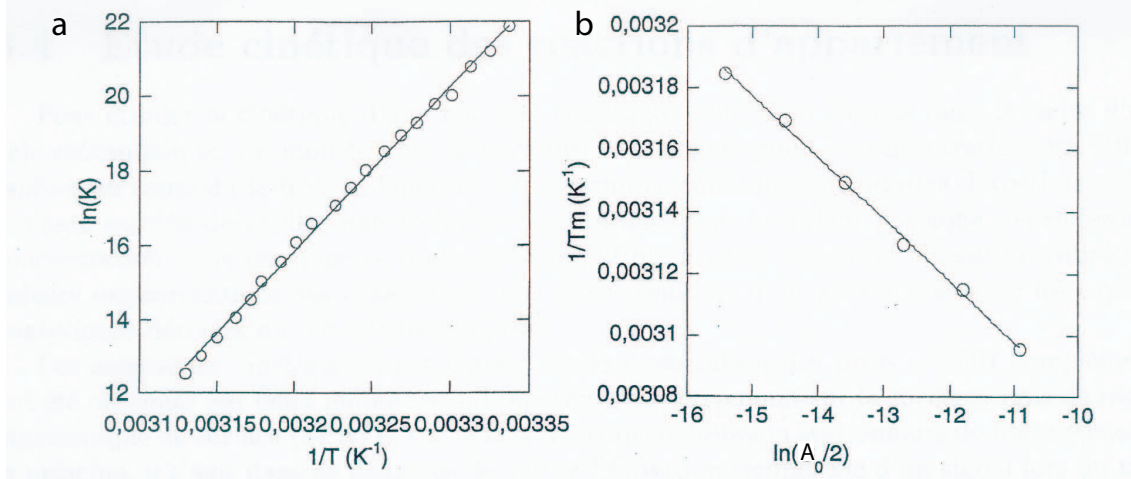


FIG. 2.4 – À partir de la courbe $\alpha(T)$ (Fig. 2.3b), deux méthodes sont utilisées pour calculer $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$. (a) $\ln K$ est tracé en fonction de $1/T$ et ajusté avec (2.5). (b) $1/T_m$ est tracé en fonction de la concentration en simple brin $\ln(A_0/2)$.

en supposant qu'ils sont indépendants de la température.

Une méthode d'analyse complémentaire repose sur le concept de température de fusion (*melting temperature*), T_m . La T_m est la température de demi-dissociation, c'est-à-dire $\alpha(T_m) = 0.5$. En combinant (2.4) et (2.5) on obtient

$$T_m = \frac{\Delta_r H^\circ}{\Delta_r S^\circ + R \ln(\frac{A_0}{2})}. \quad (2.6)$$

Et la détermination de T_m en fonction de A_0 permet aussi de calculer $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$.

D'un point de vue expérimental, le degré d'avancement de la réaction d'hybridation de l'ADN peut être suivi par spectroscopie d'absorption UV (Figure 2.3). Les bases aromatiques de l'ADN absorbent dans ce domaine du spectre ($\lambda_{max} = 250 - 270 \text{ nm}$) avec un coefficient d'absorption molaire de l'ordre de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{base}^{-1}$ [22]. Considérons le mélange équimolaire de deux brins complémentaires, chacun à la concentration A_0 . À haute température ($T \gg T_m$), les brins sont désappariés et possèdent un coefficient d'absorption molaire global (pour les deux séquences) ϵ_{sb} . À basse température, les brins forment un duplex de coefficient d'absorption molaire ϵ_{db} , inférieur à ϵ_{sb} . Cet hypochromisme, de l'ordre de 30 %, est lié à l'empilement des bases et à l'alignement de leur moment de transition dans la structure double hélice [22]. L'absorbance de la solution s'exprime, dans la limite du modèle tout ou rien (2.1), comme la somme du terme dû aux simples brins et de celui du double brin : $Abs = l(C_{sb}\epsilon_{sb} + C_{db}\epsilon_{db})$. Si l'on suppose que les grandeurs $A_0\epsilon_{sb}(T)$ et $A_0\epsilon_{db}(T)$ varient linéairement avec la température, la courbe $Abs(T)$ est une sigmoïde à partir de laquelle peuvent être facilement tracées les droites $lA_0\epsilon_{sb}(T)$ et $lA_0\epsilon_{db}(T)$ (Figure 2.3). Le degré d'avancement α de la réaction de dénaturation est

$$\alpha(T) = \frac{Abs(T) - lA_0\epsilon_{db}(T)}{lA_0\epsilon_{sb}(T) - lA_0\epsilon_{db}(T)}. \quad (2.7)$$

La Figure 2.4 montre les ajustements des courbes $\ln K$ vs. $1/T$ et $1/T_m$ vs. $\ln(A_0/2)$

pour extraire les grandeurs thermodynamiques de réaction. Les résultats obtenus par les deux méthodes de traitement sont cohérents à 20 % près.

2.2.2 La méthode des plus proches voisins

Dans le design d'un grand nombre d'applications biotechnologiques⁴, il est nécessaire de connaître la valeur de la constante thermodynamique d'hybridation de deux séquences d'acides nucléiques pour des température et concentration en sel données. Nous venons de voir que la dénaturation thermique constitue l'outil de choix pour déterminer les grandeurs thermodynamiques pour la réaction d'hybridation de l'ADN. Cependant, ces expériences sont assez coûteuses en temps. En ce sens, un grand effort a été effectué pour mettre au point un algorithme prédictif des valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$, qui est à présent disponible sous la forme du serveur web HyTher, développé par SantaLucia [24, 36, 37]. Le fonctionnement de ce serveur est le suivant. Premièrement, les grandeurs thermodynamiques $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ d'un ensemble d'une centaine d'oligonucléotides de séquences et longueurs différentes ont été déterminées expérimentalement dans le cadre du modèle de tout-ou-rien à 1 M NaCl. Deuxièmement, un algorithme utilisant l'approximation des plus proches voisins permet de prédire $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ pour toute séquence à 1 M NaCl. Enfin, des relations empiriques corrigent les valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ dans d'autres conditions salines.

L'énergie libre du double brin est calculée en supposant que les interactions tertiaires sont négligeables par rapport aux interactions secondaires. La stabilité d'une paire de bases ne dépend alors que des plus proches voisins [38] et l'énergie libre totale est la somme des interactions entre paires de bases. Par exemple, $\Delta_r H^\circ$ dans l'approximation des plus proches voisins est calculé comme

$$\Delta_r H^\circ = \Delta_r H^\circ_{init} + \sum \Delta_r H^\circ_{stack} + \Delta_r H^\circ_{term}, \quad (2.8)$$

où $\Delta_r H^\circ_{stack}$ est la contribution de chaque paire de base, et $\Delta_r H^\circ_{init}$ et $\Delta_r H^\circ_{term}$ sont les corrections pour les paires de bases situées aux extrémités.

Pour rendre utilisable la base de données dans des conditions salines variées, une relation empirique permet de calculer $\Delta_r S^\circ$ à partir de sa valeur à 1 M NaCl

$$\Delta_r S^\circ ([Na^+]) = \Delta_r S^\circ (1M NaCl) + 0.368N \ln[Na^+] \quad (2.9)$$

où N est la longueur de l'oligonucléotide. $\Delta_r H^\circ$ est supposé être indépendant de la concentration saline⁵ dans une gamme allant de 0.05 à 1 M en ions Na^+ .

2.3 Mesure de constantes cinétiques

Pour étudier la cinétique d'une réaction chimique, on se place dans le cadre d'un modèle mécanistique. Ce modèle fournit des expressions pour la concentration des différentes

⁴La PCR (*polymerase chain reaction*), la mutagenèse dirigée et le *silencing* de gènes entre autres (*cf.* www.dnasoftware.com).

⁵Owczarzy et collaborateurs ont récemment proposé une relation empirique qui prend en compte l'influence de la concentration en Na^+ dans la valeur de $\Delta_r H^\circ$ [39].

espèces au cours du temps, en fonction des constantes cinétiques introduites. Expérimentalement, il s’agit ensuite de choisir une technique qui mesure une propriété physique dépendante de la concentration dans une fenêtre de temps compatible avec le temps de relaxation chimique. Les valeurs expérimentales des constantes cinétiques résultent d’un ajustement avec les expressions analytiques dérivées du mécanisme proposé.

Quand un oligonucléotide marqué avec un fluorophore s’hybride pour former un double brin, le rendement quantique de fluorescence change. On a ainsi choisi de suivre les cinétiques d’association et de dissociation des brins d’ADN complémentaires par spectroscopie d’émission de fluorescence. Cette technique a une résolution temporelle de 1 s ou de 50 ms selon la méthode utilisée pour réaliser le mélange.

Dans la suite, on décrit le principe des expériences réalisées pour déterminer les constantes cinétiques de la réaction d’hybridation. On dérive d’abord la dépendance temporelle des concentrations dans le cadre du modèle de tout-ou-rien. Ensuite, on aborde brièvement la technique de spectroscopie de fluorescence et on relie l’intensité de fluorescence aux concentrations. Finalement on décrit la méthode de *stopped-flow* permettant le mélange rapide de réactifs pour mesurer des cinétiques entre 50 ms et 1 s.

2.3.1 Analyse mathématique de la cinétique d’hybridation

Dans le cadre du modèle de tout-ou-rien, la réaction d’hybridation entre deux oligonucléotides simple brin s’écrit



où A est le simple brin fluorescent, B le complémentaire et C le double brin, lui aussi fluorescent. L’équation de conservation associée à (2.10) est

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_1 B(t)A(t) - k_2 C(t) \quad (2.11)$$

où la concentration de chaque espèce est notée de la même façon que l’espèce elle-même et on a explicitement écrit leur dépendance temporelle.

Réaction d’association

Dans les expériences d’association, on mélange A et B à des concentrations initiales A_0 et B_0 , respectivement. On peut alors réécrire (2.11) comme

$$\frac{dC}{dt} = k_1(B_0 - C)(A_0 - C) - k_2 C. \quad (2.12)$$

Cette équation a deux solutions analytiques selon que l’espèce B est en excès ou non par rapport à A.

B en excès par rapport à A : Dans l’approximation $B_0 \gg A_0$, (2.12) prend la forme

$$\frac{dC}{dt} = k_1 B_0 A_0 - C(k_1 B_0 + k_2) \quad (2.13)$$

qui a comme solution

$$C(t) = C_\infty(1 - e^{-t/\tau}), \quad (2.14)$$

où C_∞ est la concentration de double brin à l'équilibre. La concentration de C augmente exponentiellement avec un temps caractéristique

$$\tau = \frac{1}{k_1 B_0 + k_2}. \quad (2.15)$$

Les concentrations de B et A sont similaires : Dans ce cas la solution de (2.12) est⁶

$$C(t) = C_\infty \left(1 - \frac{e^{-t/\tau}}{1 + k_1 \tau C_\infty (1 - e^{-t/\tau})} \right) \quad (2.16)$$

et le temps caractéristique est défini comme

$$\tau = \frac{1}{k_1(A_0 + B_0 - 2C_\infty) + k_2}. \quad (2.17)$$

Dans les deux situations exposées, la mesure de τ nous a permis de déterminer k_1 si k_2 était connu. Le cas $B_0 \gg A_0$ fournit une analyse facile et robuste à travers une fonction monoexponentielle. Le deuxième cas de figure, où A et B sont à des concentrations similaires, a l'avantage de permettre la détermination de cinétiques d'association plus rapides. Considérons une méthode expérimentale dont le seuil de détection est donnée par A_0^{min} et la résolution temporelle est τ_{exp} [s]. Calculons la valeur maximale k_1^{max} de la constante cinétique d'association qui peut être mesurée avec cette méthode pour les deux approximations considérées. Dans le cas $B_0 \gg A_0$ il est raisonnable de prendre $B_0 = 10A_0^{min}$, tandis qu'en l'absence de cette approximation on peut utiliser $B_0 = A_0^{min}$. Le temps caractéristique du processus d'association étant $\tau \sim (k_1 B_0)^{-1}$, on a alors

$$k_1^{max} = \frac{1}{B_0 \tau_{exp}} \quad (2.18)$$

et l'approche reposant sur (2.17) permet alors de déterminer des k_1 dix fois plus grands.

Réaction de dissociation

Pour déterminer k_2 on part d'un mélange à l'équilibre entre le simple brin fluorescent A, le complémentaire B et le double brin fluorescent C. On rajoute un troisième simple brin D ayant une affinité forte avec l'espèce B. La formation du double brin non fluorescent E entre B et D, déplace la réaction de dissociation de C. La Figure 2.5 montre le schéma réactionnel lors de cette expérience. La constante cinétique de dissociation k_2 peut être déterminée à partir d'un tel mécanisme si un certain nombre de conditions sont respectées.

Premièrement, la réaction d'association entre B et D doit être très rapide par rapport à l'association entre A et B. On a ainsi

$$k_3 D \gg k_1 B. \quad (2.19)$$

Comme $k_3 \sim k_1$ car il s'agit de l'association de deux oligonucléotides, peu dépendante de la séquence, il faut que D soit en excès par rapport à B ($D \gg B$). Dans cette situation, le processus d'association entre A et B peut être négligé.

⁶En posant $x = C - C_\infty$ (2.12) prend la forme $\frac{dx}{dt} = -x(\tau^{-1} - k_1 x)$ avec τ donné par (2.17).

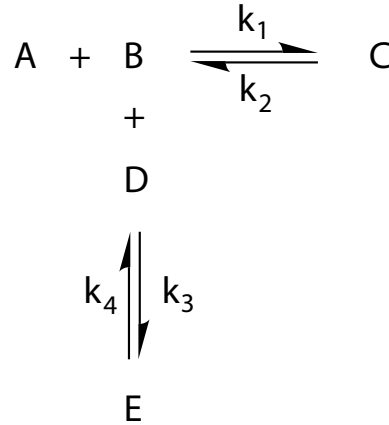


FIG. 2.5 – Mécanisme pour la détermination de la constante cinétique de dissociation k_2 . Le mélange entre le simple brin fluorescent A et son complémentaire B est initialement à l'équilibre avec le double brin fluorescent C. En présence d'un simple brin non-fluorescent D, montrant une forte affinité pour B, le double brin non fluorescent E se forme et déplace le premier équilibre vers la formation de A.

En deuxième lieu, il faut que la dissociation du double brin E soit lente par rapport à sa formation, ce qui implique

$$k_3 D \gg k_4. \quad (2.20)$$

Dans ce cas, la dissociation de E peut être négligée.

Enfin, le processus $C \rightarrow A + E$ doit être contrôlé par la cinétique de dissociation de C, ce qui est vérifié si

$$k_3 D \gg k_2 \quad (2.21)$$

Si les conditions (2.19), (2.20) et (2.21) sont respectées, le mécanisme de la Figure 2.5 se réduit à



et l'expression de la concentration du double brin fluorescent en fonction du temps est

$$C(t) = C_f + (C_i - C_f)e^{-k_2 t}, \quad (2.23)$$

où C_i et C_f sont les concentrations initiales et finales de l'espèce C.

2.3.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence

Pour réaliser les expériences de cinétique, nous avons utilisé la fonctionnalisation de l'espèce A par le fluorophore rhodamine-green en position 5'. La rhodamine-green est un marqueur fluorescent de type cyanine avec un fort rendement quantique de fluorescence qui peut être couplé au groupement phosphate 5'-terminal d'un oligonucléotide (*cf.* Annexe F pour la formule chimique).

Lorsqu'un oligonucléotide marqué fluorescent A s'apparie avec son complémentaire B pour former le double brin C, le rendement de fluorescence ϕ décroît ($\phi_C < \phi_A$) [40, 41]. Cet effet dépend de la base qui se trouve à proximité du fluorophore lors de l'hybridation, le meilleur *quencher* étant la guanine, et de la longueur d'onde d'émission du fluorophore.

Dans les séquences utilisées dans cette étude, une guanine se trouvait toujours à proximité et nous avons mesuré des rapports ϕ_C/ϕ_A entre 0.2 et 0.75. Le passage du simple brin au double brin s'accompagne alors d'une réduction de la fluorescence ce qui permet de suivre, en fonction du temps, l'avancement de la réaction dans le cadre du modèle tout-ou-rien.

Soit une solution d'un oligonucléotide fluorescent de concentration A_0 . L'intensité de fluorescence d'un tel système s'exprime, dans la limite des faibles concentrations [42],

$$I_0 = 2, 3k\phi_A(\lambda_F)I_{lampe}(\lambda_E)\epsilon_A(\lambda_E)lA_0. \quad (2.24)$$

Où k est un facteur d'appareil, $\phi_A(\lambda_F)$ est le rendement quantique de fluorescence à la longueur d'onde λ_F , $I_{lampe}(\lambda_E)$ est l'intensité de la lumière d'excitation de longueur d'onde λ_E , $\epsilon_A(\lambda_E)$ [$M^{-1}cm^{-1}$] est le coefficient d'absorption molaire du fluorophore et l [m] est le parcours optique de l'échantillon.

Après ajout d'une quantité donnée de brin complémentaire B, l'intensité de fluorescence s'exprime comme la somme des contributions des deux espèces fluorescentes, le brin marqué A et le double brin C. On a alors,

$$I(t) = 2, 3kI_{lampe}l(\phi_A\epsilon_A A(t) + \phi_C\epsilon_C C(t)) \quad (2.25)$$

où l'on a écrit explicitement la dépendance en temps de l'intensité car la concentration des espèces évolue au cours de la réaction. On peut s'affranchir des termes inconnus en faisant le rapport entre (2.25) et (2.24).

$$\frac{I(t)}{I_0} = \frac{A(t)}{A_0} + \frac{\phi_C\epsilon_C}{\phi_A\epsilon_A} \frac{C(t)}{A_{tot}}. \quad (2.26)$$

Enfin, sachant que $A(t) + C(t) = A_0$, on a

$$\frac{I(t)}{I_0} = 1 - \left(1 - \frac{Q_C}{Q_A}\right) \frac{C(t)}{A_0}. \quad (2.27)$$

où $Q_i = \epsilon_i\phi_i$ est la brillance de l'espèce i . La combinaison de (2.27) avec (2.14), (2.16) ou (2.23) permet, en fonction de l'expérience réalisée, de déterminer k_1 et k_2 à partir de l'enregistrement de $I(t)$. Les protocoles expérimentaux utilisés sont décrits dans l'Annexe A, p. 237.

2.3.3 Mélange rapide des réactifs par *stopped-flow*

Les expériences cinétiques décrites précédemment impliquent le mélange de deux réactifs puis l'observation de la relaxation de la solution vers l'équilibre. Pour pouvoir réaliser une mesure, le temps caractéristique de la réaction doit être sensiblement supérieur à celui du mélange. Dans nos expériences, on a utilisé deux protocoles de mélange. Pour les cinétiques ayant des temps caractéristiques de plusieurs dizaines de secondes, l'ajout des réactifs est réalisé manuellement. Pour les cinétiques plus rapides, on a utilisé un mélangeur de type *stopped-flow* dans lequel les deux réactifs sont injectés à l'intérieur de la cuve de fluorescence à l'aide de deux seringues. Le mélange se réalise en flux turbulent et le temps mort annoncé est de 5 ms. Cependant, à cause de problèmes de sensibilité, cette méthode ne nous a permis d'atteindre qu'une résolution temporelle de 50 ms.

2.4 Le système oligonucléotidique modèle

Notre but a été de disposer d’une banque d’oligonucléotides avec des cinétiques variées compatibles avec les contraintes des expériences exposées dans la Partie II. Pour le choix précis des séquences on s’est inspirés du travail d’Aboul-ela et collaborateurs qui ont étudié l’influence d’un mésappariement entre bases dans la stabilité thermodynamique du double brin [43]. Lorsque deux oligonucléotides dont les séquences sont complémentaires à une paire de bases près s’hybrident, le double brin présente un mésappariement. Si dans ce cas la valeur de k_1 varie peu, k_2 augmente entre un et trois ordres de grandeur dépendant de la nature du mésappariement [44].

Nom	Séquence	
		Motif commun TGT
TGT13	5' TC CTT TGT TTG TG 3'	Oligonucléotides sondes (A)
TGT11	5' C CTT TGT TTG T 3'	
TTT9	5' CTT TTT TTG 3'	
TGT9	5' CTT TGT TTG 3'	
ACA9	3' GAA ACA AAC 5'	Oligonucléotides complémentaires (B)
ACA13	3' AG GAA ACA AAC AC 5'	
ACA17	3' G AAG GAA ACA AAC ACA T 5'	
ACA19	3' AG GAA ACA AAC ACC GGA GA 5'	
ACA _m 19	3' AG GAA ACA AAT ₁ ACC GGA GA 5'	
ACA _M 19	3' AG GAA GCA AAC ACC GGA GA 5'	
		Motif commun ACA

FIG. 2.6 – Notations et séquences des différents oligonucléotides sonde et complémentaires utilisés dans cette étude. Notez que les séquences des complémentaires sont écrites dans le sens $3' \rightarrow 5'$ pour expliciter la relation de complémentarité avec les sondes. Une liste exhaustive des séquences est fournie dans l’Annexe G.

Nous avons alors choisi comme motif commun à toutes nos séquences le couple d’oligonucléotides 9-mères⁷ : $5' \text{CAAACAAG} 3' + 5' \text{CTTTGTTTG} 3'$. Sur ce motif commun, nous avons introduit deux variations visant à couvrir une grande gamme de valeurs de k_2 (Figure 2.6). D’un côté, on a introduit des mésappariements plus ou moins déstabilisants dont les positions sont soulignées. Les couples TGT+ACA sont parfaitement complémentaires. Les séquences nommées TTT+ACA présentent un mésappariement T·C à la place d’une paire G·C, celles notées ACA_M+TGT contiennent un mésappariement G·T au lieu d’une paire G·C et les couples ACA_m+TGT présentent un mésappariement T·G au lieu d’une paire T·A. De l’autre côté, on a aussi étudié différentes longueurs de chaîne en ajoutant une ou deux paires de bases de part et d’autre du motif précédent pour

⁷Les séquences d’ADN s’écrivent toujours dans le sens $5' \rightarrow 3'$ (Figure 2.6). Lors de l’appariement, les extrémités $5'$ et $3'$ de chaque brin se trouvent en face l’une de l’autre.

obtenir des 11-mères et des 13-mères. Ces trois longueurs et quatre types de séquences (une parfaitement complémentaire et trois présentant un mésappariement unique) forment l’ensemble des douze séquences étudiées. Dans la notation raccourcie, la séquence centrale, en gras dans la Figure G, et le nombre de bases sont explicités : TTT13+ACA13 correspond ainsi à TCCTTT**TTTT**TGTG + CACAA**ACA**AAGGA (Figure 2.6).

Pour étudier la cinétique des couples d’oligonucléotides évoqués et choisir ceux dont les valeurs de k_1 et k_2 sont compatibles avec les expériences couplant transport et réaction chimique, nous avons défini la stratégie suivante. Premièrement, la valeur de k_1 a été mesurée pour un couple modèle et différentes conditions salines. Ensuite, la valeur de K a été déterminée, soit expérimentalement soit par la méthode des plus proches voisins, pour chaque couple oligonucléotidique pour une concentration en sel et une température données. Puis, la valeur de k_2 a été estimée *a priori* comme $k_2 = k_1/K$. Ces valeurs estimées de k_1 et k_2 nous ont permis de choisir une série de séquences et températures compatibles avec les contraintes des expériences détaillées dans la Partie II. Finalement, nous avons déterminé expérimentalement k_1 et k_2 pour les séquences choisies dans les conditions expérimentales définies *a priori*.

2.5 Résultats

2.5.1 Thermodynamique de la réaction d’hybridation

Fiabilité de la méthode des plus proches voisins

Nous avons tout d’abord réalisé une série d’expériences de dénaturation thermique pour obtenir les grandeurs thermodynamiques pour six couples d’oligonucléotides présentant ou pas un mésappariement. Le Tableau 2.1 compare les résultats obtenus avec ceux calculés par la méthode des plus proches voisins en utilisant la base de données HyTher [36]. Les valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ sont en assez bon accord pour les 13-mères tandis que pour les 9-mères la différence est assez nette. Cependant, la méthode des plus proches voisins est construite pour être en accord avec l’avancement à l’équilibre mesuré expérimentalement. Ainsi, la grandeur calculée de manière fiable est $\Delta_r G^\circ$ ou, de la même manière, la constante thermodynamique K . Nous avons alors calculé K à 20 °C à partir des données de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ déterminées expérimentalement et calculées. Le Tableau 2.1 montre que les écarts sur K obtenus par les deux approches sont inférieurs à un facteur trois. Ce faible écart est conservé sur une plage de températures allant de 10 à 40 °C. On peut alors conclure que les valeurs de K fournies par la méthode des plus proches voisins fournissent une bonne estimation pour les systèmes oligonucléotidiques étudiés.

Nous voudrions commenter la fiabilité des valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ obtenues. Les expériences de dénaturation thermique fournissent ces valeurs avec des incertitudes qui sont typiquement de 20%. Ces incertitudes introduisent des variations de plusieurs ordres de grandeur lorsqu’on calcule la constante thermodynamique, seul paramètre (avec $\Delta_r G^\circ$) qui, à notre avis, est obtenu avec une bonne précision. Ainsi, il nous semble pertinent de comparer les valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ entre séquences différentes seulement quand les écarts des valeurs sont supérieurs à 20%. Par exemple, quand on compare les $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ pour les couples TGT9+ACA9 et TGT13+ACA13, les écarts sont suffisamment

TAB. 2.1 – Valeurs des enthalpies et entropies standard des réactions d’hybridation des paires d’oligonucléotides obtenues expérimentalement par dénaturation thermique ou calculées avec l’algorithme HyTher des plus proches voisins dans une solution 0.1 M NaCl. La précision des valeurs expérimentales est de 20 %, le tampon utilisé 10 mM cacodylate de sodium pH 7.

		$\Delta_r H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_r S^\circ$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$K(20^\circ \text{C})$
TGT9 + ACA9	Expérimental	-223	-632	6×10^6
	HyTher	-270	-797	4×10^6
TTT9 + ACA9	Expérimental	-269	-858	1×10^3
	HyTher	-192	-603	6×10^2
TGT13 + ACA13	Expérimental	-418	-1205	4×10^{11}
	HyTher	-399	-1146	2×10^{11}
TTT13 + ACA13	Expérimental	-364	-1092	6×10^7
	HyTher	-321	-953	3×10^7
TGT13 + ACA17	Expérimental	-416	-1188	1×10^{12}
	HyTher	-442	-1276	2×10^{12}
TTT13 + ACA17	Expérimental	-382	-1147	2×10^8
	HyTher	-365	-1083	3×10^8

importants (Tableau 2.1). On peut alors argumenter que le plus grand nombre d’interactions attractives entre paires de bases résulte en une valeur de $\Delta_r H^\circ$ plus négative pour le 13-mère. De la même manière, plus de degrés de liberté sont perdus pour le 13-mère lors de la formation du double brin et on s’attend à une valeur de $\Delta_r S^\circ$ plus négative, ce qui est effectivement observé. Par contre, la comparaison de ces grandeurs thermodynamiques entre les couples TGT9+ACA9 et TTT9+ACA9, pour former deux doubles brins différant seulement par la présence d’un mésappariement est, à notre avis, délicate (Tableau 2.1). Pour finir, on justifie le grand nombre de chiffres significatifs donnés pour les grandeurs $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ dans le Tableau 2.1 par rapport aux incertitudes expérimentales de 20%. On pense que ces grandeurs doivent être considérées comme étant deux paramètres couplés pour l’ajustement des données expérimentales à l’équation (2.5) dans une plage de température donnée. L’arrondi de chacune de ces grandeurs indépendamment provoque des variations très importantes dans les valeurs prédites de K . Il est alors nécessaire de garder trois ou quatre chiffres significatifs pour les valeurs de $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ afin de calculer convenablement la valeur de K dans la plage de température considérée.

Influence de la longueur de l’oligonucléotide complémentaire et du fluorophore

Dans les expériences mettant en évidence des phénomènes de réaction-diffusion, décrites à la Partie II, il est nécessaire que le coefficient de diffusion ou la mobilité électrophorétique du double brin (espèce C) soient différents de ceux du simple brin (espèce A). Les stratégies visant cette différenciation, reposent toutes sur l’utilisation d’un brin complémentaire (espèce B) plus long que A. D’autre part, dans ces expériences, l’observation se réalise par microscopie de fluorescence et l’oligonucléotide cible porte un fluorophore. On a alors étudié l’effet des bouts pendants (*dangling ends*) et du marquage par la rhodamine-green sur la thermodynamique de l’hybridation.

En premier lieu, pour analyser l’effet des bout pendants, on a réalisé des expériences

de dénaturation thermique où les 13-mères TGT13 et TTT13 s’hybrident avec ACA17, un oligonucléotide avec une séquence centrale égale à ACA13 sur laquelle on a ajouté deux bases pendantes de chaque côté (*cf.* Figure 2.6). Les mesures expérimentales montrent des valeurs de K à 20 °C trois fois plus importantes en présence de bouts pendants (Tableau 2.1). Les prévisions de HyTher [45] sont, de nouveau, en bon accord avec la valeur de K obtenue par dénaturation thermique.

Pour étudier l’influence due à la présence de la rhodamine-green dans l’oligonucléotide cible, nous avons, dans un premier temps, réalisée des expériences de dénaturation thermique suivies par spectroscopie de fluorescence. Les données obtenues sont détaillées dans le Tableau 2.2. La comparaison avec les valeurs de K obtenues en l’absence de fluorophore (Tableau 2.1) indique une faible influence de celui-ci sur la stabilité du double brin.

TAB. 2.2 – Enthalpies et entropies standard des réactions d’hybridation des paires d’oligonucléotides obtenues expérimentalement par dénaturation thermique suivie par fluorescence dans une solution 0.1 M NaCl, tampon cacodylate de sodium 10 mM pH 7. Dans chaque cas, la constante thermodynamique K est calculée à partir des grandeurs thermodynamiques. La précision des valeurs expérimentales est de 20 %.

	$\Delta_r H^\circ$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_r S^\circ$ (J K ⁻¹ mol ⁻¹)	$K(20^\circ \text{C})$
rhgTGT13+ACA17	-349	-960	1×10^{12}
rhgTTT13+ACA17	-369	-1083	1×10^9

Dans un deuxième temps, nous avons mesuré directement la valeur de K à 20 °C par titration isotherme. Pour le couple rhgTGT13+ACA17 dans 0.1 M NaCl on a obtenu $K = 1 \times 10^{10}$. Cette valeur est à comparer avec la valeur obtenue par dénaturation thermique de ce même couple, $K = 1 \times 10^{12}$ (Tableau 2.2) et les estimations des plus proches voisins pour les couples TGT13+ACA13 ($K = 2 \times 10^{11}$) et TGT13+ACA17 ($K = 2 \times 10^{12}$). La titration isotherme fournit $K = 5 \times 10^6$ pour le couple rhgTGT9+ACA9 et $K = 3 \times 10^6$ pour rhgTGT9+ACA17. Ces valeurs sont à comparer avec $K = 6 \times 10^6$, mesurée par dénaturation thermique et $K = 4 \times 10^6$, estimée par la méthode des plus proches voisins pour le couple TGT9+ACA9.

La mesure de K la plus fiable est celle obtenue par titration isotherme car il s’agit d’une détermination directe. La présence de bouts pendants ne semble pas fortement influencer la valeur de K mesurée par cette dernière technique. En conclusion, pour estimer la valeur de K pour un couple d’oligonucléotides marqués avec un fluorophore et possédant des bouts pendants, nous avons choisi d’utiliser la méthode des plus proches voisins qui ne prend pas en compte l’effet des bouts pendants. Ainsi, par exemple, l’estimation des paramètres thermodynamiques pour le couple rhgTGT13+ACA17 sera réalisé dans la suite en utilisant les séquences TGT13+ACA13 dans le calcul des plus proches voisins.

2.5.2 Dépendance de k_1 avec la concentration en sel

Nous avons vu dans la Section 2.1 que la valeur de la constante d’association k_1 est principalement déterminée par la concentration saline de la solution et peu dépendante de la séquence, de la longueur des oligonucléotides et de la température. On peut alors

déterminer k_1 pour un couple d’oligonucléotides modèle et utiliser la valeur obtenue comme une bonne estimation pour d’autres séquences et températures. Le Tableau 2.3 montre les valeurs de k_1 mesurées par spectrophotométrie de fluorescence pour le couple rhgTGT11+ACA17 à différentes concentrations en sel. Comme attendu, k_1 augmente avec la concentration en cations et Mg^{2+} a une influence plus forte que Na^+ .

TAB. 2.3 – Constantes cinétiques d’association k_1 mesurées par spectrophotométrie de fluorescence pour différentes concentrations des ions Na^+ et Mg^{2+} pour le couple rhgTGT11+ACA17, tampon Hepes pH 7.5. K_{HyTher} est la constante thermodynamique calculée par la méthode des plus proches voisins pour le couple TGT11+ACA11 et la constante cinétique de dissociation a été calculée comme $k_2 = K_{HyTher}/k_1$. Pour toutes les valeurs $T = 20^\circ \text{C}$.

$[\text{Na}^+]$ (mM)	$[\text{Mg}^{2+}]$ (mM)	k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	K_{HyTher}	k_2 (s^{-1})
25	0	1×10^4	9×10^7	10^{-4}
100	0	2×10^5	1×10^9	10^{-4}
0	1.25	4×10^5	—	—
25	1.25	5×10^5	2×10^9	2×10^{-4}
0	2.5	1×10^6	—	—

2.5.3 Estimation de k_2 par la méthode des plus proches voisins

Nous nous proposons ici d’estimer la valeur de la constante de dissociation k_2 pour une série de séquences oligonucléotidiques et températures à partir de la constante thermodynamique calculée par la méthode des plus proches voisins K_{HyTher} et de la valeur de k_1 déterminée par un oligonucléotide modèle comme $k_2 = K_{HyTher}/k_1$. Dans un premier temps, nous avons vérifié que cette approche ne dépend pas des conditions salines. Le Tableau 2.3 montre les valeurs de K_{HyTher} calculées pour le couple TGT11+ACA11 à trois concentrations salines différentes ainsi que les valeurs de la constante cinétique de dissociation calculées avec $k_2 = K_{HyTher}/k_1$, où k_1 est mesurée dans les conditions salines considérées. Dans les trois cas, les valeurs calculées pour k_2 sont très proches comme il est attendu pour la constante cinétique de dissociation, faiblement dépendante des conditions salines. On peut alors estimer k_2 à partir de la valeur calculée K_{HyTher} dans n’importe quelle concentration en sel.

Nous avons alors calculé les $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$ pour une série de séquences différentes entre 9 et 13 bases de longueur et pour plusieurs mésappariements en utilisant la méthode des plus proches voisins et une concentration de 25 mM en Na^+ . On a ensuite calculé la constante thermodynamique d’appariement à plusieurs températures K_{HyTher} et finalement estimé k_2 (Figure 2.7) en utilisant $k_1 = 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, en accord avec le Tableau 2.3. On a ainsi une banque de couples oligonucléotidiques qui présente des valeurs estimées de k_1 entre 10^4 et $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ selon la concentration en sel et des valeurs de k_2 entre 10^{-2} et 10^2 s^{-1} pour des températures entre 10 et 40°C . Nous verrons dans la Partie II que pour la mise en évidence des divers phénomènes de réaction-diffusion étudiés, il est nécessaire de choisir un couple réactif avec des valeurs de k_1 et k_2 bien précises. Les estimations de k_1 et k_2 nous permettent de choisir les conditions expérimentales et la séquence *a priori*, sans effort expérimental. Ensuite, pour le couple oligonucléotidique et les conditions choisies,

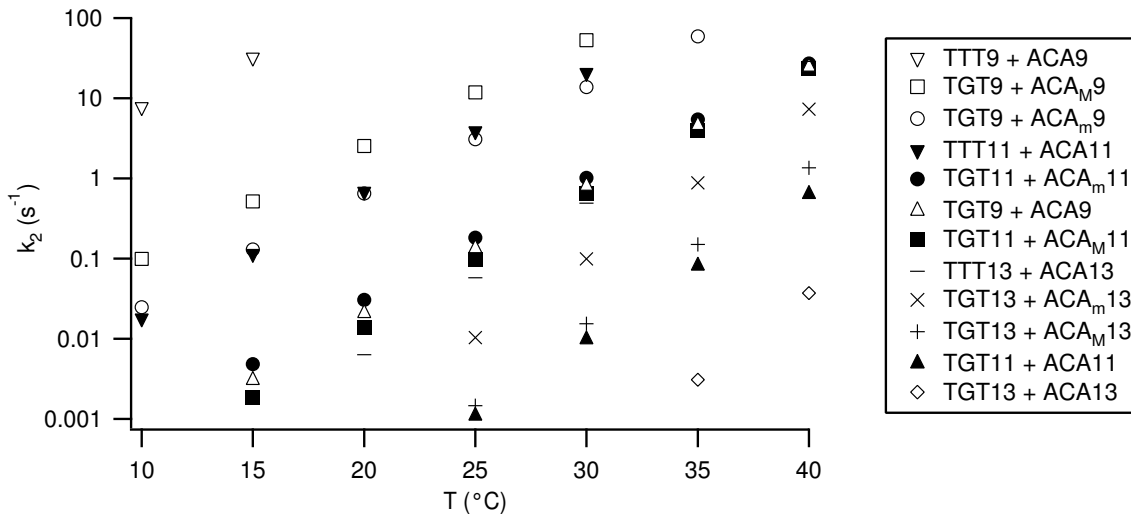


FIG. 2.7 – Constantes cinétiques de dissociation k_2 estimées par la méthode des plus proches voisins en fonction de la température pour les séquences oligonucléotidiques étudiées. On a pris $k_1 = 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour toutes les températures et séquences et calculé $k_2 = K_{HyTher}/k_1$ où K_{HyTher} est calculée par la méthode des plus proches voisins.

on détermine expérimentalement les valeurs de k_1 et k_2 . Cette approche résulte en une économie de temps considérable.

Pour évaluer la fiabilité des constantes cinétiques de dissociation calculées à partir de la méthode des plus proches voisins, on les a comparées avec des mesures expérimentales. Nous précisons d'abord qu'il y a des différences structurales entre les oligonucléotides utilisées dans les mesures et ceux considérés dans le calcul par la méthode des plus proches voisins. Dans cette dernière méthode, on considère l'hybridation entre deux oligonucléotides de même longueur, sans tenir compte des effets de bouts pendants. Expérimentalement, la réaction d'hybridation étudiée s'effectue toujours entre un oligonucléotide marqué avec un fluorophore à l'extrémité 5' (l'espèce A) et un oligonucléotide non-marqué B pour donner le double brin C. La longueur de B est, dans la plupart des cas, supérieure à celle de A. Enfin, un groupement cholestéryl (noté ch, formule chimique dans l'Annexe F) peut être attaché de façon covalente à l'extrémité 5' de B. L'utilisation de ce groupement est liée aux stratégies de réduction de la mobilité électrophorétique (*cf.* Section 6.3, p. 120).

Le Tableau 2.4 compare les valeurs de k_2 calculées par la méthode des plus proches voisins avec les résultats obtenus par spectroscopie de fluorescence à 20 °C dans 25 mM Na^+ pour cinq séquences différentes. Ces expériences ont été réalisées sur des couples dans lesquels l'oligonucléotide B portait un groupement cholestéryl pour des raisons de disponibilité des séquences. Cependant l'influence de ce groupement sur la cinétique de dissociation est faible comme l'avèrent les valeurs de k_2 pour les couples rhgTGT11+ACA13 et rhgTGT11+chACA19, respectivement de $4.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $3.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ à 20 °C dans 25 mM Na^+ .

Pour les séquences considérées au Tableau 2.4, les k_2 estimés couvrent quatre ordres de grandeur tandis que les valeurs mesurées expérimentalement s'étalent sur trois ordres de

TAB. 2.4 – Constantes cinétiques de dissociation estimées par la méthode des plus proches voisins du serveur HyTher et mesurées par spectroscopie de fluorescence dans 25 mM Na⁺ (tampon Hepes pH 7.5) à 20 ° C. rhg et ch indiquent un marquage rhodamine-green et cholestéryl, respectivement.

Couple	k_2 (s ⁻¹)	
	HyTher	Expérimental
rhgTGT13+ACA19	1×10^{-6}	3×10^{-5}
rhgTGT11+chACA19	1×10^{-4}	3×10^{-3}
rhgTGT13+chACA _M 19	1×10^{-4}	2×10^{-3}
rhgTGT13+chACA _m 19	1×10^{-3}	8×10^{-3}
rhgTTT13+chACA19	6×10^{-3}	5×10^{-2}
rhgTGT11+chACA _M 19	1×10^{-2}	4×10^{-2}
rhgTGT9+ACA19	2×10^{-2}	6×10^{-2}

grandeur. Cependant, l’ordre relatif des valeurs est en bon accord entre la prédiction de HyTher et les mesures. La valeur expérimentale de k_2 est systématiquement plus grande que la valeur calculée, entre un facteur 4 et un facteur 30. Probablement les différences les plus significatives résultent de la présence du fluorophore, ici rhodamine-green, qui peut avoir des interactions stabilisantes ou destabilisantes avec les bases [46,47]. On peut alors conclure que le calcul des plus proches voisins fournit une estimation raisonnable des valeurs de k_2 avec une erreur d’un ordre de grandeur.

2.5.4 Expériences contrôle

Dépendance de k_1 avec la séquence et la température

Nous venons d’exposer une démarche pour estimer la valeur de k_2 pour une série de séquences et de températures à partir des calculs thermodynamiques de plus proches voisins et de la valeur de k_1 déterminée pour un couple oligonucléotidique modèle dans des conditions salines données. On a ainsi supposé que la valeur de k_1 est indépendante de la séquence et de la température. Nous avons réalisé deux séries d’expériences pour tester ces hypothèses.

TAB. 2.5 – Constantes cinétiques d’association k_1 (unités 10⁵ M⁻¹s⁻¹) obtenues par spectrophotométrie de fluorescence sur quatre couples oligonucléotidiques à différentes températures dans 100 mM NaCl. Tampon Tris/HCl 10 mM pH 7.5.

T (° C)	5	10	15	25
rhgTGT9 + ACA17	0.7	0.8	0.9	—
rhgTTT13 + ACA17	1	2	2	—
rhgTGT13 + ACA17	0.7	1	2	3

Le Tableau 2.5 montre la valeur de k_1 mesurée par spectroscopie de fluorescence sur divers couples oligonucléotidiques de 9 et 13 paires de bases pour des températures entre

5 et 25 ° C dans 100 mM NaCl. La présence d'un mésappariement (TGT13 et TTT13), le nombre de paires de bases formées (TGT9 et TGT13) et la température résultent en une variation de k_1 de moins de 50% autour de la valeur moyenne $k_1 \simeq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ dans ces conditions salines. Ces paramètres ont, comme prévu, une faible influence sur la valeur de k_1 .

Le Tableau 2.6 montre les k_1 déterminées par spectroscopie de fluorescence pour une série de couples oligonucléotidiques de séquences variées dans 25 mM Na^+ à 20 ° C. De nouveau, on observe que la valeur de la constante d'association k_1 montre une faible dépendance en fonction de la séquence et de la longueur, avec un ordre de grandeur typique de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

TAB. 2.6 – Constantes cinétiques d'association k_1 déterminées par spectroscopie de fluorescence dans 25 mM Na^+ à 20 ° C. Tampon Hepes pH 7.5.

Couple	k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
rhgTGT13+ACA19	1×10^4
rhgTGT13+chACA19	3×10^4
rhgTGT11+ACA17	1×10^4
rhgTGT11+chACA19	3×10^4
rhgTGT13+chACA _M 19	1×10^4
rhgTGT13+chACA _m 19	2×10^4
rhgTTT13+chACA19	$1 \times 10^5 / 7 \times 10^3$
rhgTGT11+chACA _M 19	$4 \times 10^4 / 7 \times 10^3$
rhgTGT9+chACA19	$1 \times 10^5 / 1 \times 10^4$

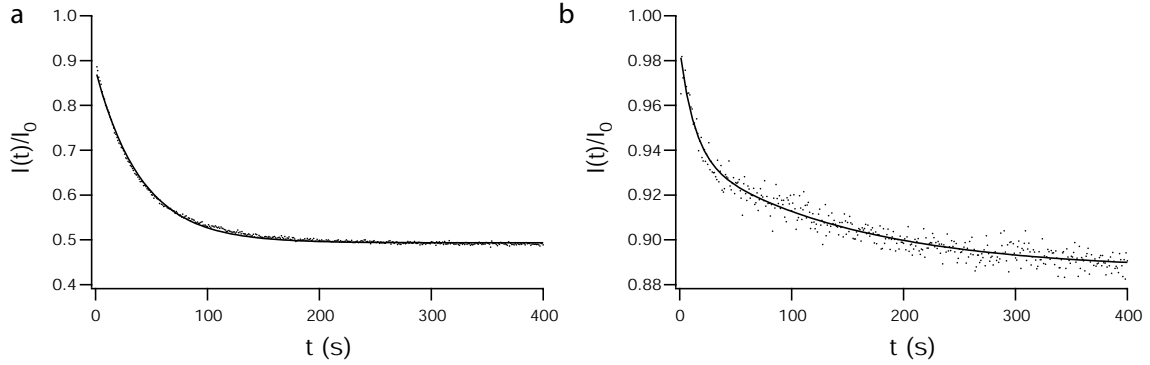


FIG. 2.8 – Intensité de fluorescence normalisée en fonction du temps pour l'association entre (a) rhgTGT13 50 nM et chACA_m19 et (b) rhgTGT11 50 nM et chACA_M19 1 μM dans NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5 à 20 ° C. Les courbes noires correspondent respectivement à un ajustement (a) monoexponentiel et (b) biexponentiel.

Pour la plupart des processus d'association exposés au Tableau 2.6, la variation de l'intensité de fluorescence avec le temps est correctement ajustée par une loi monoexponentielle, fournissant une seule valeur de k_1 , en accord avec le comportement attendu pour un mécanisme tout-ou-rien. Par contre, pour l'hybridation de rhgTGT11+chACA_M19

un comportement biexponentiel, avec deux temps caractéristiques bien différenciés associés à des amplitudes de même ordre de grandeur, est obtenu (Figure 2.8). L’identification des temps caractéristiques avec deux processus d’association de premier ordre fournit deux constantes cinétiques apparentes. Le même comportement est observé pour rhgTGT9+chACA19 et rhgTTT13+chACA19. On note que le comportement biexponentiel se présente pour les couples oligonucléotidiques les moins stables thermodynamiquement. Ce résultat indique un changement dans le mécanisme et invalide le modèle de tout-ou-rien pour ces trois séquences dans 25 mM Na⁺. Un changement de mécanisme pour ces faibles valeurs de concentration saline avait déjà été suggéré par Williams et collaborateurs [34].

Dépendance de k_2 avec la concentration en sel

Le Tableau 2.7 montre les constantes cinétiques de dissociation mesurées pour le couple rhgTGT11+chACA_M19 dans différentes conditions salines à 20 ° C. Comme attendu, l’influence du sel dans le processus de dissociation est faible. Comparé avec k_1 , qui augmente d’un facteur 100 (*cf.* Tableau 2.3), k_2 varie de moins d’un facteur 5 dans les mêmes conditions.

TAB. 2.7 – Constantes cinétiques de dissociation déterminées par spectroscopie de fluorescence pour le couple rhgTGT11+chACA_M19 dans différentes conditions salines à 20 ° C. Tampon Hepes pH 7.5.

[Na ⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	k_2 (s ⁻¹)
25	0	4×10^{-2}
0	1.5	1×10^{-2}
0	2.5	8×10^{-3}
0	5.0	8×10^{-3}
0	10.0	4×10^{-2}

2.5.5 Influence des micelles de Triton-X100 sur la cinétique d’hybridation

Nous verrons au Chapitre 6 que la stratégie finalement retenue pour la réduction de la mobilité électrophorétique entre le simple et le double brin consiste à utiliser un oligonucléotide complémentaire B portant un groupement cholestéryl en présence d’une solution de micelles de Triton-X100. Le cholestéryl, très hydrophobe, s’insère dans la micelle neutre de Triton-X100 provoquant une réduction de la mobilité.

Cette approche ne peut être intéressante que si la cinétique de la réaction d’hybridation n’est pas modifiée. Le Tableau 2.8 montre les constantes cinétiques d’association k_1 et dissociation k_2 pour différents couples d’oligonucléotides dans NaOH/Hepes 25/50 mM, Mg(OH)₂/Hepes 1.25/5 mM en présence ou en l’absence de Triton-X100 0.1% (w/w). On a d’abord testé l’influence des micelles de Triton-X100 en l’absence de marquage par le cholestéryl (rhgTGT9+ACA17). Pour ce couple, k_1 varie d’un facteur 1.5 tandis que k_2 ne change pas appréciablement. Lorsque l’on considère les oligonucléotides marqués

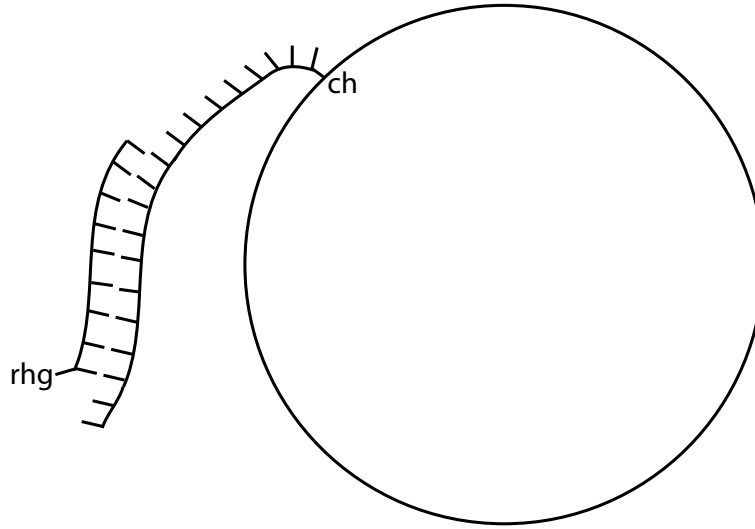


FIG. 2.9 – Représentation schématique de l'hybridation entre rhgTGT9+chACA19 en présence de micelles de Triton-X100. La taille de la micelle de Triton-X100 (grand cercle) a été estimée à 10 nm.

TAB. 2.8 – Constantes cinétiques d'association k_1 et dissociation k_2 pour différents couples d'oligonucléotides dans NaOH/Hepes 25/50 mM, Mg(OH)₂/Hepes 1.25/5 mM en présence ou en l'absence de Triton-X100 0.1% (w/w). Les mesures ont été réalisées par spectroscopie de fluorescence à 20 °C.

Couple	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)		k_2 (s ⁻¹)	
	Triton 0%	Triton 0.1%	Triton 0%	Triton 0.1%
rhgTGT9+ACA17	2.9×10^5	2.0×10^5	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}
rhgTGT9+chACA19	4.5×10^5	2.6×10^5	2.5×10^{-2}	1.1×10^{-2}
rhgTGT11+ chACA _m 19	5.5×10^5	8.8×10^5	8.6×10^{-3}	1.3×10^{-2}
rhgTTT13+chACA19	7.1×10^5	4.8×10^5	6.2×10^{-3}	1.9×10^{-3}

cholestéryl, les variations observées restent inférieures à un facteur 3 autant pour k_1 que pour k_2 . On peut alors en déduire que la présence de micelles de Triton-X100 ne change pas sensiblement la cinétique d'hybridation. Des expériences contrôle ont été réalisées en faisant varier la concentration de Triton-X100 entre 0.5 et 0.05% (w/w) pour un seul couple d'oligonucléotides et des résultats similaires ont été obtenus⁸.

2.5.6 Influence de la longueur de l'oligonucléotide complémentaire et de la nature du fluorophore sur la cinétique d'hybridation

Si l'expérience d'électrodifusion nécessite que le double et le simple brin aient des mobilités électrophorétiques différentes, la mesure de constantes cinétiques basée sur la

⁸Pour toutes les concentrations de Triton-X100 considérées, des micelles sont présentes car la cmc (concentration micellaire critique) est de 0.22 mM, correspondant à 0.01% (w/w).

diffusion (*cf.* Article 3) a besoin d’une différence entre les coefficients de diffusion des deux espèces. Dans cette dernière expérience, on réalise alors la réaction d’hybridation entre un petit oligonucléotide fluorescent A et un complémentaire B long d’une centaine de bases, ce qui résulte en une différence du coefficient de diffusion d’un facteur trois. D’autre part, la précision de la mesure dépend du rapport des rendements quantiques de fluorescence entre le double brin ϕ_C et le simple brin ϕ_A . Quand A est marqué avec la rhodamine-green (rhg) $\phi_C/\phi_A = 0.2$ tandis que lorsqu’il est marqué avec texas-red (tex) $\phi_C/\phi_A = 0.75$. Cette dernière situation est plus favorable pour la mesure de constantes cinétiques basée sur la diffusion.

TAB. 2.9 – Constantes cinétiques d’association et de dissociation pour la réaction d’hybridation entre un oligonucléotide 9-mère marqué avec rhodamine-green (rhg) ou texas-red (tex) et un oligonucléotide parfaitement complémentaire ACA de 17 ou 105 bases de longueur. Les mesures ont été réalisées par spectroscopie de fluorescence à 20 ° C dans une solution NaOH/Hepes 25/50 mM, Mg(OH)₂/Hepes 1.25/5 mM pH 7.5.

Couple	k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_2 (s ⁻¹)
rhgTGT9+ACA17	2.0×10^5	1.0×10^{-2}
texTGT9+ACA17	2.2×10^5	1.6×10^{-2}
texTGT9+ACA105	2.0×10^5	1.2×10^{-2}

On a donc évalué l’influence de la nature du fluorophore et de la longueur du complémentaire sur la cinétique d’hybridation mesurée par spectroscopie de fluorescence. Le Tableau 2.9 montre que le remplacement de rhodamine-green par texas-red a peu d’influence sur les valeurs de k_1 et k_2 . De la même manière, lorsque la longueur du complémentaire passe de 17 à 105 bases la variation des constantes cinétiques est inférieure à 50%. Ceci est un résultat important car on pourrait penser que la structure secondaire de ACA105 ralentit l’association. Un autre point est que le prix d’un oligonucléotide est proportionnel au nombre de bases. La possibilité de déterminer les constantes cinétiques avec un oligonucléotide plus court réduit ici le coût de l’expérience d’un facteur cinq.

2.6 Conclusion

La réaction d’hybridation entre deux oligonucléotides simple brin pour donner un double brin est un système idéal pour mettre au point des expériences reposant sur la cinétique chimique. Le mécanisme peut être réduit à un modèle de tout-ou-rien caractérisé par un couple de constantes cinétiques d’association k_1 et de dissociation k_2 et une constante thermodynamique $K = k_1/k_2$. La valeur de K peut être calculée en fonction de la séquence, la concentration saline et la température à l’aide de la méthode des plus proches voisins disponible sur le serveur HyTher. Nous avons montré que les résultats obtenus par ce calcul étaient similaires aux valeurs mesurées dans les expériences de dénaturation thermique.

La valeur de k_1 est déterminée par la concentration saline et dépend peu de la séquence ou de la température, tandis que la valeur de k_2 présente le comportement inverse. On a alors proposé une méthode pour sélectionner une banque des séquences oligonucléotidiques ayant des constantes cinétiques de dissociation k_2 variées avec un effort expérimental

minimum. Il s'agit de calculer K par la méthode des plus proches voisins et d'estimer la valeur de k_2 avec $k_2 = K/k_1$, k_1 étant la constante cinétique d'association d'un couple oligonucléotidique modèle. On a ainsi trouvé des conditions salines qui fournissent des valeurs de k_1 entre 10^4 et 10^6 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et des séquences oligonucléotidiques de longueurs allant entre 9 et 13 paires de bases ayant des valeurs de k_2 entre 10^2 et 10^{-5} s^{-1} . Les écarts entre les valeurs calculées et mesurées expérimentalement par spectroscopie de fluorescence sont d'un ordre de grandeur.

Enfin, on a étudié l'influence sur la cinétique d'hybridation de deux modifications structurales sur l'oligonucléotide complémentaire. D'un côté, attaché à une micelle de Triton-X100 par un groupement cholestéryl et, de l'autre, ayant une longueur d'une centaine de bases. Dans les deux cas, des changements mineurs dans la valeur des constantes cinétiques d'association et de dissociation ont été observés.

Chapitre 3

Une sonde moléculaire à motif quadruplex pour la discrimination cinétique

Nous avons étudié au Chapitre 2 le mécanisme d'hybridation entre un oligonucléotide cible et un oligonucléotide sonde pour former une espèce double brin. On a ainsi vu que la présence d'un mésappariement change fortement la valeur de la constante cinétique de dissociation k_2 , tandis que la constante cinétique d'association k_1 y est peu sensible. Notre but étant de mettre en place des méthodes de discrimination fondées sur les constantes cinétiques, nous avons cherché à rendre aussi k_1 dépendant de la présence d'un mésappariement. Pour y parvenir, une possibilité est que la réaction d'association des complémentaires parfait et mésapparié fasse appel à des mécanismes différents. C'est ainsi que nous avons envisagé que la réaction d'hybridation d'un oligonucléotide cible (parfait ou mésapparié) avec un oligonucléotide sonde structuré présentant une conformation en épingle à cheveux puisse permettre une telle différenciation mécanistique.

Les *molecular beacons* (MB) sont des sondes oligonucléotidiques simple brin qui adoptent une conformation en épingle à cheveux à l'état fermé. Dans un MB, un fluorophore et un extincteur (*quencher*) de fluorescence sont fixés aux deux extrémités de la chaîne oligonucléotidique. À l'état fermé ou replié (*folded*), les séquences à proximité des extrémités, complémentaires, s'associent pour former une tige (*stem*) double brin porteuse d'une boucle (*loop*) simple brin. Dans cette conformation, le fluorophore et le *quencher* se retrouvent proches l'un de l'autre et l'émission de fluorescence du MB est faible. À l'état ouvert (à haute température ou en présence d'une séquence d'ADN simple brin complémentaire à la boucle), la tige double brin disparaît et l'augmentation de la distance moyenne entre le fluorophore et le *quencher* se traduit par un accroissement du signal de fluorescence.

A priori, deux mécanismes d'association peuvent être proposés pour rendre compte de l'association entre un MB et un oligonucléotide cible complémentaire à la séquence de sa boucle (Figure 3.1). Dans le premier (1–2–4), le MB s'ouvre avant de s'hybrider avec la cible pour former le double brin. Dans le second, (1–3–4), la cible s'hybride partiellement sur la boucle du MB structuré dont l'ouverture conduit ensuite à l'aduit double brin. Dans une situation telle que les complémentaires parfait et mésapparié réagiraient selon les deux mécanismes distincts précédents, on pourrait s'attendre à un changement significatif de

la constante apparente d'association k_1 .

C'est ainsi que nous avons étudié le mécanisme d'association entre des oligonucléotides et des MB dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle. Ce travail s'est traduit par la conception et l'utilisation d'un nouveau type de MB dans lequel la tige double brin est remplacée par un motif quadruplex de guanines que nous avons appelé *G-quadruplex-based molecular beacons* (G4-MB).

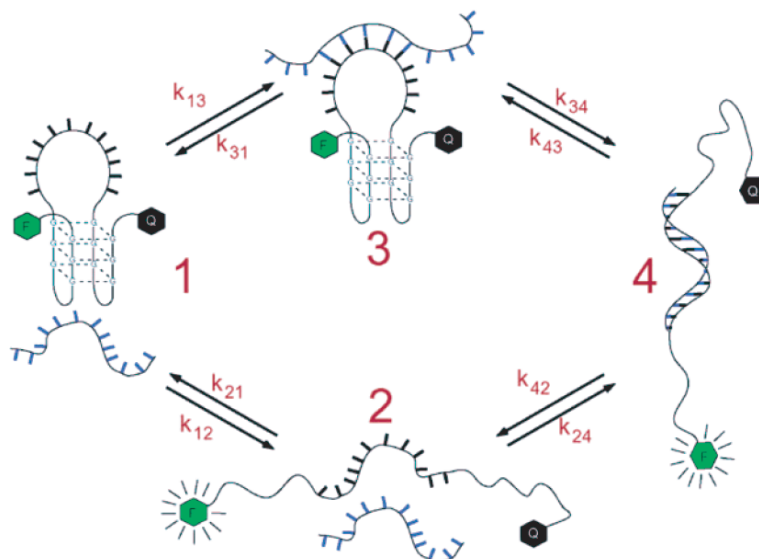


FIG. 3.1 – Deux mécanismes sont proposés pour l'hybridation entre un oligonucléotide structuré et un oligonucléotide complémentaire à la séquence de sa boucle. Dans le mécanisme (1–2–4), la sonde structurée s'ouvre avant que la réaction d'hybridation ait lieu pour former le double brin 4. Dans le mécanisme 1–3–4, une hybridation partielle a lieu avec l'oligonucléotide structuré pour former l'aduit 3 qui s'ouvre ensuite, assisté ou non par la formation du double brin, pour former 4. Figure correspondant à la Figure 1 de l'Article 1.

Ce chapitre accompagne l'Article 1 : *Quadruplex-based molecular beacons as tunable DNA probes*. Il a pour but de résumer les points importants, de guider le lecteur en référence à l'article et d'exposer plus en détail quelques points. L'Article 1 comporte deux parties. Dans la première (*cf.* Section 2.1 de l'Article 1), le G4-MB seul est caractérisé. Dans la seconde partie (*cf.* les Sections 2.2 et 3 de l'Article 1), la réaction entre le G4-MB et un oligonucléotide complémentaire à la séquence de la boucle est étudiée du point de vue thermodynamique et cinétique. Ces études permettent de discuter la capacité du G4-MB à discriminer entre des séquences complémentaires parfaite/mésappariée et d'évaluer la pertinence des deux mécanismes proposés pour cette réaction (Figure 3.1).

3.1 Le motif quadruplex

Un acide nucléique dont la séquence comprend des blocs de plusieurs guanines consécutives peut adopter une configuration à quatre brins fondée sur la formation de quadruplets

de G (*G-quartets*). Les quadruplets de G sont constitués de quatre guanines en géométrie plane-carrée reliées par une série de liaisons hydrogène, où chaque guanine est à la fois donneur et accepteur de protons [48] (Figure 3.2a). Cet arrangement fait apparaître une poche au centre de la structure entourée de groupements carbonyle qui interagissent avec un cation monovalent. Lorsque plusieurs de ces structures s'empilent les unes sur les autres, on obtient un quadruplex de G (Figure 3.2b). Cette structure peut être intermoléculaire lorsqu'elle est formée par quatre brins indépendants ou intramoléculaire, au sein d'un seul brin. Dans ce dernier cas, plusieurs conformations sont possibles (Figure 3.2c). Dans tous les cas, la nature du cation détermine fortement la stabilité thermodynamique du quadruplex. Si pour l'ADN double brin la constante thermodynamique d'association varie d'un facteur deux dans la série $K^+ > Li^+ > Na^+$ [49], pour le motif quadruplex cette variation atteint plusieurs ordres de grandeur dans la série $K^+ > Na^+ \gg Li^+$.

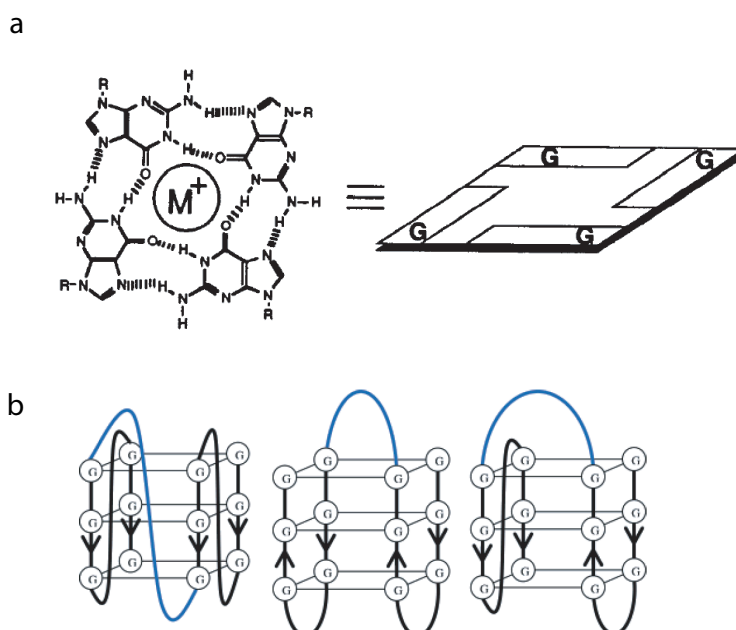


FIG. 3.2 – (a) Structure d'un quartet de guanines formé par quatre guanines agencées autour d'un cation monovalent, d'après [48]. (b) Illustration de trois conformations possibles pour un quadruplex intramoléculaire, d'après [50].

3.2 Caractérisation du G4-MB

Cette section résume la Section 2.1 de l'Article 1 qui étudie la réaction d'ouverture et de fermeture du G4-MB (étape 1–2 Figure 3.1). En premier lieu, l'existence d'une structure quadruplex intramoléculaire est démontrée, pour les séquences oligonucléotidiques considérées, par les faits expérimentaux suivants : i) Le signal d'absorbance à 295 nm varie en fonction de la température ; ii) Le spectre thermique différentiel (TDS, *cf.* Section 5 de l'Article 1) présente des signatures typiques de la structure quadruplex ; iii) La stabilité de la structure dépend, comme attendu, de la nature du cation monovalent du tampon

dans l'ordre $K^+ > Na^+ \gg Li^+$; iv) L'indépendance de ces effets avec la concentration en G4-MB confirme la nature intramoléculaire de la réaction. Ensuite, la formation de la structure en épingle à cheveux est étudiée en fonction de la taille de la boucle reliant le motif quadruplex : dans les conditions expérimentales considérées, le motif quadruplex du G4-MB est observé jusqu'à des tailles de boucle de 21 bases. C'est la première fois qu'une structure quadruplex avec une boucle de plus de 7 nucléotides est mise en évidence. D'autre part, à taille de boucle fixe, on observe la stabilisation de la structure quadruplex en présence de cations Mg^{2+} . Enfin, la cinétique des réactions d'ouverture et de fermeture d'un G4-MB est étudiée. Dans les deux cas, les données expérimentales sont convenablement ajustées par une loi biexponentielle associée à deux temps caractéristiques. Cette observation indique probablement un polymorphisme de la structure quadruplex dans la tige du G4-MB. La Figure 3.2b montre en effet trois agencements possibles de la chaîne oligonucléotidique dans un quadruplex intramoléculaire. Cependant, ce polymorphisme n'induit qu'une dispersité relativement faible des constantes cinétiques : pour le G4-MB considéré, le repliement est associé à des temps caractéristiques entre 5 et 20 s, tandis que l'ouverture a lieu sur des temps de 100 à 500 s.

3.3 Association entre un G4-MB et une cible complémentaire

La seconde partie de l'Article 1 (Sections 2.2 et 3) étudie la réaction d'hybridation entre un G4-MB, 30GMB, possédant une boucle de 12 bases et une tige formée de trois plateaux de guanines, et trois oligonucléotides 13-mères complémentaires à la séquence de sa boucle : 13ACA, complémentaire parfait, et 13ACC et 13AAA qui présentent un mésappariement. Deux questions sont abordées : i) La capacité du G4-MB à discriminer de façon thermodynamique et cinétique entre les différents oligonucléotides cibles ; ii) La nature du mécanisme de la réaction d'hybridation : **1–2–4** ou **1–3–4** (Figure 3.1). Dans le cadre de cette thèse, j'ai contribué à l'analyse des données thermodynamiques (Section 3 de l'Article 1) et cinétiques (Section 2.2 et *Appendix B* de l'Article 1). Je présente ici un aperçu des résultats principaux.

3.3.1 Thermodynamique de la discrimination

Dans le Paragraphe 2.2.1 de l'Article 1, l'avancement de la réaction **1–4** est étudié, en fonction de la température, par spectroscopie d'absorbance et d'émission de fluorescence. Les deux techniques confirment le comportement attendu pour un MB. À basse température, l'adduit entre le G4-MB et l'oligonucléotide complémentaire est formé avec un ordre relatif de stabilité $13ACA > 13ACC > 13AAA$. À température intermédiaire, le double brin disparaît et le G4-MB se structure. Enfin, à haute température, tous les oligonucléotides adoptent la conformation simple brin. Ce comportement permet d'utiliser le G4-MB pour discriminer de façon thermodynamique entre des séquences cible différentes, avec ou sans mésappariement. La nature de cette discrimination est discutée dans la Section 3 de l'Article 1 ainsi que de façon plus détaillée dans la suite de ce paragraphe.

La thermodynamique de la discrimination est étudiée en présence et en l'absence de cation Mg^{2+} . Nous avons montré que la concentration en cet ion divalent est un pa-

ramètre intéressant pour ajuster la plage de température dans laquelle le G4-MB permet la discrimination entre séquences complémentaires parfaite et mésappariée. En fait, c'est précisément cette propriété, facilitant le design des séquences, qui nous a amené à adopter le motif quadruplex pour former la tige du MB utilisé. Dans le cas des MB à tige double brin classiques, la possibilité de modulation par la concentration en ion Mg^{2+} est réduite car le MB structuré et l'aduit double brin résultant de son appariement avec le complémentaire y sont également sensibles.

Discrimination thermodynamique à température constante

Un G4-MB (et un MB en général) rend donc possible la discrimination thermodynamique entre des séquences cibles complémentaires parfaite/mésappariée. Or, il est largement admis dans la littérature que l'hybridation avec un MB offre une sélectivité thermodynamique accrue par rapport à l'hybridation avec un brin complémentaire non-structuré [51, 52]. C'est un point que nous avons voulu examiner.

Nous considérons ici le cas d'une discrimination à température constante et reprenons plus en détail la discussion de la Section 3 de l'Article 1. En référence à la Figure 3.1, on note **1** la conformation structurée d'un MB ayant une longueur de N bases¹. On écrit $N = N_{\text{boucle}} + 2N_{\text{tige}}$ où N_{boucle} et N_{tige} désignent les nombres de bases dans la boucle et dans la tige, respectivement. Écrivons tout d'abord la réaction d'ouverture de **1** pour donner le simple brin **2**



où K_{12} est la constante thermodynamique d'équilibre associée à la réaction **1**–**2**, et le signe égal sous-entend que l'on s'intéresse aux états initiaux et finaux et non pas au mécanisme de la réaction.

P est un oligonucléotide simple brin cible de longueur N_P , parfaitement complémentaire de toute ou d'une partie de la séquence de la boucle de **1**, $N_P \leq N_{\text{boucle}}$. M est un oligonucléotide analogue à P mais présentant un mésappariement lorsqu'il s'associe à **1**. Les réactions d'hybridation de P et M sur **1** s'écrivent :



où K_{14}^P et K_{14}^M sont les constantes thermodynamiques relatives à l'association de P et M avec la sonde structurée **1**, et $\mathbf{4}_i$ est le double brin correspondant à la cible i (Figure 3.1). À température constante, la discrimination thermodynamique entre P et M induite par **1** est évaluée par le rapport des constantes thermodynamiques K_{14}^P/K_{14}^M .

À titre de référence, abordons à présent la discrimination entre P et M par une sonde non-structurée, telle qu'un oligonucléotide simple brin de longueur N . Cette sonde comporte une séquence centrale identique à celle de la boucle de **1** et deux séquences pendantes de chaque côté, choisies pour ne pas former de tige. D'un point de vue thermodynamique, la nature précise de ces séquences pendantes joue un rôle mineur dans la réaction d'hybridation. On peut ainsi identifier cette sonde non-structurée avec l'espèce **2**, la conformation non-structurée du MB **1**, ce qui simplifie les notations. Ces réactions avec P et M s'expriment :

¹Cette argumentation est valable pour toute sonde structurée : G4-MB, MB classique ou autre.



de constantes thermodynamiques K_{12}^P et K_{12}^M respectivement. La discrimination thermodynamique à température constante est également fondée sur le rapport K_{12}^P/K_{12}^M . En combinant (3.1) avec, (3.2) et (3.4) d'un côté, et (3.3) et (3.5) de l'autre, on obtient

$$K_{14}^P = K_{12}^P K_{12} \quad \text{et} \quad K_{14}^M = K_{12}^M K_{12} \quad (3.6)$$

et enfin

$$\frac{K_{14}^P}{K_{14}^M} = \frac{K_{12}^P}{K_{12}^M}. \quad (3.7)$$

On peut alors conclure qu'à température constante, l'utilisation d'une sonde structurée, telle qu'un MB, n'accroît pas la discrimination thermodynamique entre séquences complémentaires parfaite et mésappariée. La sélectivité de reconnaissance est en effet la même que pour une sonde non-structurée.

Une plage de température comme critère de discrimination

Dans de nombreuses applications de discrimination de séquences, c'est l'avancement des réactions (3.2) à (3.5) en fonction de la température, plutôt que la valeur de la constante thermodynamique, qui constitue l'observable. Ces réactions ont des enthalpies et des entropies standard de réaction, $\Delta_r H^\circ$ et $\Delta_r S^\circ$, négatives. Ainsi, à haute température, les espèces simple brin P et M sont majoritaires tandis qu'à basse température sont majoritaires les duplexes $\mathbf{4}_P$ et $\mathbf{4}_M$. On définit la température de fusion comme la température à laquelle les concentrations en simple et double brin sont égales à l'équilibre. On utilisera les notations T_{14}^P , T_{14}^M , T_{24}^P et T_{24}^M respectivement associées aux réactions (3.2), (3.3), (3.4) et (3.5). La plage de température dans laquelle il est possible de discriminer P et M est

$$\Delta T_{14} = T_{14}^P - T_{14}^M \quad (3.8)$$

pour l'hybridation avec la sonde structurée **1** et

$$\Delta T_{24} = T_{24}^P - T_{24}^M \quad (3.9)$$

dans le cas d'une hybridation avec la sonde non-structurée **2**.

Pour estimer les valeurs de $\Delta T_{m,14}$ et $\Delta T_{m,24}$ nous allons suivre la démarche de Bonnet et collaborateurs [51], reprise dans la Section 3 de l'Article 1, et construire un diagramme de prédominance de chaque espèce en fonction de la température. Pour ce faire, écrivons le potentiel chimique de l'espèce i , à la concentration d'équilibre C_i [mol L⁻¹], dans une solution idéale où le système de référence est une solution infiniment diluée

$$\mu_i = \mu_i^\circ + RT \ln \frac{C_i}{C^\circ}, \quad (3.10)$$

où μ_i° [J mol⁻¹] est le potentiel chimique standard de l'espèce i , R [J K⁻¹ mol⁻¹] la constante des gaz parfaits, T [K] la température et $C^\circ = 1$ mol L⁻¹ la concentration standard. L'indice i dénote l'espèce **1**, **2**, P, M, $\mathbf{4}_P$ ou $\mathbf{4}_M$.

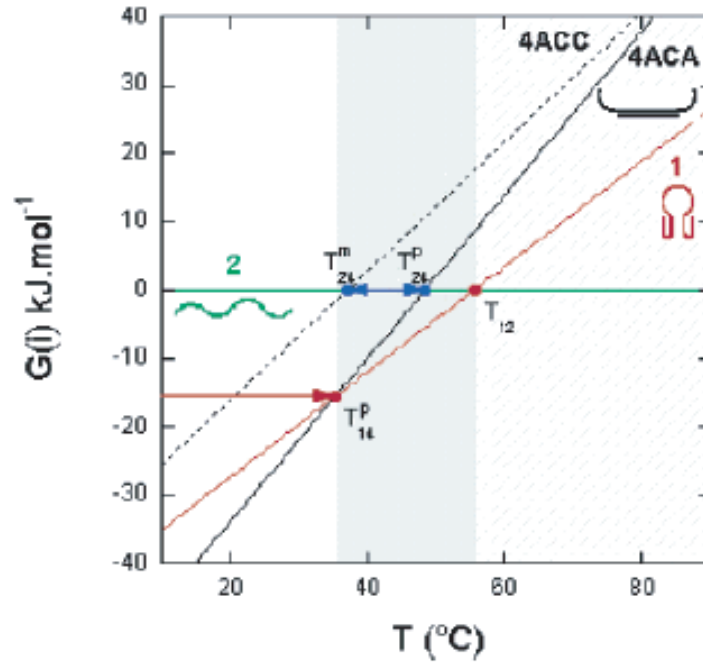


FIG. 3.3 – Diagramme de prédominance entre un MB structuré **1** et deux double brins d'ADN parfaitement complémentaires **4_P** et mésappariés **4_M**. Pour que le MB présente une utilité il faut $\Delta T_{14} > \Delta T_{24}$, ce qui implique que le MB fonde à une température plus haute que les doubles brins, $T_{12} > T_{14}$ et que les pentes des droites $G(\mathbf{4_P})$ et $G(\mathbf{4_M})$ soient supérieures à celle de $G(\mathbf{1})$. Cette figure correspond à la Figure 9 de l'Article 1.

Le diagramme de prédominance de la Figure 3.3 représente, à la manière d'un diagramme de phases, l'énergie libre G d'une espèce en fonction de la température. Pour pouvoir représenter ces valeurs sur le même graphe, il est nécessaire de choisir un zéro d'énergie libre et on a pris ici

$$G(\mathbf{2}) = 0. \quad (3.11)$$

L'énergie libre de la sonde structurée **1**, du double brin parfait **4_P** et du mésapparié **4_M** s'écrivent alors

$$G(\mathbf{1}) = \mu_1 - \mu_2 = \Delta_{21}H^\circ - T\Delta_{21}S^\circ \quad (3.12)$$

$$G(\mathbf{4_P}) = \mu_{4_P} - \mu_2 = \Delta_{24_P}H^\circ - T(\Delta_{24_P}S^\circ + R \ln \frac{C_0}{2}) \quad (3.13)$$

$$G(\mathbf{4_M}) = \mu_{4_M} - \mu_2 = \Delta_{24_M}H^\circ - T(\Delta_{24_M}S^\circ + R \ln \frac{C_0}{2}) \quad (3.14)$$

où nous avons considéré que toutes les espèces se trouvent à la concentration $C_0/2$. Pour que l'utilisation du MB soit intéressante, il faut qu'il permette d'élargir la plage de température dans laquelle il est possible de discriminer P et M

$$\Delta T_{14} > \Delta T_{24}. \quad (3.15)$$

Les températures des fusion entre les espèces i et j se retrouvent à partir des équations (3.11), (3.12), (3.13) et (3.14) par identification $G(\mathbf{i}) = G(\mathbf{j})$. Sachant que forcément

$T_{14}^P > T_{14}^M$, il en résulte que pour satisfaire (3.15) il faut

$$T_{12} > T_{14}^P, \quad (3.16)$$

c'est-à-dire que la température de fusion du MB soit supérieure à celle du double brin parfaitement complémentaire, et

$$|\Delta_{21}S^o| < |\Delta_{24_P}S^o|, |\Delta_{24_M}S^o|, \quad (3.17)$$

toutes ces dernières grandeurs étant négatives. Cette dernière contrainte se traduit graphiquement dans le fait que la pente de la droite $G(\mathbf{1})$, associée au MB structuré, doit être inférieure à celle des droites $G(\mathbf{4_P})$ et $G(\mathbf{4_M})$, associées aux doubles brins.

3.3.2 Discrimination par la cinétique et mécanisme d'hybridation

Nous avons également étudié en détail la cinétique d'hybridation entre le G4-MB et les trois oligonucléotides cible complémentaires (Figure 3.1). Les résultats expérimentaux sont exposés dans le Paragraphe 2.2.2 de l'Article 1. La section nommée *Appendix B* du *Supporting Information* correspondant à l'Article 1, p. 93, offre une discussion détaillée des expériences contrôlées réalisées pour trancher entre les mécanismes **1–3–4** ou **1–2–4**. Nous exposons ici brièvement les résultats principaux et invitons le lecteur à consulter les parties indiquées de l'Article 1.

Mécanisme : Deux temps de relaxation τ_1 et τ_2 sont associés aux deux mécanismes **1–2–4** et **1–3–4** de la Figure 3.1. Dans les conditions expérimentales de cette étude, il est possible d'assigner τ_1 et τ_2 , dans une bonne approximation, aux temps de relaxation des étapes élémentaires de chaque mécanisme. Pour le mécanisme **1–2–4**, τ_1 est associé à l'étape **1–2** et τ_2 à **2–4** qui est l'étape cinétiquement déterminante ($\tau_2 > \tau_1$). Pour le mécanisme **1–3–4**, τ_1 est relié à l'étape cinétiquement déterminante **1–3** et τ_2 à **3–4** ($\tau_1 > \tau_2$). Nous apportons, dans l'*Appendix B*, p. 93, des éléments plaçant en faveur du mécanisme **1–3–4**.

Observations expérimentales : La cinétique d'interaction entre le G4-MB 30GMB et les oligonucléotides 13ACA, 13ACC et 13AAA a été suivie par spectroscopie de fluorescence à différentes concentrations. Dans la plupart des cas, le signal de fluorescence est convenablement ajusté par une fonction biexponentielle qui met en évidence deux temps caractéristiques d'environ 100 et 1000 s respectivement. Ces deux temps ne s'identifient pas aux deux temps de relaxation chimique τ_1 et τ_2 qui ressortent de l'analyse mécanistique. En effet, dans un mécanisme **1–3–4**, seul le temps τ_2 , associé à l'étape **3–4**, peut être observé dans les conditions expérimentales utilisées. Ainsi, les deux temps caractéristiques observés expérimentalement suggèrent plutôt la présence de deux structures polymorphiques du G4-MB, *a* et *b*, réagissant chacune avec un temps caractéristique spécifique, τ_{2a} et τ_{2b} .

Discrimination par la cinétique : Il a été possible de trouver des conditions expérimentales qui permettent une discrimination des séquences oligonucléotidiques complémentaires basée sur la cinétique. La Figure 3.4 montre la variation de l'intensité de fluorescence quand on rajoute un oligonucléotide complémentaire à la boucle du MB. Quand le complémentaire parfait est utilisé, l'étape **3–4** se réalise effectivement et l'on observe le temps caractéristique associé à cette étape de forte variation du rendement quantique de fluorescence. Par contre, lorsque un complémentaire mésapparié est utilisé, on n'observe que l'étape **1–3** qui est plus rapide et associée à une variation de fluorescence faible. Ainsi, dans ces conditions de concentration, l'observation à des temps supérieurs à 200 s permet une discrimination entre séquences complémentaires parfait/mésappariée basée sur la cinétique.

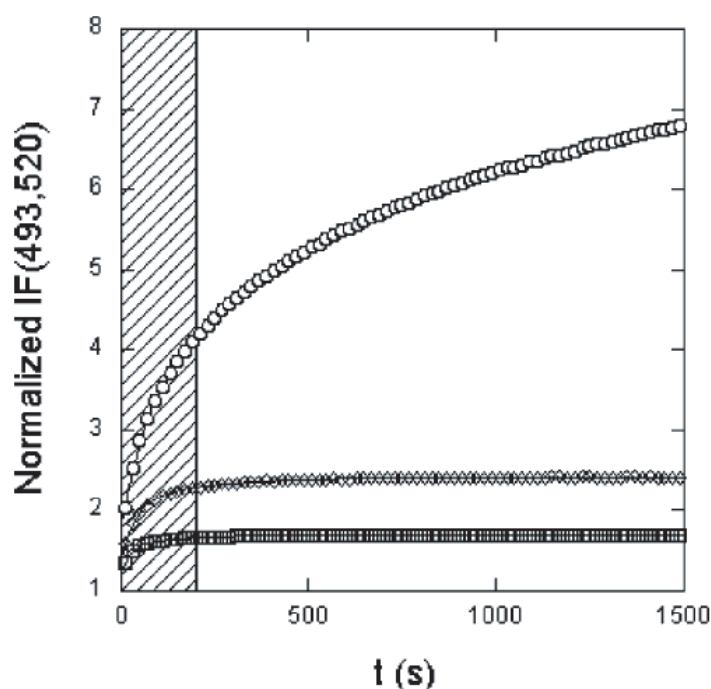


FIG. 3.4 – Intensité de fluorescence normalisée en fonction du temps lors de l'ajout d'un complémentaire parfait (cercles) ou mésapparié (carrés et losanges) dans une solution d'un G4-MB. Le fort changement de signal induit par le complémentaire parfait indique la formation du duplexe **4**. Par contre, les complémentaires donnant lieu à un mésappariement s'hybrident sur le MB pour former l'espèce **3** mais sans l'ouvrir pour donner **4**. Une discrimination cinétique est possible au delà de la zone rayée. Cette Figure correspond à la Figure 8 de l'Article 1.

3.4 Conclusion

Les MB basés sur un motif quadruplex nous ont ainsi permis de réaliser une discrimination thermodynamique ajustable par la présence d'ions Mg^{2+} et de mettre en évidence une discrimination d'origine cinétique. Cependant, il faut situer cette discrimination vis-à-vis de l'expérience d'électrodiffusion, dans laquelle on s'intéresse à une réaction d'association

à deux niveaux



où les espèces A et C ont des mobilités électrophorétiques différentes. À l'échelle de temps du processus $\mathbf{3} \rightleftharpoons \mathbf{4}$, où la discrimination cinétique a lieu, on peut alors écrire



Cependant, cette réaction, intramoléculaire, entraîne difficilement une différence de mobilité électrophorétique (*cf.* Figure 3.1). De plus, le prix à payer pour une discrimination cinétique sur l'étape d'association est une dynamique plus lente. Nous n'avons pas utilisé les sondes structurées dans les expériences couplant transport et réaction chimique.

Chapitre 4

Article 1 : *Quadruplex-based molecular beacons as tunable DNA probes*

Quadruplex-Based Molecular Beacons as Tunable DNA Probes

A. Bourdoncle,^{†,‡} A. Estévez Torres,[†] C. Gosse,^{*,§} L. Lacroix,[‡] P. Vekhoff,[‡]
T. Le Saux,[†] L. Jullien,^{*,†} and J.-L. Mergny^{*,‡}

Contribution from the Département de Chimie, CNRS UMR 8640, École Normale Supérieure, 24 rue Lhomond, 75231 Paris Cedex 05, France, Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM503, INSERM U 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, France, and Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France

Received February 2, 2006; E-mail: Ludovic.Jullien@ens.fr

Abstract: Molecular beacons (MBs) are fluorescent nucleic acid probes with a hairpin-shaped structure in which the 5' and 3' ends are self-complementary. Due to a change in their emissive properties upon recognition with complementary sequences, MBs allow the diagnosis of single-stranded DNA or RNA with high mismatch discrimination, in vitro and in vivo. Whereas the stems of MB hairpins usually rely on the formation of a Watson–Crick duplex, we demonstrate in this report that the preceding structure can be replaced by a G-quadruplex motif (G4). Intramolecular quadruplexes may still be formed with a central loop composed of 12 to 21 bases, therefore extending the sequence repertoire of quadruplex formation. G4-MB can efficiently be used for oligonucleotide discrimination: in the presence of a complementary sequence, the central loop hybridizes and forms a duplex that causes opening of the quadruplex stem. The corresponding G4-MB unfolding can be detected by a change in its fluorescence emission. We discuss the thermodynamic and kinetic opportunities that are provided by using G4-MB instead of traditional MB. In particular, the intrinsic feature of the quadruplex motif facilitates the design of functional molecular beacons by independently varying the concentration of monovalent or divalent cations in the medium.

1. Introduction

Molecular beacons (MBs) are oligonucleotide probes that become fluorescent upon binding to a complementary sequence of single-stranded nucleic acid. Since their discovery in 1996,¹ they have been extensively used in homogeneous hybridization assays in vitro and in vivo.^{2,3} An MB contains a stem and a loop. In the MB closed state, the stem brings to proximity a fluorescent dye and a quencher located at both ends of the oligonucleotide: the fluorescence emission from the dye is consequently quenched.^{4,5} The loop region, and sometimes also a part of the stem in the so-called shared-stem constructs,⁶ is the target recognition portion of the MB. Upon binding to a matching target region, the stem opens and the distance between the fluorescent dye and the quencher increases, enabling fluorescence emission to be detected (Figure 1).

MB design involves considerations related to both fluorescence detection and molecular recognition. An efficient detection requires choosing an appropriate fluorescent dye/quencher

combination to maximize the alteration of the fluorescence emission upon target binding.^{1,7,8} An optimized recognition relies on maximizing the association extent with the complementary target regarding mismatched sequences. Engineering constraints here are numerous to ensure, at the same time, a significant hybridization at a given target concentration and the emphasis on the free-energy penalty associated with mismatched base pairs. In their pioneering work on stringency clamps, Roberts and Crothers suggested that the stability of the alternative secondary structure of the probe (here the MB hairpin) should be between the ones of the perfect and of the defect complexes: matched duplexes would then form, whereas mismatched ones would not due to the competing intramolecular folding of the probe.⁹ MBs allow achievement of the preceding thermodynamic condition quite easily because different free parameters such as the stem length and sequence, as well as the loop length, can be tuned independently.¹⁰ As it will be shown in the present report, one can finely play with a larger number of optimizing parameters when using structured DNA probes that involve G-quadruplexes.

[†] École Normale Supérieure.[‡] Muséum National d'Histoire Naturelle.[§] LPN-CNRS.

- (1) Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- (2) Broude, N. E. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20*, 249–256.
- (3) Tan, W.; Wang, K.; Drake, T. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 547–553.
- (4) Tyagi, S.; Bratu, D. P.; Kramer, F. R. *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53.
- (5) Bernacchi, S.; Mely, Y. *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, e62.
- (6) Tsourkas, A.; Behlke, M. A.; Bao, G. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4208–4215.

- (7) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 365–370.
- (8) Marras, S. A. E.; Kramer, F. R.; Tyagi, S. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, e122.
- (9) Roberts, R. W.; Crothers, D. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 9397–9401.
- (10) Bonnet, G.; Tyagi, S.; Libchaber, A.; Kramer, F. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 6171–6176.

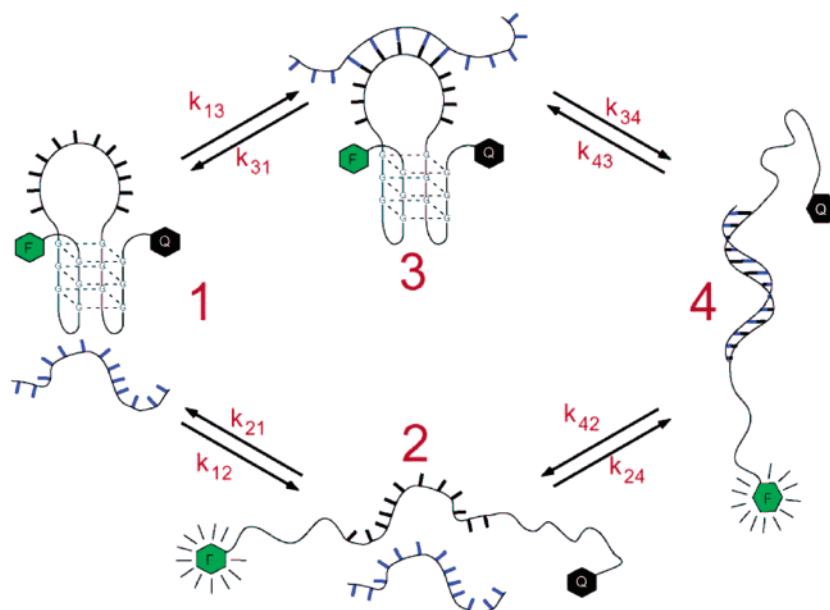


Figure 1. Competing pathways for molecular recognition between an oligonucleotide target and a G4-based molecular beacon (G4-MB). In the upper pathway, partial recognition is followed by invasion that leads to beacon opening. In contrast, binding of the target occurs only after spontaneous opening of the beacon in the lower pathway. The intramolecular quadruplex is represented with a central lateral loop. Similar pathways could have been drawn with a central diagonal loop (as for the intramolecular human telomeric repeat in the presence of Na^+) or with a double reversal loop. Provided that the fluorescent dye (F) and the quencher (Q) are in close proximity in the folded state **1** and enough moved away in the duplex **4**, the photophysical signature associated with the **1-4** conversion should be similar.

G-quadruplexes (G4) result from the association of four oligonucleotidic strands held together by the hydrophobic stacking of large, planar, hydrogen-bonded DNA base quartets coordinated to a monovalent cation. A G-quartet, alternatively called a G-tetrad, involves four guanines and a G-quadruplex consists of at least two layers of G-quartets. The presence of the central cation is essential to the structure, but not all cations are equivalent for quadruplex stabilization; their stabilizing power obeys $\text{K}^+ > \text{Na}^+ \gg \text{Li}^+$.¹¹ The potassium cation, which is very abundant in the intracellular medium, is highly favorable for G-quadruplex formation. Indeed this structure has been reported in cells.¹² Different G-quadruplex structures exist, depending on the orientation of the strands and the *syn/anti* conformations of guanines.¹³ Although the basic features of G-quartets have been known for more than forty years,¹⁴ it is only in the past decade that the interest in these peculiar structures has increased, due to growing evidences for the implication of G-quadruplex structures in key biological processes.^{15–17}

In this manuscript, we evaluate a G-quadruplex-based approach to build molecular beacons (G4-MB). In particular, we examine the opportunities that a G-quadruplex stem could provide to optimize target recognition from both the thermodynamic and the kinetic point of view. Besides a recent report

using homo-DNA,¹⁸ i.e., reverse Hoogsteen AA base pairs, G4-MBs are among the first attempts to substitute, in the MB stem, Watson–Crick base pairing by another pairing system. After investigation of the significance of the loop length and of the cation nature on quadruplex stability, we designed a G4-MB with a stem made of 3 quartets and a loop composed of 12 nucleotides. We demonstrate that the latter G4-MB acts as a molecular beacon toward complementary single-stranded DNA targets. In particular, we show, by observing the thermodynamics as well as the kinetics of the recognition process, that discrimination between matched and mismatched sequences can be performed over a larger temperature range than that with classical Watson–Crick MBs. We analyze the origin of this feature, and we eventually discuss the considerations to be taken into account for engineering G4-MBs adapted to more general circumstances.

2. Results

2.1. Design of a G4-MB. In the present account, we introduced the motif for target recognition in the central loop of an intramolecular quadruplex. As shown in the structure displayed in Figure 1, the sequence of an oligonucleotide giving such a G4-MB should contain (i) two lateral portions to form the quadruplex structure as well as a central 10 to 20 base-long loop portion complementary to the target and (ii) a fluorophore–quencher pair located at the termini of the oligonucleotide.

2.1.1. Oligonucleotide Backbone. We used the human telomeric sequence to design the lateral portions that will form a three quartet stem (Figure 1 and Table 1). Such sequences were reported to yield intramolecular quadruplexes with 1 to 7 base-long loops.^{13,19} In contrast, no evidence existed for intra-

(11) Williamson, J. R. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1994**, *23*, 703–730.

(12) Schaffitzel, C.; Berger, I.; Postberg, J.; Hanes, J.; Lipps, H. J.; Plückthun, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2001**, *98*, 8572–8577.

(13) Hazel, P.; Huppert, J.; Balasubramanian, S.; Neidle, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16405–16415.

(14) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1962**, *48*, 2013–2018.

(15) Rangan, A.; Fedoroff, O. Y.; Hurley, L. H. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 4640–4646.

(16) Duquette, M. L.; Handa, P.; Vincent, J. A.; Taylor, A. F.; Maizels, N. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 1618–1629.

(17) Paeschke, K.; Simonsson, T.; Postberg, J.; Rhodes, D.; Lipps, H. *J. Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 847–854.

(18) Crey-Desbiolles, C.; Ahn, D.; Leumann, C. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e77.

(19) Risitano, A.; Fox, K. R. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 1852–1855.

Table 1. Names and Sequences (5'-3' Orientation) of the Oligonucleotides That Were Used in This Study^a

Name	Sequence
30G	GGGTTAGGGTCCTTTGTTTGTGGGTTAGGG
30GMB	Fluorescein- GGGTTAGGGTCCTTTGTTTGTGGGTTAGGG -Dabcyl
13ACA	CACAAACAAAGGA
13AAA	CACAAA <u>AAA</u> AGGA
13ACC	CACAAACA <u>ACG</u> GA
F-13ACA	Fluorescein-CACAAACAAAGGA
9C	CCCTAACCC
38G	GGGGGTTAGGGGGTCCTTTGTTTGTGGGGTTAGGGGG
30con	GGGTTAGTGTCCTTTGTTTGT<u>GCGTTAGTG</u>
21tel	GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG
39G	GGGTTAGGGTTTTTTCCTTTGTTTGTGGGTTAGGG
36G	GGGTTAGGGTTTTTCCTTTGTTTGTGGGTTAGGG
33G	GGGTTAGGGTTTCCTTTGTTTGTGGGTTAGGG
24G	GGGTTAGGGTTTGTGGGTTAGGG
21G	GGGTTAGGGTGTGGGTTAGGG

^a The G4-MB (30G and the corresponding doubly labeled 5' fluorescein-3' dabcyl 30GMB) as well as the complementary oligonucleotides (matched sequence, 13ACA; mismatched sequences, 13AAA and 13ACC) are shown in the tabletop. The bases in bold are involved in the formation of the quadruplex structure, whereas the underlined ones locate the mismatches. The sequences in the middle were used as control oligonucleotides (38G and 30con are 30G analogues that do not unfold and do not contain a quadruplex structure, respectively). The oligonucleotides in the table bottom were studied to probe the effect of the loop length on the beacon stability.

molecular quadruplex formation with a longer loop when we started the present work. We consequently first analyzed the behavior of putative G4 probes with central sequences of different lengths (3 to 21 bases), in the presence of different salts (Table 1).

Figure 2a displays the typical evolution with respect to temperature of the absorbance at 295 nm of a 2 μ M solution of 30G, a sequence with a 12 base-long loop, in the presence of 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 supplemented with 100 mM LiCl, NaCl, or KCl (see also Figure 1Sa and 1Sb for complementary UV absorption and circular dichroism experiments). One notices the presence of a cation-dependent conformational change associated with the temperature increase. The corresponding thermal differential spectra (TDS) in K⁺ and Na⁺ buffers are shown in Figure 2b. These TDS spectra were obtained by the difference between the absorption spectra recorded above and below the observed transition. They exhibit the typical pattern of an intramolecular G-quadruplex structure with two positive maxima at 240 and 275 nm and a negative minimum around 295 nm.²⁰ Thus, the observed transition was suggested to be associated with the melting of an intramolecular quadruplex at a melting temperature denoted as T_m in the following. Formation of a quadruplex was confirmed by the stability dependence of the structure on the nature of the monocation. As expected, the stability of the G4-MB quadruplex was the lowest in LiCl, intermediate in NaCl, and the highest in KCl (T_m = <15, 46, and 55 °C, respectively, Figure 2a and Table 2). Concentration-independent melting temperatures confirmed that the folding process was intramolecular (Supporting Information; Figure 2S). Similar observations were made throughout the series of oligonucleotides devoted to probe the

effect of the loop length on the G4-MB stability. Table 2 summarizes the thermodynamic data that were collected from the analysis of the UV melting experiments.²¹

Figure 3 shows the evolution of T_m as a function of the number n of nucleotides in the loop portion for 2 μ M oligonucleotide solutions in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate pH 7.2. As previously observed for a limited size range,¹³ T_m steadily decreases when the loop length is increased (see also Table 1S in the Supporting Information). The corresponding evolutions of the enthalpic $\Delta_{21}H^\circ$ and entropic $T\Delta_{21}S^\circ$ contributions to the Gibbs free energy $\Delta_{21}G^\circ$ associated with the formation of the quadruplex motif at 298 K are displayed in Figure 3S (see also Table 1S in the Supporting Information). We observed enthalpy–entropy compensations that are often observed in families of closely related species submitted to identical reactions;²² they have also already been studied for nucleic acid associations.^{23,24}

Mg²⁺ cations affect DNA duplex stability but have been reported to marginally alter one of DNA intramolecular quadruplexes.¹⁹ We envisioned that such a feature could facilitate the design of G4-MBs: in addition to the lengths of the loop and of the stem, magnesium(II) concentration could become a relevant parameter to finely tune the difference in melting temperatures associated with the beacon folding and with the probe–target duplex formation, respectively. Thus, we examined

(20) Mergny, J. L.; Li, J.; Lacroix, L.; Amrane, S.; Chaires, J. B. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e138.

(21) Despite the presence of several folded states, a two-level model was proven to be relevant for the analysis of the UV melting curve experiments (eq 1). If the thermodynamic parameters of the different foldamers are similar within experimental errors, the extracted constants hold for all of them. Otherwise, a folded state is more stable than the other ones, and the measured parameters will correspond to it. The significance of the extracted values is discussed in Appendix A of the Supporting Information.

(22) Leffler, J. E.; Grunwald, E. *Rates and Equilibria of Organic Reactions as Treated by Statistical, Thermodynamic, and Extrathermodynamic Methods*, reprint; Dover: New York, 1989.

(23) Searle, M. S.; Williams, D. H. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2051–2056.

(24) Strazewski, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3546–3554.

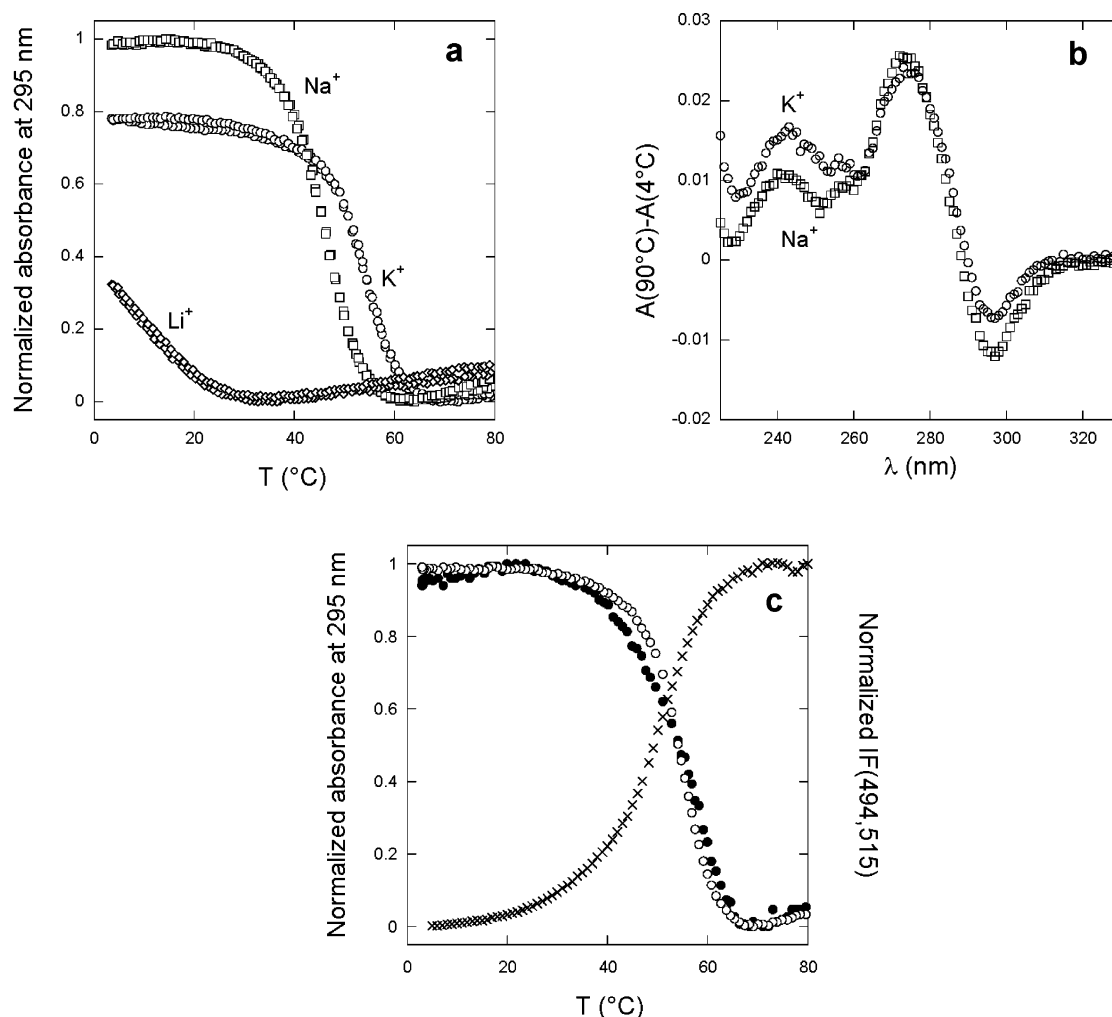


Figure 2. (a) Quadruplex folding/unfolding transitions followed by absorbance and fluorescence spectroscopies. Change in the absorbance at 295 nm (A) with respect to temperature of a 2 μ M 30G solution in 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 in the presence of 100 mM KCl ($\circ$), NaCl ($\square$), or LiCl ($\diamond$). For comparison, the maximum and minimum values in the presence of NaCl were normalized to 1 and 0, and the values in the presence of LiCl and KCl were correspondingly transformed. (b) Corresponding thermal differential spectra (TDS). (c) Change, with respect to temperature, in the absorbance at 295 nm of 2 μ M oligonucleotide solutions (30G, $\circ$; 30 GMB, $\bullet$) and in the steady-state fluorescence emission at 515 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 494$ nm) of a 0.2 μ M 30GMB solution ($\times$). Buffer: 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate pH 7.2. Maximum and minimum values were normalized to 1 and 0 for comparison.

the significance of Mg^{2+} on the melting behavior of the investigated G4-MB. Figure 3 shows that the addition of 10 mM MgCl_2 to a 100 mM KCl buffer increases the melting temperature of the G4-MB by up to 10 °C. The presence of Mg^{2+} correspondingly alters the thermodynamics of the melting transition (Figure 3S). It is worth noting that, in contrast to the human telomeric sequence 21tel, the quadruplex formed by the closely related 21G sequence is noticeably stabilized in the presence of Mg^{2+} (Tables 1 and 1S). This unexpected observation points out that the loop composition could be important in the stability of the quadruplex and in the interaction with magnesium ions (possibly associated with the preferential formation of different foldamers),¹³ at least for small loops.

The preceding results suggest that a G4-MB may accommodate a central loop of up to 21 bases and still be formed at physiological temperature. This observation is significant in relation to the prevalence of putative quadruplex sequences throughout the human genome. Over 370 000 quadruplex-prone sequences were recently found by setting a maximum seven nucleotide length for quadruplex loops;^{25,26} our results indicate that this number could be even larger than anticipated.

For the rest of this study, we retained a G4-MB oligonucleotide with a 12 base-long central loop, 30G, and its fluorescently labeled analogue, 30GMB (Table 1).

2.1.2. Fluorophore/Quencher Couple. The choice of the fluorophore/quencher couple relies on both photophysical and functional considerations.⁸ Ideally, the transition between the open and the closed G4-MB states should be accompanied by a major change in fluorescence emission. In addition, labeling should not too strongly alter the intrinsic thermodynamic features of the nonlabeled probe. We relied on 30GMB, a labeled analogue of the 30G sequence, bearing fluorescein and dabcyl units at its extremities. The latter fluorophore/quencher pair has been already extensively investigated.⁸ Figure 2c displays the evolution with respect to temperature of the absorbance at 295 nm as well as of the steady-state fluorescence emission at 515 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 494$ nm) of 30GMB solutions in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate pH 7.2. At the same 2 μ M concentration in oligonucleotide, the melting transition observed in UV

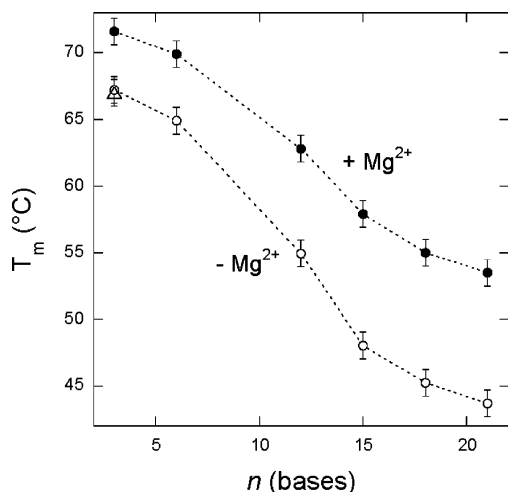
(25) Todd, A. K.; Johnston, M.; Neidle, S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2901–2907.

(26) Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2908–2916.

Table 2. Thermodynamic Data Associated with the Intramolecular Formation of a Three Quartet Quadruplex Motif for the 30G and 30GMB Sequences, as Extracted from UV Melting Experiments Using a Two-State Model (Appendix A in the Supporting Information)^a

sequence	$T_m \pm 1$ (°C)	$\Delta_{21}H^\circ \pm 20\%$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{21}S^\circ \pm 20\%$ (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	$\Delta_{21}G^\circ(298\text{ K}) \pm 20\%$ (kJ mol ⁻¹)
30G (KCl)	55	-250	-770	-22
30G (KCl,MgCl ₂)	63	-260	-760	-29
30G (NaCl)	46	-220	-700	-15
30G (LiCl)	<15	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
30GMB (KCl)	53	-180	-550	-16
30GMB (KCl,MgCl ₂)	64	-210	-640	-25
30GMB (NaCl)	45	-150	-470	-10
30GMB (LiCl)	<10	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

^a Experimental conditions: 2 μ M oligonucleotide in 10 mM lithium cacodylate buffer (pH 7.2) containing 100 mM KCl, NaCl, or LiCl, in the presence or in the absence of 10 mM MgCl₂. ^b Not determined (T_m too low).

**Figure 3.** Influence of the loop length on the quadruplex stability. Change in the melting temperature T_m with respect to the number of nucleotides in the loop portion of the G4-MB for 2 μ M oligonucleotide solutions in 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 supplemented with 100 mM KCl in the presence (●) or in the absence (○) of 10 mM MgCl₂. The corresponding data for the 21tel sequence are displayed as a triangle (identical T_m in the absence and in the presence of 10 mM MgCl₂; Table 1S).

absorption satisfactorily compares with the one in fluorescence emission: both observables can be equally used to monitor the conformational transition. In agreement with previous reports,²⁷ we observed that the presence of labels does not forbid the quadruplex formation. In fluorescence emission, the stem melting is accompanied by an increase of fluorescence emission from the fluorescein (16-fold at 515 nm upon excitation at 494 nm). This observation agrees with the expected increase of the average distance between the fluorophore and the quencher when going from the folded state to the random coil (Table 1).

Despite the fair agreement between the melting temperatures of the labeled and nonlabeled sequences ($T_m = 53$ °C for 30GMB and $T_m = 55$ °C for 30G), Table 2 shows that the enthalpy $\Delta_{21}H^\circ$ and the entropy $\Delta_{21}S^\circ$ of the labeled oligonucleotide are less favorable for quadruplex formation. Such alterations associated with labeling have already been reported.²⁷ In relation with G4-MB design process, sequence optimization should thus include the terminal labels from the beginning.

2.1.3. Opening/Closing Dynamics. The folding dynamics of a molecular beacon is a significant parameter that determines the time scale of the response to the targeted oligonucleotide. Therefore, we successively measured the opening and the closing rate constants of 30GMB.

We used two different approaches to measure the folding rate constant of 30GMB, k_{21} , in 100 mM KCl, 10mM MgCl₂ buffer at 298 K. We first performed T-jump experiments by adding to the buffer thermostated at 298 K aliquots of 30GMB concentrated solutions thermostated at 353 K: the drop in temperature here is expected to promote quadruplex folding. Figure 4a shows that the T-jump causes a drop in the fluorescence emission from fluorescein in less than 1 min. Such an observation is in line with the quadruplex formation that brings the fluorophore and its quencher to closer proximity. In contrast to the expected behavior for an isomerization (Appendix B in the Supporting Information), the time-dependence of fluorescence emission could not be fitted by a monoexponential function. However, it is satisfactorily accounted for by a biexponential function leading to two folding rate constants: $k_{21a} = (2.7 \pm 0.05) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{21b} = (4.8 \pm 0.05) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (relative amplitudes $a_{21a} = 45\%$ and $a_{21b} = 55\%$). We also performed isothermal salt-change experiments²⁸ at 298 K by adding to 100 mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 aliquots of 30GMB concentrated solutions in 100 mM LiCl, 10mM MgCl₂, 10mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 (300-fold dilution): the change in cation, Li⁺ to K⁺, is responsible for the formation of the quadruplex. As shown in Figure 4a, the fluorescence emission from fluorescein drops in the same time range as that in the T-jump experiment. Again, this time evolution could not be satisfactorily fitted with a monoexponential function. The biexponential fit now leads to $k_{21a} = (2.7 \pm 0.05) \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ and $k_{21b} = (3.6 \pm 0.05) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (relative amplitudes $a_{21a} = 60\%$ and $a_{21b} = 40\%$). These values are in reasonable agreement with the values found in T-jump experiments.

To estimate the opening rate constant k_{12} in 100 mM KCl, 10mM MgCl₂ buffer at 298 K, we studied 30GMB hybridization with a short DNA oligonucleotide, 9C, that is complementary to the sequence of the stem but not of the loop (Table 1).^{28–31} Provided that pairing of 9C with the 30GMB open state occurs faster than opening of the 30GMB closed form,³² hybridization kinetics of the 9C trap will be limited by the kinetics of quadruplex opening. As shown in Figure 4b, the addition of a 100 molar excess of 9C to a 20 nM 30GMB G4-MB solution in 100 mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K causes a slow increase in fluorescence emission

(28) Raghuraman, M. K.; Cech, T. R. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4543–4552.

(29) Zhao, Y.; Kan, Z.-Y.; Zeng, Z.-X.; Hao, Y.-H.; Chen, H.; Tan, Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13255–13264.

(30) Ying, L.; Green, J. J.; Li, H.; Klennerman, D.; Balasubramanian, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 14629–14634.

(31) Green, J. J.; Ying, L. M.; Klennerman, D.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3763–3767.

(27) Mergny, J. L.; Maurizot, J. C. *ChemBioChem* **2001**, *2*, 124–132.

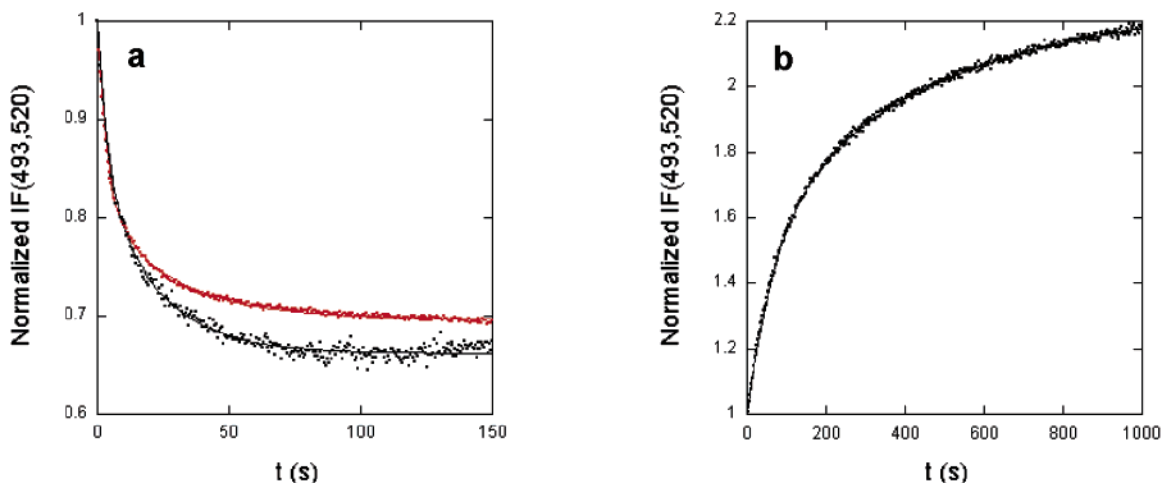


Figure 4. Quadruplex folding/unfolding kinetics. (a) Formation kinetics of the quadruplex stem of 30GMB at 298 K. T-jump experiment (black markers): an aliquot of concentrated solution of unfolded 30GMB at 353 K is 300-fold diluted at $t = 0$ s in 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K. Salt change experiment (red markers): an aliquot of concentrated solution of unfolded 30GMB in 100 mM LiCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 is 300-fold diluted at $t = 0$ s in 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K. Final concentration in 30GMB is 100 nM. (b) Unfolding kinetics of 30GMB at 298 K in 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. A 100 molar excess of 9C was added at $t = 0$ s to a 20 nM 30GMB solution in 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K. Markers: experimental points. Lines: biexponential fits. $\lambda_{\text{exc}} = 493$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm. The fluorescence signal is normalized at $t = 0$.

from fluorescein. This observation agrees with the quadruplex disruption that moves away the fluorophore from its quencher. Again, the corresponding time evolution of the fluorescence emission could not be fitted by a monoexponential function, but it was satisfactorily accounted for by a biexponential fit giving $k_{12a} = (1.9 \pm 0.04) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{12b} = (1.4 \pm 0.05) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (relative contributions $a_{12a} = 60\%$ and $a_{12b} = 40\%$). The latter rate constants are associated with 1–10 min half-life times that are slightly shorter than that of the intramolecular human telomeric quadruplex under nearly identical conditions.^{29,31,33} Such results are in agreement with the observations made for regular MBs: the opening rate depends on the length and on the composition of the stem but is relatively insensitive to loop composition.^{34,35}

In principle, the unsuccessful monoexponential fits of the 30GMB folding/unfolding data could reveal multistep mechanisms or/and the presence of at least two different G4-MB polymorphs. In fact, such a polymorphism has already been observed for the human intramolecular telomeric quadruplex,^{36–38} and the kinetic behavior of both subpopulations was even resolved:^{30,39} similarly 30GMB could exhibit multiple conformations (parallel, antiparallel or mixed) in solution.¹³ In relation

to this feature, a distribution of 30GMB photophysical properties as well as of the thermodynamic/kinetic constants would be expected: such a diversity could limit the usefulness of G4-based molecular beacons.

We performed a series of complementary electrophoretic experiments to address the polymorphism issue (Appendix C in the Supporting Information). We did evidence several 30G folded states that could at least partially account for the preceding unsuccessful monoexponential fits. At the same time, we showed that the rate constants associated with the opening and closing processes for the different 30G foldamers were contained within a range covering about 1 order of magnitude, which remained much lower than the penalty associated with a mismatch during the recognition process (vide infra): thus the distribution of thermodynamic and kinetic properties within the foldamer population remains narrow enough to most often satisfactorily assimilate the mixture to one species only at the present experimental precision (see also Appendix A in the Supporting Information). Taking into account that the proper design of the fluorophore–quencher couple should yield a significant fluorophore quenching for all the compact G4-MB folded structures, we conclude that the existence of different G4-MB folded states should not prevent the use of G4-MB for discrimination of oligonucleotide sequences.

2.2. 30G/GMB as Probes for Complementary Oligonucleotides. The 30G/GMB sequence was evaluated as a probe toward complementary oligonucleotides: 13ACA is the matched sequence, and 13AAA and 13ACC are two mismatched ones that differ by the position of the mutated base. We successively analyzed the thermodynamic and the kinetic aspects of the recognition.

2.2.1. Thermodynamic Aspects. Duplex Formation Between Unfolded 30G/GMB and Complementary Sequences. In a first step, we investigated the thermodynamics of association between the loop sequence of the 30G/GMB unfolded state and the complementary sequences.

The pairing process was examined in 100 mM LiCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K.

- (32) Under the present experimental conditions, the apparent first-order rate constant for pairing between 9C and the 30GMB open state should be about $(1 \times 10^6) \times (2 \times 10^{-6}) = 2 \text{ s}^{-1}$. The first number corresponds to an order of magnitude of the bimolecular rate constant for pairing between two complementary oligonucleotides in the presence of 10 mM MgCl₂ (for instance, we measured $k_{24} = 1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ during the present study). The second number corresponds to the 9C concentration during the experiment. The 2 s^{-1} latter value is much larger than the measured rate constants which can then be attributed to the 30GMB opening process. Additionally, kinetics curves did not evolve anymore when increasing the 9C molar excess from 100 to 1000, proving that trapping is not the limiting step in this concentration range.
- (33) Alberti, P.; Mergny, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 1569–1573.
- (34) Bonnet, G.; Krichevsky, O.; Libchaber, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 8602–8606.
- (35) Goddard, N. L.; Bonnet, G.; Krichevsky, O.; Libchaber, A. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 2400–2403.
- (36) Wang, Y.; Patel, D. J. *Structure* **1993**, *1*, 263–282.
- (37) Parkinson, G. N.; Lee, M. P. H.; Neidle, S. *Nature* **2002**, *417*, 876–880.
- (38) Lee, J. Y.; Okumus, B.; Kim, D. S.; Ha, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 18938–18943.
- (39) Phan, A. T.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 15021–15271.

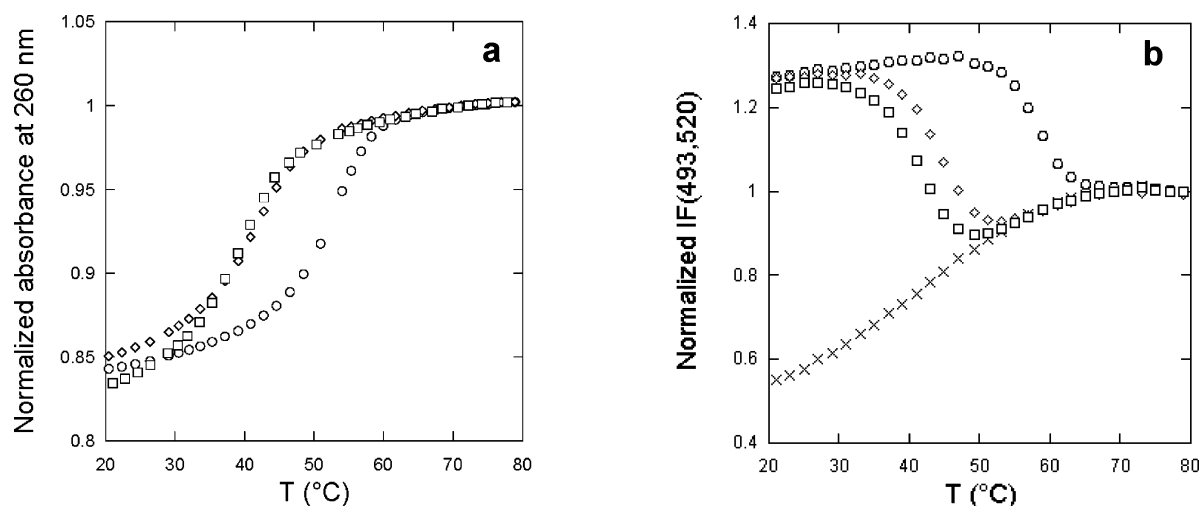


Figure 5. Influence of the mismatches on the duplex stability in Li^+ -containing buffer. (a) Temperature dependence of the absorbance at 260 nm of $2 \mu\text{M}$ 30G in the presence of 1 equiv of 13ACA ($\circ$), 13ACC ($\diamond$), or 13AAA ($\square$). (b) Temperature dependence of the fluorescence emission from 200 nM 30GMB, alone ($\times$) or in the presence of $6 \mu\text{M}$ 13ACA ($\circ$), 13ACC ($\diamond$), or 13AAA ($\square$). $\lambda_{\text{exc}} = 493 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$. Only the cooling curves are shown here for clarity; they were normalized at 80°C by homothetic transformation along the y-axis. Solvent: 100 mM LiCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2.

Table 3. Thermodynamic Data Associated with the Formation of a Duplex between the 30G/30con Sequences and the Complementary Sequences 13ACA/13ACC, as Extracted from UV Melting Experiments^a

sequence	$T_m \pm 1$ ($^\circ\text{C}$)	$\Delta_{24}H^\circ \pm 20\%$ (kJ mol^{-1})	$\Delta_{24}S^\circ \pm 20\%$ ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	$\Delta_{24}G^\circ(298 \text{ K}) \pm 20\%$ (kJ mol^{-1})
30G-13ACA (LiCl)	48	−380	−1070	−61
30G-13ACA (LiCl, MgCl_2)	53	−430	−1200	−72
30G-13ACC (LiCl)	37	−300	−850	−47
30G-13ACC (LiCl, MgCl_2)	41	−290	−800	−52
30con-13ACA (KCl, MgCl_2)	52	−450	−1270	−72
30con-13ACC (KCl, MgCl_2)	42	−330	−920	−56

^a Experimental conditions: $2 \mu\text{M}$ oligonucleotide in 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 containing 100 mM KCl or LiCl, in the presence or in the absence of 10 mM MgCl_2 .

Under such conditions, the quadruplex does not form. Figure 5a displays the temperature dependence of the absorbance at 260 nm of $2 \mu\text{M}$ 30G in the presence of 1 equiv of complementary strand. One observes a transition that is interpreted as the melting of an intermolecular duplex. The duplex stability is at the largest with the matched sequence 13ACA; the corresponding duplex exhibits a melting temperature T_m of 53°C . As expected, the duplexes that involve the complementary mismatched sequences 13ACC and 13AAA are less stable with respective melting temperatures equal to 41°C and 40°C . The analyses of the duplex behavior as a function of the concentration in complementary strands yielded the thermodynamic data displayed in Table 3. We additionally investigated in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 buffer at 298 K the association behavior between the complementary sequences and 30con, a control oligonucleotide with the 30G loop but a mutated stem that cannot form the quadruplex. The results from UV melting experiments with 30con in a potassium medium are in fair agreement with the ones obtained with 30G in a lithium medium (Table 3).

Figure 5b displays the temperature dependence of the fluorescence emission in the lithium medium from 200 nM 30GMB, alone or in the presence of $6 \mu\text{M}$ 13ACA, 13ACC, or 13AAA (at such concentrations, pairing between complementary sequences is complete at 298 K). The fluorescence emission from 30GMB alone increases with temperature. Taking into account that the quantum yield of fluorescein drops when the

temperature is increased, the latter behavior probably reflects an endothermic conformational change that moves away the fluorophore and its quencher. In the presence of complementary sequences, one observes a transition that increases fluorescence emission at low temperatures. This result was anticipated from the larger fluorescein–dabcyl distance in the paired duplex rather than in single-stranded 30GMB. The evolution of the melting temperature suggests that the duplex stability decreases in the order 13ACA > 13ACC > 13AAA, which is in agreement with the above UV–vis absorption data.

Recognition Between Folded 30G/GMB and Complementary Sequences. In a second step, we investigated the thermodynamics of association between the loop sequence of the 30G/GMB folded state and the complementary sequences.

Figure 6 displays the evolution with respect to temperature of the fluorescence emission from a 50 nM 30GMB solution in the presence of $6 \mu\text{M}$ complementary sequences in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 buffer. In view of the slow kinetics of association/dissociation between 30G/GMB and the target sequences (vide infra), the heating and cooling profiles were not perfectly superimposable: only the cooling curves are displayed in Figure 6 for clarity (see also Figure 4Sa for the complete heating/cooling curves).

In the presence of its complementary target 13ACA, the temperature profile of the fluorescence emission exhibits a typical V-shape:¹⁰ the fluorescence emission from fluorescein is large below 40°C , then it reaches a minimum around 55°C ,

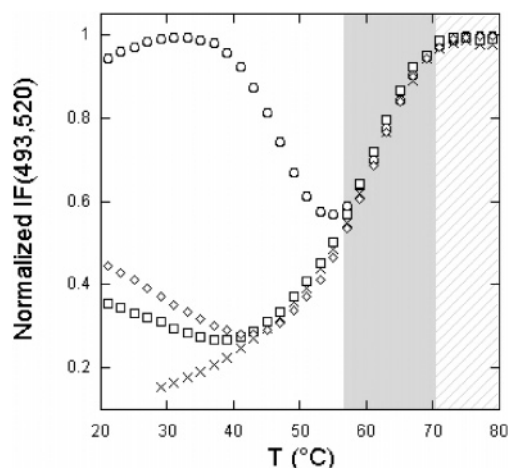


Figure 6. Temperature dependence of the fluorescence emission (normalized by homothetic transformation at 80 °C) from 50 nM 30GMB, alone (○) or in the presence of 6 μ M 13ACA (○), 13ACC (◇), or 13AAA (□). $\lambda_{\text{exc}} = 493$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm. Solvent: 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. Only the cooling curves are shown here for clarity (a slight hysteresis was observed; Figure 4Sa). Target discrimination is possible in the white zone; outside, the duplex is disrupted. In the gray zone, the quadruplex is still partially present, whereas, in the hatched zone, all the nucleotides are single-stranded.

and becomes large again above 70 °C. Such an observation is in line with the following interpretation: (i) above its melting temperature (hatched region), 30GMB is unstructured and dissociated from its target. The distance between fluorescein and dabcyI is large (no fluorescence quenching); (ii) at low enough temperature (here 40 °C or below), 30GMB is opened by pairing with its complementary target. Again, the fluorescein–dabcyI distance is large (no quenching); (iii) at intermediate temperatures, centered around 63 °C (grey region), 30GMB is dissociated from its target and it forms the intramolecular quadruplex structure. The fluorescein–dabcyI distance is reduced, and fluorescence quenching occurs. Note that, above 55 °C, the melting profile of 30 GMB–target mixtures overlap the profile of 30GMB alone.

When the complementary target is replaced by a mismatched sequence, the increase of fluorescence emission at low temperatures is displaced toward lower values. The corresponding shift is more pronounced for 13AAA than for 13ACC. This result is in agreement with the observations that were made with MBs:⁴⁰ a point mutation near the center of the probe-binding domain has a larger effect on molecular beacon dissociation than a mutation near the extremities (13AAA versus 13ACC).

The results that were obtained by UV–vis absorption on 30G are in fair agreement with the observations made on 30GMB. Figure 7a displays the temperature dependence of the absorbance at 295 nm of 2 μ M 30G in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 buffer. In the presence of 1 equiv of the complementary matched sequence 13ACA, the temperature profile of the absorbance again exhibits a V-shape.¹⁰ The absorbance at 295 nm that signals the presence of the quadruplex motif²⁰ is at its largest at intermediate temperatures (around 50 °C) and at its lowest below 40 °C and above 70 °C. This behavior is in line with the following sequence, induced by lowering the temperature: (i) unstructured and dissociated complementary oligonucleotides;

(ii) quadruplex structuration of 30G; (iii) pairing between complementary strands leading to the duplex formation and disappearance of the quadruplex motif. A similar trend is observed when the complementary target is replaced by a mismatched sequence. Nevertheless, the decrease of the absorbance at 295 nm is displaced toward lower temperatures, and it remains incomplete even at the lowest investigated temperatures.

Experiments were also conducted in the absence of Mg^{2+} to study the influence of divalent cations on the G4-MB function. Figure 7b shows the temperature dependence of the absorbance at 295 nm of 2 μ M 30G in 100 mM KCl buffer in the presence of complementary oligonucleotides. With regards to the behavior displayed in Figure 7a, the most noticeable points are (i) the shift of the whole absorbance vs temperature profiles toward lower temperatures and (ii) the destabilization of the duplexes at low temperatures, even in the case of the 13ACA matched sequence for which hybridization remains incomplete.

In relation to using molecular beacons for sequence discrimination of complementary oligonucleotides, the present results show that the G4-MB strategy is attractive. First, the observed behavior is robust. In particular, it does not strongly depend on the presence of the fluorescent terminal labels. This aspect is important because the relevant thermodynamic parameters are significantly affected by labeling. Second, one notices that the temperature range in which the signal arising from G4-MB can be used to differentiate 13ACA from 13ACC and 13AAA is particularly large with regards to that for previously reported MB.^{6,10,40} Eventually, we demonstrated that the temperature window for sequence discrimination can be advantageously tuned by altering the concentration of magnesium cation.

2.2.2. Kinetic Aspects. Beyond the above evoked use of G4-MB fluorescence emission at equilibrium for sequence discrimination, we also evaluated the opportunities provided by the time dependence of the G4-MB fluorescence emission with regards to sequence analysis. In fact, the possibility of retrieving sequence information not only from thermodynamics but also from kinetics would be an advantage for selectivity improvements. In this section, we do not extensively report on the kinetic analysis of the recognition between 30GMB and its complementary targets but only emphasize the main results (the details are provided in Appendix B of the Supporting Information).

Two different mechanisms were envisaged to interpret the kinetic experiments (Figure 1). In the first one, denoted **1-2-4**, the spontaneous opening of 30GMB constitutes a first step which is followed by the bimolecular association of the unfolded sequence with its complementary target. In contrast to previous reports dealing with opening of a rather compact intramolecular quadruplex and subsequent trapping with a complementary oligonucleotide,^{19,31,33,41} the presence of a longer loop in 30GMB led us to examine the possible formation of an intermediate **3** in which the target is partially bound to the folded G4-MB. Thus, we also considered a second mechanism, denoted **1-3-4**, in which the bimolecular reaction of 30GMB with its complementary target gives the adduct **3** that subsequently intramolecularly evolves by beacon opening and duplex formation.⁴⁰ The later second step may be or not be assisted by the sequence recognition with regards to the spontaneous opening of 30GMB. We performed several experiments to discriminate between the two preceding mechanisms. The whole collection of exper-

(40) Tsourkas, A.; Behlke, M. A.; Rose, S. D.; Bao, G. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 1319–1330.

(41) Phan, A. T.; Mergny, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4618–4625.

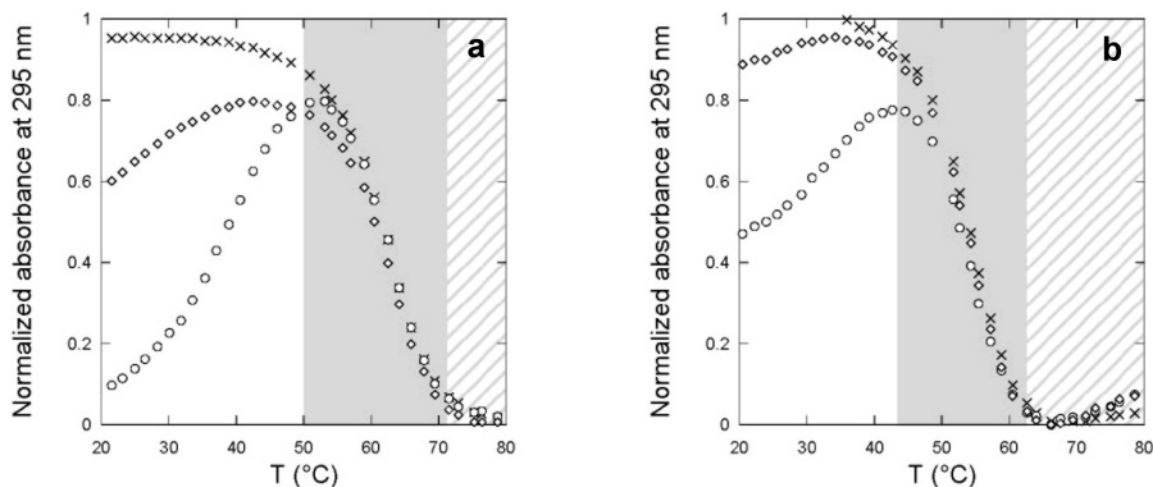


Figure 7. Temperature dependence of the absorbance at 295 nm (normalized between 0 and 1 for the lowest and largest absorbances, respectively) of 2 μ M 30G alone ($\times$) or in the presence of 1 equiv of 13ACA ($\circ$) or 13ACC ($\diamond$). Solvent: 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 in the presence (a) or in the absence (b) of 10 mM MgCl_2 . Only the cooling curves are shown here for clarity (a slight hysteresis was observed; Figure 4Sb). Target discrimination is possible in the white zone; outside, the duplex is disrupted. In the gray zone, the quadruplex is still present, whereas, in the hatched zone, all the nucleotides are single-stranded.

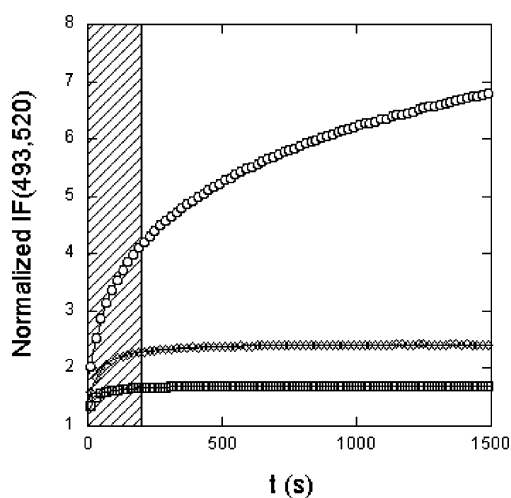


Figure 8. Change in the fluorescence emission from 200 nM 30GMB with respect to time after sudden addition of 1 equiv of 13ACA ($\circ$), 13ACC ($\diamond$), or 13AAA ($\square$) at 298 K. $\lambda_{\text{exc}} = 493$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm. Solvent: 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. The curves were normalized by dividing the instantaneous fluorescence intensity by the initial fluorescence emission. Sequence discrimination can rely on kinetics beyond the times located in the hatched zone.

imental observations support the **1-3-4** mechanism to be effective for the matched 13ACA sequence and likely for the mismatched 13ACC and 13AAA ones (see Supporting Information for a detailed discussion). The main conclusions are as follows: (i) over micromolar concentrations in complementary strand, the first step **1-3** is fast with regards to the second one **3-4**. In relation to the absence of the marked dependence of the rate constants of **3-4** on the target sequence, it is **1-3** that conveys the sequence selectivity; (ii) under the present experimental conditions, the realization of the second step **3-4** is mainly observed beyond a few seconds during the whole **1-4** conversion; (iii) the zipping process arising from the duplex formation does not act as a strong driving force for quadruplex disruption.

Figure 8 displays the time evolution of the fluorescence emission from 200 nM 30GMB after addition of 1 equiv of 13ACA, 13ACC, or 13AAA in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 buffer at 298 K. As anticipated from the preceding thermo-

dynamic investigation, the fluorescence emission increases as a function of time. More interestingly, the matched sequence 13ACA is the only complementary one for which we could detect an evolution of the fluorescence signal on a long time scale (beyond 200 s), this kinetic drift being under the control of step **3-4**. The preceding observation is significant in relation to using G4-MBs for probing single-strands: sequence analysis here may rely on kinetics. Not only the final value of the fluorescence emission but also its time evolution can discriminate sequences; it exists as a kinetic regime in which a significant evolution of the fluorescence emission is exclusively observed with the matched sequence at the predictable G4-MB opening time scale.

3. Discussion

This study demonstrates that one can obtain efficient molecular beacons that incorporate a G-quadruplex in their stem. Beyond the latter result, the present discussion aims at evaluating the possible advantages and drawbacks associated with choosing a G4 motif instead of a more classical Watson–Crick duplex to build the beacon stem. In relation with thermodynamic aspects, we successively consider the efficiency for sequence discrimination and the design step. Then, we briefly discuss the kinetic aspects.

Sequence discrimination by a beacon usually means obtaining a sequence-specific response after addition of a complementary strand: for instance, one looks for pairing with a perfectly matched oligonucleotide P and no association with a single base mismatched sequence M. In relation with the evaluation of the beacon structure for improved recognition efficiency, two aspects here have to be considered. The first one explicitly deals with recognition selectivity: does a particular beacon design facilitate sequence discrimination at thermodynamic equilibrium by maximizing the ratio K_P/K_M of the association constants between the closed beacon and the oligonucleotides to be probed? When the recognition sequence is located in the beacon loop, one can demonstrate that K_P/K_M only depends on the difference between the Gibbs free energy of association of the unfolded beacon with P and the Gibbs free energy of association of the unfolded beacon with M. In fact, the detailed structure

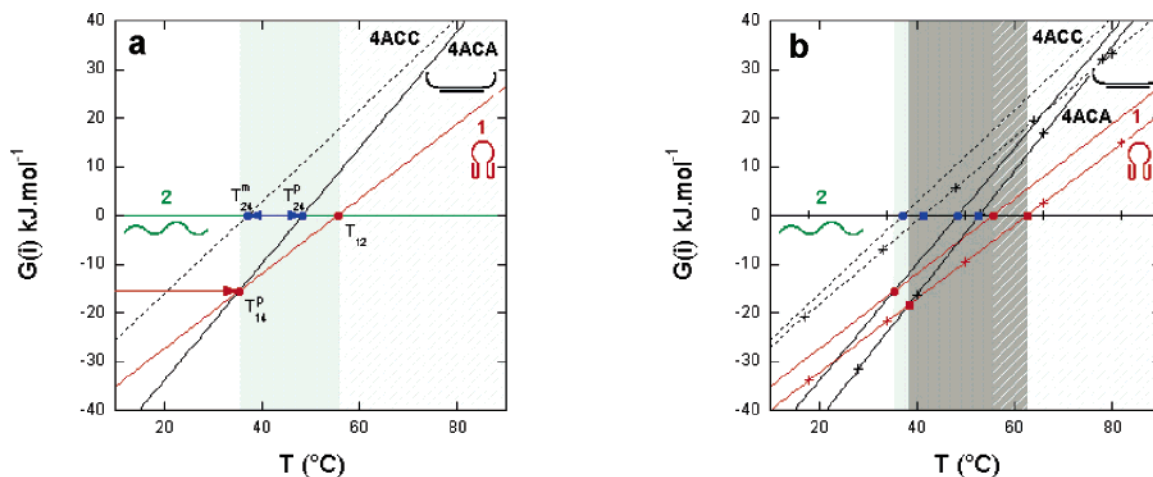


Figure 9. (a) Dependence on temperature of the Gibbs free energy $G(i)$ of the three 30G states: folded (1; red solid line), unfolded (2; horizontal green solid line), and paired with the complementary target (4; black solid line for 13ACA and black dotted line for 13ACC). 30G and its complementary target, 13ACA or 13ACC, are at a $C_0 = 2 \mu\text{M}$ total concentration per strand in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. T_{12} , T_{P14} , T_{P24} , and T_{M24} denote the temperatures, respectively, associated with the 30G melting, with the conversion of the folded state 1 to the duplex state 4 for 30G + 13ACA, and with the melting of the central duplexes formed by pairing of 30G with 13ACA and with 13ACC, respectively. In the absence of 30G, sequence discrimination can be envisaged in the $[T_{M24}; T_{P24}]$ temperature interval (blue arrow). The corresponding range is considerably enlarged when use is made of 30G that adopts its folded state in the gray zone. Sequence discrimination is now possible below T_{P14} , in the white temperature zone (red arrow). (b) Effect of Mg^{2+} . Dependence on temperature of the Gibbs free energy $G(i)$ of the three 30G states: folded (1; red solid line), unfolded (2; horizontal green solid line), and paired with the complementary target (4; black solid line for 13ACA and black dotted line for 13ACC). 30G and its complementary target, 13ACA or 13ACC, are at a $C_0 = 2 \mu\text{M}$ total concentration per strand in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2, in the absence (no marker on the lines) and in the presence (crosses on the lines) of 10 mM MgCl_2 . The temperature range for sequence discrimination is enlarged by adding magnesium cations. See Experimental Section.

of the folded probe does not enter into consideration, and none should bring any distinct advantage. The second aspect deals with the Gibbs free energy associated with the beacon opening that acts as an adjustable penalty which displaces, and increases, the temperature range for mismatch discrimination.^{9,10,40} From an experimental point of view, it is desirable to enlarge the latter range. In relation to the present work, the question is whether quadruplex-based beacons bring any new opportunity with regards to traditional MBs.

Figure 9a displays the dependence on temperature of the Gibbs free energy $G(i)$ of the three states 1, 2, and 4 for $2 \mu\text{M}$ 30G and its complementary target, 13ACA or 13ACC, at $2 \mu\text{M}$ concentration in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2.¹⁰ At a given temperature, the most stable state is associated with the lowest value of the Gibbs free energy. State 2 is the most stable down to the melting temperature T_{12} of the quadruplex motif. Then, in the case of 30G+13ACA, state 1 is the most stable between T_{12} and T_{P14} below which the duplex 4 forms. The same succession is anticipated for 30G+13ACC, but the duplex cannot considerably form, even at the lowest temperatures: T_{M24} lies below the covered temperature range. In relation to using 30G for discriminating the sequence of complementary oligonucleotides, the low slope of the $G(1)$ line is responsible for two main advantages of MBs: discrimination can be made at lower temperatures and in a broader temperature range than if it would be directly based on duplex formation 2-4.

At the considered $2 \mu\text{M}$ concentration, eqs 7 and 9 (Experimental Section) show that the $G(i)$ positive slopes are essentially governed by the opposites of the negative standard entropies, $\Delta_{21}S^\circ$ and $\Delta_{24}S^\circ$, associated with the formation of the quadruplex and of the duplex, respectively. At the same time, the intercepts between the $G(i)$ lines and the y-axis are governed by the corresponding negative enthalpies of reactions $\Delta_{21}H^\circ$ and $\Delta_{24}H^\circ$.

Thus, the efficiency of 30G/GMB results from the relations $\Delta_{24}H^\circ < \Delta_{21}H^\circ$ and $\Delta_{24}S^\circ < \Delta_{21}S^\circ$. In fact, the latter inequalities are anticipated for most structured probes devoted to yield functional MBs. Indeed, $\Delta_{24}H^\circ < \Delta_{21}H^\circ$ is required to enthalpically drive the conversion from state 1 to state 4 which is entropically disfavored. Moreover, the reaction 2-1 is an isomerization, whereas reaction 2-4 reduces by one the number of reactants; one correspondingly expects $\Delta_{24}S^\circ < \Delta_{21}S^\circ$. Taking into account that $\Delta_{24}H^\circ$ and $\Delta_{24}S^\circ$ should be essentially independent of the structure of the folded state of the beacon, the discrimination efficiency of a particular kind of molecular beacon will only depend on the relationship $\Delta_{21}H^\circ(\Delta_{21}S^\circ)$ ²² that is characteristic of its stem structure.

Consequently, we compared the present G4-MB with traditional MB exhibiting similar melting temperatures by establishing the corresponding relationship $\Delta_{21}H^\circ(\Delta_{21}S^\circ)$ for different loop lengths. In the absence of extensive experimental investigations, we relied on theoretical predictions based on the Mfold software⁴² to get the values of $\Delta_{21}H^\circ$ and $\Delta_{21}S^\circ$ in the case of duplex MB. Figure 9S displays the results. $\Delta_{21}H^\circ$ is linearly dependent on $\Delta_{21}S^\circ$ in the range of investigated stem and loop lengths. In addition, the G4-MBs do not seem to exhibit a behavior that would specifically depart from the one of traditional MBs. Its better efficiency in terms of temperature range for discrimination results from large values of $\Delta_{21}H^\circ$ and $\Delta_{21}S^\circ$; however, the folding simulations indicate that one could probably design as efficient duplex MB by working with longer stems. Here one should notice that the number of bases involved in the stem would then be similar in G4-MB (18) and in MB (16–20). In principle, such large numbers could be a disadvantage because long sequences may participate in nonspecific

(42) Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406–3415. The free energies used are from the laboratory of John SantaLucia Jr. (for instance, see: SantaLucia, J. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 1460–1465).

target binding. Nevertheless, G4-MB could be more favorable from the latter point of view. Indeed, the bases involved in the lateral loops may be advantageously replaced by a non-nucleotidic linker, therefore avoiding complementarity to undesired sequences.⁴³ One may also use inversion probes, as recently proposed for classical beacons.⁴⁴

Although G4-MBs may not significantly be different from MBs as evidenced by the $\Delta_{21}H^\circ(\Delta_{21}S^\circ)$ relationship, they exhibit some advantages for the design step. Indeed, as shown in Figure 9a, an efficient molecular beacon requires setting $T_{12} > T_{14}$. In the case of traditional MBs, one is left to play with the lengths of the stem and of the loop. In contrast, to reach the appropriate regime with G4-MB, one can additionally play with the concentration of cations, monovalent as well as divalent. This point is illustrated in Figure 9b that displays the evolution of the phase diagram of Figure 9a upon addition of 10 mM $MgCl_2$. In fact, the presence of Mg^{2+} affects $\Delta_{24}H^\circ$ and $\Delta_{24}S^\circ$ much more than it alters $\Delta_{21}H^\circ$ and $\Delta_{21}S^\circ$. As a consequence, one observes here a differential effect leading to an increase of the temperature range for sequence discrimination at a constant sequence of the molecular beacon.

The secondary structure of molecular beacons imposes some kinetic penalty with regard to recognition involving unstructured probes: complex formation proceeds slower, and MB-target association rate constants are generally lower than those reported for hybridization between unstructured probes.^{6,40,45} Indeed, an energy barrier must be overcome to open the stem. Opening rate constants that were measured in the present series of G4-MBs are rather small, and the recognition process will be consequently "slow". Such a feature could be a drawback for some applications. At the same time, this study suggests that sequence discrimination could be performed by analyzing the kinetics of beacon opening and not too fast a signal evolution could be here an advantage.

4. Conclusion

G4-MBs provide a versatile strategy for designing efficient molecular beacons. The G4 platform is compatible with building functional MBs that contain long central loops to ensure selective targeting. In the presence of a complementary sequence, the central loop hybridizes and forms a duplex that causes opening of the quadruplex stem, yielding an important change in fluorescence emission. The presence of a single base mismatch hinders this opening process, demonstrating that G4-MB can be efficiently used for oligonucleotide discrimination. With regard to MB containing stems based on a Watson–Crick duplex, G4-MBs offer unprecedented, easy, and predictable new degrees of freedom to tune the experimental conditions for oligonucleotide probing. As an example, the concentration in monovalent as well as divalent cations can be modified to shift the large temperature range in which sequence discrimination can be performed. Eventually, G4-MBs offer an interesting route to building molecular beacons that rely on both thermodynamics and kinetics to perform the discrimination of targeted oligonucleotides.

Beyond the preceding analytical issue, the present study extends the sequence repertoire of quadruplex formation and

their implication in biological processes. Furthermore, in the scope of the formation of such structure in vivo, the opening mechanism either by competition or by structure invasion can also be of biological interest, in particular at the telomeres.⁴⁶

5. Experimental Section

Oligonucleotides and Solutions. The sequences of the oligodeoxynucleotides that were used during the present study are given in Table 1. Oligodeoxynucleotides were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium) or IBA (Göttingen, Germany) on the 0.2 or 1 μ mol scale. They were subsequently purified by HPLC, and the doubly labeled 30GMB sequence (fluorescein in 5' and dabcy1 in 3') was additionally characterized by mass spectrometry. The solution concentrations were estimated by UV absorption using published sequence-dependent absorption coefficients.⁴⁷

The lithium cacodylate buffer was prepared by neutralizing an acid cacodylic solution with lithium hydroxide.

Absorption and Emission Spectra. UV–vis absorption spectra were recorded in 0.2 or 1 cm path length quartz cuvettes on a Kontron Uvikon 940 spectrophotometer thermostated with an external ThermoNeslab RTE111 or ThermoHaake Phoenix C25P1 waterbath.

CD spectra were recorded on a Jasco J810 spectropolarimeter equipped with a Peltier effect-based thermostated cell holder (Jasco France, Nantes, France). A 2 mm optical path quartz cell and an instrument scanning speed of 500 nm/min with a 1 s response time were used for measurements. Each measurement is the average of 6 scans between 220 and 330 nm after an equilibration time of 900 s at each temperature. Spectra were baseline-corrected by subtracting the ellipticity contribution from the buffer and the cell recorded at 20 °C.

The steady-state fluorescence emission spectra were obtained on a Spex Fluoromax3 instrument (Jobin-Yvon Horiba, Chilly-Mazarin, France) thermostated with a ThermoNeslab RTE7 waterbath. Fluorescence emission spectra were collected using a bandwidth of 5 nm and 0.2×1 cm² quartz cuvettes containing 600 μ L of solution.

Melting Experiments and Thermal Difference Spectra. Absorbance at different wavelengths (245, 260, and/or 295 nm) and fluorescence emission spectra were recorded as a function of temperature that was increased/decreased at a rate of 0.2 °C/min. Melting experiments were typically performed at a concentration of 2 μ M per strand. The intramolecular formation of the G-quadruplex beacons was evaluated in the 1–25 μ M range.

Thermal difference spectra (TDS) were obtained by the difference between the absorbance spectra from unfolded and folded oligonucleotides that were respectively recorded much above and below its melting temperature (T_m).²⁰

Thermodynamic Analysis. Thermal curves were analyzed with a two-state model²¹ to extract the standard enthalpy $\Delta_r H^\circ$ and the standard entropy $\Delta_r S^\circ$ of the considered process r under the conditions of Ellingham approximation. In the case of G4-MB, we used

$$\text{G4-MB (open)} = \text{G4-MB (closed)} \quad (1)$$

$$T_m = \frac{\Delta_r H^\circ}{\Delta_r S^\circ} \quad (2)$$

$$K(T) = \frac{1 - \alpha(T)}{\alpha(T)} \quad (3)$$

and in the case of bimolecular associations between complementary oligonucleotides at identical initial concentration per strand C_0 , we used

(43) Risitano, A.; Fox, K. R. *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, 2598–2606.

(44) Browne, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 1989–1994.

(45) Kuhn, H.; Demidov, V. V.; Coull, J. M.; Fiandaca, M. J.; Gildea, B. D.; Frank Kamenetskii, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1097–1103.

(46) Zaug, A. J.; Podell, E. R.; Cech, T. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, 102, 10864–10869.

(47) Cantor, C. R.; Warshaw, M. M.; Shapiro, H. *Biopolymers* **1970**, 9, 1059–1077.

$$S + S' = SS' \quad (4)$$

$$T_m = \frac{\Delta_r H^\circ}{\Delta_r S^\circ + R \ln(C_0/2)} \quad (5)$$

$$K(T) = \frac{1 - \alpha(T)}{[\alpha(T)]^2 C_0} \quad (6)$$

In the latter equations, T_m designates the temperature at which the exchanging states are in equal amounts, R is the gas constant, and α measures the proportion of the open (G4-MB) or dissociated (association between complementary oligonucleotides) state.

The experimental data were processed with the Kaleidagraph 3.5 software to extract $\Delta_r H^\circ$ and $\Delta_r S^\circ$ from the Van't Hoff equation: $\ln K(T) = -\Delta_r H^\circ/RT + \Delta_r S^\circ/R$. Then, we wrote $\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T\Delta_r S^\circ$ to derive the corresponding value of the standard Gibbs free energy.

To extract thermodynamic data, we only analyzed melting profiles that displayed a reversible behavior at the chosen temperature gradient.

Phase Diagrams. The Gibbs free energies of the three states **1**, **2**, and **4** shown in Figure 1 were calculated by assuming the aqueous solutions to be ideal and by taking the same concentration $C_0/2$ for all the different species (the folded quadruplex, the unfolded one, the free complementary target, and the duplex). We additionally considered $G(2) = 0$ at any temperature.¹⁰ Then, the final expressions of the Gibbs free energies are easily derived:

$$G(1) = \Delta_{21}H^\circ - T\Delta_{21}S^\circ \quad (7)$$

$$G(2) = 0 \quad (8)$$

$$G(4) = \Delta_{24}H^\circ - \left(\Delta_{24}S^\circ + R \ln \frac{C_0}{2} \right) T \quad (9)$$

The phase diagrams that are shown in Figure 9a and 9b were drawn by using corrected values of the 30G thermodynamic data that were collected during the present study. In view of the large incertitudes, we corrected the experimentally derived enthalpies and entropies of reaction, $\Delta_{21}H^\circ(\text{exp})$ and $\Delta_{21}S^\circ(\text{exp})$, that are displayed in Tables 2 and 3 to account for the more precisely measured values of the melting temperatures $T_m(\text{exp})$. In the case of the reaction **2-1**, we adopted $\Delta_{21}H^\circ(\text{corr}) = T_m(\text{exp})\Delta_{21}S^\circ(\text{exp})$ and $\Delta_{21}S^\circ(\text{corr}) = \Delta_{21}S^\circ(\text{exp})$, whereas, for the reaction **2-4**, we wrote $\Delta_{24}H^\circ(\text{corr}) = (1 + x)\Delta_{24}H^\circ(\text{exp})$ and $\Delta_{24}S^\circ(\text{corr}) = (1 + x)\Delta_{24}S^\circ(\text{exp})$ and used eq 5 and $T_m(\text{exp})$ to extract the x value. The corresponding correction was always lower than 7%, which is smaller than the generally accepted experimental incertitudes on enthalpies and entropies.

Kinetic Experiments. The kinetic models and analyses are reported in Appendix B of the Supporting Information. The experimental data were fitted using the Kaleidagraph 3.5 software.

For the slowest kinetics, we relied on fast addition of a reactant in the cuvette under agitation. We correspondingly introduced a time delay t_0 in the fitting laws by replacing t by $(t - t_0)$. The fits typically provided $t_0 \approx 2-3$ s. Such values are in line with the time required for signal stabilization upon dilution of fluorescent samples. For the fastest kinetics, we performed stop-flow experiments on a Spex Fluoromax3 fluorimeter that was equipped with an Applied Photophysics RX2000 rapid kinetics stopped-flow accessory. We used 5-nm-wide excitation and emission slits. The setup requires 120 μL of solution in each reactant for a run. To reduce the noise, data acquisition frequencies were set between 4 and 1 Hz (corresponding to integration times in the 125–500 ms range).

Capillary Electrophoresis. Electrophoretic measurements were performed with a PACE/MDQ (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA)

capillary electrophoresis system. This instrument automatically realizes all the steps of the analytical protocols, including capillary conditioning, sample introduction, voltage application, and diode array detection (20 cm from the inlet). Migrations were performed in 50 μm I.D. $\times$ 30 cm hydroxypropyl cellulose coated capillaries. New silica capillaries (Polymicro, Phoenix, AZ) were coated using previously described procedures.⁴⁸ The running voltage was 10, 12.5, or 15 kV according to these cases. The temperature of the capillary cartridge was set at 20 $^\circ\text{C}$. Samples were introduced hydrodynamically by applying a positive pressure of 0.2 psi for 5 s (c.a. 4 nL) at the inlet end of the capillary. The DNA samples were detected by UV absorbance at 260 nm. Data were processed with the 32 Karat software. Between runs, capillaries were rinsed for 1 min at 20 psi with the running buffer: 220 mM K (or Li) Hepes pH 7.45 (110 mM ionic strength) or 220 mM K (or Li) Hepes pH 7.45 containing 10 mM Mg^{2+} (125 mM ionic strength). All the reagents were obtained from Sigma (Saint Louis, MO) and were of analytical grade.

Acknowledgment. We thank M. Zuker (Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, NY), A. De Cian, L. Guittat, J. Gros, B. Saccà, and T. Garestier (MNH, Paris) for helpful discussions; J. Garel (ENS, Paris) for performing initial kinetic experiments; and C. Tribet (ESPCI, Paris) for giving access to his capillary electrophoresis system. This work was supported by ARC (No. 3365) and EU FP6 (LSHC-CT-2004-502943) MolCancerMed grants (to J.-L.M.); ACI 2003 “Cargos Moléculaires” and ACI-NMAC 2003 “Puces cinétiques” grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (to L.J., C.G., L.L., A.B., and J.-L.M.); and a Ministère de la Recherche fellowship (to A.E.T.)

Supporting Information Available: Change in the absorbance (Figure 1Sa) and in the ellipticity (Figure 1Sb) with respect to temperature of 30G solutions in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. Change in the absorbance at 295 nm with respect to temperature of 30G solutions at different concentrations in 100 mM KCl, 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 (Figure 2S). Influence of the loop length on the enthalpic and entropic contributions to the Gibbs free energy associated with the formation of the quadruplex motif (Figure 3S). Temperature dependence of the 30GMB fluorescence emission or of the 30G absorbance in the presence of 13ACA, 13ACC, or 13AAA in 100 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 (Figure 4S). Free energy relationships $\Delta_{21}H^\circ$ ($\Delta_{21}S^\circ$) for G4-MB and traditional molecular beacons (Figure 12S). Thermodynamic data associated with the intramolecular formation of a three quartet quadruplex motif for the nonlabeled oligonucleotide sequences (Table 1S). Appendix A: evaluation of the relevance of the thermodynamic parameters extracted from analysis of thermal denaturation curves with a two-level model. Appendix B: detailed analysis of the association kinetics between 30GMB and its complementary targets (including Figures 5S–8S and Tables 2S–4S). Appendix C: electrophoretic measurements (including Figures 9S–11S). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

JA0608040

(48) Shen, Y.; Xiang, F.; Veenstra, T. D.; Fung, E. N.; Smith, R. D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5348–5353.

Chapitre 5

Article 1 : *Supporting information*

A. Bourdoncle,^{1,2} A. Estévez Torres,¹ C. Gosse,^{3,*} L. Lacroix,²
P. Vekhoff,² T. Le Saux,¹ L. Jullien,^{1,*} J.-L. Mergny^{2,*}

1) Département de Chimie, Ecole Normale Supérieure, 24 rue Lhomond 75005, Paris, France ; 2)
Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire, 43 rue Cuvier, 75005, France ; 3)
Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460
Marcoussis, France

Supporting Information

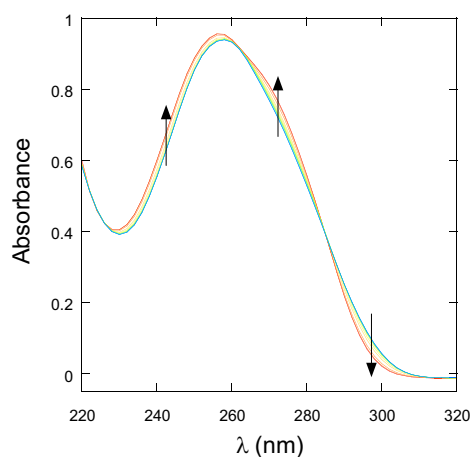
- Supplementary Materials
- Supplementary Figures
 - Change in the absorbance (Figure 1Sa) and in the ellipticity (Figure 1Sb) with respect to temperature of 30G solutions in 100 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM lithium cacodylate pH 7.2,
 - Change in the absorbance at 295 nm with respect to temperature of 30G solutions at different concentrations in 100 mM KCl 10 mM lithium cacodylate pH 7.2 (Figure 2S),
 - Influence of the loop length on the enthalpic and entropic contributions to the Gibbs free energy associated to the formation of the quadruplex motif (Figure 3S),
 - Temperature dependence of the 30GMB fluorescence emission or of the 30G absorbance in the presence of 13ACA, 13ACC, or 13AAA in 100 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 (Figure 4S),
 - Free energy relationships $\Delta_{21}H^\circ$ ($\Delta_{21}S^\circ$) for G4-MB and traditional molecular beacons (Figure 12S).
- Supplementary Tables.
 - Thermodynamic data associated to the intramolecular formation of a three quartet quadruplex motif for the nonlabeled oligonucleotide sequences (Table 1S).
- Appendices :
 - Appendix A : Evaluation of the relevance of the thermodynamic parameters extracted from analysis of thermal curves with a two-level model when more than one closed G4-MB is formed ;

- Appendix B : Detailed analysis of the kinetics of association between 30GMB and its complementary targets ;
- Appendix C : Electrophoretic measurements.

Supplementary Materials

Supplementary Figures

a)



b)

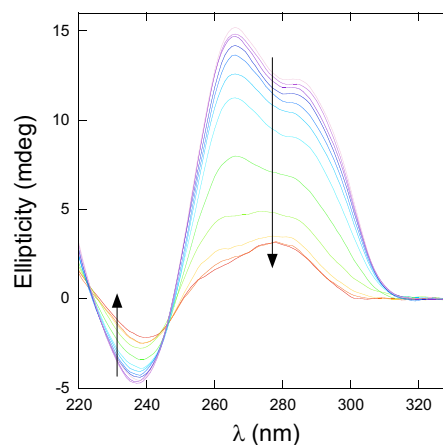


Figure 1S. Change in the absorbance (**a**) and in the ellipticity (**b**) upon increasing temperature (from blue to red) of 30G solutions in 100 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM lithium cacodylate pH 7.2. **a** : 3 μM in a cuvette with a 10 mm light path length, $T(^{\circ}\text{C}) = 75.0, 69.8, 64.6, 59.2, 55.6, 50.2, 44.8, 39.4, 34.1, 30.6, 25.3, 23.9$; **b** : 15 μM in a cuvette with a 2 mm light path length, $T(^{\circ}\text{C}) = 84, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 25$. At low temperature, the spectrum compares well with reported results for G4 [1]. Despite the solvent expansion with the temperature change, one notices the presence of sharp isosbestic (1Sa) or isoelliptic (1Sb) points in both Figures.

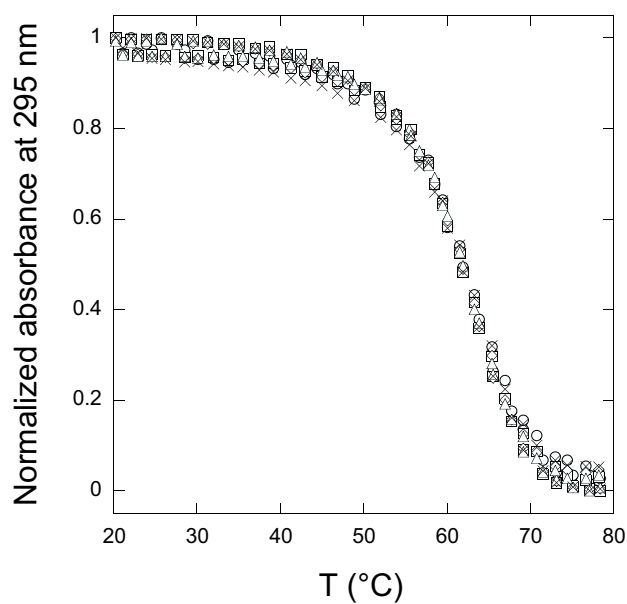


Figure 2S. Change in the absorbance at 295 nm with respect to temperature of 30G solutions at different strand concentrations in 100 mM KCl 10 mM lithium cacodylate pH 7.2. 30 G concentrations : 1 (circles), 2 (squares), 5 (diamonds), 10 (triangles) and 25 (crosses) μM . Maximum and minimum values were normalized to 1 and 0 for comparison.

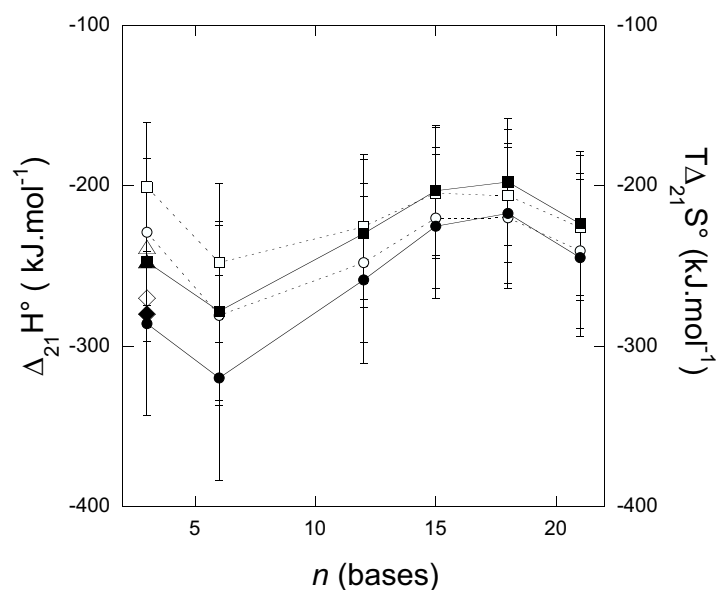
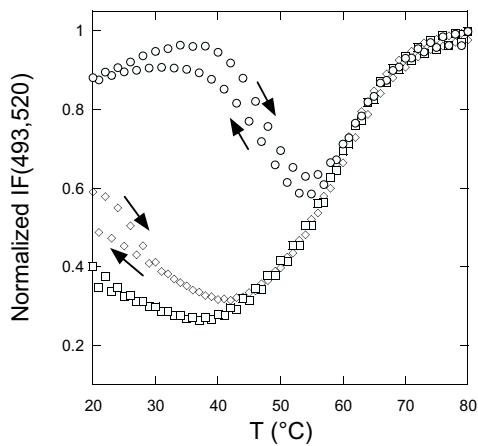


Figure 3S. Influence of the loop length on the enthalpic $\Delta_{21}H^0$ (circles) and entropic $T\Delta_{21}S^0$ (squares) contributions to the Gibbs free energy $\Delta_{21}G^0$ associated to the formation of the quadruplex motif in the presence (filled markers) or in the absence (empty markers) of 10 mM MgCl_2 at 298 K. The corresponding data for the 21tel sequence are displayed as diamonds for the enthalpic contribution and as triangles for the entropic contribution (filled markers : 10 mM MgCl_2 ; empty markers : no MgCl_2).

a)



b)

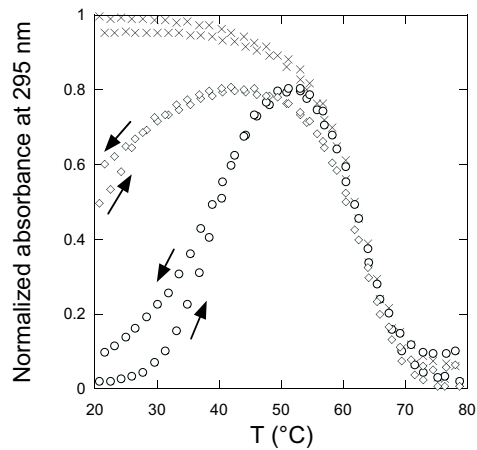


Figure 4S. a : Temperature dependence of the fluorescence emission (normalized by homothetic transformation at 80°C) from 50 nM 30GMB in the presence of 6 μ M 13ACA (circles), 13ACC (diamonds), and 13AAA (squares). λ_{exc} = 493 nm; λ_{em} = 520 nm; **b :** Temperature dependence of the absorbance at 295 nm (normalized at 80°C) of 2 μ M 30G alone (crosses) or in the presence of 1 equivalent of 13ACA (circles) or 13ACC (diamonds). Solvent : 100 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. Both cooling and heating curves are shown ; the arrows indicate the directions of the temperature change.

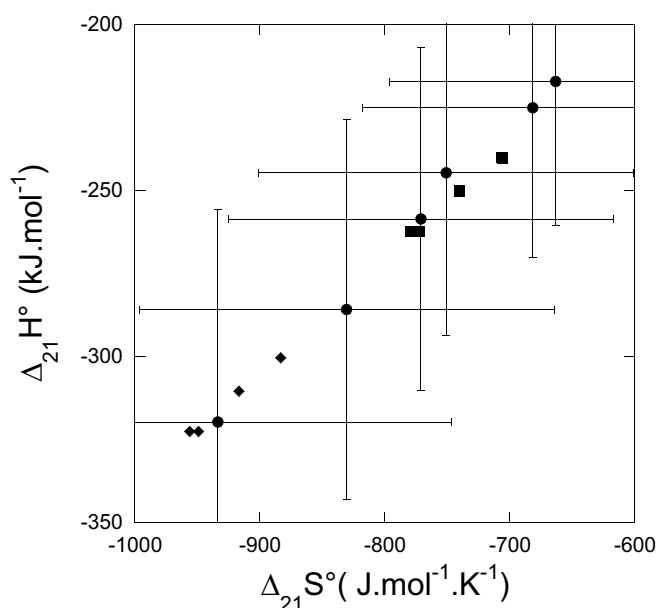


Figure 12S. Free energy relationships $\Delta_{21}H^\circ$ ($\Delta_{21}S^\circ$) for G4-MB and traditional Watson-Crick molecular beacons. G4-MB data (disks) are extracted from Table 1S (solvent : 100 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2). The corresponding data for the traditional molecular beacons were calculated by using the Mfold program [2] with 100 mM Na^+ 10 mM Mg^{2+} . Two stems : GACATGAC-loop-GTCATGTC (squares) and GATCATGTAC-loop-GTACATGATC (diamonds), and four loop sequences : TGT, TTTGTT, CTTTGTTT, and TCCTTTGTTTGT were analyzed. One should note that in order to generate traditional MB with comparable T_m and ($\Delta_{21}H^\circ, \Delta_{21}S^\circ$) values in the range of the one of the G4-MB, relative long stem were required. In the case of more classical traditional MB with 5-7 bp stem and with a T_m comparable to the one of the G4-MB, ($\Delta_{21}H^\circ, \Delta_{21}S^\circ$) values were lower in absolute value.

Supplementary Tables

Table 1S. Thermodynamic data associated to the intramolecular formation of a three quartet quadruplex motif for the nonlabeled oligonucleotide sequences displayed in Table 1. Data associated to the human telomeric motif 21tel are also displayed as references. Experimental conditions : 2 μ M oligonucleotide in 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 containing 100 mM KCl in the presence or in the absence of 10 mM MgCl_2 .

Sequence	n	$T_m \pm 1$ (°C)	$\Delta_{21}H^\circ \pm 20\%$ (kJ.mol ⁻¹)	$\Delta_{21}S^\circ \pm 20\%$ (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	$\Delta_{21}G^\circ(298\text{ K}) \pm 20\%$ (kJ.mol ⁻¹)
39G (KCl)	21	44	-240	-760	-14
39G (KCl,MgCl ₂)	21	53.5	-245	-750	-21
36G (KCl)	18	45	-220	-690	-14
36G (KCl,MgCl ₂)	18	55	-215	-665	-20
33G (KCl)	15	48	-220	-685	-13
33G (KCl,MgCl ₂)	15	58	-225	-680	-22
30G (KCl)	12	55	-250	-770	-22
30G (KCl,MgCl ₂)	12	63	-260	-760	-29
24G (KCl)	6	65	-280	-830	-33
24G (KCl,MgCl ₂)	6	70	-320	-935	-42
21G (KCl)	3	67	-230	-675	-28
21G (KCl,MgCl ₂)	3	72	-285	-830	-38
21tel (KCl)	3	67	-270	-800	-33
21tel (KCl,MgCl ₂)	3	67	-280	-830	-35

Appendix A : Evaluation of the relevance of the thermodynamic parameters extracted from analysis of thermal curves with a two-level model when more than one closed G4-MB is formed

In tandem with capillary electrophoresis, the kinetic experiments associated to 30GMB folding suggested that several conformers coexist in the folded state (see Figure 4, Main Text and Figure 9–11S). At the same time, we used a two-level model to extract from the UV melting experiments the values of the thermodynamic parameters shown in Table 2. Thus, one has to evaluate the relevance of the extracted apparent thermodynamic parameters in relation to the true ones of the different folded conformers.

The model

To address the later issue, we consider that two folded states, **1** and **1'**, coexist with the unfolded state **2** during the melting experiments. Instead of only one folding reaction, denoted (1) in the Main Text, two folding processes have now to be taken into account :



In reference to the notations used in the Main Text, we designate by $\Delta_{21}H^0$, $\Delta_{21}S^0$, and $\Delta_{21}G^0$ the standard enthalpy, entropy, and Gibbs free energy associated to the reaction (5.1), $\Delta_{21'}H^0$, $\Delta_{21'}S^0$, and $\Delta_{21'}G^0$ the standard enthalpy, entropy, and Gibbs free energy associated to the reaction (5.2). $\Delta_{21}H^0$, $\Delta_{21}S^0$, $\Delta_{21'}H^0$, and $\Delta_{21'}S^0$ are assumed to be constant in the considered temperature range.

We introduce α to measure at chemical equilibrium the proportion of **2** in the **1+1'+2** mixture and α' to measure at chemical equilibrium the relative proportion of **1** in the mixture of folded conformers **1+1'** :

$$\alpha(T) = \frac{\alpha'(T)}{\alpha'(T) + K_{21}(T)} = \frac{\frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta_{11'}G^0}{RT}\right)}}{\frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta_{11'}G^0}{RT}\right)} + \exp\left(-\frac{\Delta_{21}G^0}{RT}\right)} \quad (5.3)$$

where we introduce $\Delta_{11'}H^0$, $\Delta_{11'}S^0$, and $\Delta_{11'}G^0$ to respectively designate the standard enthalpy, entropy, and Gibbs free energy associated to the reaction (5.4) :



In the analysis of a melting experiment relying on a two-level model (**2=1**), the experimental melting curve is appropriately normalized to access $\alpha(T)$ that is subsequently used to calculate $K_{21}(T) = \frac{1-\alpha(T)}{\alpha(T)}$. Then, the van't Hoff analysis of $K_{21}(T)$ according to $\ln K_{21}(T) = -\frac{\Delta_{21}H^0}{RT} + \frac{\Delta_{21}S^0}{R}$ yields the values of $\Delta_{21}H^0$ and $\Delta_{21}S^0$.

When two conformers are present, Eq.(5.3) provides :

$$\ln K_{21}^{app}(T) = -\frac{\Delta_{21}G^0}{RT} + \ln \left[1 + \exp\left(-\frac{\Delta_{11'}G^0}{RT}\right) \right] \quad (5.5)$$

where the superscript *app* was introduced to precise that the two-level model is used to analyze the behavior of the three-component system.

We introduce the respective melting temperatures of **1** and **1'** : $T_{m,1} = \frac{\Delta_{21}H^0}{\Delta_{21}S^0}$ and $T_{m,1'} = \frac{\Delta_{21'}H^0}{\Delta_{21'}S^0}$. We evaluate the deviation in the standard entropies of reaction between **1** and **1'** by writing $\Delta_{21'}S^0 = x\Delta_{21}S^0$ where we take $x \geq 1$. Then, one can easily extract $\Delta_{11'}G^0$:

$$\Delta_{11'}G^0 = (x - 1)\Delta_{21}G^0 + \left(\frac{T_{m,1'}}{T_{m,1}} - 1\right)x\Delta_{21}H^0 \quad (5.6)$$

We can now calculate the apparent thermodynamic parameters $K_{21}^{app}(T)$, $\Delta_{21}H^{0,app}$ and $\Delta_{21}S^{0,app}$, extracted from the application of the two-level model. Three cases have to be envisaged according to the x value.

- $x = 1$:

In relation to the observation of the enthalpy-entropy correlation (*vide infra*), **1** and **1'** here exhibit identical thermodynamic parameters. Then one easily derives :

$$\ln K_{21}^{app}(T) = -\frac{\Delta_{21}G^0}{RT} + \ln 2 \quad (5.7)$$

$$\Delta_{21}H^{0,app} = \Delta_{21}H^0 \quad (5.8)$$

$$\Delta_{21}S^{0,app} = \Delta_{21}S^0 + R \ln 2 \quad (5.9)$$

One notices that $\ln K_{21}^{app}$ linearly depends on $\frac{1}{T}$. The apparent standard enthalpy $\Delta_{21}H^{0,app}$ is equal to the true one, $\Delta_{21}H^0$, for **1** and **1'**. Taking into account the typical orders of magnitude displayed in Table 2 of the Main Text, one notices that $R \ln 2$ is less than 1% of $\Delta_{21}S^0$; as a consequence, one has also $\Delta_{21}S^{0,app} = \Delta_{21}S^0$ with the present 20% experimental precision given in Table 2.

- $1 < x < 1.2$:

A simple analytical treatment is not possible in that intermediate regime. In contrast, numerical simulations (data not shown) support that the dependence of $\ln K_{21}^{app}$ on $\frac{1}{T}$ should be essentially linear in the investigated temperature range. In addition, the extracted apparent thermodynamic values would be equal to the true ones of both foldamers within the 20% error.

- $x > 1.2$:

Assuming that the folded state **1'** is more stable than the folded state **1** at low temperature, one has now typically within 20% experimental precision :

$$\ln K_{21}^{app}(T) = -\frac{\Delta_{21'}G^0}{RT} \quad (5.10)$$

$$\Delta_{21}H^{0,app} = \Delta_{21'}H^0 \quad (5.11)$$

$$\Delta_{21}S^{0,app} = \Delta_{21'}S^0 \quad (5.12)$$

when $\exp\left(-\frac{\Delta_{11'}G^0}{RT}\right) \gg 1$ (or $T < T_{inv} = T_{m,1'} + \frac{T_{m,1'} - T_{m,1}}{x-1}$; regime of the lowest temperatures) and :

$$\ln K_{21}^{app}(T) = -\frac{\Delta_{21}G^0}{RT} \quad (5.13)$$

$$\Delta_{21}H^{0,app} = \Delta_{21}H^0 \quad (5.14)$$

$$\Delta_{21}S^{0,app} = \Delta_{21}S^0 \quad (5.15)$$

when $\exp\left(-\frac{\Delta_{11'}G^0}{RT}\right) \ll 1$ (or $T > T_{inv} = T_{m,1'} + \frac{T_{m,1'} - T_{m,1}}{x-1}$; regime of the highest temperatures). One now notices that $\ln K_{21}^{app}$ linearly depends on $\frac{1}{T}$ both at low and high temperatures, but with different slopes in the two temperature regimes : The apparent thermodynamic parameters are equal to the ones of the most stable folded conformer in the corresponding temperature regime.

We now take advantage of the linear free energy relation displayed in Figure 9S : In the present series of G4-MB, we experimentally observed :

$$\Delta_{21}H^0(J \text{ mol}^{-1}) = \rho\Delta_{21}S^0(J \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}) + \eta \quad (5.16)$$

(linear regression coefficient : 0.996) with $\rho = 386 \text{ K}$ and $\eta = 39 \cdot 10^3 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$.¹ Applying the latter free energy relation to **1** and **1'**, one easily demonstrates : $T_{inv} = \rho$. Taking into account that we observed $T_m \approx 330 \text{ K}$ (see Table 2 of the Main Text), we conclude that we performed the whole extraction of the thermodynamic parameters from the experimental curves in the unique temperature regime $T < \rho$; indeed, the thermodynamic information is essentially contained within the $[T_m - 20; T_m + 20]$ temperature range.

Thus, one again notices that $\ln K_{21}^{app}$ should linearly depend on $\frac{1}{T}$ in the present series. The apparent thermodynamic parameters should now be equal to the ones of the most stable folded conformer (here **1'**).

Conclusion

The following cases are meaningful in relation to the analysis of thermal curves with a two-level model when more than one closed G4-MB is formed :

- If the different folded conformers exhibit identical thermodynamic parameters, the two-level model is analytically appropriate to fit the data extracted from melting experiments and the extracted apparent thermodynamic constants are essentially identical to the true thermodynamic parameters in common to the different foldamers. The system apparently behaves as if it would contain one folded component only with the average spectroscopic features of the different folded states ;
- If the difference in the value of the thermodynamic parameters of the different folded states is lower than the experimental error (here 20%), the dependence of $\ln K_{21}^{app}$ on $\frac{1}{T}$ should be essentially linear in the investigated temperature range. In addition, the extracted apparent thermodynamic values would be equal to the true ones of both foldamers within the 20% error ;

¹Under such conditions, the difference of the thermodynamic parameters associated to **1** and **1'** exceeds the present 20% experimental precision : $\Delta_{21'}S^0 = x\Delta_{21}S^0$; $\Delta_{21'}H^0 = x\frac{T_{m,1'}}{T_{m,1}}\Delta_{21}H^0$ with $T_{m,1'} > T_{m,1}$ because $T_{m,1'} = T_{m,1} + \frac{(x-1)(\rho-T_{m,1})}{x}$ with $\rho = 386 \text{ K}$ and $T_{m,1} \simeq 330 \text{ K}$.

- If the difference in the value of the thermodynamic parameters of the different folded states exceeds the experimental error (here 20%), one expects to observe a deviation from a linear behavior in the $\ln K_{21}^{app}(\frac{1}{T})$ curve. In particular, one could be able to extract the true thermodynamic parameters of the different foldamers by linear fit at low and large enough temperatures. Nevertheless, the inversion temperature at which the deviation should appear is here larger than the upper temperature investigated. As a consequence, the two-level model remains here analytically appropriate to fit the data extracted from melting experiments and the apparent thermodynamic parameters should be identical to the true ones of the most stable foldamer. In fact, only one folded state should be significantly populated at any temperature below the inversion temperature and the system again should essentially behave as if it would contain the most stable folded component only.²

²Note that the nature of the observable is here not significant to evidence the presence of several foldamers during melting experiments.

Appendix B : Detailed analysis of the kinetics of association between 30GMB and its complementary targets

In this section, we analyze the kinetics of recognition between a molecular beacon belonging to the present G4-MB series and a complementary oligonucleotide. We first examine the kinetic model corresponding to the conversion of the folded G4-MB state to the duplex resulting from association with its target. Then, we report complementary experiments devoted to mechanism analysis. The whole collection of experimental facts is subsequently discussed to discriminate the active mechanism controlling the conversion. The kinetic analysis of the experimental data is described at the end of the section.

The kinetic model

In this part, we derive the time-dependent evolutions of the concentrations for both mechanisms displayed in Figure 1 of the Main Text.

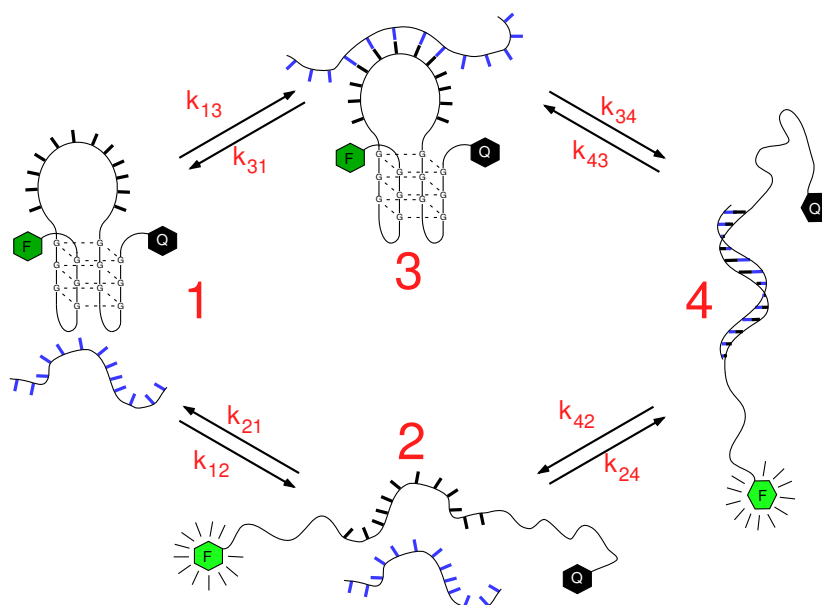


Figure 1. Competing pathways for molecular recognition between an oligonucleotide target and a G4-based molecular beacon (G4-MB). In the upper pathway, partial recognition is followed by invasion that leads to beacon opening. In contrast, binding of the target occurs only after spontaneous opening of the beacon in the lower pathway. The notations : **1**, **2**, **C**, **3**, and **4** stand for the folded G4-MB, the unfolded G4-MB, the complementary single-stranded oligonucleotide, the intermediate resulting from the partial hybridization of **C** with the **1** loop, and the duplex, respectively.

In this section, we assume that G4-MB exhibits only one folded state leading to only one set of kinetic and thermodynamic parameters. The behavior alterations resulting from the presence of at least two G4-MB foldamers are discussed in section 3.3.

The opening mechanism **1-2-4** can be written as (5.17) and the invasion mechanism **1-3-4** as (5.18).



To derive analytical expressions, we assume that the complementary strand **C** is in excess compared to the G4-MB derived species.³ Then, (5.17) and (5.18) can be considered to only involve unimolecular steps, leading to the same simplified mechanism (5.19) :



where $X = \mathbf{1}$, $Y = \mathbf{2}$, $Z = \mathbf{4}$, $k_1 = k_{12}$, $k_{-1} = k_{21}$, $k_2 = k_{24}C$, $k_{-2} = k_{42}$ in the case of the opening mechanism **1-2-4** and $X = \mathbf{1}$, $Y = \mathbf{3}$, $Z = \mathbf{4}$, $k_1 = k_{13}C$, $k_{-1} = k_{31}$, $k_2 = k_{34}$, $k_{-2} = k_{43}$ in the case of the invasion mechanism **1-3-4**. In the following, we use the same notation for the species and its concentration.

In a closed system, the set of differential equations governing the time-evolution of the concentrations X , Y , and Z related by (5.19) is given by Eqs.(5.20–5.22) :

$$\frac{dX}{dt} = -k_1X + k_{-1}Y \quad (5.20)$$

$$\frac{dY}{dt} = k_1X - (k_{-1} + k_2)Y + k_{-2}Z \quad (5.21)$$

$$\frac{dZ}{dt} = k_2Y - k_{-2}Z \quad (5.22)$$

the solutions of which can be expressed by Eqs.(5.23–5.25) :

$$X(t) = x_0 + x_1e^{\lambda_1 t} + x_2e^{\lambda_2 t} \quad (5.23)$$

$$Y(t) = y_0 + y_1e^{\lambda_1 t} + y_2e^{\lambda_2 t} \quad (5.24)$$

$$Z(t) = z_0 + z_1e^{\lambda_1 t} + z_2e^{\lambda_2 t} \quad (5.25)$$

where λ_1 and λ_2 designate the nontrivial eigenvalues of the determinant of Eqs.(5.20–5.22) :

$$\lambda_1 = \frac{1}{2} \left[-(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}) - \sqrt{[(k_1 + k_{-1}) - (k_2 + k_{-2})]^2 + 4k_{-1}k_2} \right] \quad (5.26)$$

$$\lambda_2 = \frac{1}{2} \left[-(k_1 + k_{-1} + k_2 + k_{-2}) + \sqrt{[(k_1 + k_{-1}) - (k_2 + k_{-2})]^2 + 4k_{-1}k_2} \right] \quad (5.27)$$

The eigenvalues λ_1 and λ_2 given in Eqs.(5.26–5.27) are negative. Thus $-1/\lambda_1$ and $-1/\lambda_2$ can be identified to two relaxation times τ_1 (short) and τ_2 (long) associated to (5.19).

³As can be seen in the Main Text and below in this section, this hypothesis is always verified in our experiments.

Starting from X alone (initial concentration X_0), we eventually compute :

$$x_0 = \frac{k_{-1}k_{-2}}{\lambda_1\lambda_2}X_0; \quad y_0 = \frac{k_1k_{-2}}{\lambda_1\lambda_2}X_0; \quad z_0 = X_0 - x_0 - y_0 \quad (5.28)$$

$$x_1 = \frac{k_{-1}}{\lambda_1 - \lambda_2} \left[-y_0 + (x_0 - X_0) \frac{k_1 + \lambda_2}{k_{-1}} \right]; \quad y_1 = x_1 \frac{k_1 + \lambda_1}{k_{-1}}; \quad z_1 = -(x_1 + y_1) \quad (5.29)$$

$$x_2 = X_0 - (x_0 + x_1); \quad y_2 = -(y_0 + y_1); \quad z_2 = -(z_0 + z_1) \quad (5.30)$$

Complementary experiments

To discriminate between the mechanisms **1-2-4** and **1-3-4**, we envisaged two different approaches. A first series of complementary experiments addressed the mechanism issue by evidencing the formation of the intermediate **3**. In parallel, a second series attempted to perform mechanism discrimination by detailed analysis of the fluorescence relaxation curves associated to G4-MB binding to its targets.

Evidence for the intermediate **3**

To evidence the formation/dissociation of the putative intermediate adduct **3** between 30GMB and its complementary target, we investigated the reaction of F13ACA with 38G (Table 1 of the Main Text). The first oligonucleotide is a fluorescein-labeled analog of 13ACA, whereas the second one is a G4-MB designed to forbid any disruption of the quadruplex stem : it bears a central loop sequence identical to 30GMB but its longer lateral portions were conceived to form a very stable stem involving five quartets. As expected, the stability of 38G was considerably larger than that of 30GMB (T_m : 90°C in the presence of MgCl_2 ; data not shown).

Then we recorded the time evolution of the fluorescence emission from 200 nM F13ACA in 100 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 after sudden addition of 10 equivalents of 38G at 298 K (Figures 5Sa and b).

The interaction between F13ACA and 38G was evidenced by a fast 60% drop in fluorescence emission subsequently followed by a slow minor drift. We attributed the fast decay to the realization of the step **1-3** which did not process further in the 38G case; a monoexponential fit was satisfactory leading to $k_{13} = 2 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ as an estimate for the corresponding on-rate for F13ACA :38G pairing. Thereafter, to derive an order of magnitude of the off-rate constant k_{31} , we subsequently added a 100-fold excess of 13ACA to the final adduct of the preceding experiment. As shown in Figure 6S, the fluorescence emission from free F13ACA was satisfactorily restituted as expected from the displacement of the fluorescent strand by its unlabeled analog. Except for a minor contribution at short times, a monoexponential fit was satisfactory providing $1.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ as an estimate for k_{31} .

The preceding results suggest that the loop sequence and the complementary strand form a rather stable complex that may exhibit some specific organization. First, we did not observe the formation of such a complex with the much smaller and not complementary 21tel loop (Figures 5Sa and b). Second, the rather low on-rate constant $k_{13} \simeq 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$

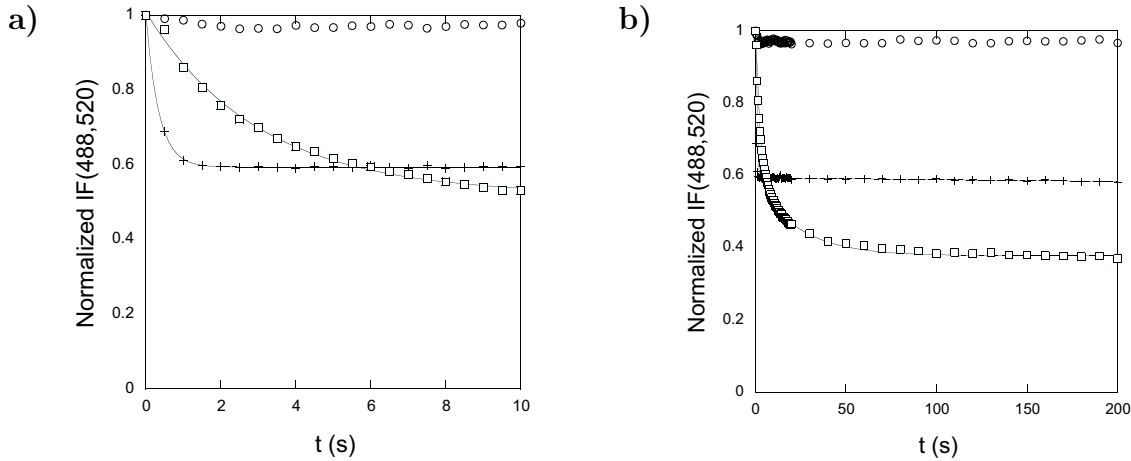


Figure 5S. Short (a) and long (b) time dependence of the fluorescence emission from 200 nM F13ACA after stopped-flow addition of 10 equivalents of 21tel (circles), 38G (squares) or 30con (crosses) at 298 K. Solvent : 100 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. λ_{exc} = 488 nm ; λ_{em} = 520 nm. Markers : experimental points ; lines : monoexponential (a) and biexponential (b) fits.

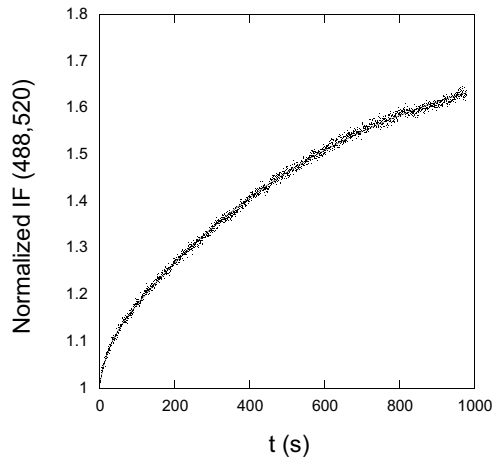


Figure 6S. Time dependence of the fluorescence emission from an equilibrated mixture of 200 nM F13ACA and 2 μ M 38G after sudden addition of 10 equivalents of 13ACA (*i.e.* final concentration 13ACA concentration of 20 μ M) at 298 K. Solvent : 100 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. λ_{exc} = 488 nm ; λ_{em} = 520 nm. Markers : experimental points ; line : monoexponential fit.

could reveal a selective nucleation step more than a nonselective hydrophobic collapse expected to be diffusion-controlled ($k_{13} \simeq 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Eventually, an estimate of the association constant for **3** formation is given by the ratio $k_{13}/k_{31} \approx 10^8$ that does not considerably differ from the association constant for the F13ACA :30con duplex formation, evaluated as $k_{24}/k_{42} \approx 10^{11}$ (*vide infra*).

Measurements of the rate constants associated to the hybridization of the unfolded beacon

To complement our derivation of orders of magnitude, we estimated k_{24} and k_{42} by investigating at 298 K the kinetics of 30con association with 13ACA (step **2-4** in Figure 1). The time dependence of the fluorescence emission from 200 nM F13ACA in 100 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 was recorded after sudden addition of 10 equivalents of 30con (Figures 5S a and b). A decrease in fluorescence emission was observed as a function of time. It asymptotically reduces the fluorescein brightness by 40% and probably reflects a quenching by the 30con guanines facing the fluorescein in the complex. We extracted $1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ as an order of magnitude for the k_{24} rate constant. We also derived $3.2 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ as an estimate of the dissociation rate k_{42} by analyzing the signal evolution arising from adding a 100-fold excess of unlabelled 13ACA to the F13ACA :30con duplex (Figure 7S).

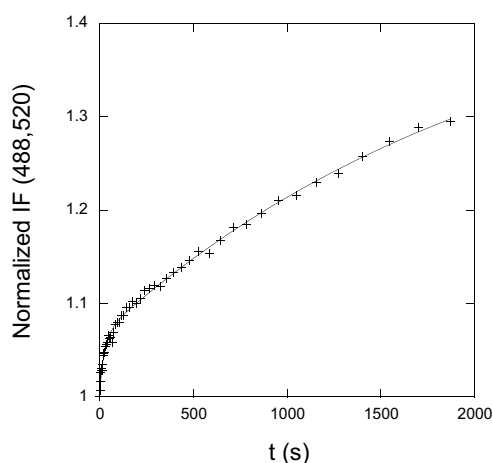


Figure 7S. Time dependence of the fluorescence emission from an equilibrated mixture of 200 nM F13ACA and 2 μM 30con after sudden addition at 298 K of 10 equivalent of 30con in 13ACA (20 μM final concentration in 13ACA) at 298 K. Solvent : 100 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. λ_{exc} = 488 nm ; λ_{em} = 520 nm. Crosses : experimental points; line : biexponential fit.

Kinetic characterization of the overall process : sequence and concentration dependence

In principle, the dependence of the characteristic relaxation times associated to G4-MB opening could bring valuable insights to facilitate mechanism discrimination (*vide infra*). Figures 8Sa, b, and c display the time evolution of the fluorescence emission from 200 nM 30GMB after addition of different amounts of 13ACA, 13ACC, or 13AAA in 100 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2 at 298 K.

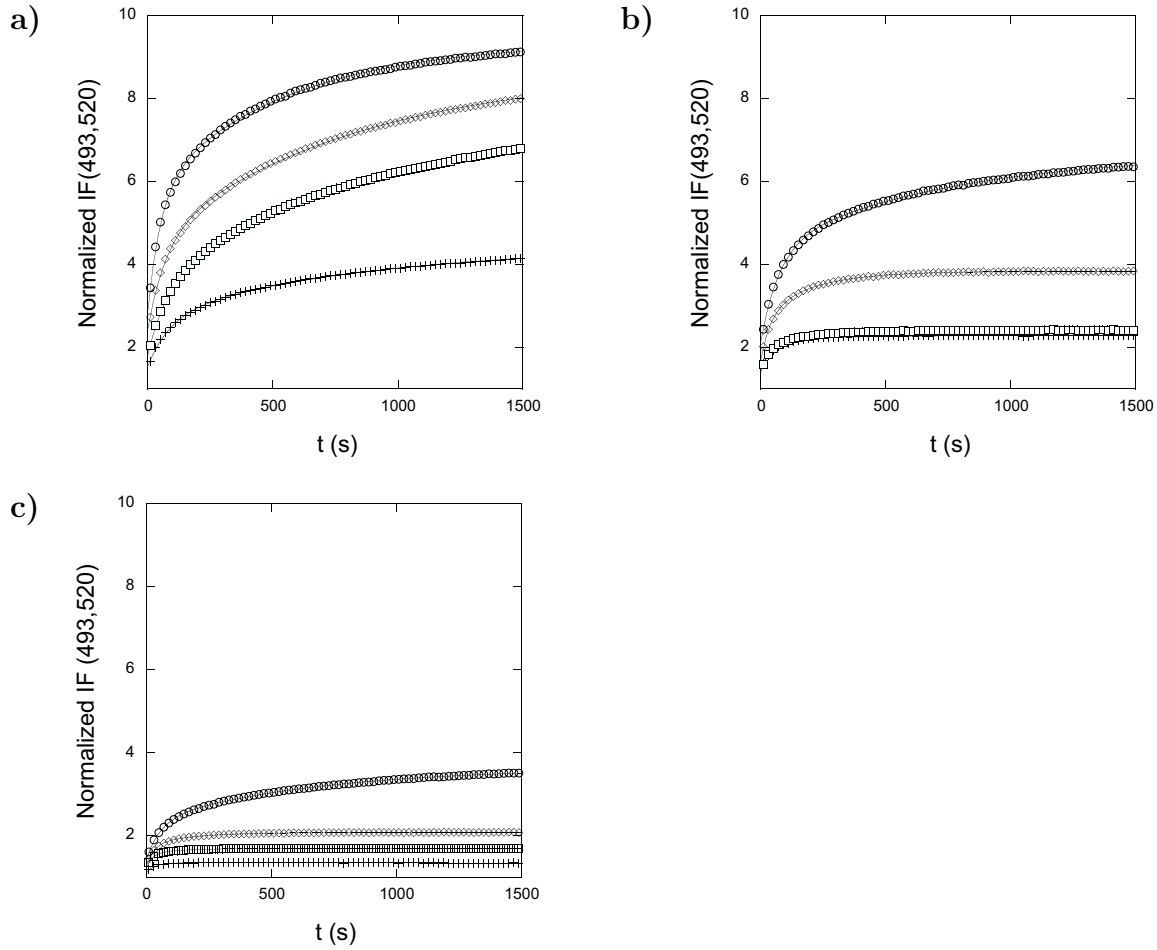


Figure 8S. Change in the fluorescence emission from 200 nM 30GMB with respect to time after sudden addition at 298 K of 0.5 (crosses), 1 (squares), 5 (diamonds), or 50 (circles) equivalents of 13ACA (a), 13ACC (b), and 13AAA (c). $\lambda_{exc}=493$ nm; $\lambda_{em}=520$ nm. Solvent : 100 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2. Markers : experimental points ; lines : biexponential fits.

Figure 8Sa displays the results obtained in the series of experiments with 13ACA. As also shown in Table 4S, two time scales are associated to the interaction of 30GMB with this complementary strand. In a first kinetic regime, the signal increases in the 50–100 s range, whereas in a second one, the fluorescence evolution is about ten times slower (on a 500–1000 s time scale). As anticipated, the final fluorescence emission increases with an increase of the concentration C in the complementary target. Table 4S shows that the amplitudes a_a and a_b associated to both kinetic regimes are essentially independent on C . In contrast, the relaxation times associated to both kinetic regimes decrease by a factor 2 when using from 1 to 50 equivalents in 13ACA.

The Figures 8Sb and c show the corresponding behavior when either 13ACC or 13AAA was added to 30GMB. At the largest concentrations in complementary strand, one finds again the behavior that was observed with 13ACA, however with some delay in the concentration of complementary target required to observe a given time evolution. In contrast, we only observe a rather fast slight increase of fluorescence emission at the lowest investigated

Table 4S. Relaxation times and amplitudes obtained from biexponential analysis (Eq.(15) in the Main Text) of the time evolution of the fluorescence emission from 200 nM 30GMB after sudden addition at 298 K of 0.5, 1, 5, or 50 equivalents of 13ACA. λ_{exc} = 493 nm; λ_{em} =520 nm. Solvent : 100 mM KCl 10 mM MgCl₂ 10 mM lithium cacodylate buffer pH 7.2.

Number of equivalents	τ_a (s)	a_a (%)	τ_b (s)	a_b (%)
0.5	91	40	862	60
1	87	30	971	70
5	73	30	826	70
50	53	40	543	60

concentrations in complementary strand.

Discussion

We successively considered two types of arguments to discriminate between the mechanisms **1-2-4** and **1-3-4**.

Evidence for the intermediate **3**

The above complementary experiments showed that a 13ACA :G4-MB intermediate **3** forms and can be observed when G4-MB opening is impeded. It was also possible to derive the orders of magnitude of i) the on-rate constant k_{13} and ii) the thermodynamic constant K_{13} corresponding to **3** formation. Over micromolar concentrations in complementary strand C , such values are compatible with the fast realization of the equilibrium **1-3** with respect to the steps **1-2** and **3-4** ($k_{13}C > k_{12}$ and $k_{13}C > k_{34}$; *vide infra*). This result would apply for all the oligonucleotide sequences that were investigated since k_{13} should not considerably depend on the presence of any mismatch. In addition, the extent of reaction **1-3** at equilibrium above micromolar concentrations C should favor the intermediate **3** during G4-MB opening. This result is expected for the matched sequence where $K_{13}C \gg 1$ under such conditions. It probably also applies for mismatched sequences. Indeed K_{13} should not be lower than 10^8 by more than two orders of magnitude in these cases.

Temporal evolution of the concentrations

We successively considered the two possible mechanisms, **1-2-4** and **1-3-4**, with particular emphasis on the dependence of the relaxation times τ_1 and τ_2 on the concentration in complementary strand C . We then examined whether the analysis of the temporal evolution of the fluorescence emission from the G4-MB could be used to discriminate the mechanisms **1-2-4** and **1-3-4**.

First possibility : the mechanism 1-2-4 is operative The relaxation times of the individual steps **1-2** and **2-4** can be evaluated by using the values of k_{12} , k_{21} , k_{24} and k_{42} given in the Main Text and derived above. The relaxation time of the step **1-2**, τ_{12} , is in the 100 s range whereas the relaxation time of the step **2-4**, τ_{24} , is in the 1 s range at the relevant micromolar concentrations in complementary strands (see Eqs.(8,12) in the Main Text). If the mechanism **1-2-4** is operative, one should thus conclude that the step **1-2** is rate-limiting under the present experimental conditions. Then, $(k_1 + k_{-1}) \ll (k_2 + k_{-2})$ and at first order from Eqs.(5.26,5.27) :

$$\frac{1}{\tau_1} = -\lambda_1 \approx k_2 + k_{-2} = k_{24}C + k_{42} \quad (5.31)$$

$$\frac{1}{\tau_2} = -\lambda_2 \approx k_1 + k_{-1} \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{k_{-2}}{k_2}} \right) = k_{12} + k_{21} \left(\frac{1}{1 + \frac{k_{24}C}{k_{42}}} \right) \quad (5.32)$$

Taking into account the orders of magnitude for the values of $k_{12} \approx 10^{-2}$ – 10^{-3} s^{-1} , $k_{21} \approx 10^{-1}$ – 10^{-2} s^{-1} , $k_{24} \approx 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, and $k_{42} \approx 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ as well as the overmicromolar concentration C in complementary strand at the largest investigated concentrations, one should observe under the present experimental conditions the temporal behavior expressed by Eqs.(5.33–5.34) :

$$\frac{1}{\tau_1} \approx k_{24}C \quad (5.33)$$

$$\frac{1}{\tau_2} \approx k_{12} \quad (5.34)$$

Above micromolar concentrations in complementary strand, the short relaxation time τ_1 should be lower than 1 s and would not be observed during the present series of experiments. In contrast, the long relaxation time τ_2 should i) be in the 70–500 s range ($k_{12a}=1.9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{12b}=1.4 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$); ii) not depend on the concentration in complementary strand C .

Second possibility : the mechanism 1-3-4 is operative The relaxation time τ_{13} of the step **1-3** can be evaluated from the values of k_{13} and k_{31} . In contrast, k_{43} and k_{34} could not be independently measured as the other rate constants extracted in the present investigation. Hence it is not possible to evaluate *a priori* the order of magnitude of the relaxation time τ_{34} of the step **3-4**. At that point, we assume that the rate limiting step under the present experimental conditions should be **3-4** (this assumption will have to be validated later). Then, $(k_1 + k_{-1}) \gg (k_2 + k_{-2})$ and from Eqs.(5.26,5.27) at first order :

$$\frac{1}{\tau_1} = -\lambda_1 \approx (k_1 + k_{-1}) = (k_{13}C + k_{31}) \quad (5.35)$$

$$\frac{1}{\tau_2} = -\lambda_2 \approx k_{-2} + k_2 \left(1 - \frac{1}{1 + \frac{k_1}{k_{-1}}} \right) = k_{43} + k_{34} \left(\frac{\frac{k_{13}C}{k_{31}}}{1 + \frac{k_{13}C}{k_{31}}} \right) \quad (5.36)$$

Above micromolar concentrations in complementary strand, the short relaxation time τ_1 should be lower than 10 s. Then the 100–1000 s relaxation times in Figures 8Sa, b, and c could only correspond to the long relaxation time τ_2 associated to the step **3-4**.

In contrast to the preceding situation, $k_{13}C$ could not systematically exceed k_{31} in the investigated C range, due to the lower stability of the intermediate **3** with regard to the duplex **4**. At the highest investigated C concentrations, $k_{13}C \gg k_{31}$ and the longest relaxation time $\tau_2^{-1} \approx k_{43} + k_{34}$ from Eq.(5.36). In contrast, $\tau_2^{-1} \approx k_{43}$ for the lowest C values.

In fact, a crude derivation of k_{43} and k_{34} results from the observation that 30GMB opening is not complete even in the presence of the matched sequence 13ACA. Indeed Figure 5b (see Main Text) shows that the pairing of unfolded 30GMB with its complementary strand is accompanied by an increase of fluorescence emission by about 20 % whereas the fluorescence emission of the mixture of folded 30GMB with 13ACA below 30°C is identical to the one of unfolded 30GMB (Figure 6). The simplest explanation to the latter observation consists in assuming that the system still contains some intermediate **3** below 30°C (by using the relative fluorescence intensities shown in Figures 5b and 6 at 30°C and 80°C, we evaluate the relative proportions to about 80% of duplex **4**, and 20% of intermediate **3**). Then the thermodynamic constant associated to the duplex **4** formation, $K_{34} = \frac{k_{34}}{k_{43}}$, is not much more than one under the present experimental conditions. In the case of 30GMB :13ACA, we retained $K_{34} = \frac{k_{34}}{k_{43}} \approx 1$ as an order of magnitude. As $k_{43} \lesssim \tau_2^{-1} \lesssim k_{43} + k_{34}$, we derived from Table 4S : $k_{34} \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $k_{43} \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ as crude estimates. Such values are in line with the corresponding rate constants that were observed for the step **1-2**. Indeed both steps are associated to G4-MB opening.

Finally, if the mechanism **1-3-4** is operative, i) the rate-limiting step is effectively **3-4** during the conversion from the state **1** to the state **4**; ii) the short relaxation time τ_1 should be lower than 10 s above micromolar concentrations in complementary strand and could be hardly observed at the largest C values during the present series of experiments; iii) the long relaxation time τ_2 should be in the 10^3 s range and could slightly depend on the concentration in complementary strand C in the rather narrow range of values $k_{43} \lesssim \tau_2^{-1} \lesssim 2k_{43}$.

Analysis of the experimental results We successively examine the amplitude and the time-dependence of the fluorescence evolution from 30GMB.

Analysis of the amplitude of the fluorescence emission from 30GMB as a function of time In principle, the analyses of the amplitude of the fluorescence emission as a function of time may provide some insight into the nature of the mechanism, **1-2-4** or **1-3-4**.

If the mechanism **1-2-4** is relevant, one would directly observe the conversion of the closed beacon 30GMB **1** to the duplex **4** at the τ_2 time scale. In fact, the signal increase by a factor 8 that is observed in Figure 8Sa at 50 equivalents in 13ACA would be reasonably in line with this interpretation. First, 30GMB denaturation was shown to be associated by a 16-fold fluorescence increase resulting from the levelling-off of the quenching of fluorescein emission by dabcyI (see Main Text). Duplex formation from unfolded 30G and F13ACA was secondly shown to be accompanied by a 40% fluorescence drop (*vide supra*). If the latter drop reflects some fluorescein quenching associated to 13ACA-30G duplex formation, the **1-4** 30GMB conversion should be associated to a fluorescence increase of fluorescein in the 16×0.4 range.

If the mechanism **1-3-4** is active, one would reach a fast **1-3** equilibrium followed by a slow conversion of the intermediate **3** to the duplex **4** at the τ_2 time scale. Then one should deduce from the 8-fold signal increase that is observed in Figure 8Sa that

the intermediate **3** and the closed beacon 30GMB **1** would exhibit a similar brightness. This would not contradict the expectations if one considers that the interaction of the complementary target with the 30GMB loop does not considerably affect the relative positions of fluorescein and dabcyI in the G4-MB moiety. Given the relative positions of the labels with regards to the loop, the latter assumption appears reasonable.

Thus it does not appear possible to distinguish between the mechanisms **1-2-4** and **1-3-4** on the basis of the amplitude analyses.

Analysis of the temporal evolution of the fluorescence emission from G4-MB The values of the relaxation times τ_2 observed in Figures 8Sa, b, and c cannot be used to discriminate among the mechanisms **1-2-4** and **1-3-4**. Indeed similar values could be expected in both cases by appropriately attributing the values of the rate constants.

However, as explained above, the study of the dependence of τ_2 on C could be used to make the discrimination. In the 13ACA case, Table 4S shows that the two relaxation times τ_{2a} and τ_{2b} effectively decrease by a factor 2 when the concentration C in complementary strand is increased by a factor 10 (entries 5 and 50 equivalents in 13ACA⁴). This observation would be both qualitatively and quantitatively in line with the mechanism **1-3-4** to control unfolding of (at least) two conformers of 30GMB in comparable amounts (*vide supra*). In fact such an explanation would additionally agree with i) the kinetic measurements of 30GMB unfolding. Indeed, the factor 10 found between τ_{2a} and τ_{2b} satisfactorily compare with the corresponding factor between the two relaxation times that were experimentally found to be associated to 30GMB unfolding ($\tau_{12a}=530$ s and $\tau_{12b}=70$ s); ii) the kinetic behavior in the case of mismatched sequences 13ACC and 13AAA. In the latter case, one could imagine that the less stable and possibly most reactive 30GMB conformer(s) preferentially react(s) : the relaxation time should be small at the lowest concentrations C in complementary strand. The more stable and possibly less reactive 30GMB conformer(s) would then react at larger concentrations C leading to behavior comparable to the ones observed in the 13ACA case at lower concentrations C .

Conclusion

All together, the observation of an intermediate **3** in the case of a G4-MB that cannot open, associated to the dependence of the relaxation times for 30GMB opening with the concentration in complementary strand incline to favor the mechanism **1-3-4** as operative in the case of the matched complementary oligonucleotide 13ACA.⁵ Consequently, the present experimental results suggest the following mechanism to be active during hybridization between a folded G4-MB such as 30GMB, and an oligonucleotide target complementary to its loop : i) the target first wraps onto a part of the probe domain of G4-MB which remains closed ; ii) an increase in the number of zipped base pairs subsequently leads to quadruplex opening, in a manner analogous to the mechanism described for regular MB. [3] Noticeably, the time scale that is associated to the second step **3-4** does not significantly depart from the time scale that is associated to the spontaneous

⁴The experiments in which 0.5 or 1 equivalent of 13ACA is added to 30GMB cannot be easily analyzed. Indeed, the absence of excess in the complementary strand makes difficult the analysis of the characteristic times of the biexponential fit (see Eq.(9) in the Main Text). In addition, the rather long relaxation time τ_{13} interferes with the fastest relaxation time of the step **3-4** under such conditions.

⁵In contrast, the present data cannot exclude the mechanism **1-2-4** to play some role in the pairing of the mismatched sequences 13ACC and 13AAA with 30GMB.

opening of 30GMB. Hence the zipping process arising from the duplex formation does not act as a strong driving force for quadruplex disruption.

Kinetic Analysis of the Experimental Data

The kinetic situations encountered during the present study are displayed in Figure 1. They correspond to kinetic laws that can be grouped in two categories : isomerizations and bimolecular reactions. The first category was appropriate to extract the rate constants k_{12} and k_{21} , whereas the second was used to extract orders of magnitude of k_{24} , k_{42} , k_{13} , and k_{31} .

The isomerizations were modeled by considering a process in which a reactant **R** (initial concentration R_0) yields a product **P** (initial concentration 0) :



Then, the time evolution of the concentrations can be written :

$$R(t) = R_\infty + (R_0 - R_\infty)\exp(-t/\tau) = R_0 - P(t) \quad (5.38)$$

with

$$\tau = \frac{1}{k_+ + k_-} \quad (5.39)$$

and where R_∞ designates the concentration in **R** at equilibrium. During the present series of experiments, one of the rate constants, k_+ or k_- , was set at a much larger value than the other so as to directly extract it from the relaxation time τ .

For bimolecular reactions, we considered that we started from a mixture of reactants **R** and **R*** (respective initial concentrations R_0 and R_0^*) yielding a product **P** (initial concentration 0) :



Then, the time evolution of the concentrations in **R**, **R***, and **P** can be written :

$$R(t) = R_\infty + (R_0 - R_\infty) \frac{\exp(-t/\tau)}{1 + k_+\tau P_\infty[1 - \exp(-t/\tau)]} = R_0 - P(t) \quad (5.41)$$

$$R^*(t) = R_0^* - P(t) \quad (5.42)$$

with

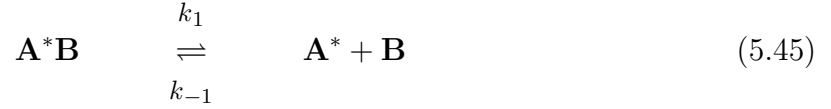
$$\tau = \frac{1}{k_+(R_0 + R_0^* - 2P_\infty) + k_-} \quad (5.43)$$

In the preceding equations, R_∞ , R_∞^* and P_∞ stand for the concentrations at equilibrium in **R**, **R***, and **P**, respectively. If one of the species, **R** or **R***, is in excess (here **R*** for illustration), Eq.(5.41) adopts the dependence shown in Eq.(5.38) with :

$$\tau = \frac{1}{k_+R_0^* + k_-} \quad (5.44)$$

In the course of this study, we systematically adopted appropriate experimental conditions to remain in the preceding regime of approximation. As for isomerizations, one of the terms contained in τ , $k_+R_0^*$ or k_- , was much larger than the other during the present series of experiments so as to directly extract its value from the relaxation time τ .

Eventually, we also performed displacement experiments in which the unlabeled oligonucleotide 13ACA (**A**) replaced the F13ACA labeled analog (**A**^{*}) in the intermediate **3** or in the duplex **4** (**AB** or **A**^{*}**B**). The corresponding kinetic scheme can be written :



If the solution initially only contains **A**^{*}**B** (concentration A_{tot}^*), the addition of **A** in excess leads to the complete conversion of **A**^{*}**B** into **AB** at equilibrium. When the concentrations are chosen to make the dissociation of **A**^{*}**B** rate-limiting with regards to the subsequent formation of **AB**, the time dependence of the **A**^{*} concentration is given by :

$$A^*(t) = A_{tot}^*[1 - \exp(-k_1t)] \quad (5.47)$$

For each of our experiments, the recorded signal in fluorescence emission, $S(t)$, is the sum of all the individual contributions from the present species **i**. In the present range of absorbance values, each contribution $s_i(t)$ is proportional to the brightness Q_i and the concentration $C_i(t)$ of the considered species **i**. Thus, we always used Eq.(5.48), with the corresponding expression of the relaxation time, to analyze the temporal evolution of the fluorescence emission when monoexponential fitting was appropriate :

$$S(t) = \sum_i s_i(t) = S_\infty + (S_0 - S_\infty)\exp(-t/\tau) \quad (5.48)$$

where S_0 and S_∞ respectively designate the initial and final fluorescence signal. In contrast, we adopted the biexponential fitting law :

$$S(t) = \sum_i s_i(t) = S_\infty + a_a\exp(-t/\tau_a) + a_b\exp(-t/\tau_b) \quad (5.49)$$

when the monoexponential law failed to fit the experimental data.

Appendix C : Electrophoretic measurements

We performed capillary electrophoresis experiments on the 30G sequence. They were directed towards the investigation of :

- the possible presence of several 30G folded states in the potassium containing buffers ;
- the significance of the Mg^{2+} cation on the 30G electrophoretic mobility ;
- the comparison of the rate constants associated to the folding/unfolding processes within the mixture of 30G folded states.

Figure 9-11S display the electropherograms by capillary electrophoresis of 30G and 30con samples, equilibrated in different buffers, and separated in columns conditioned with different buffers.

Figures 9a and 9b compare the electropherograms of 30G in potassium and lithium containing buffers, either in the absence or in the presence of magnesium cation. The electropherogram of 30con, which do not form any motif, was used as a 30G reference.

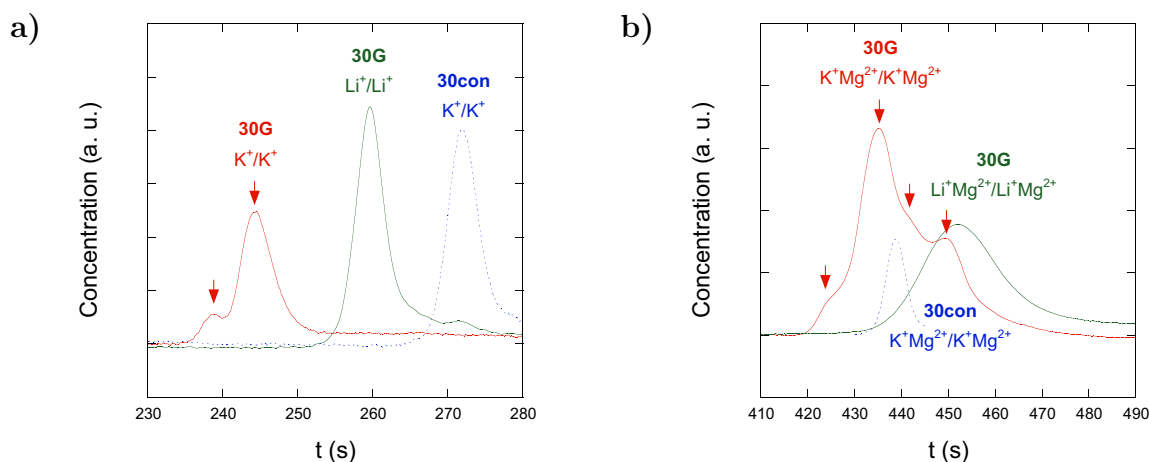


Figure 9S. Electropherograms of 30G in potassium and lithium containing buffers using the electropherogram of the G4-nonforming 30con sequence as a reference, either in the absence (**a**) or in the presence (**b**) of magnesium cation. The notation cation/cation below the name of the sequence indicates the nature of the buffer cation in the injected oligonucleotide sample and in the column, respectively. Buffers : 220 mM K(or Li) Hepes pH 7.45 or 220 mM K (or Li) Hepes pH 7.45 containing 10 mM Mg^{2+} ; $T = 298 \text{ K}$; Applied voltage : 10 kV ; concentration of the injected samples 0.2 mM.

One notices :

- the presence of a unique peak for 30G in lithium containing buffers or for 30con in potassium containing buffers. This observation is in line with the unique unfolded state anticipated from the melting experiments for the corresponding sequences under the present experimental conditions ;

- the presence of several peaks for 30G in potassium containing buffers that suggests the existence of several 30G foldamers under the present experimental conditions. In the absence of magnesium cation, one observes two peaks ; in contrast, four peaks (two large and two smaller) can be recognized in the presence of magnesium. One may additionally note the absence of any residual peak corresponding to the unfolded state that should be eluted like 30con ; this observation is in line with the existence of 30G folded states only at room temperature, expected from melting experiments ;
- the alterations of electrophoretic mobility. In agreement with their smaller size, the folded states migrate faster than the unfolded ones. In addition, the migration is considerably smaller in the presence of magnesium cation which denotes a stronger interaction of the negatively charged oligonucleotidic sequences with Mg^{2+} than with the monovalent cations.

Figure 10S is relevant to analyze the folding process that occurs when the unfolded 30G state initially contained in a lithium containing buffer is injected in a column conditioned with a potassium containing buffer. At the time scale of the electropherograms (450 s), one notices that the injected sample reached the equilibrium state. This observation :

- is in line with the results displayed in Figure 4a of the Main Text. During the latter experiment, the folding time scale was expected to lie in the 4 – 25 s range which indeed is smaller than the elution time (450 s) ;⁶
- suggests that the distribution of the folding rate constants among the foldamer population is rather narrow. Indeed the slowest folding time scale among the foldamer population should be lower than 200 s. All together, the different experiments suggest that the 4 – 200 s range at most for the folding time scale of 30G.

⁶It was impossible to decrease the elution time with the present experimental set up.

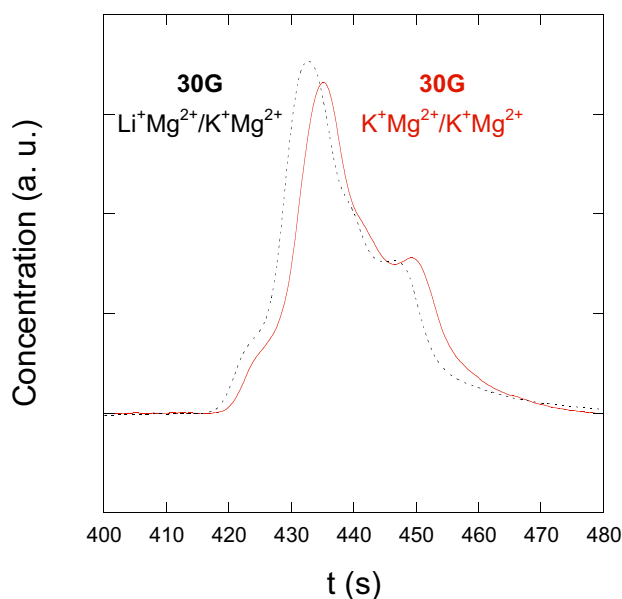


Figure 10S. Electropherograms of 30G in potassium containing buffers in the presence of magnesium cation. The notation cation/cation below the name of the sequence indicates the nature of the buffer cation in the injected oligonucleotide sample and in the column respectively. Buffer : 220 mM K (or Li) Hepes pH 7.45 containing 10 mM Mg^{2+} ; $T = 298\text{ K}$; Applied voltage : 10 kV; concentration of the injected samples 0.2 mM.

Figure 11S analyzes the unfolding process that takes place when the equilibrated mixture of 30G foldamers in a potassium containing buffer is injected in a column conditioned with a lithium containing buffer. At the time scale of the electropherogram (450 s), one again notices that the injected sample reached the unfolded equilibrium state. This observation :

- is in reasonable agreement with the results displayed in Figure 4b of the Main Text. During the latter experiment, the unfolding time scale was observed in the 70 – 500 s range and the latter values are essentially smaller than the elution time (450 s);⁷
- suggests that the distribution of the unfolding rate constants among the foldamer population is rather narrow. In particular, one notices the absence of any shoulder in the observed peak. Thus the slowest unfolding time scale within the foldamer population should not exceed about 450 s. All together, the different experiments suggest the 70 – 500 s range at most for the unfolding time scale of 30G.

⁷It was impossible to decrease the elution time with the present experimental set up.

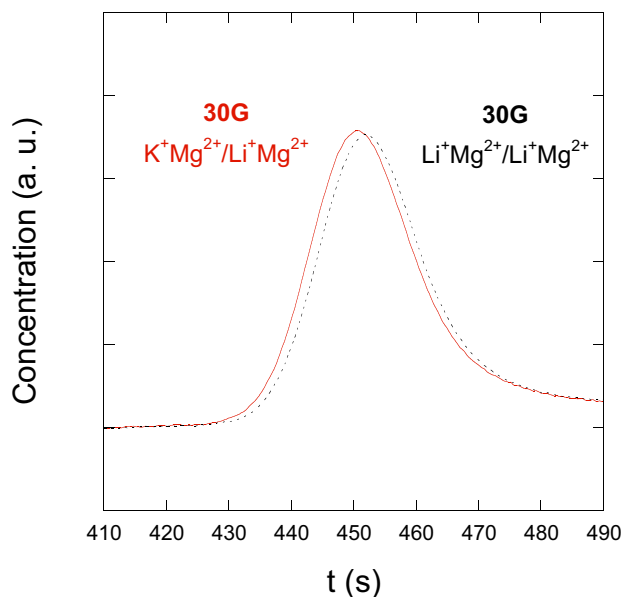


Figure 11S. Electropherograms of 30G in lithium containing buffers in the presence of magnesium cation. The notation cation/cation below the name of the sequence indicates the nature of the buffer cation in the injected oligonucleotide sample and in the column respectively. Buffer : 220 mM K (or Li) Hepes pH 7.45 containing 10 mM Mg^{2+} ; $T = 298 \text{ K}$; applied voltage = 12.5 kV ; concentration of the injected samples 0.2 mM.

Conclusion

We evidenced the presence of several 30G folded states at room temperature. At the same time, the combination of the results from the kinetic experiments relying on fluorescence emission and capillary electrophoresis led us to conclude that the rate constants of the different 30G foldamers are most probably contained in a range covering about one order of magnitude. This conclusion is in line with the results displayed in Figure 4 of the Main Text and the corresponding analyses.

The preceding electrophoretic measurements bear also some significance to evaluate the distribution of the thermodynamic constant associated to the folding process within the population of 30G folded states : The observation that the rate constants associated to folding and unfolding for the different 30G foldamers are most probably contained in a range covering about one order of magnitude suggests a similar distribution for the thermodynamic constant. Then the different foldamers should exhibit essentially similar thermodynamic properties.

Bibliographie

- [1] Vorlickova, M. ; Chladkova, J. ; Kejnovska, I. ; Fialova, M. ; Kypr, J. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 5851–5860.
- [2] Zuker, M. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 3406–3415. The free energies used are from the laboratory of John SantaLucia Jr (see for instance : SantaLucia, J. Jr *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, *95*, 1460–1465).
- [3] Tsourkas, A. ; Behlke, M. A. ; Rose, F. D. ; Bao, G. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, *31*, 1319–1330.

Chapitre 6

Réduction de la mobilité électrophorétique d'un oligonucléotide

Le Chapitre 2 a abordé les propriétés thermocinétiques de la réaction d'hybridation d'oligonucléotides d'ADN. Puisque le but de ce travail est de mettre en place des expériences révélant le couplage entre réaction, diffusion et migration dans ces systèmes, nous dressons ici une image des propriétés diffusives et électrophorétiques de l'ADN en nous restreignant aux comportements en solution libre, c'est-à-dire en l'absence de matrice de séparation. La Section 6.1 présente la théorie générale pour les polyélectrolytes et la Section 6.2 des résultats bibliographiques sur l'ADN. Finalement, la Section 6.3 présente nos résultats sur la réduction de la mobilité électrophorétique de l'ADN.

6.1 Aspects théoriques sur la diffusion et la mobilité électrophorétique des polyélectrolytes

L'ADN, qu'il soit simple ou double brin, est un polymère chargé. Pour comprendre les propriétés d'un polyélectrolyte en solution, il est nécessaire de définir un certain nombre d'échelles de longueur au niveau moléculaire¹. On considère une molécule formée de N monomères, chacun de longueur a [m]. La longueur de contour de la molécule est $L_c = Na$ [m] et son diamètre d [m]. Les répulsions électrostatiques entre les charges portées par la chaîne induisent une certaine rigidité sur une distance l_p [m], appelée longueur de persistance, qui représente plus exactement l'échelle des corrélations d'orientation le long d'une chaîne soumise à des fluctuations browniennes. Dans la théorie des polyélectrolytes, il est intéressant d'introduire la longueur de Kuhn, $l_K = 2l_p$, car on peut considérer la conformation d'un polyélectrolyte comme une marche au hasard de segments de longueur l_K quand $L_c \gg l_K$. Inversement, les chaînes très courtes ($l_K \geq L_c$) se comportent comme des tiges rigides. Le Tableau 6.1 recueille les longueurs caractéristiques de l'ADN simple et double brin [54]. Dans la suite, nous verrons comment la valeur relative de ces longueurs caractéristiques détermine la conformation du polymère et donc ses propriétés de diffusion. Nous aborderons brièvement l'étude des solutions ioniques, ce qui nous amènera à intro-

¹Pour écrire cette section, on s'est inspiré des revues de Viovy [53] et de Meagher et collaborateurs [54].

TAB. 6.1 – Longueur de Kuhn l_K , longueur d'un monomère a et diamètre d pour les molécules d'ADN simple brin (ssDNA) et double brin (dsDNA). D'après [54].

Molécule	l_K (nm)	a (nm)	d (nm)
ssDNA	6	0.43	1.1
dsDNA	100	0.34	2

duire la longueur de Debye, puis en fonction de sa valeur et de la taille du polyélectrolyte, nous distinguerons deux grands régimes électrophorétiques.

6.1.1 Diffusion et conformation d'un polymère

Le coefficient de diffusion d'un objet dont le coefficient de friction est ξ [kg s⁻¹] s'exprime par la relation d'Einstein

$$D = \frac{RT}{\xi}, \quad (6.1)$$

où R [JK⁻¹mol⁻¹] est la constante des gaz parfaits et T [K] la température. Le coefficient ξ exprime l'opposition au mouvement d'une molécule au sein d'un liquide et peut être calculé, pour les polymères, en utilisant le modèle de Zimm [55]. Pour ces objets, les interactions hydrodynamiques entre les monomères sont importantes et dominent la dynamique. De ce fait, la chaîne se comporte comme un objet sphérique imperméable et son coefficient de friction, dans un solvant de viscosité η [kg s⁻¹m⁻¹], est donné par la loi de Stokes

$$\xi = 6\pi\eta R_h. \quad (6.2)$$

Cette expression opère comme définition du rayon hydrodynamique R_h [m]. Le calcul du coefficient de diffusion d'un polymère revient ainsi à l'évaluation de R_h .

Pour des petits fragments qui se comportent comme une tige rigide ($L_c \leq l_K$), le rayon hydrodynamique peut être calculé par une expression dérivée par Tirado et García de la Torre [56]

$$R_h = \frac{1}{2} \frac{L_c}{\ln(L_c/d) + \gamma}, \quad (6.3)$$

où d est le diamètre de la chaîne et γ est un facteur de correction qui prend en compte les effets de taille finie.

Dans le cas de chaînes longues² ($L_c \gg l_k$), la conformation d'un polymère peut être assimilée à celle d'une chaîne gaussienne, c'est-à-dire à une molécule composée de segments organisés selon une marche au hasard où les interactions de volume exclu peuvent être négligées. On peut alors écrire

$$R_h \simeq \frac{2}{3} R_g \quad (6.4)$$

et

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{6} N a^2, \quad (6.5)$$

où R_g [m] est le rayon de giration du polymère, un paramètre définissant sa taille moyenne.

²Sans toutefois atteindre une longueur critique au delà de laquelle il est nécessaire de tenir compte des interactions de volume exclu (*vide infra*).

Le rayon de giration d'une molécule semiflexible, telle que l'ADN dans le régime $l_K < L_c \simeq 10l_K$, est mieux évalué par l'équation de Kratky-Porod

$$\langle R_g^2 \rangle \simeq \frac{l_K L_c}{6} \left[1 - 3 \left(\frac{l_K}{2L_c} + 6 \left(\frac{l_K}{2L_c} \right)^2 - 6 \left(\frac{l_K}{2L_c} \right)^3 (1 - e^{-2L_c/l_K}) \right) \right]. \quad (6.6)$$

Comme il n'existe pas de relation pour calculer R_h dans ce régime, cette équation est souvent utilisée, sans justification théorique, en combinaison avec (6.4).

Pour de très longues molécules, les interactions de volume exclu ne peuvent plus être négligées. La théorie de Flory pour des chaînes avec volume exclu décrit le bilan entre l'énergie de répulsion entre les monomères, qui gonfle la chaîne, et la perte entropique due à ce gonflement. Elle prédit une loi d'échelle

$$R_h \sim N^{3/5}. \quad (6.7)$$

Il est possible d'évaluer la taille critique en dessous de laquelle les interactions de volume exclu peuvent être négligées. Pour l'ADN simple brin, cette taille est de 400 bases tandis que pour le double brin elle est de 10 kilobases [53].

En résumé, pour calculer le coefficient de diffusion de l'ADN, il suffit de calculer son rayon hydrodynamique. On peut admettre une conformation de tige rigide jusqu'à une longueur d'environ 13 bases pour le ssDNA et de 300 paires de base pour le dsDNA et on utilisera (6.3) pour calculer R_h . Jusqu'à environ 300 bases pour le ssDNA et 3000 paires de bases pour le dsDNA, la molécule sera mieux décrite comme une chaîne semiflexible et on combinera (6.4) et (6.6). Enfin, au delà de ces limites et en deçà des longueurs de volume exclu, l'ADN est une chaîne gaussienne et le rayon hydrodynamique est mieux décrit par (6.4) et (6.5).

6.1.2 Solutions ioniques

Distribution des ions en solution

Lorsqu'un objet chargé est introduit dans un électrolyte, les ions en solution se distribuent autour de l'objet pour minimiser l'énergie libre du système. L'équilibre est déterminé par le bilan entre forces électrostatiques et browniennes. Il en résulte une région près de l'objet chargé, appelée double couche électrique, dans laquelle la densité ionique est différente de la densité moyenne dans le liquide. Cette double couche est composée d'une zone où les charges sont adsorbées de façon permanente, appelée couche de Stern, et d'une autre, plus externe, où les ions sont plus mobiles et qui s'appelle couche diffuse. L'épaisseur de la couche de Stern est de l'ordre de la longueur de Bjerrum

$$l_B = \frac{e^2}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 kT}, \quad (6.8)$$

où e [C] est la charge de l'électron, ϵ_r la constante diélectrique du solvant, ϵ_0 [F m⁻¹] la permittivité du vide et k [J K⁻¹] la constante de Boltzmann. Dans l'eau, à température ambiante, l_B vaut 0.7 nm.

Au delà de la couche de Stern et dans le cadre d'une théorie de champ moyen, la distribution des ions mobiles peut être calculée en utilisant l'équation de Poisson-Boltzmann

$$\epsilon_r\epsilon_0 \nabla^2 \phi = -e \sum_i z_i C_i \exp\left(\frac{ez_i \phi}{kT}\right), \quad (6.9)$$

TAB. 6.2 – Ordre de grandeur de la longueur de Debye à température ambiante dans différentes solutions aqueuses.

Solution	λ_D (nm)
Eau pure théorique	$\simeq 10^3$
Eau ultra-pure utilisée en laboratoire	$\simeq 10^2$
NaCl 1 mM	$\simeq 10$
NaCl 100 mM	$\simeq 1$
NaCl 1 M	$\simeq 0.3$

où ez_i [C] est la charge et C_i [m^{-3}] la concentration de l'espèce i et ϕ [V] le potentiel électrique dans la solution. La linéarisation de (6.9) fournit l'équation de Debye-Hückel, applicable à la couche diffuse : le champ électrique créé dans un électrolyte par un objet chargé est écranté et le potentiel décroît exponentiellement avec la distance comme

$$\phi(x) = \phi(0)e^{-x/\lambda_D}, \quad (6.10)$$

où $\phi(0)$ est le potentiel à la surface de l'objet et

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 kT}{e^2 \sum_i z_i^2 C_i}}, \quad (6.11)$$

la longueur de Debye, mesure la distance au delà de laquelle les forces électrostatiques sont écrantées dans une solution. Elle est fixée par la concentration d'ions en solution et dans le Tableau 6.2 nous avons calculé sa valeur pour différentes conditions salines.

Polyélectrolytes en solution

La théorie de condensation de Manning décrit la distribution des contre-ions près d'un électrolyte [57]. Deux cas limites peuvent être considérés en fonction du paramètre adimensionnel $\rho = l_B/a$, rapport entre la longueur de Bjerrum et la distance entre deux charges dans le polymère. Lorsque $\rho \ll 1$, le polyélectrolyte est faiblement chargé et il est possible de linéariser l'équation de Poisson-Boltzmann : la couche de Stern n'existe pas et il n'y a autour de la molécule qu'une couche diffuse de contre-ions. Dans le cas $\rho > 1$, les contre-ions proches du polyélectrolyte condensent sur celui-ci formant la couche de Stern et réduisant la charge surfacique. La théorie de condensation de Manning prédit que les contre-ions se distribueront de sorte à atteindre $\rho \simeq 1$. Dans le cas de l'ADN, $\rho > 1$ et sa charge effective est donc fortement réduite par l'effet de la condensation³.

6.1.3 Électrophorèse

Lorsqu'on applique un champ électrique E [V m^{-1}] dans une solution ionique, une force sera exercée sur le soluté chargé mais aussi, et en sens contraire, sur le nuage de

³Pour dsDNA, $a = 0.34$ nm et $\rho = 2$. Pour ssDNA, $a = 0.43$ nm et $\rho = 1.5$. Nous avons pris $l_B \simeq 0.7$ nm.

contre-ions qui l'entoure. Dans la limite des faibles champs électriques, la vitesse du soluté s'écrit

$$v = \mu E, \quad (6.12)$$

où μ [$\text{V m}^2\text{s}^{-1}$] est sa mobilité électrophorétique.

Cas simples

Il est possible de calculer μ dans le cas d'un objet sphérique de rayon R [m]. Cependant, le calcul complet est assez complexe car il doit tenir compte du couplage entre les équations de l'électrostatique et de l'hydrodynamique. On peut extraire, dans deux cas limites, des résultats simples et importants.

Dans le cas où la particule est petite par rapport à la longueur de Debye, les forces électrique et visqueuse peuvent être calculées séparément et

$$\mu = \frac{2\sigma R}{3\eta} = \frac{Q}{6\pi\eta R} = \frac{Q}{\xi} \quad (R \ll \lambda_D), \quad (6.13)$$

où σ [Cm^{-2}] est la densité de charge surfacique de la molécule, Q [C] sa charge totale et ξ le coefficient de friction d'une sphère de rayon R d'après (6.2)⁴.

Dans la limite opposée d'une particule très grande, le champ électrique est non-nul seulement dans une couche d'épaisseur λ_D autour de la particule. La vitesse devient donc indépendante de la taille et de la forme de la particule et

$$\mu = \frac{\sigma \lambda_D}{\eta} \quad (R \gg \lambda_D). \quad (6.14)$$

Polyélectrolytes

Quatre longueurs caractéristiques définissent les propriétés d'un polyélectrolyte telle que l'ADN dans une solution ionique : la taille du monomère a , la longueur de Debye λ_D , la longueur de Kuhn l_K et le rayon de giration R_g . La valeur de a renseigne sur les effets de condensation. La valeur relative de λ_D , l_K et R_g fait émerger quatre régimes conformationnels qui donnent lieu à deux régimes électrophorétiques ($R_g < \lambda_D$ et $R_g > \lambda_D$) comme l'illustre la Figure 6.1.

Rayon de giration inférieur à la longueur de Debye ($R_g < \lambda_D$) : Dans ce régime, nous avons un objet chargé, entouré de contre-ions non condensés. Le mouvement électrophorétique d'un tel objet est essentiellement équivalent à un mouvement de sédimentation, c'est-à-dire, un mouvement résultant de l'action d'une force non-électrique qui agirait seulement sur la chaîne. Dans ce cas, la mobilité s'écrit comme le rapport entre la charge totale de la chaîne Q et le coefficient de friction hydrodynamique ξ ,

$$\mu = \frac{Q}{\xi}, \quad (6.15)$$

où ξ est donnée par (6.2).

⁴Ce n'est que dans cette limite $R \ll \lambda_D$ que l'équation de Nernst-Einstein $\frac{\mu}{D} = \frac{Q}{kT}$, reliant la mobilité électrophorétique et le coefficient de diffusion, est valable.

Deux types de conformations peuvent être considérés pour le calcul du rayon hydrodynamique R_h . Lorsque $l_K > R_g$, la chaîne prend la forme d'une tige rigide avec R_h donné par (6.3). Quand $\lambda_D > R_g > l_K$, la chaîne est semiflexible ou gaussienne (en fonction du rapport R_g/l_K) et R_h est calculé par une combinaison de (6.6) et (6.4).

Rayon de giration supérieure à la longueur de Debye ($R_g > \lambda_D$) : Dans ce cas, le polymère se comporte, vis-à-vis de l'électrophorèse, comme une molécule formée de sous-unités de rayon λ_D . Les interactions hydrodynamiques entre ces sous-unités sont écrantées par les interactions électrostatiques et la mobilité électrophorétique du polyélectrolyte est donnée par celle d'une sous-unité. Elle est calculée à partir de la charge de cette sous-unité $Q(\lambda_D)$ qui est simplement proportionnelle à λ_D , et de son rayon hydrodynamique $R_h(\lambda_D)$, lui aussi ne dépendant que de λ_D :

$$\mu = \frac{Q(\lambda_D)}{6\pi\eta R_h(\lambda_D)}. \quad (6.16)$$

Dans ce régime on dit que le polyélectrolyte est en « chute libre » ou *free draining* et sa mobilité est donc indépendante de sa longueur.

Du point de vue de la conformation, trois régimes peuvent être distingués. Dans le cas $l_K > R_g$, le polymère se comporte comme une tige rigide de longueur L_c et chaque sous-unité est une tige de longueur λ_D . Quand $R_g \gg l_K > \lambda_D$, on a une chaîne gaussienne — dans la limite où R_g n'est pas trop grand et les effets de volume exclu peuvent être négligés — formée de tiges rigides de longueur l_K chacune composée de sous-unités de longueur λ_D . Dans ces deux cas $Q(\lambda_D) \simeq e\lambda_D/a$ et $R_h \simeq \frac{1}{2} \frac{\lambda_D}{\ln(\lambda_D)}$ et

$$\mu = \frac{e}{3\pi\eta a} \ln\left(\frac{\lambda_D}{a}\right) \sim \ln\left(\frac{1}{\sqrt{I}}\right), \quad (6.17)$$

où I [mol L⁻¹] est la force ionique de la solution.

Enfin, quand $R_g \gg \lambda_D > l_K$, nous avons une chaîne semiflexible formée de sous-unités de longueur λ_D , chacune composée d'une chaîne gaussienne contenant des sous-unités de longueur l_K . Ici $Q(\lambda_D) \simeq 6e\lambda_D^2/al_k$ et $R_h \simeq 6\pi\eta\lambda_D$ et la mobilité est donnée par

$$\mu \simeq \frac{e\lambda_D}{\pi\eta al_k} \sim \frac{1}{\sqrt{I}} \quad (6.18)$$

Il est important de noter que nous n'avons dérivé ici que des lois d'échelle sans tenir compte des effets de bords. Ils sont importants pour les ssDNA ayant moins de que 20 bases et les dsDNA en dessous de 400 paires de bases [59].

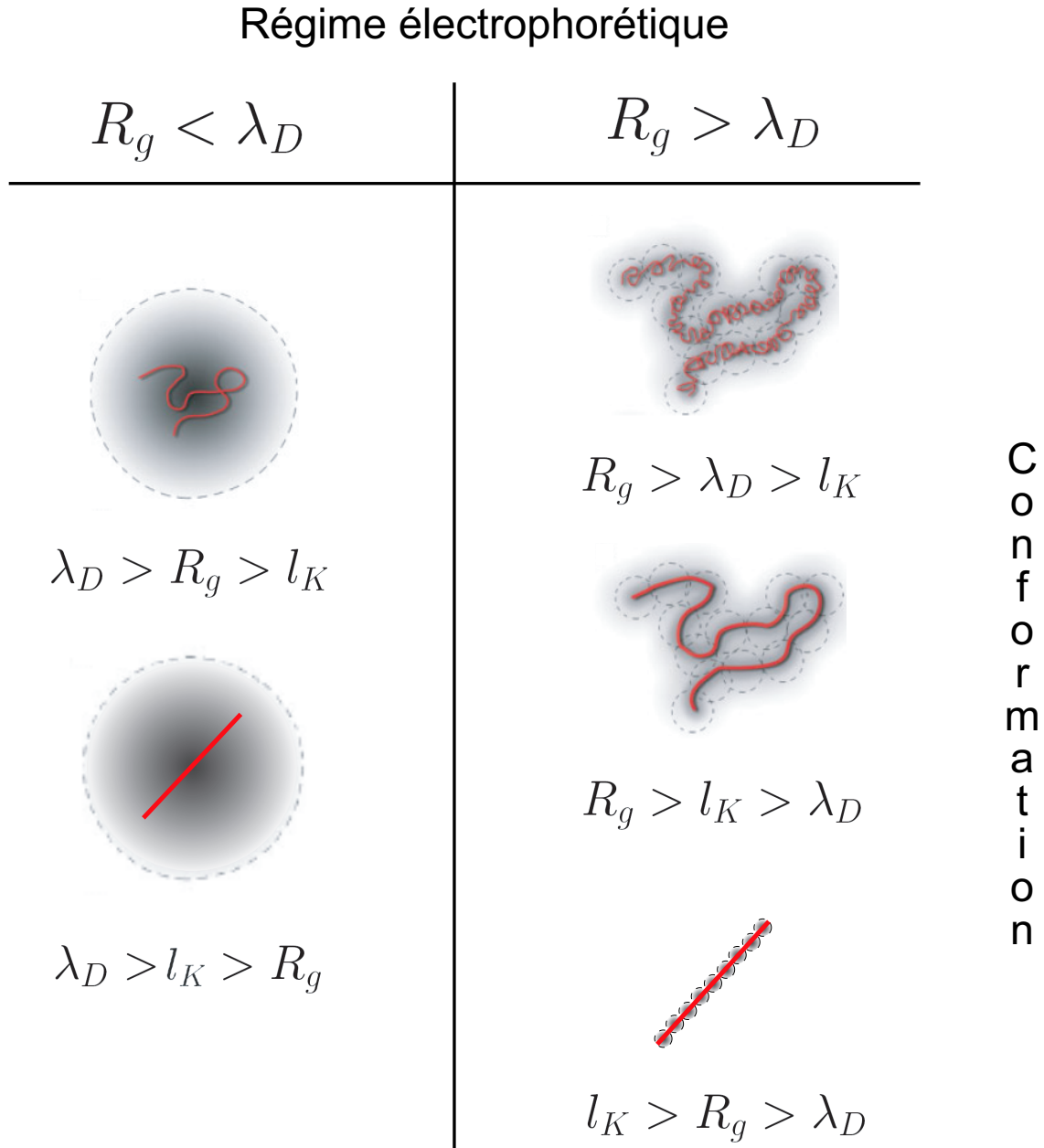


FIG. 6.1 – Dessins schématiques des régimes électrophorétiques et conformationnels d'un polyelectrolyte selon la valeur relative du rayon de giration R_g , la longueur de Kuhn l_K et la longueur de Debye λ_D . La longueur de Debye est indiquée par des cercles pointillés. Figure inspirée de [58] et [54].

6.2 Données bibliographiques sur le coefficient de diffusion et la mobilité électrophorétique de l'ADN

6.2.1 Coefficients de diffusion

Le coefficient de diffusion de l'ADN double brin (dsDNA) en solution libre a été étudié par de nombreuses techniques comme la diffusion de la lumière [60], des techniques de molécule unique [61], la *field-flow fractionation* [62] ou le FRAP (*Fluorescence recovery after photobleaching*, cf. Paragraphe 9.1.3, p. 162) [63]. Le coefficient de diffusion de simples brins d'ADN (ssDNA) a été moins largement étudié, assurément car il est plus difficile d'en obtenir. Tinland et collaborateurs ont réalisé des mesures dans une gamme de longueurs allant de 200 à 5000 bases [64] en conditions dénaturantes. Des mesures sur de petits oligonucléotides ont été menées par RMN [65] et récemment dans un dispositif microfluidique [66].

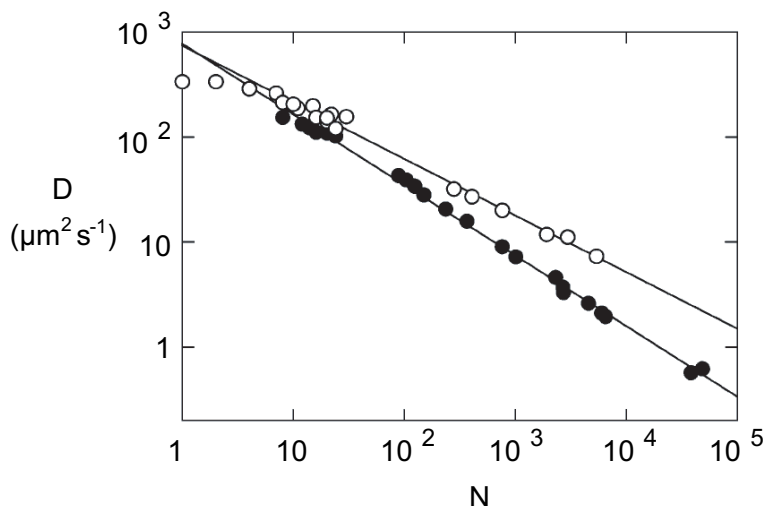


FIG. 6.2 – Coefficients de diffusion à 20 ° C d'ADN simple (cercles vides) et double brin (cercles pleins) en fonction de sa longueur en nombre de bases (N), déterminés dans la littérature par différentes techniques. Figure extraite de [59].

Enfin, Stellwagen et collaborateurs ont réalisé des mesures pour ssDNA et dsDNA en électrophorèse capillaire [67, 68] et ont récemment proposé une vue d'ensemble en comparant un grand nombre de résultats existants [59]. D'après ces auteurs, le coefficient de diffusion de l'ADN double brin entre 30 et 3×10^4 paires de bases, mesuré par un grand nombre de techniques, peut être ajusté par une loi de type :

$$D_{dsDNA} = 7.73 \times 10^{-10} \times N^{-0.67} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}, \quad (6.19)$$

où l'exposant est proche de -0.70 qui peut être calculé à partir de la théorie de Yamakawa et Fuji pour des chaînes de type vers en l'absence de volume exclu. Les travaux de Nkodo, réalisés sur des dsDNA marqués fluorescents entre 10^3 et 10^5 paires de bases, fournissent en revanche un exposant de -0.57 [63]. Toujours selon Stellwagen, les coefficients de diffusion

des dsDNA peuvent être décrits, entre 10 et 10^3 paires de bases, en combinant (6.1) à (6.3), équations applicables à des tiges rigides.

Dans le travail de Stellwagen [59], une équation est aussi dérivée pour ajuster les données expérimentales pour le coefficient de diffusion des ssDNA entre 10 et 10^4 bases :

$$D_{ssDNA} = 7.38 \times 10^{-10} \times N^{-0.54} \text{m}^2\text{s}^{-1}, \quad (6.20)$$

qui est un exposant intermédiaire entre celui attendu pour une chaîne gaussienne en l'absence (-0.50) et en présence d'interactions de volume exclu (-0.60).

6.2.2 Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique de l'ADN a été largement étudiée. La grande majorité de ces travaux se centre sur des cas d'intérêt pour la Biologie Moléculaire, à savoir : des fragments d'ADN double brin de longueur supérieure à plusieurs centaines de paires de bases et dans des milieux de séparation tels que les gels d'agarose ou de polyacrylamide [69].

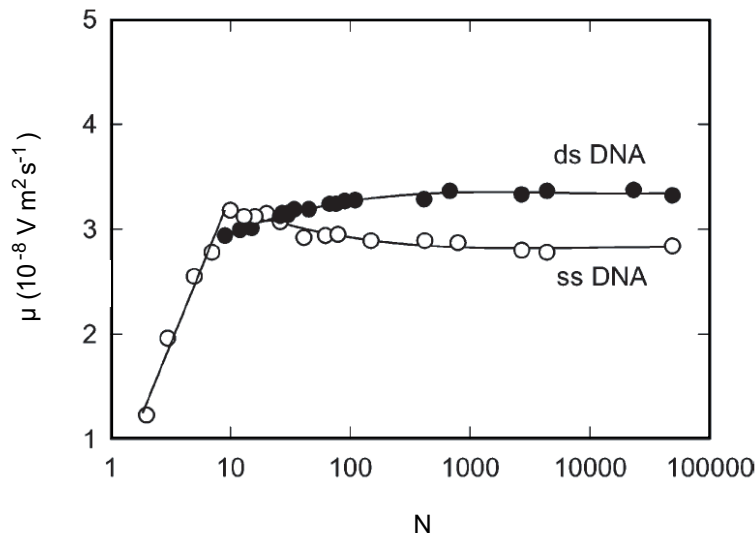


FIG. 6.3 – Mobilité électrophorétique en fonction de la longueur en nombre de bases de l'ADN double (dsDNA, cercles pleins) et simple brin (ssDNA, cercles vides). Tampon Tris-acétate 40 mM, 20 ° C. Figure extraite avec modifications de [59].

C'est de nouveau le groupe de Stellwagen qui a le plus étudié la mobilité de l'ADN en solution libre [59]. Selon ses résultats, μ varie seulement d'environ 10% pour des fragments entre 10 et 400 bases et demeure essentiellement constante entre 400 et 10^6 bases, autant pour les simples que pour les doubles brins. Ces résultats sont en bon accord avec les prévisions théoriques qui considèrent l'ADN comme un *free draining polymer* de mobilité électrophorétique constante.

6.3 Résultats : Réduction de la mobilité

Nous rappelons qu’une réaction d’hybridation entre deux simples brins d’ADN, A et B, pour former un double brin C peut s’écrire



Afin de mettre en évidence le phénomène d’électrodifusion dans ce système il est nécessaire que les mobilités électrophorétiques de A et C, μ_A et μ_C , soient les plus différentes possibles (*cf.* (1.13), p. 24). Nous introduisons le rapport $h = \frac{\mu_C}{\mu_A}$ et nous recherchons des conditions telles que $h \rightarrow 0$. Comme le suggère la Figure 6.3, les différences de mobilité entre simples et doubles brins d’ADN sont minimales pour les longueurs allant de 10 à 100 bases. Nous avons, dans un premier temps, mesuré les mobilités électrophorétiques de divers oligonucléotides utilisés lors de ce travail. Ces résultats sont présentés dans le Tableau 6.3. Ils confirment que, dans nos systèmes, les différences de mobilités électrophorétiques sont très faibles. Ces résultats empêchent donc la mise en évidence du phénomène d’électrodifusion dans des systèmes oligonucléotidiques non modifiés. Nous avons donc envisagé d’attacher un ballast hydrodynamique à l’espèce B pour en modifier la mobilité électrophorétique ainsi que celle de C.

TAB. 6.3 – Mobilités électrophorétiques en solution libre d’oligonucléotides simple brin utilisés dans cet étude. Ces valeurs ont été obtenues en électrophorèse capillaire et sont corrigées de l’électroosmose. Tampon NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 20 ° C. rhg et tex indiquent un marquage avec rhodamine-green ou texas-red, le chiffre représente la longueur en bases.

Échantillon	Mobilité ($10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$)
rhgTGT9	-36.9
texTGT9	-37.1
TGT9	-36.7
ACA9	-37.0
rhgTGT13	-37.6
TGT13	-38.0
TTT13	-37.7
ACA13	-39.8
ACA17	-39.0
chACA19	-35.8
rhgACA27	-39.4
ACA27	-40.2
rhgACA105	-39.9

L’ajout d’un ballast hydrodynamique neutre pour modifier la mobilité électrophorétique d’une molécule d’ADN simple brin a été proposé pour la première fois par Mayer et collaborateurs [70], avec des applications au séquençage, sous le nom de *end-labeled free-solution electrophoresis* (ELFSE) [54, 58]. Dans ce travail, le ballast utilisé est une

protéine, la streptavidine, liée à l'ADN par une biotine (*vide infra*). Ce système est, avec d'autres peptides, le seul marqueur utilisé à notre connaissance en ELFSE.

Nous avons donc mis en œuvre la stratégie biotine-streptavidine dans nos systèmes puis exploré deux autres approches en tenant compte du fait que, dans nos expériences, l'ajout du ballast doit respecter les critères suivants :

- Ne pas modifier sensiblement la cinétique de la réaction (6.21).
- Être compatible avec une technique d'observation par fluorescence.
- Ne pas s'adsorber sur les parois du microdispositif présenté à la Partie II.

6.3.1 Biotine – Streptavidine

L'avidine et la streptavidine sont deux protéines de structure très similaire⁵ qui présentent quatre sites de reconnaissance pour la biotine, une petite molécule organique aussi connue sous le nom de vitamine H (la formule chimique est disponible dans l'Annexe F). L'interaction biotine-streptavidine/avidine implique une des plus fortes liaisons non-covalentes existant en Biologie —la constante d'affinité étant supérieure à 10^{15} — et elle constitue un outil de choix pour le marquage en Biologie Moléculaire.

Nous avons utilisé des oligonucléotides liés de façon covalente à une molécule de biotine. Ils ont été mis en présence de quatre types de ballasts streptavidine (Tableau 6.4) et nous avons mesuré leur vitesse électrophorétique dans le microdispositif présenté au Chapitre 8 (*cf.* Figure 8.18, p. 155).

TAB. 6.4 – Liste des différents ballasts hydrodynamiques utilisés pour réduire la mobilité électrophorétique d'oligonucléotides marqués biotine.

Nom	Fabriquant	Description	Rayon (nm)
Streptavidine	NEB	4 sites biotine, $pI = 6$	2
Avidine	Fluka	4 sites biotine, $pI = 10$	2
Billes de Neutravidine	Molecular Probes	Neutravidine adsorbée sur billes de latex	40
Billes de Streptavidine	Sigma	Streptavidine adsorbée sur colloïdes d'or	10

De tous les ballasts considérés, le seul donnant des résultats satisfaisants est la streptavidine. En effet, l'avidine précipite en présence du polyanion ADN car elle est chargée positivement à $pH = 7$ ($pH < pI$). Pour leur part, les billes de neutravidine et de streptavidine présentent une forte adsorption sur les parois de PDMS du microdispositif. La streptavidine, qui a montré aussi une certaine tendance à s'adsorber, est capable de réduire d'environ 70% ($h = 0.27$) la mobilité d'un oligonucléotide 9-mère simple brin marqué en 5' avec un groupement biotine (Figure 6.4), ce qui est tout à fait satisfaisant pour l'application considérée.

Cependant, dans le protocole d'électrodifusion, il est nécessaire que l'oligonucléotide marqué biotine-streptavidine (l'espèce B de (6.21)) soit présent en excès, dans toute la

⁵Même si elles proviennent de sources très différentes. L'avidine se trouve dans le blanc d'œuf et la streptavidine est fabriquée par la levure *Streptomyces avidinii*.

chambre d'analyse, à des concentrations entre 1 et 10 μM . La streptavidine étant une molécule assez coûteuse, nous avons exploré d'autres approches de réduction de la mobilité, en particulier ne présentant pas de phénomène d'adsorption.

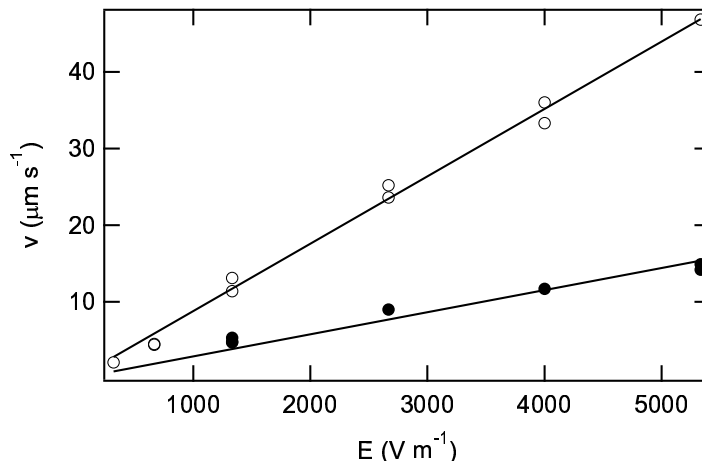


FIG. 6.4 – Vitesse de migration mesurée dans le microlaboratoire (*cf.* Paragraphe 8.8.1, p. 155) en fonction du champ électrique appliqué pour un oligonucléotide 9-mère marqué biotine (rhgACA9bio) à 10 μM en l'absence (cercles vides) et en présence (cercles pleins) de streptavidine 40 μM en sites biotine. Agarose 1%, tampon $\text{Mg}(\text{OH})_2/\text{Pipes}$ 10/20 mM pH 7, 25 °C. En l'absence de streptavidine, on obtient $\mu_{app} = 9 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ et en sa présence $\mu_{app} = 3 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

6.3.2 Thiol – Colloïde d'or

Un article récent de Sandström et Åkerman [71] mesure la mobilité électrophorétique de brins d'ADN liés de façon covalente, par un groupement thiol, à des colloïdes d'or de 7 nm de diamètre. Dans leur travail, ces auteurs montrent qu'environ une centaine de simples brins de 12 bases de longueur sont attachés à chaque bille et présentent une mobilité de $52 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, tandis que le même colloïde recouvert de doubles brins d'ADN a une mobilité électrophorétique de $75 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Cette approche a attiré notre attention, en particulier parce qu'elle se traduit par une augmentation de la mobilité du double brin, ce qui permettrait d'appliquer des champs électriques moins intenses dans l'expérience d'électrodifusion. Malheureusement, cette approche s'est révélée incompatible avec une méthode d'observation par fluorescence : les colloïdes d'or sont en effet des *quenchers* de fluorescence extrêmement efficaces.

6.3.3 Cholestéryl – Micelle

Nous avons aussi envisagé d'utiliser une micelle neutre, un ballast très abordable, avec des oligonucléotides marqués cholestéryl. Le groupement cholestéryl, très hydrophobe, s'insère dans la micelle et, même si on s'attend à ce que cette insertion soit réversible, l'espèce moyenne en l'équilibre dynamique devrait présenter une mobilité électrophorétique moindre.

La mise au point de cette approche a été particulièrement simple dans le microlaboratoire. Une solution de Triton-X100 (*cf.* Annexe F pour la formule chimique), au-dessus de la concentration micellaire critique, réduit la mobilité électrophorétique apparente d'un oligonucléotide simple brin de 19 bases marqué cholestéryl de 40% ($h = 0.6$) sans changer la mobilité d'un oligonucléotide 13-mère non-marqué (Figure 6.5). Ces mesures sont en accord avec celles réalisées en électrophorèse capillaire. Dans cette dernière technique, les mobilités électrophorétiques sont corrigées de l'électroosmose et on obtient $h = 0.4$.

Outre ses performances de réduction de la mobilité, l'approche cholestéryl-micelle ne présente pas de problèmes d'adsorption sur les parois et nous avons vu au Chapitre 2 qu'elle ne modifie pas la cinétique de la réaction d'hybridation. Il est ainsi devenu notre système de choix pour réduire la mobilité du double brin.

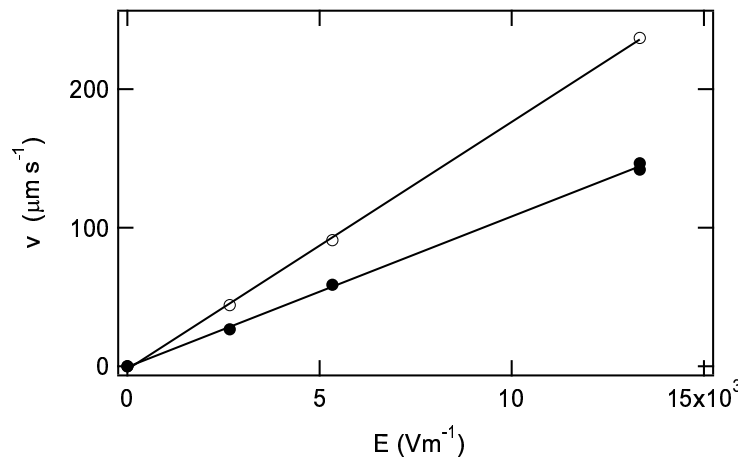


FIG. 6.5 – Vitesse de migration mesurée dans le microlaboratoire (*cf.* Paragraphe 8.8.1, p. 155) en fonction du champ électrique appliqué pour rhgTGT13 (cercles vides) et chACA19rhg (cercles pleins) dans une solution contenant du Triton-X100 0.1% (w/w). Tampon Na(OH)/Hepes 25/50 mM pH 7.5, agarose 1%, 20 °C. On obtient $\mu_{app} = 18 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ et $\mu_{app} = 11 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivement.

Deuxième partie

Un microlaboratoire utilisant la
diffusion comme critère analytique

Chapitre 7

Design d'un dispositif pour le contrôle cinétique du coefficient de diffusion

7.1 Dimensionnement du dispositif

Le principe de l'expérience d'électrodifusion décrite dans l'Introduction (Section 1.2, p. 24) est simple ; il s'agit d'enregistrer l'évolution d'un profil de concentration au cours du temps pendant qu'on applique un champ électrique alternatif (Figure 7.1). La quantification de l'élargissement de ce profil nous permettra d'accéder au coefficient de diffusion total (7.3) et dans le cas où $D_0 \leq D_{disp}$ à la contribution dispersive. Nous concevons l'expérience de la manière suivante : i) Une condition initiale de concentration de l'espèce A est créée dans un capillaire contenant l'espèce B ; ii) L'application d'un champ électrique alternatif provoque un déplacement du pic d'une longueur l_{migr} [m] pendant une demi-période et un élargissement l_{diff} [m] à la fin de la durée de l'expérience (Figure 7.1). Le profil de concentration est enregistré à l'aide d'une technique d'imagerie adaptée (transmission ou fluorescence). On se place ici dans une perspective d'expérimentateur en se demandant les caractéristiques que devra avoir le dispositif expérimental pour observer le phénomène d'électrodifusion en champ électrique alternatif.

Considérons la réaction



Lorsque l'espèce B est en excès et sa concentration B [mol L⁻¹] est uniforme, (7.1) prend la forme



avec $\kappa_1 = k_1 B$ [s⁻¹]. Ce système est soumis à un champ électrique alternatif sinusoïdale $E(t) = E \sin(\omega t)$, d'amplitude E [V m⁻¹] et pulsation ω [rad s⁻¹]. Pour les espèces A et C on note D_A et D_C ses coefficients de diffusion et μ_A et μ_C ses mobilités électrophorétiques, respectivement. On s'intéresse au phénomène d'électrodifusion en champ électrique alternatif. Par souci de clarté, nous rappelons que le coefficient de diffusion effectif de l'espèce moyenne {A, C} est

$$D = D_0 + D_{disp}, \quad (7.3)$$

où

$$D_0 = \frac{k_2}{\kappa_1 + k_2} D_A + \frac{\kappa_1}{\kappa_1 + k_2} D_C \quad (7.4)$$

est le coefficient de diffusion de l'espèce moyenne en absence de champ électrique et

$$D_{disp} = E^2 (\mu_A - \mu_C)^2 \frac{\kappa_1 k_2}{(\kappa_1 + k_2)^3} \left[\frac{1}{2(1 + \frac{\omega^2}{(\kappa_1 + k_2)^2})} \right] \quad (7.5)$$

est le terme dispersif résultant du couplage entre la réaction chimique et le champ électrique alternatif.

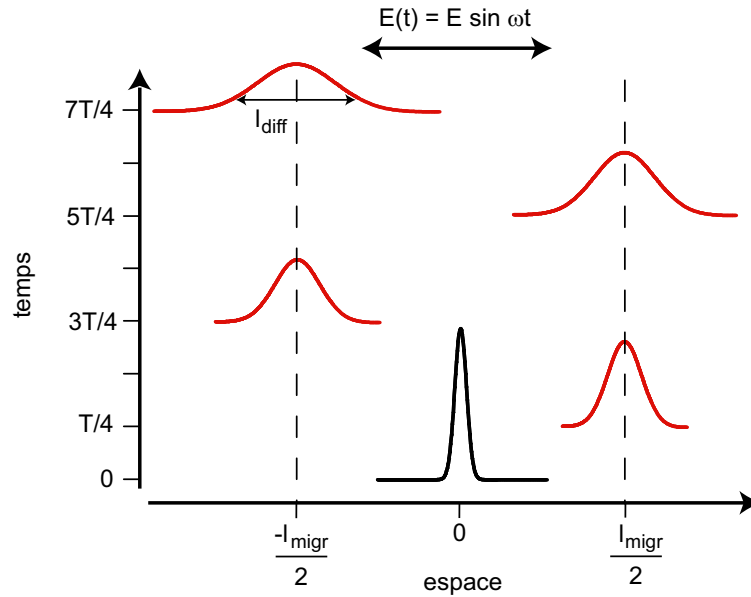


FIG. 7.1 – Schéma de l'expérience d'électrodifusion. Lorsqu'on applique un champ électrique alternatif $E(t) = E \sin \omega t$ sur un profil de concentration situé initialement à l'origine, le pic se déplace sous l'effet de celui-ci et migre sur une distance l_{migr} durant une demie période du champ électrique $T/2 = \pi/\omega$. Dans le même temps, le pic s'élargit du fait de la diffusion/dispersion sur une largeur l_{diff} .

Pour le dimensionnement du dispositif, on se place à la condition de résonance $k_1 B = k_2 = \omega/2$. Les équations (7.4) et (7.5) prennent la forme

$$D_0 = \frac{1}{2} D_A + \frac{1}{2} D_C \quad (7.6)$$

$$D_{disp} = [E(\mu_A - \mu_C)]^2 \frac{1}{32k_2}. \quad (7.7)$$

Définissons les nombres adimensionnels

$$h = \frac{D_C}{D_A} = \frac{\mu_C}{\mu_A}, \quad g = \frac{D_{disp}}{D_A}, \quad j = \frac{t}{T}, \quad (7.8)$$

où h ($0 \leq h \leq 1$) est le facteur de réduction de la mobilité¹, g ($g \geq 1$) quantifie la contribution dispersive au coefficient de diffusion et j est le temps adimensionné par la période T [s] du champ électrique alternatif,

$$T = \frac{2\pi}{\omega} = \frac{\pi}{k_2}. \quad (7.9)$$

En combinant (7.3), (7.4) et (7.8), on obtient pour le coefficient de diffusion de l'espèce moyenne $\{A, C\}$ à la résonance

$$D = \frac{1}{2}(1 + h + 2g)D_A. \quad (7.10)$$

Nous obtenons l'amplitude du champ électrique E_g [V m⁻¹] nécessaire pour générer un terme dispersif d'amplitude $D_{disp} = gD_A$ d'après (7.7) et (7.8)

$$E_g = \frac{4\sqrt{2g}}{1-h} \frac{\sqrt{k_2 D_A}}{\mu_A}, \quad (7.11)$$

qui est proportionnel à la racine carrée de la constante cinétique de dissociation k_2 .

Lors de l'expérience, le barycentre du profil de concentration initial se déplace par migration et sa largeur augmente à cause de la diffusion (Figure 7.1). La longueur de migration pendant une demi période est

$$l_{migr} = \bar{\mu} E_g \frac{T}{2}, \quad (7.12)$$

où $\bar{\mu} = 1/2(1 + h)\mu_A$ est la mobilité électrophorétique de l'espèce moyenne $\{A, C\}$. En remplaçant (7.9), (7.10) et (7.11) dans l'équation précédente, on obtient

$$l_{migr} = \pi \sqrt{2g} \frac{1+h}{1-h} \sqrt{\frac{D_A}{k_2}}. \quad (7.13)$$

Pour calculer la longueur due à la diffusion au cours de l'expérience, on considère que le profil de concentration évolue comme une gaussienne de variance $\sigma^2 = 2Dt$ associée à une la largeur totale l_{diff} définie comme celle qui représente 90% de la surface sous la courbe. Tenant compte de (7.8), (7.9) et (7.10) on obtient

$$l_{diff} = 3.2\sigma = 3.2\sqrt{\pi j(1+h+2g)} \sqrt{\frac{D_A}{k_2}}. \quad (7.14)$$

Si l'on envisage de suivre l'excursion du profil de concentration par une méthode d'imagerie, la largeur du champ de vue $l_{tot} = l_{migr} + l_{diff}$ devra être

$$l_{tot} = \sqrt{\pi} \left(3.2\sqrt{j(1+h+2g)} + \frac{1+h}{1-h} \sqrt{2\pi g} \right) \sqrt{\frac{D_A}{k_2}}. \quad (7.15)$$

Enfin, calculons la durée totale de l'expérience t_{exp} [s]. Dans les équations précédentes, j est le temps adimensionné par la période du champ électrique. Pour que le phénomène

¹Nous considérons ici que le même facteur s'applique au rapport des coefficients de diffusion et des mobilités électrophorétiques entre l'espèce A et C (*cf.* Chapitre 6).

d'électrodiffusion se manifeste, il faut considérer des temps plus longs que le temps de relaxation de la réaction chimique (7.2) $\tau_\chi = (\kappa_1 + k_2)^{-1}$ [s]. À la résonance $\tau_\chi = (2k_2)^{-1}$ et la période du champ électrique appliqué vaut $T = \pi/k_2 = 2\pi\tau_\chi$. Ainsi, une période est le temps minimale d'expérience. Si l'on considère j périodes,

$$t_{exp} = \frac{j\pi}{k_2}. \quad (7.16)$$

7.2 Discussion

Les équations (7.9), (7.11), (7.15) et (7.16) montrent que la constante cinétique de dissociation k_2 domine la physique du problème. Plus sa valeur sera grande, moins le phénomène d'électrodiffusion sera important. Ce comportement peut se comprendre car plus k_2 est grand, moins la largeur de la distribution de probabilité des temps de vie de l'état C est importante, ce qui a comme conséquence une dispersion plus faible pour une amplitude du champ donnée².

En conséquence, pour une amplitude du terme de dispersion g donnée, il est nécessaire d'appliquer un champ électrique plus important quand la cinétique est plus rapide (7.11). Ceci est une contrainte expérimentale majeure car l'application d'un champ électrique d'amplitude importante génère de l'échauffement par effet Joule. Nous observons aussi que (7.11) diverge pour $h \rightarrow 1$ ce qui souligne l'importance de la différence de mobilité électrophorétique entre les espèces A et C pour observer le phénomène d'électrodiffusion. Enfin, on note que la valeur de E_g varie comme $\sqrt{g}$.

Les cinétiques rapides vont dans le sens d'une réduction des échelles de temps (7.16) et longueur (7.15) impliquées et si on est capable de réaliser une condition initiale suffisamment fine, cette technique peut fournir un test analytique très rapide.

7.3 Application au système oligonucléotidique

Dans la Figure 7.2, nous avons calculé le champ électrique E_g et la longueur l_{tot} en fonction de la constante cinétique de dissociation k_2 en utilisant le coefficient de diffusion et la mobilité électrophorétique d'un oligonucléotide 9-mère et pour des valeurs du facteur de réduction de la mobilité comme ceux obtenus au Chapitre 6. La longueur parcourue lors de l'expérience est inversement proportionnelle à k_2 , ce qui nous amène pour des systèmes chimique « rapides » à une réduction de la taille du dispositif expérimental.

La banque de couples oligonucléotidiques étudiée au Chapitre 2 présente des constantes cinétiques de dissociation k_2 entre 10^{-5} et 10^2 s⁻¹ et des constantes cinétiques d'association k_1 entre 10^4 et 10^6 M⁻¹s⁻¹. Nous avons voulu construire un dispositif qui permette la réalisation de l'expérience d'électrodiffusion pour le plus grand nombre possible de séquences. Le dimensionnement que l'on vient d'effectuer fixe les contraintes sur les valeurs de k_2 accessibles (Figure 7.2). Ainsi, la valeur maximale k_2^{max} pour laquelle un

²La dispersion a comme source un phénomène stochastique qui fait transiter l'espèce considérée entre des états de vitesse différente. Si l'échange entre les états est rapide, la dispersion est plus faible. C'est le même raisonnement que pour la dispersion de Taylor dans un tube où le profil de vitesses n'est pas constant (cf. Paragraphe 9.2.4, p. 165). Le terme de dispersion est inversement proportionnel au temps moyen employé pour explorer les états de vitesse différente, qui est donné par le coefficient de diffusion brownien. Ici ce temps moyen est donné par k_2^{-1} .

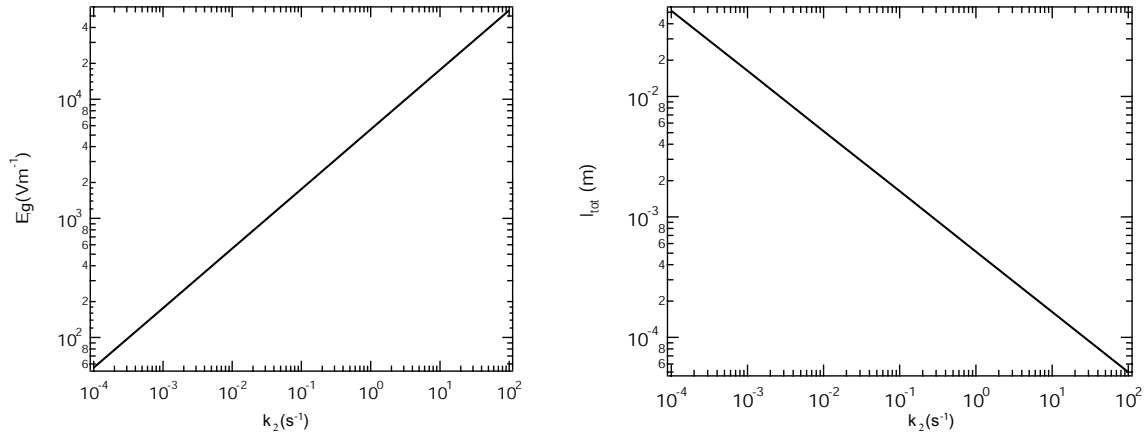


FIG. 7.2 – (a) Amplitude du champ électrique calculée d'après (7.11) pour avoir $D_{disp} = gD_A$ ($g = 1$) et (b) longueur de l'excursion du profil de concentration calculée à partir de (7.15). Nous avons utilisé les valeurs $D_A = 1.4 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ et $\mu_A = 20 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, $h = 0.4$, $g = 1$ et $j = 10$ correspondant à un temps d'expérience dix fois la période du champ électrique.

accroissement du coefficient de diffusion est envisageable, est principalement limitée par l'amplitude maximale du champ électrique. Pour des valeurs de 10^4 à 10^5 V m^{-1} , limite supérieure accessible expérimentalement, k_2^{max} vaut entre 10 et 10^2 s^{-1} (Figure 7.2a). La valeur minimale k_2^{min} est limitée par la concentration d'oligonucléotide complémentaire à la résonance

$$B = \frac{k_2}{k_1}. \quad (7.17)$$

En effet, le modèle d'électrodifusion présentée dans la Section 1.2 de l'Introduction est seulement valable si l'espèce B est en excès et la réaction (7.1) peut être écrite sous la forme (7.2). Prenons comme ordre de grandeur le rapport de concentrations $B/A = 10$. Notons A^{min} la concentration minimale détectée par la technique d'imagerie utilisée. k_2^{min} est alors donnée par

$$k_2^{min} = k_1 B^{min} = 10k_1 A^{min}. \quad (7.18)$$

La valeur minimale de k_1 dans le système oligonucléotidique est $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ pour des faibles concentrations salines. Dans le dispositif présenté au Chapitre 8, $A^{min} \simeq 1 \mu\text{M}$ et donc $k_2^{min} = 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

7.4 Conclusion

L'observation du phénomène d'électrodifusion en champ électrique alternatif nous amène vers les petites distances quand la cinétique de la réaction chimique considérée devient de plus en plus rapide. Ainsi, des valeurs de k_2 entre 10^2 et 10^{-2} s^{-1} correspondent une échelle de distance de 5 mm à 50 μm (Figure 7.2b). D'autre part, il est nécessaire d'utiliser des champs électriques entre 10^2 et 10^5 V m^{-1} (Figure 7.2a). Pour les valeurs les plus importantes, la température de l'échantillon est susceptible d'augmenter du fait du réchauffement par effet Joule. Puisque la constante cinétique de dissociation de la

réaction d'hybridation d'oligonucléotides est très dépendante de la température (*cf.* Figure 2.7, p. 49), le dispositif expérimental doit dissiper le plus efficacement possible toute génération de chaleur. Ces considérations nous ont emmené tout naturellement à utiliser des techniques de microfabrication pour réaliser notre dispositif expérimental.

Chapitre 8

Construction d'un microlaboratoire d'électrophorèse 2D polyvalent

Les techniques de microfabrication permettent de réaliser des objets entre un et une centaine de microns à l'aide de processus mis en place pour la construction de circuits intégrés dans les années 70. La lithographie optique, par exemple, utilise un masque avec des motifs micrométriques posé sur une couche mince de résine photosensible. L'application d'une lumière UV permet de transférer les dessins du masque sur la résine avec une précision maximale limitée par la diffraction de la lumière. Dans le début des années 90, Manz a été un des pionniers à utiliser ces techniques pour réaliser des microcanaux et les remplir avec des liquides à des fins de séparation en Chimie, notamment pour l'électrophorèse et la chromatographie [72, 73]. Il a ensuite émis le concept de *Micro total analysis system* (μ TAS), dans lequel le but est d'intégrer dans ces microsystèmes les opérations basiques d'un laboratoire analytique pour la Chimie ou la Biologie [74]. Une petite révolution dans cette communauté est ensuite apparue à la fin des années 90 avec les techniques de lithographie molle introduites dans le groupe de Whitesides [75]. Ayant comme base des matériaux tels que le silicium et le verre, les méthodes de fabrication héritées de l'industrie des semi-conducteurs sont, en effet, onéreuses et ont besoin d'investissements importants en instrumentation. La lithographie molle réduit l'utilisation de ces techniques coûteuses au minimum. Il s'agit d'utiliser la lithographie optique pour réaliser des structures avec des canaux et des chambres entre 10 et 100 μm « dessinées » sur des résines photosensibles qui sont ensuite utilisées comme moules de matériaux polymères, notamment le poly(diméthylsiloxane) (PDMS). Après durcissement, les motifs microfabriqués, transférés au polymère, sont posés sur une lamelle de verre pour créer des réseaux de canaux microfluidiques. Le bas coût de cette technologie a permis la démocratisation et l'essor de cette technologie molle [76, 77].

Dans ce chapitre, nous exposons la démarche suivie dans la construction d'un microlaboratoire pour mesurer des coefficients de diffusion en présence d'un champ électrique alternatif. Pour caractériser le dispositif, nous présenterons, le cas échéant, des mesures de D sans rentrer dans le détail du traitement des données expérimentales pour son obtention. Ce traitement est abordé dans l'Article 2.

8.1 Mesurer la diffusion et appliquer un champ électrique dans un microsystème

8.1.1 Les premiers essais : Création d'une condition initiale non-stationnaire

Au début de ce travail, nous avons envisagé de reproduire en microsystème les expériences antérieurement réalisées en capillaire de verre millimétrique pour observer la relaxation temporelle du profil de concentration sous l'effet de l'électrodifusion (*cf.* Introduction, p. 27). Il était nécessaire de construire un dispositif microfluidique qui génère un profil de concentration initial suffisamment fin dans lequel on puisse appliquer les champs électriques les plus importants possibles.

Idée naïve : transposition directe macroscopique-microscopique

La création d'une condition initiale fine a été un de nos problèmes principaux. Nous l'avons initialement abordé en translatant directement le protocole du dispositif macroscopique dans le microsystème. Le capillaire millimétrique était rempli d'un gel d'agarose, pour empêcher les écoulements électroosmotiques, relié au réservoir contenant l'échantillon. La largeur de la condition initiale était ainsi fixée par la forme de l'interface entre le gel et la solution.

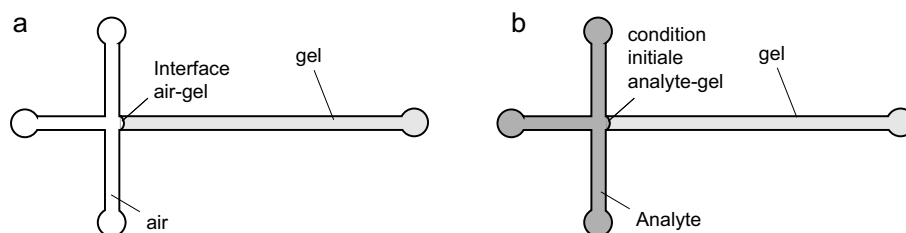


FIG. 8.1 – Protocole pour la création d'une condition initiale à l'aide de l'interface du gel. (a) Le gel d'agarose est introduit à chaud et la position de son front est arrêtée à l'intersection des canaux par contrôle de pressions. (b) Une fois le gel formé, l'analyte est introduit et une condition initiale à l'interface analyte-gel est créée.

Nous avons réalisé un dispositif microfluidique avec deux canaux en croix (de $200\ \mu\text{m}$ de large et $10\ \mu\text{m}$ de haut) dans le but de remplir un des bras avec la solution d'agarose à chaud en arrêtant le front à l'intersection entre les canaux (Figure 8.1). Une fois le gel formé, l'idée était de remplir la solution avec l'échantillon par le biais du canal perpendiculaire, formant une interface analyte/gel et d'observer la diffusion de cette interface au cours du temps.

Pour mettre en œuvre ce principe, nous avons utilisé un système de contrôle de pression qui permet de positionner le front de la solution d'agarose, lors du remplissage, au croisement entre les deux canaux. Le remplissage de la solution de gel à chaud s'est avéré, comme prévu [75], très dépendant de l'état de surface des canaux. Quand les surfaces du canal (en verre et PDMS) étaient hydrophiles, il était impossible d'arrêter le gel à une position précise car tous les canaux se remplissaient par capillarité. Lorsque les surfaces

étaient hydrophobes, nous avons réussi à arrêter le front du gel à la position souhaitée. Cependant, une fois le gel formé, l'interface analyte/gel se déforme avec le temps et devient courbe sur une dimension caractéristique de l'ordre de la largeur du canal. Ces essais se sont avérés infructueux pour la création d'une condition initiale fine.

Injection électrophorétique

On s'est ensuite dirigé vers les stratégies d'injection de l'électrophorèse capillaire en chip (Figure 8.2). Celles-ci reposent également sur un design formé de deux canaux en croix. Dans notre cas, tous les canaux sont remplis du gel d'agarose et l'application d'une différence de potentiel entre les deux réservoirs du canal d'injection achemine l'analyte jusqu'à l'intersection entre les deux canaux. La condition initiale n'étant plus limitée par une interface gel/liquide mais par la largeur du canal d'injection. Ensuite, une différence de potentiel entre les bords du canal principal permet d'y introduire une condition initiale de type créneau.

En réalité, des inhomogénéités de champ électrique à la jonction du canal d'injection et du canal principal ont pour conséquence que la largeur du profil n'est pas constante dans la direction perpendiculaire au canal principal (Figure 8.2b). Ainsi, avec un canal d'injection de $50\text{ }\mu\text{m}$, il est possible de générer des profils initiaux de concentration de $250\text{ }\mu\text{m}$ de largeur [78]. Des raffinements existent pour réaliser des conditions initiales plus fines, de largeur égale à celles du canal d'injection. C'est le cas de la focalisation électrique [79], dans laquelle un troisième canal, appelé canal de focalisation, permet d'appliquer une différence de potentiel qu'amincit le profil de concentration dans le canal d'injection (Figure 8.2c).

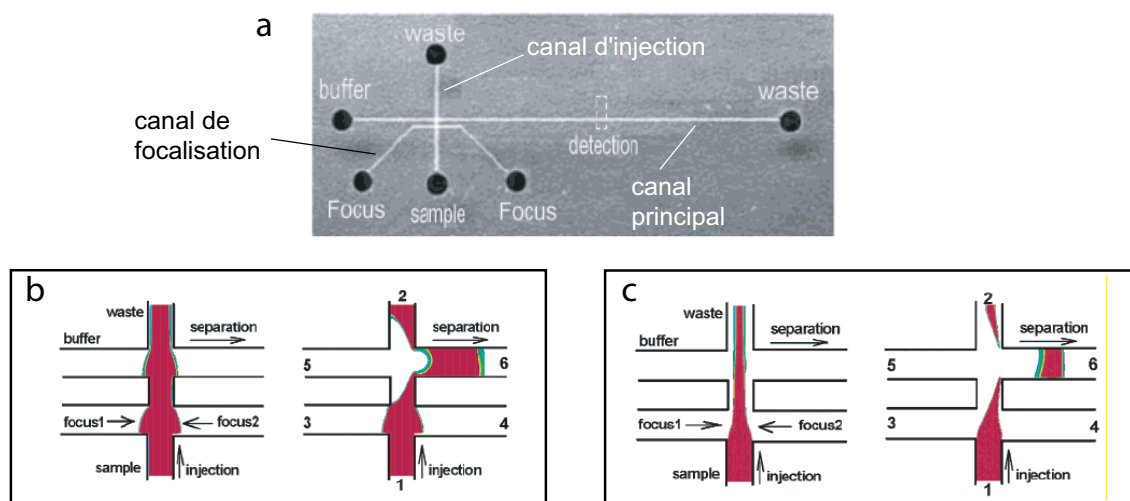


FIG. 8.2 – Principe du chip pour l'injection d'une fine condition initiale dans un microcanal. (a) Chip avec trois canaux pour l'injection avec focalisation électrique. Injection en l'absence (b) et en présence (c) de focalisation. Extrait de [79].

Bien que ces méthodes d'injection permettent la création d'une condition initiale suffisamment fine ($\sim 50\text{ }\mu\text{m}$), leur caractère non-stationnaire présentait une limitation forte pour nous. Notre but étant d'imager les profils de concentration qui évoluent avec la

diffusion/dispersion, la dilution de l'analyte au cours de l'expérience aurait fait apparaître des problèmes de sensibilité. Ces approches empêchaient de réaliser une moyenne temporelle pour améliorer le rapport signal sur bruit. D'autre part, elles nécessitaient une alimentation électrique programmable dont nous ne disposions pas à l'époque.

8.1.2 Mesure stationnaire du coefficient de diffusion

Les problèmes rencontrés dans l'approche précédente peuvent être contournés en transformant le problème non-stationnaire d'étalement d'une condition initiale unidimensionnelle au cours du temps en un problème stationnaire à deux dimensions spatiales. L'application d'un champ de vitesse constant v [m s^{-1}] le long d'une des dimensions (par exemple x) réalise une conversion temps-espace (par exemple, $x = vt$). Il suffit alors d'injecter un profil de concentration selon y qui sera translaté par le champ de vitesses vers les x croissants et qui s'étalera du fait des phénomènes de diffusion/dispersion, principalement selon l'axe y (Figure 8.3).

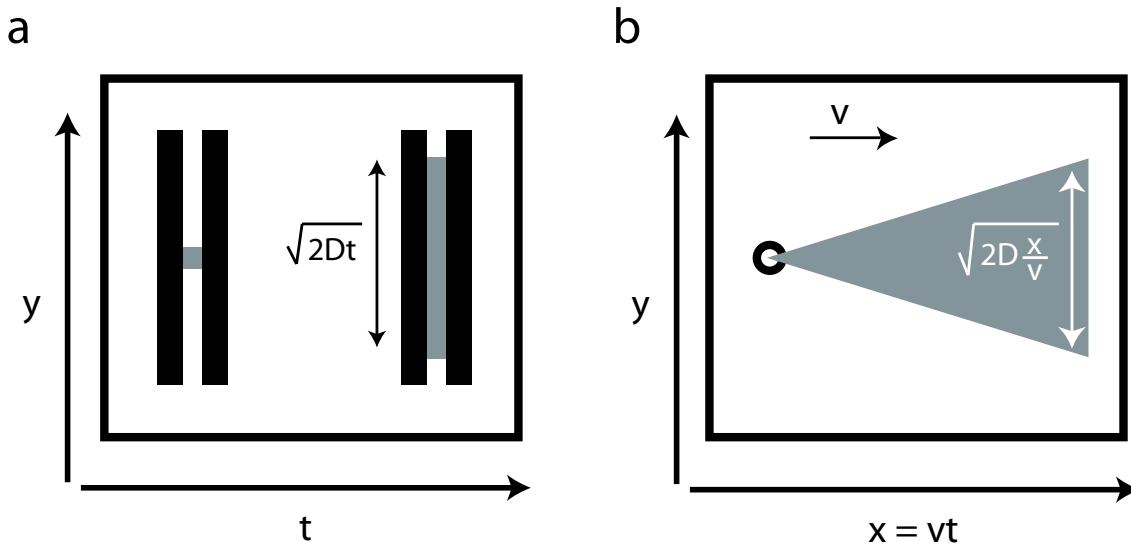


FIG. 8.3 – Principe de mesure d'un coefficient de diffusion D par observation de l'étalement d'un profil de concentration. (a) Mesure dépendante du temps. (b) La mesure devient stationnaire lorsque l'on applique une vitesse constante v selon l'axe x .

L'application d'un champ de vitesse constant dans une direction spatiale pour introduire une équivalence espace-temps a déjà été appliquée dans des méthodes de séparation classiques tels que la *free flow electrophoresis*¹ [80, 81]. Elle est particulièrement adaptée aux systèmes microfluidiques car la nature laminaire des écoulements facilite l'obtention de vitesses constantes dans l'espace. Le groupe d'Ismagilov l'a mise en place pour développer une méthode de mesure de la cinétique chimique dans des microgouttes qui se déplacent à vitesse constante [82]. L'équivalence espace-temps est aussi utilisée dans le *T-sensor*, un dispositif microfluidique qui exploite la diffusion à but analytique et que l'on présentera au Chapitre 9.

¹Aussi appelée *continuous flow electrophoresis*.

Pour implémenter l'électrodifusion avec équivalence espace-temps, il s'agit de construire une chambre d'analyse parallépipédique de longueur l_x , largeur l_y et épaisseur h . À l'intérieur de cette chambre, il est nécessaire de générer un champ de vitesses constant selon l'axe x ainsi qu'un champ électrique alternatif selon l'axe y . Ce champ de vitesses peut être généré par différence de pression ou par un champ électrique. Dans le premier cas, un écoulement de Poiseuille avec un profil de vitesse parabolique apparaît. Dans le deuxième, deux phénomènes se superposent, l'écoulement du liquide sous l'action de l'électroosmose et la mise en mouvement des espèces chargées par électrophorèse. Notre dispositif étant destiné à la mesure de la diffusion et de l'électrodifusion, toute autre source de dispersion doit être limitée. Nous avons donc écarté l'écoulement de Poiseuille qui induit une dispersion supplémentaire et décidé d'utiliser un deuxième champ électrique, constant et dirigé selon l'axe x . La construction d'un tel dispositif présente les contraintes suivantes :

- L'homogénéité du champ électrique lorsque l'on applique simultanément deux champs perpendiculaires.
- Le contrôle, ou la suppression, du flux électroosmotique pour qu'il n'induisse pas de dispersion.
- Le rapprochement d'un problème théorique en 2D. L'épaisseur h doit être la plus faible possible.
- La limitation de l'échauffement par effet Joule lors de l'application du champ électrique, l'épaisseur h et la conductivité du tampon de travail doivent être réduits au minimum.
- La tenue mécanique de la chambre d'analyse fabriquée dans un matériau mou comme l'est le PDMS.
- La sensibilité à la détection.
- La facilité de remplissage du dispositif avec un gel ou une solution.

8.2 Génération d'un champ électrique homogène en 2D

Une des grandes préoccupations dans le design du microlaboratoire a été de créer, à l'intérieur de la chambre d'analyse, un champ électrique homogène en deux dimensions.

8.2.1 Éléments bibliographiques

Cette difficulté existe déjà en électrophorèse sur gel en champ pulsé², où il est nécessaire d'alterner entre champs uniformes selon différentes directions dans un espace bidimensionnel qui fait typiquement $30 \times 30 \text{ cm}^2$. En principe, on pourrait utiliser deux paires d'électrodes face à face, une paire par composante du champ, verticale ou horizontale, pour réaliser des champs électriques variés à deux dimensions. Cependant, le champ résultant est fortement distordu, chaque paire d'électrodes perturbant le champ généré par l'autre paire (Figure 8.4a). Dans l'électrophorèse sur gel en champ pulsé, le problème est résolu

²La *pulsed-field gel electrophoresis* utilise des gels d'agarose pour séparer des molécules d'ADN de grande taille, typiquement de quelques millions de paires de bases [84].

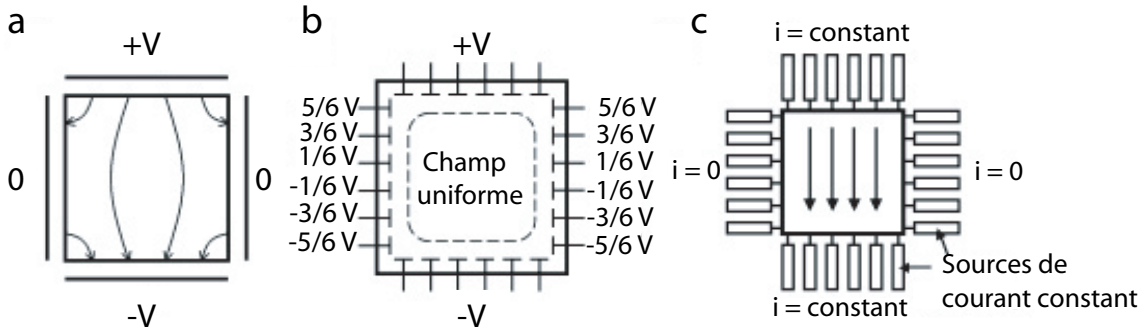


FIG. 8.4 – (a) Champ électrique dans un système bidimensionnel avec quatre électrodes. (b) *Clamped* électrodes de voltage ajustable pour créer un champ homogène. (c) Modèle de Huang et collaborateurs où le courant électrique est fixé aux bords de la chambre d'analyse par des microcanaux jouant le rôle de résistances électriques. Figure extraite, avec modifications, de [83].

en reconstruisant le champ, point par point, à l'aide d'un grand nombre d'électrodes (Figure 8.4b). Ainsi, chacune des quatre électrodes est divisée en petites électrodes qui fixent le potentiel à la valeur correspondante pour avoir un champ homogène dans toute la zone de travail.

La transposition directe de cette approche dans un microsystème n'est pas souhaitable. Le grand nombre d'électrodes nécessaires serait encombrant dans un petit système et les bulles de gaz résultant de l'activité électrolytique pourrait obstruer les microcanaux. Huang et collaborateurs ont proposé une élégante alternative : au lieu de fixer le potentiel électrique, comme dans l'approche précédente, c'est le courant électrique qui est fixé en chaque point du bord de la chambre d'analyse [83, 85]. Ceci est effectué en reliant les quatre électrodes macroscopiques à la chambre par le biais de quatre réseaux de canaux microfluidiques de même taille (Figure 8.4c). Pour obtenir un champ homogène, il suffit que la résistance électrique de chaque réseau de canaux R_c [Ω] soit grande par rapport à la résistance de la chambre d'analyse R_{ch} [Ω] de sorte que le potentiel au bord de la chambre est parfaitement défini, indépendamment de la position des quatre électrodes au sein des réservoirs tampon.

Dans leur article, Huang et collaborateurs [83] ont estimé l'inhomogénéité résiduelle du champ électrique en fonction du rapport $\frac{R_{ch}}{R_c}$. Quand ce rapport vaut 2, l'inhomogénéité est de l'ordre de 10% avec un angle maximum de déviation du vecteur champ de 10° , quand il vaut 10, ces valeurs sont 1% et 1° , respectivement.

8.2.2 Notre design

Nous avons conçu une chambre carrée de 7.5 mm de côté et 10 μm de hauteur. Quatre réseaux de canaux relient les quatre côtés de la chambre d'analyse aux réservoirs macroscopiques, contenant la solution tampon et les quatre électrodes. Les canaux font 7.5 mm de longueur, 20 μm de largeur et sont séparés par des murs de PDMS de 20 μm de largeur dans le design final ce qui fait $\frac{R_{ch}}{R_c} = 2$ (Figure 8.5). Sur un des côtés, les canaux microfluidiques ont été courbés pour dégager un canal d'injection relié au réservoir conte-

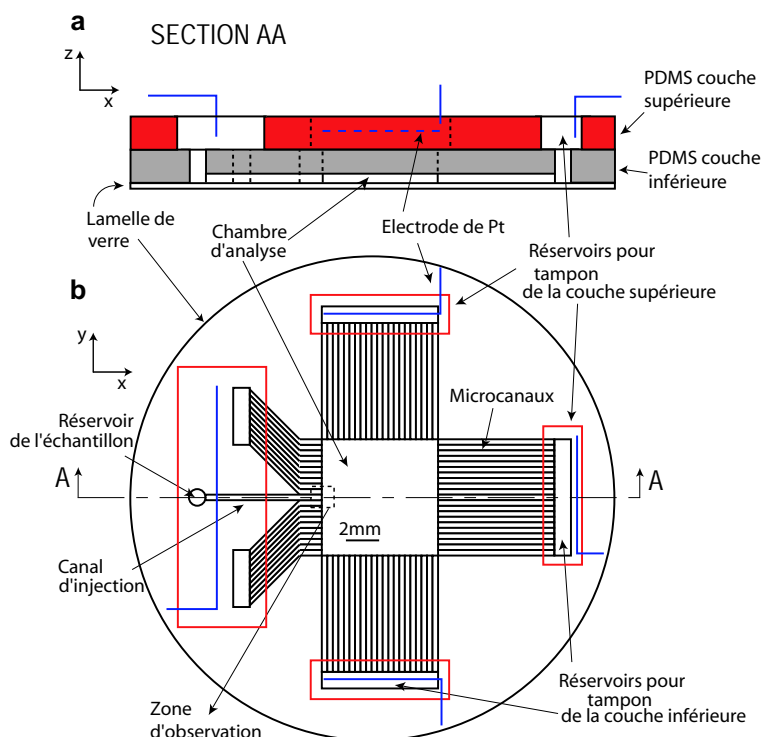


FIG. 8.5 – Vue de côté (a) et vue du dessus (b) du microlaboratoire d'électrophorèse 2D. Il est constitué d'une lamelle de verre et de deux couches de PDMS. La couche inférieure contient une chambre d'analyse carrée de 7.5 mm de côté et 10 μm de hauteur reliée par des réseaux de canaux microfluidiques à des réservoirs tampon et par un canal d'injection au réservoir de l'échantillon. La couche supérieure de PDMS délimite quatre grands réservoirs tampon contenant les quatre électrodes qui permettent d'imposer des potentiels constants à chaque côté de la chambre. Cette figure correspond à la Figure S-1 du *Supporting Information* de l'Article 2.

nant l'échantillon. Les dimensions de ces canaux courbés ont été calculées pour que leur résistance électrique soit la même que celle des canaux parallèles. L'ensemble de ces motifs microfabriqués et des six réservoirs est contenu dans un timbre de PDMS d'environ 3 mm d'épaisseur et 2.5 cm de côté qui est collé sur une lamelle de verre circulaire de 4 cm de diamètre (*cf.* Paragraphe 10.3.2 de l'Article 2, p. 176) pour sceller le dispositif. Enfin, une deuxième couche de PDMS de 5 mm d'épaisseur, contenant quatre réservoirs tampon d'environ 500 μL de volume, est collée au dessus du timbre précédent. Ces derniers réservoirs augmentent le volume de tampon disponible et garantissent la stabilité du $p\text{H}$ lors de l'application du champ électrique. Ils relient également électriquement les trois réservoirs du côté gauche (Figure 8.5).

Calcul du champ électrique dans la chambre d'analyse

L'ajustement des différences de potentiel, ΔV_x et ΔV_y , appliquées entre les électrodes du microlaboratoire permet de créer des champs électriques variés. Ainsi, un champ électrique constant est obtenu le long de l'axe x en fixant $\Delta V_x \neq 0$, $\Delta V_y = 0$ (Figure 8.6a).

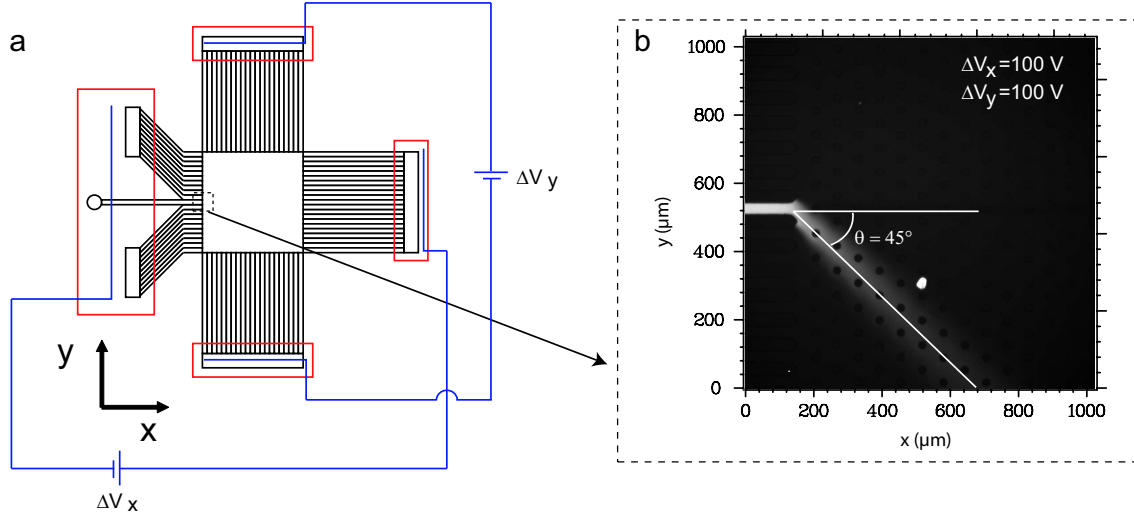


FIG. 8.6 – (a) Schéma électrique du dispositif et (b) image par microscopie de fluorescence à l'intersection entre le canal d'injection et la chambre d'analyse lorsque la fluorescéine est injectée en appliquant $\Delta V_x = 100 \text{ V}$, $\Delta V_y = 100 \text{ V}$ ce qui donne un angle d'injection de 45° . Les cercles noirs sont des piliers de PDMS qui servent à tenir le plafond de la chambre d'analyse (cf. Section 8.6, p. 146)

Dans ce cas, le champ électrique dans la chambre d'analyse prend la valeur

$$E_x = \frac{\Delta V_x}{l_x} \frac{R_{ch}}{2R_c + R_{ch}}, \quad (8.1)$$

expression qui tient compte du fait que la chute de potentiel effective dans la chambre, de longueur l_x [m], est $\Delta V_x R_{ch} / (2R_c + R_{ch})$. L'expression (8.1) peut être reliée aux dimensions du dispositif. Ainsi, la résistance électrique d'une chambre longue de l_x , large de l_y et de hauteur h , remplie d'un tampon de résistivité ρ [$\Omega \text{ m}^{-1}$] est

$$R_{ch} = \rho \frac{l_x}{hl_y}. \quad (8.2)$$

Chaque réseau de canaux a une largeur l_y , une longueur l_c et une hauteur h . On considère des canaux de largeur w_c [m] séparés par des murs de PDMS de largeur w_m [m]. R_c vaut alors

$$R_c = \rho \frac{l_c}{hl_y} \frac{w_c + w_m}{w_c}. \quad (8.3)$$

Dans tous nos dispositifs $l_c = l_x$ et le rapport de (8.3) et (8.2) est

$$\frac{R_c}{R_{ch}} = \frac{w_c + w_m}{w_c}. \quad (8.4)$$

En combinant (8.1) et (8.4), le champ électrique à l'intérieur de la chambre est donné par

$$E_x = \frac{\Delta V_x}{l_x} \frac{1}{2 \frac{w_c + w_m}{w_c} + 1}. \quad (8.5)$$

Pour créer un champ électrique formant un angle θ [rad] avec l'axe x on applique des différences de potentiel de rapport

$$\frac{\Delta V_y}{\Delta V_x} = \tan \theta. \quad (8.6)$$

La Figure 8.6, montre que l'on obtient effectivement un angle de 45° quand $\Delta V_x = \Delta V_y$.

Homogénéité du champ électrique

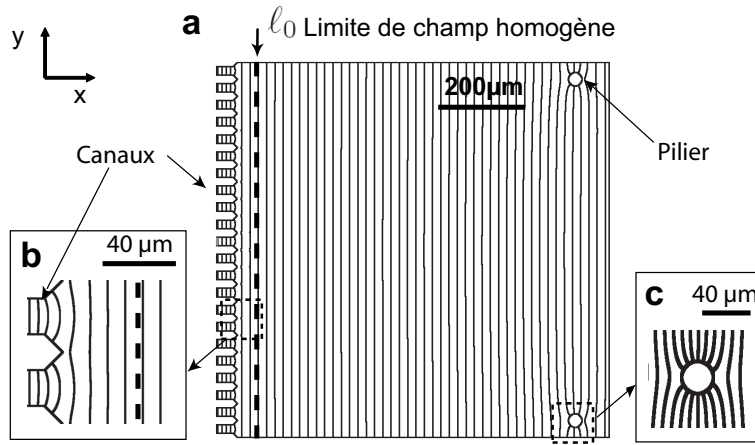


FIG. 8.7 – Lignes isopotentielles électriques calculées par une méthode d'éléments finis quand on applique une différence de potentiel seulement selon l'axe x dans la chambre d'analyse. Un dispositif avec des piliers séparés de $800 \mu\text{m}$ a été simulé ici. (a) Zone correspondante au champ d'observation. Chaque ligne représente une variation de 2%. (b) et (c) Zooms sur la jonction entre les canaux microfluidiques et la chambre d'analyse et autour d'un pilier, respectivement. Chaque ligne représente une variation de 1%. Après une distance $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ (ligne pointillée), le champ électrique est homogène et parallèle à l'axe x . Cette figure correspond à la Figure S-7 du *Supporting Information* de l'Article 2.

Même si nous avons conçu le microlaboratoire pour réaliser l'expérience d'électrodifusion, nous l'avons utilisé tout d'abord pour la mesure stationnaire de coefficients de diffusion, sujet couvert en détail dans l'Article 2, p. 171. Dans ces expériences, on applique seulement un champ électrique constant selon l'axe x . L'homogénéité de ce champ électrique a été évaluée par des méthodes d'éléments finis en utilisant le programme Comsol Multiphysics comme il est détaillé dans le Paragraphe 10.4.1 de l'Article 2, p. 182, et dans la Section 11.5 de son *Supporting Information*, p. 200. Ces méthodes nous permettent de simuler le profil de champ électrique à l'intérieur de la chambre en définissant sa géométrie et les conditions de potentiel aux bords. Le résultat principal obtenu est que, lorsque l'on applique une différence de potentiel selon le seul axe x , le champ créé dans la chambre est homogène partout sauf dans une bande à la limite entre la chambre et les canaux microfluidiques. La largeur caractéristique de cette bande, ℓ_0 [m], est fixée par la distance séparant les canaux microfluidiques qui servent d'injecteurs du courant. Dans notre design, $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ (Figure 8.7).

8.3 Optimisation du procédé de fabrication

La fabrication du microdispositif montré à la Figure 8.5 comporte deux étapes particulièrement coûteuses en temps : d'une part la réalisation par des techniques photolithographiques du moule en résine initial, d'autre part, une fois le timbre en PDMS obtenu, la découpe manuelle des réservoirs macroscopiques qui doit être suffisamment précise pour atteindre une bonne homogénéité du champ électrique à l'intérieur de la chambre de séparation. Ceci ne serait pas un problème majeur si la durée de vie du microdispositif était suffisamment longue. Cependant, durant une grande partie de ce travail, on a utilisé comme milieu de remplissage un gel d'agarose, qui présente une durée de vie d'un à deux jours et ne peut pas être remplacé (*cf.* Paragraphe 8.7.1, p. 150). Dans ces circonstances, la durée de fabrication d'un microdispositif était initialement prohibitive.

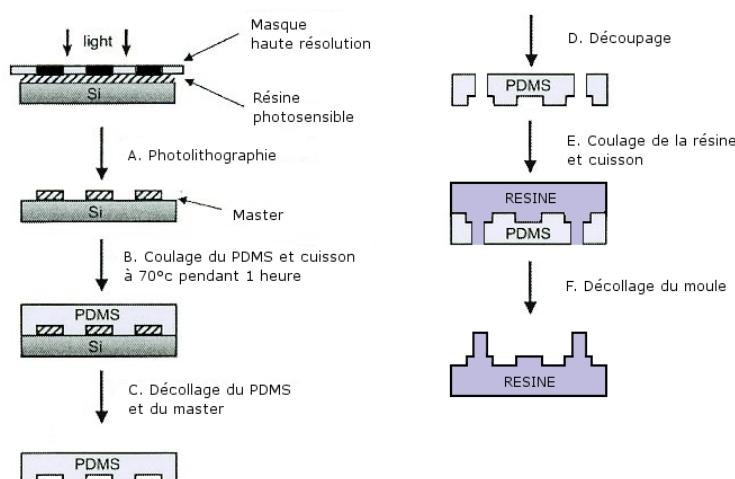


FIG. 8.8 – Illustration des étapes nécessaires à la fabrication d'un moule époxydique qui rassemble à la fois les motifs microfluidiques et les réservoirs macroscopiques. L'image a été adaptée d'après [77].

Nous avons considérablement réduit la durée de fabrication du microdispositif en réalisant un moule final en résine époxydique qui rassemble à la fois les motifs microfluidiques et les réservoirs macroscopiques [76] (Figure 8.8). Plus précisément, une fois obtenu un premier timbre en PDMS avec les motifs microfluidiques et les réservoirs, celui-ci est utilisé comme moule intermédiaire sur lequel on verse la résine époxydique. Cette longue opération est effectuée juste une fois et on dispose désormais d'un moule très résistant qui nous permet d'obtenir le dispositif final en peu de temps. Il suffit de verser une petite quantité de PDMS — avec une économie substantielle en produit — dans le moule époxydique, de dégazer et de cuire au four à 70°C pendant 2 h. Après décollage du timbre de PDMS et traitement de sa surface au *plasma cleaner*, le collage sur une lamelle de verre achève le dispositif : le tout demande moins de trente minutes de travail manuel (*cf.* Paragraphe 10.3.2 de l'Article 2, p. 176, et Annexe E, p. 261).

8.4 Limitation de l'effet Joule

8.4.1 Le choix du tampon

L'application d'un champ électrique d'amplitude E [V m^{-1}] dans une solution ionique génère un échauffement par effet Joule. La loi d'échelle du flux de chaleur Q_J [$\text{J m}^{-1}\text{s}^{-1}$] engendré dans un dispositif de hauteur h et de largeur l_y , rempli d'un milieu de conductivité σ [$\text{m}^{-1}\Omega^{-1}$] lors de l'application d'un champ électrique d'amplitude E est³

$$Q_J = E^2 h l_y \sigma. \quad (8.7)$$

La conductivité d'une solution ionique est

$$\sigma = \sum_i |z_i| \lambda_i^0 C_i, \quad (8.8)$$

où λ_i^0 [$\text{m}^{-1}\text{M}^{-1}\Omega^{-1}$] est la conductivité molaire équivalente de l'ion i , z_i sa charge et C_i [M] sa concentration. Le flux de chaleur maximal que l'on peut dissiper dans un canal rectangulaire étant $\frac{2l_y}{\pi h}$ $\text{J m}^{-1}\text{s}^{-1}$. Le champ électrique maximum que l'on peut appliquer sans surchauffe est calculé en substituant cette dernière valeur dans l'expression (8.7) [86]. On obtient

$$E_{max} = \frac{1}{h} \sqrt{\frac{2}{\pi \sigma}}. \quad (8.9)$$

À géométrie fixe, on peut diminuer la hauteur du dispositif pour augmenter la limite supérieure de l'amplitude du champ. Cela nuit cependant à la sensibilité de la détection qui varie comme h . On peut aussi changer la nature des espèces ioniques en solution, ce qui modifie λ_i^0 , ou en diminuer les concentrations C_i . Cependant, le tampon doit posséder les espèces suivantes : i) un couple acido-basique qui agit comme tampon de pH^4 ; ii) un sel de fond de concentration sensiblement plus importante que l'analyte et iii) un ion positif tel que Na^+ ou Mg^{2+} pour définir la valeur de la constante cinétique d'hybridation des oligonucléotides (*cf.* Chapitre 2).

La Figure 8.9 montre l'intensité du courant mesurée dans le microlaboratoire en fonction du champ électrique appliqué à l'intérieur de la chambre pour différents tampons. Nous avons initialement choisi comme milieu NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7. La concentration de Na^+ fixe la valeur de la constante cinétique d'hybridation k_1 , tandis que Tris agit comme tampon pour contrôler le pH . La forte conductivité électrique ($\sigma \simeq 1.4 \text{ m}^{-1}\Omega^{-1}$)⁵ de ce tampon a provoqué un échauffement de la solution lors de l'électrophorèse, comme le montre l'écart à la loi linéaire de la Figure 8.10b. Nous avons donc cherché à en réduire la valeur sans perdre le contrôle sur les propriétés thermocinétiques du système oligonucléotidique. Nous avons tout d'abord remplacé dans le

³La puissance W [J s^{-1}] générée dans un système de résistance R [Ω] lorsque l'on applique une différence de potentiel ΔV est $W = \Delta V^2 / R$. Prenons un parallépipède de longueur l_x , largeur l_y et hauteur h . Si le champ électrique est appliqué selon l'axe x , on a $E = \frac{\Delta V}{l_x}$. $R = \frac{l_x}{h l_y} \sigma$. Calculant le flux de chaleur comme $Q_J = W / l_x$ nous obtenons l'expression (8.7).

⁴Pendant l'électrophorèse, la réaction à l'anode est $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+$ et à la cathode $\text{H}^+ \rightarrow 1/2\text{H}_2$. Le pH varie en l'absence de solution tampon.

⁵Nous avons utilisé (unités $\text{m}^{-1}\text{M}^{-1}\Omega^{-1}$) $\lambda_{\text{Na}^+}^0 = 5.0$, $\lambda_{\text{Cl}^-}^0 = 7.63$, $\lambda_{\text{Mg}^{2+}}^0 = 5.3$ et approximativement $\lambda_{\text{Tris}^+}^0 \simeq \lambda_{\text{Pipes}^-}^0 \simeq \lambda_{\text{HEPES}^-}^0 \simeq 5.0$.

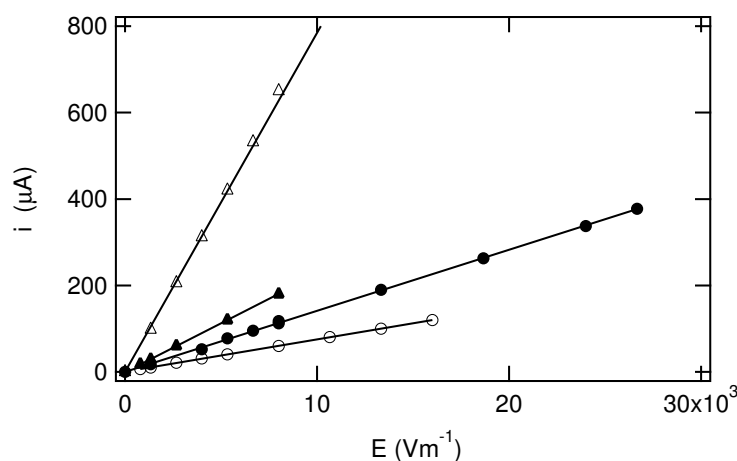


FIG. 8.9 – Intensité du courant électrique i circulant dans un microlaboratoire thermostaté à 20°C en fonction du champ électrique, E , dans la chambre d'analyse pour différentes solutions tampon : NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7 (triangles vides) ; MgCl_2 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7 (triangles pleins) ; NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5 (cercles pleins) ; $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Pipes 10/20 mM pH 7 (cercles vides). Les lignes correspondent à des ajustement linéaires et les pentes sont en rapport 1.4 : 0.4 : 0.24 : 0.13 en bon accord avec les conductivités calculées (*cf.* texte). La linéarité de la fonction $i(E)$ suggère que la température de la chambre est constante pour toutes les valeurs de E employées.

tampon NaCl par MgCl_2 ($\sigma = 0.4 \text{ m}^{-1}\Omega^{-1}$ pour MgCl_2 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7). La conductivité pouvait encore être réduite en éliminant l'anion Cl^- , spectateur lors de la réaction d'hybridation. Notre choix s'est finalement porté sur des tampons à base de molécules comportant une amine cyclique (comme pipérazine ou morpholine) et une ou plusieurs fonctions acide sulphonique tel que Pipes et Hepes (*cf.* Annexe F pour les formules chimiques). Ainsi une solution $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Pipes 10/20 mM pH 7 présente $\sigma \simeq 0.1 \text{ m}^{-1}\Omega^{-1}$. Nous avons aussi couramment utilisé une solution NaOH/Hepes 25/50 mM qui a une conductivité $\sigma \simeq 0.25 \text{ m}^{-1}\Omega^{-1}$.⁶ Pour atteindre des forces ioniques plus importantes nous rajoutons des concentrations croissantes de $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Hepes. Une solution NaOH/Hepes 25/50 mM, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Hepes 1.25/5 mM présente une conductivité suffisamment faible pour pouvoir négliger le réchauffement par effet Joule dans les conditions expérimentales utilisées au cours de ce travail et augmente d'un ordre de grandeur la constante cinétique d'hybridation entre deux brins d'ADN (*cf.* Tableau 2.3, p. 48).

⁶Dans ces conditions, la constante cinétique d'hybridation a comme valeur $k_1 \simeq 1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

8.4.2 Contrôle de la température

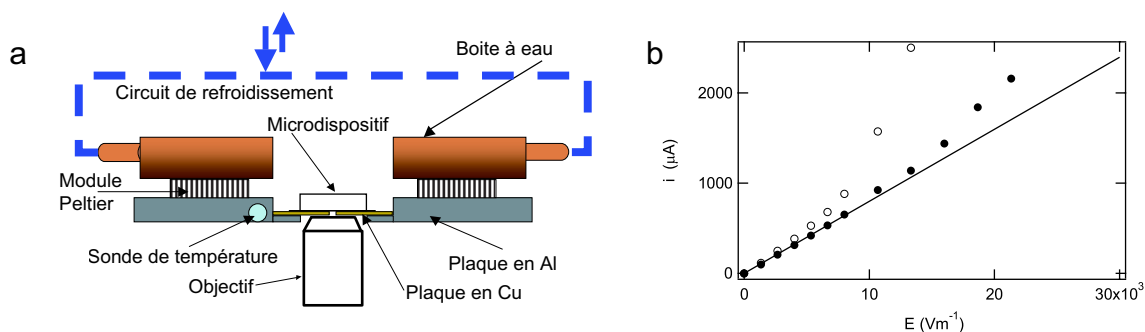


FIG. 8.10 – (a) Schéma du thermostat. Une plaque en cuivre de 1 mm d'épaisseur assure le contact thermique entre la face inférieure du microdispositif, en verre, et le bloc thermostaté en aluminium. Elle dispose d'une ouverture permettant l'observation avec un objectif de microscope. Une température consigne est envoyée au module Peltier et comparée à la valeur de la sonde de température. La face supérieure des modules Peltier est refroidie par un circuit d'eau qui joue le rôle de puits thermique. (b) Effet du thermostat sur le courant électrique i circulant dans le microlaboratoire. Le courant est mesuré en fonction du champ électrique, E , dans la chambre d'analyse dans un tampon NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7 en présence (cercles pleins) et en l'absence (cercles vides) du thermostat à 20 °C. La ligne pleine est un ajustement linéaire à bas champ électrique. L'écart à la linéarité indique un réchauffement du dispositif.

Nous avons construit un thermostat en contact avec la lamelle de verre du microdispositif (Figure 8.10a). Son utilité est double : i) il améliore les échanges de chaleur avec l'extérieur et permet ainsi l'application de champs électriques plus importants à conductivité du tampon constante (Figure 8.10b) et ii) il permet de fixer la température de l'expérience entre 10 et 45 °C ce qui nous permet de faire varier la constante cinétique de la réaction de dissociation entre deux oligonucléotides sur environ 5 ordres de grandeur (*cf.* Figure 2.7, p. 49).

8.5 Observation

L'observation est réalisée à l'intersection du canal d'injection et de la chambre d'analyse par microscopie de fluorescence (Figure 8.5). Pour ce faire nous avons utilisé un microscope d'épifluorescence fait maison dont la construction est détaillée dans l'Annexe D. Un objectif 10× Zeiss Fluor d'ouverture numérique 0.5 permet d'imager une zone d'environ 1 mm² avec une résolution de 1 μm sur une caméra CCD JAI CV-M4+CL (*cf.* Paragraphe 10.3.4 de l'Article 2, p. 177). La Figure 8.11 montre la réponse de la caméra pour une série de solutions de fluorescéine de concentration connue dans un dispositif de 10 μm d'épaisseur. La calibration a été réalisée en moyennant 240 images (10 s) pour indiquer la limite de détection dans nos conditions habituelles. La limite de détection est de 0.5 μM .

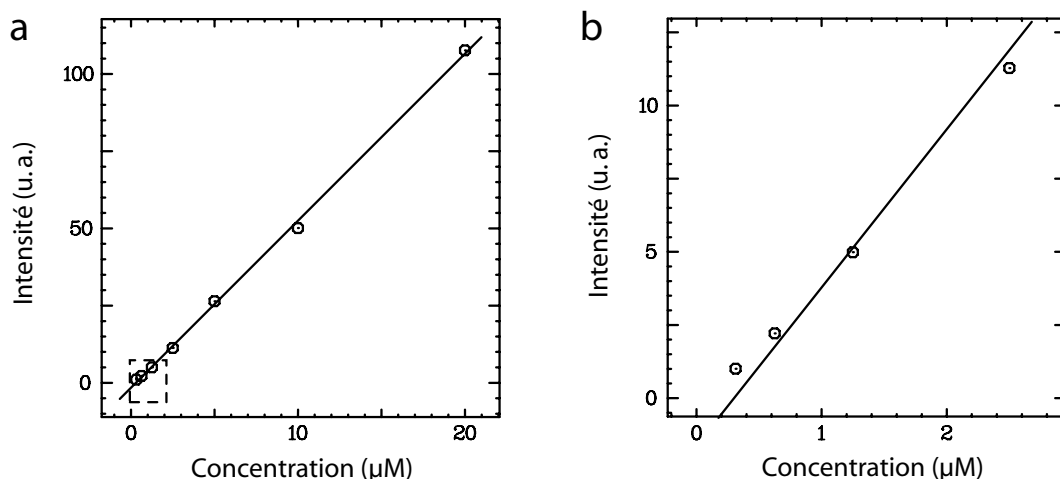


FIG. 8.11 – (a) Intensité de fluorescence mesurée par la caméra en fonction de la concentration de fluorescéine dans un dispositif d'épaisseur $10\ \mu\text{m}$. (b) Zoom sur le carré pointillé de la figure (a). Tampon NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 20°C .

8.6 Tenue mécanique : Effet des piliers et remplissage du dispositif

8.6.1 Bibliographie

Les techniques de microfabrication utilisent des supports durs, tels que le verre et le silicium, ou mous, tels que le PDMS. Ce dernier a l'avantage d'être facile à utiliser. Par contre, il faut tenir compte de ses faibles caractéristiques mécaniques lors du design. Ainsi, il n'est pas possible d'obtenir des systèmes en PDMS présentant des rapports d'aspect très importants⁷ : Le PDMS se bombe et finit par s'effondrer au delà d'un rapport d'aspect critique r_c . Il est ainsi nécessaire de mettre en place une série de piliers dans la chambre d'analyse pour éviter l'effondrement.

Zhang et Manz ont réalisé un dispositif de *free flow electrophoresis* en PDMS avec des contraintes similaires aux nôtres. Dans une chambre de $12 \times 4\ \text{mm}^2$ ils injectent l'échantillon dans une direction en utilisant un écoulement par suction et appliquent un champ électrique perpendiculairement [80]. La chambre d'analyse a une forte densité de piliers qui servent à garantir la tenue mécanique du plafond de la chambre ainsi qu'à augmenter le rapport surface/volume pour améliorer les échanges de chaleur et réduire le réchauffement par effet Joule. Les piliers ont une taille caractéristique de $30\ \mu\text{m}$ et sont séparés de seulement $40\ \mu\text{m}$ (entre ses centres), ce qui fait que 95% de la surface de la chambre est remplie de piliers.

⁷Une surface horizontale de PDMS tenue entre deux supports de hauteur h et espacés de l a un rapport d'aspect $r = l/h$. Pour un matériau de module élastique $E\ [\text{N m}^{-2}]$ et supportant une pression $P\ [\text{N m}^{-2}]$, le rapport d'aspect critique est donné par $r_c \simeq E/P$ [87]. Pour le PDMS E varie entre 0.5 et 4 MPa [88], en prenant P entre 10^5 et $10^4\ \text{Pa}$ on obtient $r_c \simeq 10 - 100$.

8.6.2 Résultats

Dans notre premier design, nous avons repris l'idée de Zhang et Manz et réalisé un dispositif avec une forte densité de piliers. Cette première génération nous a permis de mettre au point un premier protocole de remplissage du dispositif. Il peut sembler *a priori* difficile de remplir sans bulles plusieurs centaines de canaux microfluidiques reliés à une chambre possédant des milliers de piliers, cependant cette étape n'a pas posé de problème particulier. Avant d'assembler le chip, les surfaces du timbre de PDMS et de la lamelle de verre sont exposées à un plasma puis mises en contact. Ce traitement garanti un collage permanent en même temps qu'il rend les surfaces hydrophiles. Le remplissage se fait alors par capillarité en introduisant, immédiatement après collage, une solution ou un gel d'agarose à chaud dans les réservoirs tampon. La perméabilité aux gaz du PDMS fait disparaître les éventuelles bulles de gaz.

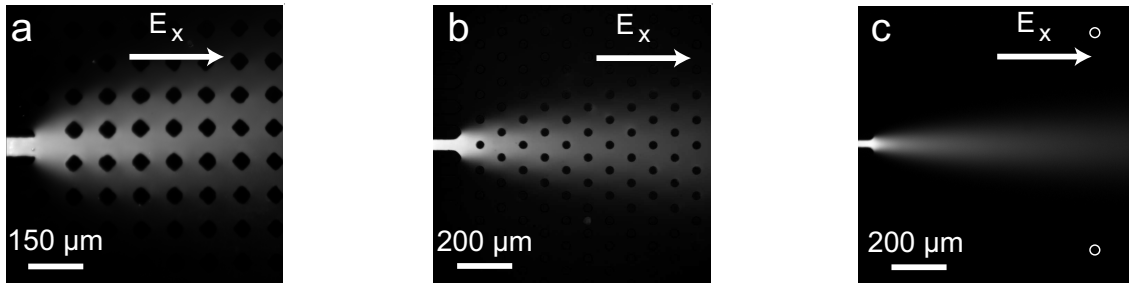


FIG. 8.12 – Micrographies de fluorescence lorsqu'un échantillon fluorescent est injecté par un champ électrique constant selon x dans des microlaboratoires avec différentes séparations entre les piliers. (a) et (b) premiers designs. (c) Design définitif où les piliers (cercles blancs) ont $30\ \mu\text{m}$ de diamètre et sont séparés de $800\ \mu\text{m}$.

En appliquant une différence de potentiel selon x nous avons réussi à injecter un échantillon fluorescent, au travers d'un canal, dans la chambre et obtenu une image de migration/diffusion (Figure 8.12a). Dans la seconde génération du microlaboratoire, la section des piliers a été réduite et leur séparation augmentée pour atteindre un réseau hexagonal de piliers de $30\ \mu\text{m}$ de diamètre séparés de $80\ \mu\text{m}$ (Figure 8.12b). Ce design a constitué, pendant une grande partie de ce travail, le dispositif expérimental de référence. La Figure 8.13 montre une image de migration-diffusion stationnaire dans ce dispositif. Le coefficient de diffusion extrait par analyse de Fourier (*cf.* Paragraphe 10.4.2 de l'Article 2, p. 183) est indépendant de la fréquence de Fourier, comme attendu pour un phénomène diffusif (Figure 8.13b). Cependant, la valeur de D extraite pour un oligonucléotide 13-mère fluorescent dans ces conditions est $1.7 \pm 0.2 \times 10^{-10}\ \text{m}^2\text{s}^{-1}$, tandis qu'en l'absence de piliers elle vaut $1.0 \pm 0.1 \times 10^{-10}\ \text{m}^2\text{s}^{-1}$.

De la même façon, lorsqu'on réalise une expérience de dispersion 1D en champ électrique alternatif E_y selon l'axe y (*cf.* Paragraphe 8.8.5, p. 159), la présence des piliers induit une dispersion et le coefficient de diffusion mesuré augmente avec l'amplitude du champ électrique comme le montre la Figure 8.14.

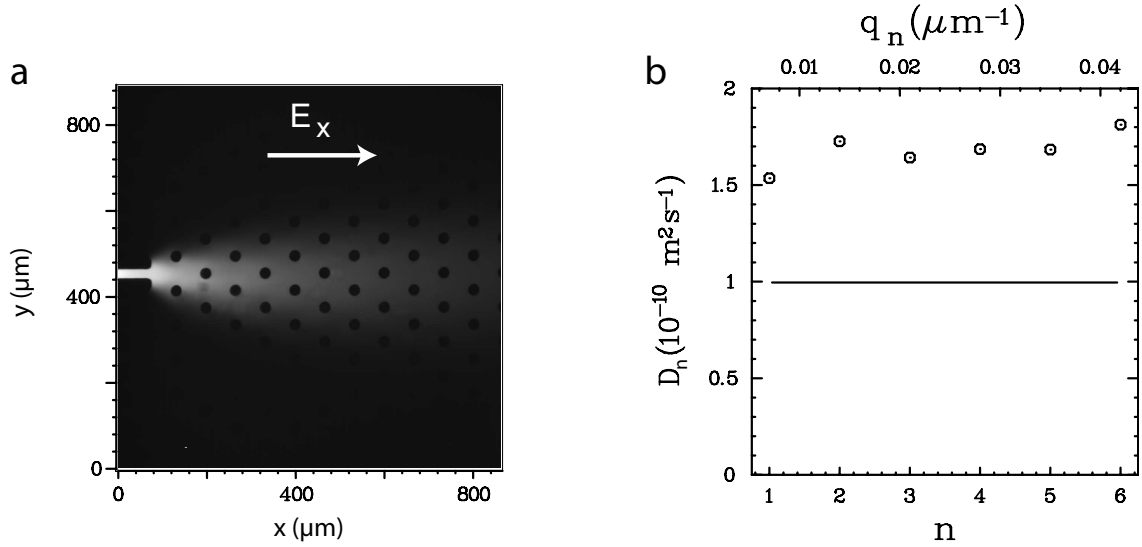


FIG. 8.13 – (a) Image de migration-diffusion stationnaire lorsque un oligonucléotide 13-mère marqué rhodamine-green, rhgTGT13, est injecté par un champ électrique constant $E_x = 2660 \text{ V m}^{-1}$ dans une chambre présentant des piliers de $30 \mu\text{m}$ séparés de $80 \mu\text{m}$. (b) Coefficient de diffusion D_n en fonction du mode de Fourier n ou de la fréquence spatiale q_n extraits par transformée de Fourier selon l'axe y de la figure (a) comme indiqué dans l'Article 2. La ligne horizontale indique la valeur de référence, obtenue dans une chambre d'analyse où les piliers étaient espacés de $800 \mu\text{m}$ (*cf.* Tableau 10.1 de l'Article 2, p. 186.). Tampon NaOH/Hepes 25/50 mM, pH 7.5, agarose %, 20°C .

Ces deux expériences, montrent que la présence de piliers peu espacés induit une dispersion importante. Pour réaliser les expériences d'électrodifusion en champ alternatif il est donc nécessaire de réduire la densité des piliers de manière considérable et nous avons retenu des designs avec des piliers espacés de $800 \mu\text{m}$ (Figure 8.12c). Si lors de l'assemblage entre le timbre de PDMS et la lamelle de verre la tenue mécanique était garantie, le remplissage provoquait l'affaissement systématique du plafond de la chambre d'analyse. En effet, lorsque l'on remplit le dispositif juste après traitement au plasma, le liquide rentre trop rapidement et la composante verticale des forces capillaires occasionne l'effondrement de la structure. L'hydrophilicité de la surface de PDMS se réduit avec le temps car les chaînes de polymère se réorganisent et font rentrer les parties hydrophiles à l'intérieur de la matrice. Cependant nous n'avons pas réussi à effectuer le remplissage du dispositif par le seul biais des forces capillaires ; lorsqu'elles sont trop faibles, la chambre ne se remplit plus. Ceci a été pendant une longue période un problème majeur pour nous et un changement de technologie vers un matériau dur, en verre ou silicium, a été considéré. Cependant, la fabrication dans ces matériaux est coûteuse et l'étape d'assemblage difficile à mettre en œuvre, de telle façon qu'il est nécessaire de garantir une vie utile minimale au dispositif. À cette étape de notre travail, les expériences étaient effectuées en gel d'agarose, les dispositifs avaient une durée de vie maximale de deux ou trois jours et le passage en technologie verre est apparu prohibitif.

Ito [89] et Goulpeau [90] ont proposé indépendamment un protocole de remplissage extrêmement simple qui profite de la porosité du PDMS au gaz. Il s'agit d'enlever le

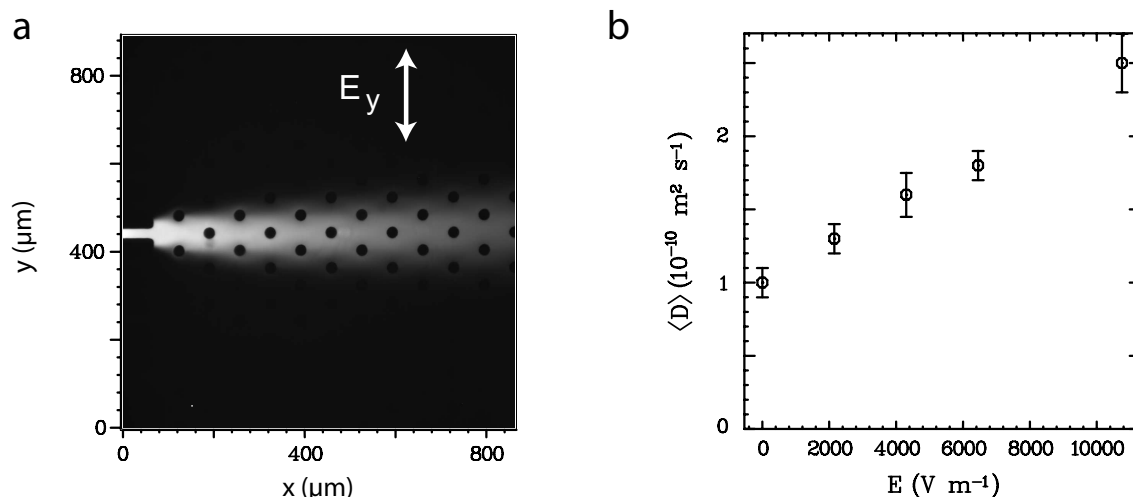


FIG. 8.14 – Dispersion induite par la présence des piliers dans un dispositif tel que celui de la Figure 8.12b. (a) Le coefficient de diffusion est mesuré pour un oligonucléotide 13-mère marqué rhodamine-green, rhgTGT13, dans une expérience de dispersion 1D en l'absence ou en présence d'un champ électrique alternatif E_y parallèle à la direction de diffusion. (b) Coefficient de diffusion moyen extrait de (a) en fonction de l'amplitude du champ électrique alternatif appliqué. Matrice : agarose 1%, NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5 20 °C. Le coefficient de diffusion de rhgTGT13 mesuré en l'absence de piliers dans ces conditions est $1.1 \pm 0.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (*cf.* Tableau 10.1 de l'Article 2, p. 186.)

gaz dissout dans le PDMS en exposant le dispositif assemblé au vide. Ensuite, à pression atmosphérique, le liquide est versé dans les réservoirs et le dispositif se remplit de façon autonome. Inspirés de ces travaux, on a combiné la capillarité (réduite de manière contrôlée) avec l'exposition au vide ce qui évite l'affaissement de la chambre d'analyse lors du remplissage. Dans ce design, le coefficient de diffusion mesuré à partir d'une figure de migration-diffusion stationnaire ou dans une expérience de dispersion 1D est indépendante de l'amplitude du champ électrique appliqué (*cf.* Section 10.4 de l'Article 2, p. 182, et Tableau 8.2).

8.7 Matrice d'analyse et suppression de l'électroosmose

Lorsque l'on introduit une solution ionique entre deux surfaces chargées et que l'on applique un champ électrique parallèlement à la surface, un écoulement du fluide apparaît. Ce phénomène est appelé électroosmose. Considérons une surface chargée négativement⁸. Le respect de l'électroneutralité génère une accumulation d'ions positifs dans son environnement proche. L'application d'un champ électrique met en mouvement ces ions positifs qui entraînent avec eux leur couche d'hydratation provoquant ainsi un déplacement du fluide dans son ensemble.

⁸C'est le cas du verre et du PDMS dans l'eau qui exposent des groupement SiO^- .

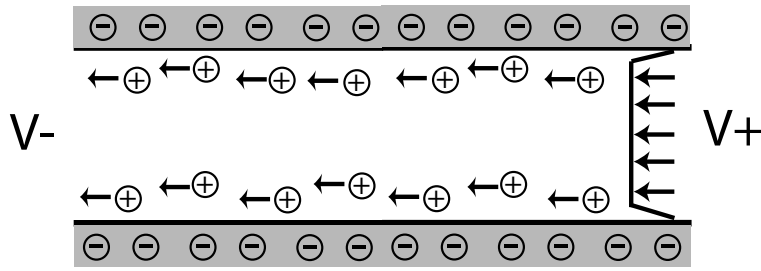


FIG. 8.15 – Schéma du profil de vitesse entre deux surfaces possédant une charge surfacique constante lorsque l'on applique un champ électrique parallèlement à la surface.

Dans le cas simple où les surfaces sont parallèles et ont une densité de charge surfacique constante, le profil de vitesses du fluide est de type bouchon (Figure 8.15). Cependant, lorsque des inhomogénéités de densité de charge sont présentes à la surface, la vitesse n'est plus constante dans l'espace. Le couplage entre la diffusion brownienne et un profil de vitesse non-constant dans l'espace génère des phénomènes de dispersion. Notre dispositif étant destiné à quantifier des phénomènes de diffusion/dispersion, toute autre source de dispersion est nuisible et doit être réduite.

8.7.1 Première solution : utilisation d'un gel d'agarose

Une façon de s'affranchir des sources de dispersion induites par un écoulement électro-osmotique résultant d'une distribution inhomogène de charges à la surface est de travailler en gel. Nous avons choisi un gel d'agarose pour deux raisons : i) La taille des pores est typiquement de 100 à 400 nm, une longueur beaucoup plus grande que celle des oligonucléotides utilisés ce qui ne devrait pas altérer leur réactivité. On peut alors supposer que les constantes cinétiques déterminées en solution vont avoir la même valeur dans ce gel. ii) Il est neutre ce qui limite les écoulements électroosmotiques à l'intérieur du pore.

L'utilisation de ce milieu doit être resituée de manière historique ; il s'agit effectivement du milieu utilisé dans l'expérience d'électrodifusion en capillaire millimétrique. D'autre part, la facilité de remplissage du microdispositif rencontrée lors des premières utilisations et l'obtention aisée de profils de migration-diffusion stationnaires ont fait du gel d'agarose la matrice d'analyse utilisée pendant une grande partie de ce travail. Cependant, cette matrice présente des faiblesses manifestes. Ainsi, le temps de vie des dispositifs remplis d'agarose est court, variant entre une dizaine de minutes et deux jours. Lors de l'application prolongée d'un champ électrique, le gel à l'intérieur des canaux se déplace ou simplement l'injection de l'analyte cesse. Nous avons longuement tenté de résoudre ce problème. D'abord en optimisant le processus de fabrication du microlaboratoire pour permettre de réaliser un nouveau dispositif en peu de temps. Ensuite, en utilisant plusieurs types de gels d'agarose visant à réduire ses interactions avec le champ électrique. On a essayé des agaroses IEF (*isoelectric focusing*) et à faible caractère électroosmotique sans résultats plus favorables.

L'explication de ces observations apparaît à présent limpide. Au début de sa vie utile, le gel d'agarose empêche de manière effective les flux électroosmotiques macroscopiques et permet ainsi la mesure de coefficients de diffusion sans observer d'autres sources de

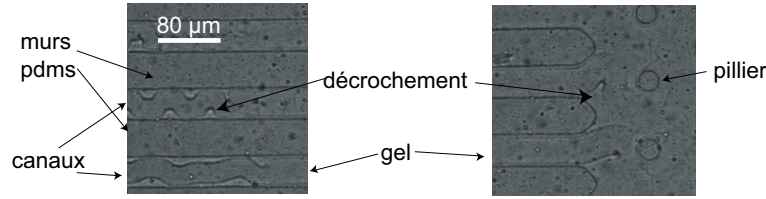


FIG. 8.16 – Images de microscopie en lumière blanche montrant le décrochement du gel d'agarose après application d'un champ électrique dans le microlaboratoire.

dispersion. Cependant, au cours du temps, la nature des surfaces de verre et PDMS est mal contrôlée et leur charge varie. De ce fait, des phénomènes électroosmotiques apparaissent à l'interface gel/paroi et cisailent le gel.

Notre conclusion est que le gel d'agarose est une mauvaise matrice lorsque l'on applique des champs électriques dans un dispositif microfluidique.

8.7.2 La matrice définitive : le PDMA

Une seconde façon de réduire la dispersion induite par l'électroosmose est de diminuer les inhomogénéités de charge surfacique. C'est la stratégie retenue par l'électrophorèse en capillaire de silice et plusieurs méthodes visant à contrôler la chimie de surface de ce matériau ont été mises en place [91]. Un traitement habituel consiste, par exemple, à recuire un capillaire contenant de l'hydroxypropylcellulose. La formation d'une couverture neutre à la surface du capillaire, sur une distance supérieure à la longueur de Debye, écrante les interactions électrostatiques et diminue fortement la surdensité de cations à l'origine du phénomène d'électroosmose. D'autres traitements reposent sur la modification covalente de la surface de silice, par exemple en utilisant un polyacrylamide linéaire [92].

Même si les groupements à la surface de la silice et du PDMS sont formellement les mêmes, la transposition de ces traitements de surface permanents d'un matériau à l'autre pose problème. En effet, le caractère polymère du PDMS confère à sa surface des propriétés dynamiques : un traitement de surface covalent aura ainsi une durée limitée par la réorganisation des chaînes de polymère [93].

Pour répondre aux besoins du séquençage de l'ADN, des nouvelles stratégies de suppression de l'électroosmose ont été mises au point en électrophorèse capillaire. Dans cette technique, on utilise traditionnellement une solution concentrée de polyacrylamide comme matrice de séparation de l'ADN, accompagnée d'un traitement de surface covalent. Des modifications récentes de ce polymère lui permettent d'agir en même temps comme matrice de séparation et agent de suppression de l'électroosmose [94, 95]. Ces polymères hydrophiles s'adsorbent de façon dynamique à la surface et empêchent la surconcentration de cations en sa proximité, diminuant ainsi fortement le flux électroosmotique⁹.

Pour le contrôle de l'électroosmose dans notre microdispositif hybride en verre et PDMS, nous avons utilisé le poly(diméthylacrylamide) (PDMA) d'une masse moléculaire moyenne $3 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$. N'étant pas intéressés par les propriétés de tamisage moléculaire de cette matrice, il est nécessaire de se situer en dessous de la concentration d'enchevê-

⁹D'autres traitements dynamiques antiélectroosmose ont été mis au point pour le PDMS. Ils utilisent des surfactants ioniques [96], neutres [97], ou des polyélectrolytes [93].

trement C^* [g L⁻¹] de ce polymère. Considérons un polymère en solution dont la taille caractéristique est donnée par son rayon de giration R_g [m]. Une solution est dite diluée quand la distance moyenne entre deux pelotes de polymère d_p [m] est supérieure à R_g . Quand la solution est plus concentrée, $d_p < R_g$, on rentre dans le régime semi-dilué et les différentes molécules de polymère s'enchevêtrent. Dans ce régime, les caractéristiques de la solution changent considérablement et par exemple des propriétés de tamisage moléculaire apparaissent. La concentration C^* correspond à la situation $d_p \sim R_g$ et s'exprime

$$C^* \cong \frac{1.5}{[\eta]}, \quad (8.10)$$

en fonction de la viscosité intrinsèque de la solution $[\eta]$ [L kg⁻¹] qui, à son tour, peut être reliée à la masse moléculaire du polymère M_w [g mol⁻¹] par l'équation empirique de Mark-Houwink [98]

$$[\eta] = K M_w^a, \quad (8.11)$$

où K [L kg⁻¹] et a sont des paramètres qui dépendent de la température, la nature du polymère et le solvant. Ces paramètres ont été déterminés dans la littérature pour des solutions de PDMA de poids moléculaire entre 200 kDa et 1.5 MDa ($K = 0.023$ mL g⁻¹, $a = 0.72$ à 25 °C) [99]. Avec ces valeurs, on peut estimer grossièrement la valeur de $C^* \sim 0.1\%$ (w/w) pour des solutions de PDMA de poids moléculaire 3 MDa à 20 °C.

TAB. 8.1 – Coefficients de diffusion de la fluorescéine et d'un fragment d'ADN double brin de 151 bp teinté avec YOYO-1 en fonction de la concentration de PDMA 3 MDa dans un tampon NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5 à 20 °C.

[PDMA] (w/w)	D (10 ⁻¹² m ² s ⁻¹)	
	Fluorescéine	151 bp
1%	260 ± 40	15 ± 2
0.1%	330 ± 10	17 ± 2
0%	340 ± 40	20 ± 2

Le Tableau 8.1 présente les coefficients de diffusion mesurés en microlaboratoire d'une petite molécule tel que la fluorescéine et d'un fragment d'ADN double brin de 151 bp teinté avec YOYO-1 dans des solutions 1%, 0.1% et 0% (w/w) en PDMA. Ces coefficients de diffusion ont été déterminés par la méthode de diffusion 1D non-stationnaire (*cf.* Figure 8.20, p. 157) en l'absence de champ électrique et d'effets électroosmotiques. Pour les deux espèces considérées, le coefficient de diffusion varie peu quand on passe de 0% à 0.1% PDMA.

La présence du PDMA peut avoir une influence sur le coefficient de diffusion de deux façons. D'une part en changeant la viscosité, de l'autre par un effet de tamisage. Dans le premier cas, il faut distinguer entre viscosité microscopique η_{micro} et viscosité macroscopique η_{macro} ¹⁰. La première est reliée à la diffusion, $D \sim 1/\eta_{micro}$, tandis que η_{macro} est associée aux propriétés rhéologiques de la solution. Dans une solution de polymère, les écarts entre ces deux grandeurs peuvent être conséquents. On peut supposer que les effets

¹⁰Ces deux grandeurs sont identiques lorsqu'on utilise une petite molécule comme additif (telle que le sucre ou le glycérol) mais elles diffèrent quand l'additif est un polymère.

de tamisage sont négligeables pour la fluorescéine. Ainsi, cette petite molécule sert d'indicateur de la variation de η_{micro} . Par contre, le fragment de 151bp permet de sonder les propriétés de tamisage à l'échelle de sa longueur de contour ~ 50 nm. Le Tableau 8.1 indique que ces deux effets sont faibles pour la solution 0.1% PDMA. Nous avons ainsi choisi cette dernière concentration en PDMA comme condition opératoire dans nos expériences.

Le Tableau 8.2 montre les coefficients de diffusion mesurés pour un fragment d'ADN de 151bp en l'absence et en présence de PDMA 0.1% par des expériences de diffusion 1D et de dispersion 1D en présence d'un champ électrique alternatif. Quand le PDMA n'est pas présent, la dispersion induite par l'électroosmose est très importante. En présence du PDMA la dispersion est négligeable même pour une espèce diffusant relativement lentement ($D_{151bp} = 17 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$).

TAB. 8.2 – Effet du PDMA sur la dispersion induite par l'électroosmose. Coefficients de diffusion D d'un fragment d'ADN double brin de 151 bp teinté avec YOYO-1 dans un milieu contenant ou pas du PDMA 0.1% (w/w). D est mesuré par la méthode non-stationnaire de diffusion 1D en l'absence ou en présence d'un champ électrique alternatif E_y , parallèle à la direction de diffusion. Tampon NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5 à 20 ° C.

E_y (V m ⁻¹)	D (10 ⁻¹² m ² s ⁻¹)	
	Tampon pur	Tampon + PDMA 0.1%
0	20 ± 2	17 ± 2
6000	60 ± 10	18 ± 2

L'utilisation de cette solution de PDMA a résolu tous les problèmes de la matrice d'agarose et a constitué une amélioration technologique majeure. Le remplissage du microdispositif demeure simple et, de plus, le milieu peut être échangé. On peut ainsi faire varier la nature du tampon ou régénérer l'état de charge de la surface sans devoir fabriquer un nouveau dispositif. D'autre part, le temps de vie est allongé de manière considérable et il est désormais limité seulement par l'accumulation de poussières dans les microcanaux. En effet, le microlaboratoire dispose de grands réservoirs en contact avec l'air pour permettre le dégagement des bulles de gaz générées aux électrodes. Le filtrage des solutions de travail et une manipulation soigneuse permettent d'utiliser un dispositif rempli de PDMA pendant un mois.

8.7.3 Reproductibilité des mesures de mobilité

Le microlaboratoire permet la mesure de la vitesse électrophorétique v [m²s⁻¹] en enregistrant un front de migration en fonction du temps (Figure 8.18). Une mobilité électrophorétique apparente peut être obtenue par ajustement linéaire de la vitesse mesurée en fonction du champ électrique appliqué

$$\mu_{app} = (\mu + \mu_{EO}) = \frac{v}{E} \quad (8.12)$$

où μ est la mobilité électrophorétique de l'analyte et μ_{EO} la mobilité électroosmotique. Le champ électrique E à l'intérieur de la chambre d'analyse est calculé d'après (8.5).

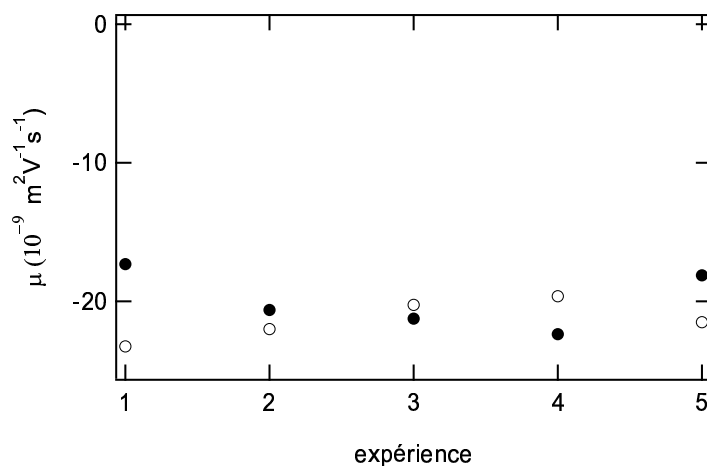


FIG. 8.17 – Mobilité électrophorétique apparente d'un oligonucléotide 13-mère marqué avec rhodamine-green (rhgTGT13) mesurée pour différents microdispositifs et différents jours dans une solution contenant PDMA 0.1% (cercles vides) ou un gel d'agarose 1% (cercles pleins). Solution NaOH/Hepes 25/0 mM pH 7.5, 20 ° C.

La Figure 8.17 représente la mobilité apparente d'un oligonucléotide 13-mère marqué rhodamine-green, mesurée dans le microlaboratoire pour différentes dispositifs et jours d'expérience dans deux matrices différentes. Les mobilités obtenues dans la solution PDMA 0.1% et dans le gel d'agarose 1% sont comparables et valent ici $\mu_{app} = -20 \pm 2 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, avec une variabilité d'environ 10% en fonction du temps (le signe moins indique que l'espèce migre vers l'électrode positive). Si le dispositif ne permet pas une mesure extrêmement précise de la mobilité, les valeurs obtenus sont assez stables avec le temps quand le PDMA est présent. Pour chaque expérience, on détermine la vitesse de migration directement dans le microlaboratoire et non pas en la calculant à partir de la valeur de la mobilité apparente et du champ appliqué.

La mobilité apparente mesurée dans le chip est à comparer avec la mobilité électrophorétiques (corrigées de l'électroosmose) obtenue en électrophorèse capillaire (*cf.* Tableau 6.3, p. 120) en solution libre $\mu = -37.6 \pm 0.4 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, pour rhgTGT13. Une différence d'un facteur deux est observée entre ces deux mesures. Les sources de cette différence peuvent être variées : électroosmose, adsorption aux parois, erreur dans le calcul du champ électrique. Nous n'avons jamais observé de fluorescence résiduelle dans les parois du microlaboratoire, ce qui indique que l'adsorption des analytes est faible. La valeur du champ électrique à l'intérieur de la chambre dépend de la géométrie des canaux et celle-ci peut varier d'un dispositif à un autre au plus de 10%. Ainsi, tout semble indiquer que la mobilité électroosmotique résiduelle dans le microlaboratoire est d'environ $\mu_{EO} = +20 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, autant dans une solution de PDMA 0.1% qu'en gel d'agarose 1%. Cette valeur est à comparer avec la mobilité électroosmotique mesuré dans le tampon pur $\mu_{EO} = +50 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$. Nous n'avons pas cherché à mesurer précisément cette contribution puisque notre seul intérêt était de trouver une matrice d'analyse qui n'induisse pas de dispersion lors de l'application d'un champ électrique.

8.8 Les possibilités du microlaboratoire

Au delà de la mise en évidence du phénomène d'électrodifusion en champ électrique alternatif et son application à la séparation dans le cas d'un mélange réactif d'oligonucléotides, le microlaboratoire élaboré au cours de cette thèse fournit une plateforme idéale pour étudier une série de problèmes couplant diffusion, migration et réaction chimique. Les paragraphes suivants décrivent brièvement les types d'expériences qui peuvent y être réalisées et l'information qui peut être en déduite. Le cadre théorique correspondant à chaque expérience est détaillé à la Section B.3, p. 243.

8.8.1 Mesure de mobilités

Lorsque la chambre d'analyse est libre de toute substance fluorescente et que l'on applique un champ électrique constant selon l'axe x , E_x , l'échantillon fluorescent migre le long du canal d'injection dans la chambre. L'enregistrement du front fluorescent en fonction du temps permet de mesurer la vitesse de migration de l'analyte dans la chambre, v_x , (Figure 8.18). La pente de v_x en fonction de E_x permet d'atteindre la mobilité apparente μ_{app} , somme de la mobilité électrophorétique μ et électroosmotique μ_{EO} (cf. Section 8.7).

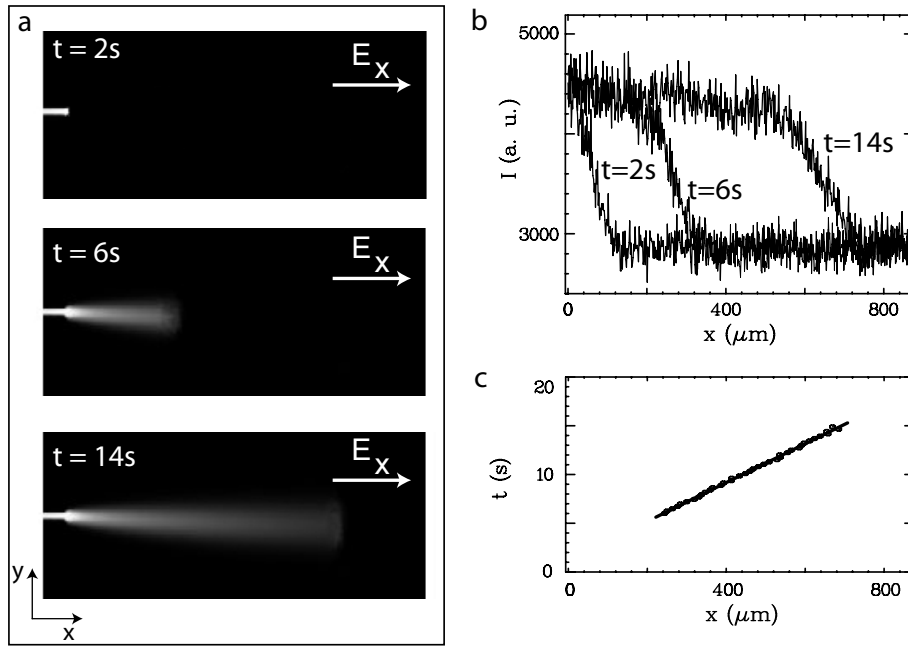


FIG. 8.18 – Mesure de la vitesse de migration d'un analyte. (a) images successives à différents temps lors de l'injection d'un analyte fluorescent (rhgTGT13, $1 \mu M$) en champ électrique constant $E_x = 2600 \text{ V m}^{-1}$. (b) Profils d'intensité fluorescence selon x pour les trois images représentées en (a). (c) Tracé de la position du front en fonction du temps calculé par auto-corrélation des profils d'intensité de fluorescence. La ligne fournit un ajustement linéaire des points expérimentaux.

8.8.2 Image de migration-diffusion stationnaire

Au bout d'un certain temps, l'application d'un champ électrique constant selon x , E_x , résulte en une image stationnaire qui ressemble à un cône (Figure 8.19). L'analyte migre selon l'axe x à vitesse constante v_x et diffuse selon les deux axes x et y . Le temps de séjour d'une molécule dans le champ de vue de la caméra, de longueur ℓ_x [m], est $t_{exp} = \ell_x/v_x$. La largeur typique du cône de diffusion est proportionnelle à D/v_x , où D est le coefficient de diffusion de l'espèce fluorescente. Selon le type d'échantillon injecté, une analyse détaillée de l'image stationnaire de migration-diffusion permet de :

- Mesurer des coefficients de diffusion lorsqu'on injecte une espèce pure (Paragraphe 10.4.3 de l'Article 2, p. 185).
- Quantifier et identifier les composants d'un mélange binaire (Paragraphe 10.4.4 de l'Article 2, p. 187).
- Déterminer la constante thermodynamique et les constantes cinétiques de la réaction $A + B \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C$ lorsqu'on injecte le mélange à l'équilibre et que A et C présentent des coefficients de diffusion différents (Article 3).

Nous avons réalisé ces trois expériences au cours de cette thèse.

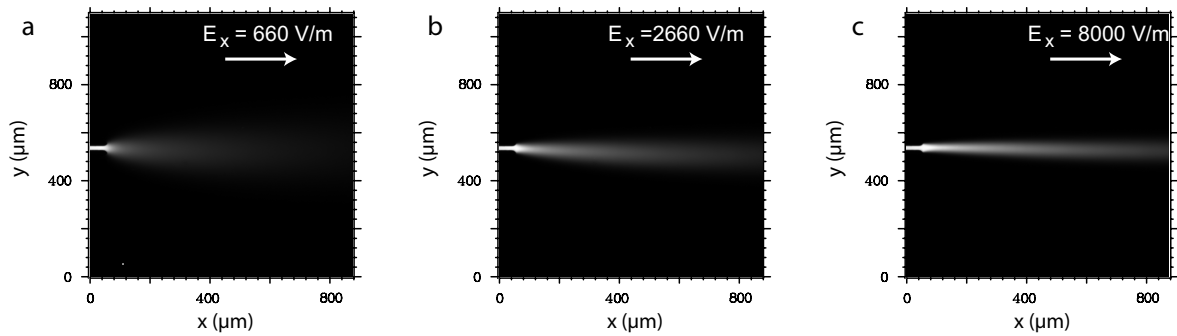


FIG. 8.19 – Image de fluorescence du cône de migration-diffusion stationnaire d'un oligonucléotide fluorescent (rhgTGT13) lorsqu'on applique des champs électriques E_x de plus en plus importants correspondant à des vitesses de migration de (a) $v_x = 16 \mu\text{m s}^{-1}$, (b) $v_x = 64 \mu\text{m s}^{-1}$ et (c) $v_x = 186 \mu\text{m s}^{-1}$.

8.8.3 Diffusion 1D

Lorsque l'on éteint le champ électrique E_x utilisé pour créer l'image de migration-diffusion précédente, le cône initial s'étale au cours du temps. On peut enregistrer l'évolution temporelle du profil de fluorescence selon l'axe y et réaliser les mêmes expériences que celles que l'on vient de décrire en mode stationnaire. Cependant, le rapport signal sur bruit des acquisitions non-stationnaires est défavorable et nous n'avons réalisé au cours de cette thèse que des mesures de coefficients de diffusion d'espèces pures dans cette configuration.

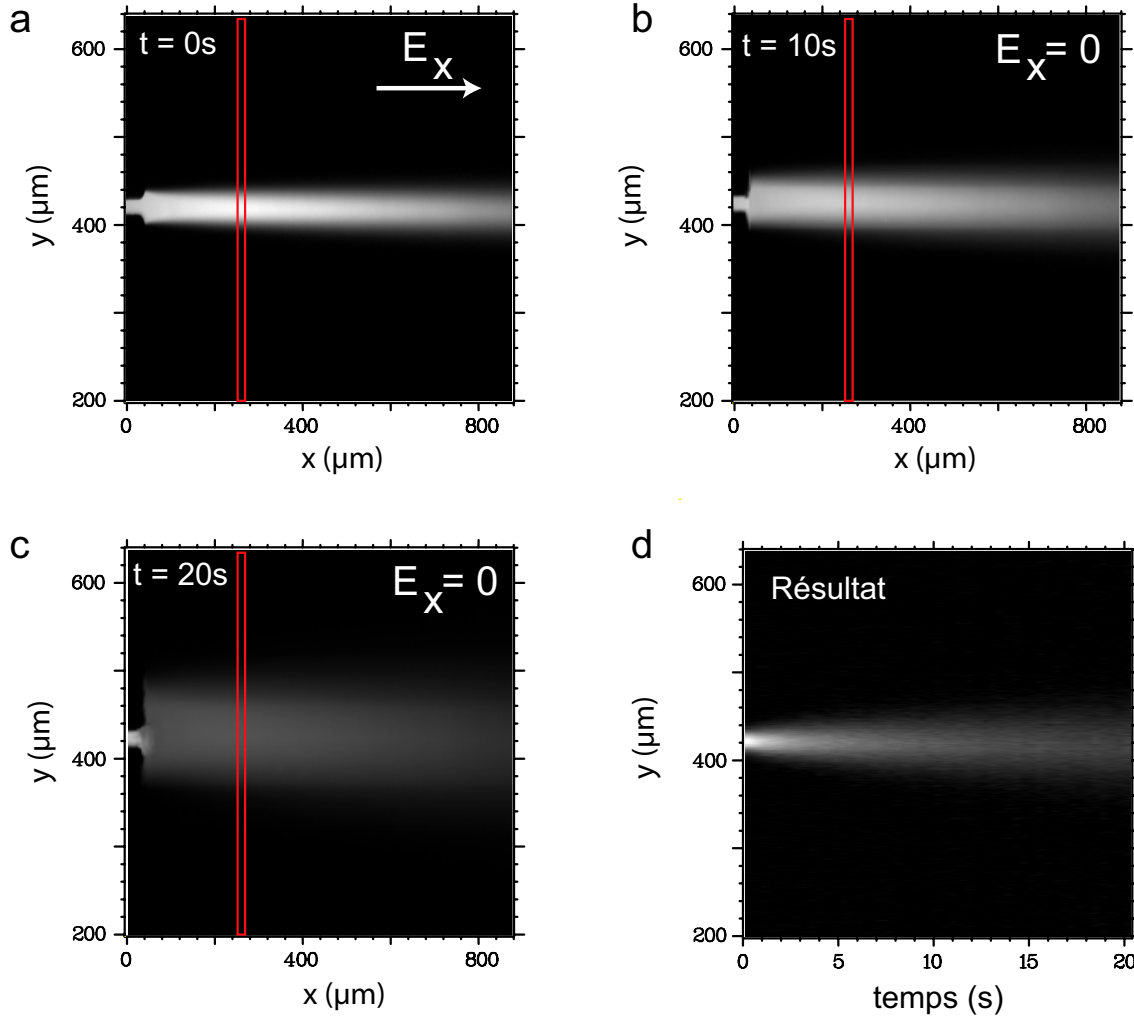


FIG. 8.20 – Mesure de diffusion 1D dans le microlaboratoire. (a) Une condition initiale stationnaire est créée en appliquant un champ électrique E_x . (b) et (c) Le champ est éteint et l'étalement du profil de concentrations est enregistré au cours du temps en moyennant les profils à l'intérieur du rectangle. (d) Les profils enregistrés sont réunis dans une image espace/temps, dont la largeur nous renseigne sur le coefficient de diffusion.

8.8.4 Électrophorèse 1D

À partir de l'image de migration-diffusion stationnaire, on peut également éteindre le champ E_x et appliquer un champ constant E_y . L'enregistrement du profil de fluorescence selon l'axe y en fonction du temps permet de réaliser des expériences d'électrophorèse. Pour un analyte qui migre à la vitesse v_y , la durée totale de l'expérience est limitée par la largeur du champ de vue du microscope ℓ_y et on obtient $t_{exp} = \ell_y/v_y$. Nous pouvons ainsi :

- Mesurer la mobilité électrophorétique apparente d'une espèce pure $\mu_{app} = E_y/v_y$.
- Séparer des composés non-réactifs selon leur mobilités électrophorétiques.
- Mesurer les constantes cinétiques de la réaction $A + B \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C$ lorsque A et C possèdent des mobilités électrophorétiques différentes.

Les deux premiers types d'expériences, là-encore défavorables du point de vue du rapport signal sur bruit, ont été réalisées au cours de cette thèse. La troisième expérience est évaluée théoriquement dans le Paragraphe B.3.4, p. 246.

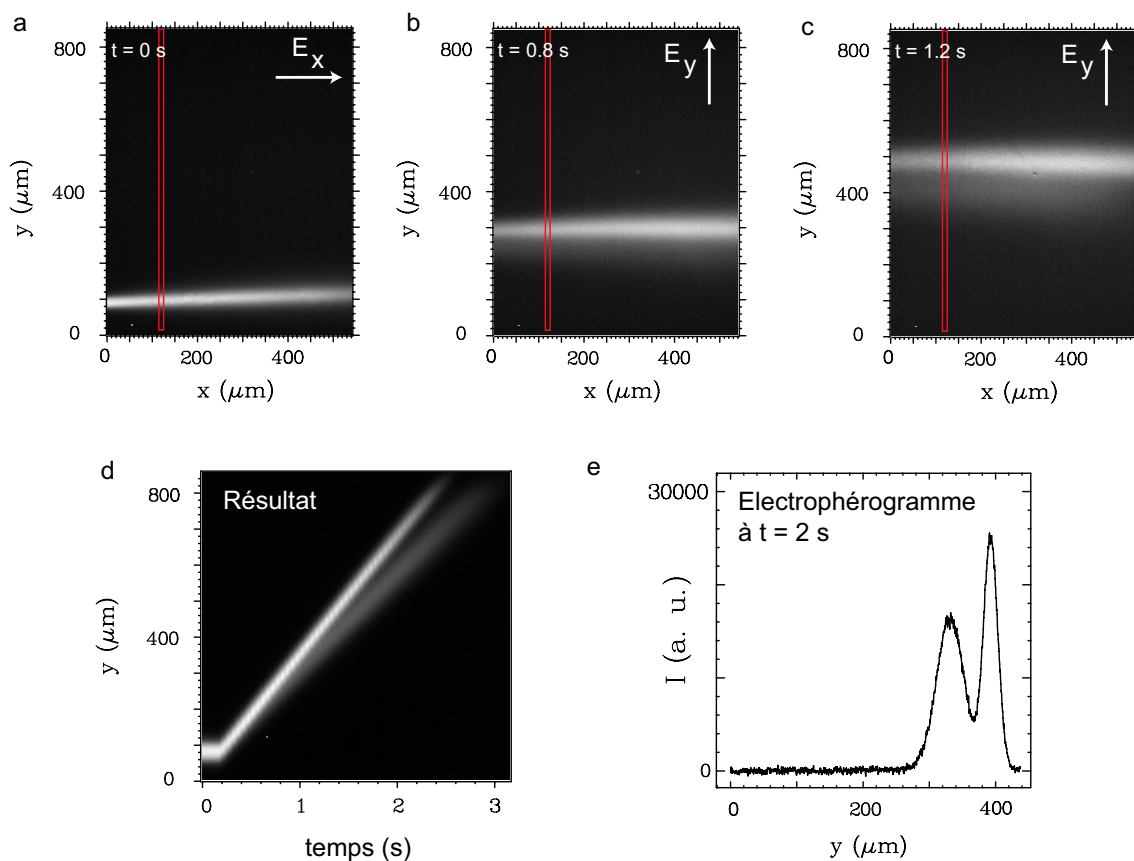


FIG. 8.21 – Expérience d'électrophorèse 1D montrant la séparation de deux espèces non-réactives : la fluorescéine et rhgACA27, un oligonucléotide simple brin de 27 bases de longueur marqué rhodamine-green. (a) Une condition initiale stationnaire est créée en appliquant un champ électrique E_x . Ce champ est éteint et un champ E_y est allumé (b), (c). Le profil de fluorescence selon y est enregistré (rectangle) et tracé en fonction du temps (d). (e) Électrophérogramme à $t = 2$ s correspondant à (d).

8.8.5 Dispersion 1D en champ électrique alternatif

On peut également réaliser une expérience analogue à celle de la diffusion 1D mais en présence d'un champ électrique alternatif selon l'axe y , E_y . Pour une espèce pure, cette mesure permet de quantifier l'existence de sources de dispersion associées à l'électrosmose ou à la présence des piliers. En présence d'un milieu réactionnel $A + B \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C$ tel que A et C ont des mobilités électrophorétiques différentes, le phénomène d'électrodifusion devrait être observé, comme il l'a déjà été dans une configuration voisine (*cf.* Introduction générale p. 24, Figure 1.4 et [15, 16]). Au cours de cette thèse, seule la première expérience a été réalisée.

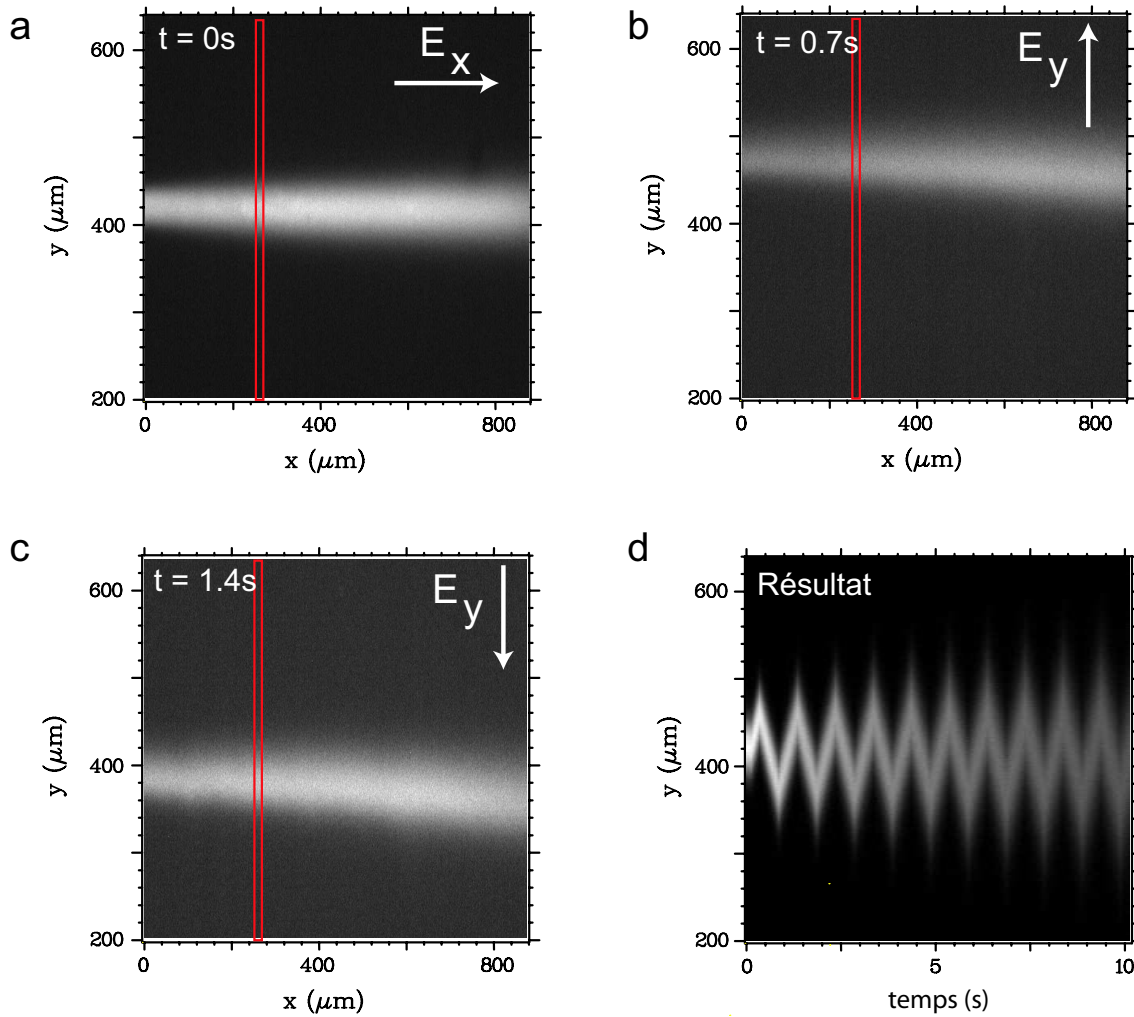


FIG. 8.22 – Expérience de dispersion 1D en champ électrique alternatif. (a) Une condition initiale stationnaire est créée en appliquant un champ électrique E_x . Le champ E_x est éteint et un champ électrique alternatif E_y est allumé entraînant le déplacement du profil de concentrations par migration et son étalement par diffusion/dispersion (b) et (c). Le profil de fluorescence selon y est enregistré (rectangle) et tracé en fonction du temps (d).

8.8.6 Electrodiffusion quasi-stationnaire

Voici enfin l'expérience pour laquelle le microlaboratoire a été initialement conçu. Un champ électrique constant E_x est superposé à un champ électrique alternatif E_y . Le premier champ fournit l'équivalence espace-temps et le second permet de révéler le phénomène d'électrodiffusion. Les expériences destinées à illustrer cette configuration sont en cours. Elles n'ont pu être intégrées dans ce manuscrit de thèse mais pourront, le cas échéant, être présentées lors de la soutenance orale.

Pour toutes les applications expérimentales qui viennent d'être évoquées, on profite d'un point fort du microlaboratoire : à l'intérieur de la chambre d'analyse, le profil de vitesses est de type bouchon. Il est alors possible de résoudre analytiquement les équations couplant réaction et transport (migration et diffusion). Nous avons systématiquement appliqué la transformée de Fourier pour obtenir les solutions (*cf.* Annexe B et Article 2) et profité du caractère multi-échelle de cette analyse pour découpler la contribution des trois phénomènes considérés.

8.9 Conclusion

Nous avons présenté la démarche suivie lors de ce travail pour construire un micro-dispositif répondant aux contraintes de l'expérience d'électrodiffusion. Notre idée initiale était de transposer directement le principe de l'expérience en capillaire millimétrique. Cette approche s'est révélée inadéquate et ce n'est qu'en s'éloignant de la conception macroscopique qu'un microlaboratoire opérationnel a pu être réalisé, spécialement pour les protocoles d'injection de la condition initiale et de contrôle de l'électroosmose.

Le dispositif permet l'injection d'un profil de concentration de $20\ \mu\text{m}$ de largeur dans une chambre d'analyse dans laquelle on peut appliquer des champs électriques homogènes en deux dimensions d'amplitudes entre 2.6×10^4 et $260\ \text{V m}^{-1}$. Les vitesses d'injection mesurées dans ces conditions varient entre 5 et $500\ \mu\text{m s}^{-1}$ pour la fluorescéine et des oligonucléotides simple et double brin de longueurs variées. L'observation se faisant avec une champ de vue d'environ 1 mm ces vitesses se traduisent par des temps de séjour dans la chambre entre 0.5 et 50 s.

Dans les prochains chapitres, nous discutons les applications du microlaboratoire déjà évoquées à la Section 8.8. Le Chapitre 9 et l'Article 2 discutent de la mesure stationnaire de coefficients de diffusion d'une espèce pure et de mélanges binaires non-réactifs. La mesure de constantes cinétiques par injection d'un mélange à l'équilibre est abordée dans l'Article 3.

Chapitre 9

Mesure de coefficients de diffusion

Ce chapitre accompagne l’Article 2 qui traite de la mesure stationnaire de coefficients de diffusion dans le microdispositif présenté au Chapitre 8. Dans un premier temps, nous introduisons brièvement quelques méthodes de mesure de coefficients de diffusion existant dans la littérature, autant macroscopiques que dans un microsystème. Ensuite, la mesure dans le *T-sensor*, un dispositif semblable au nôtre, est étudiée plus en détail. Enfin, les résultats de l’Article 2 sont présentés.

9.1 Généralités sur la mesure de coefficients de diffusion

9.1.1 La RMN

L’information du mouvement de translation d’une molécule peut être encodée dans un spectre de RMN en appliquant un gradient pulsé de champ magnétique dans l’échantillon. Cette méthode, appelée PFG-NMR (*pulsed-field gradient NMR*) permet alors de mesurer des coefficients de diffusion [100]. En variant le délai entre les impulsions de gradient de champ magnétique, il est possible de sonder différentes échelles de temps de diffusion. C’est une méthode très précise mais présente l’inconvénient d’être peu sensible. D’autre part, la mesure est limitée à des coefficients de diffusion supérieurs à $10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$.

9.1.2 La FCS

Dans la spectroscopie de corrélation de fluorescence (*fluorescence correlation spectroscopy*) on enregistre l’intensité de fluorescence en fonction du temps provenant d’une région de l’espace de l’ordre de $1 \text{ } \mu\text{m}^3$. Ce volume est situé dans un échantillon fluorescent à faible concentration (typiquement 100 nM) de telle façon que le nombre de fluorophores à l’intérieur du volume d’excitation est suffisamment petit pour pouvoir observer des fluctuations d’intensité de fluorescence (10 – 100 molécules). Lorsqu’une molécule sort ou rentre du volume d’excitation par diffusion, l’intensité de fluorescence change. En calculant la fonction d’autocorrélation d’intensité de fluorescence, il est possible de remonter au temps moyen qu’une molécule passe dans le volume d’observation et à son coefficient de diffusion (*cf.* Paragraphe 10.3.8, p. 181) [101]. Nous avons utilisé cette technique comme référence pour évaluer les mesures réalisées en microlaboratoire.

9.1.3 Le FRAP

La technique de retour de fluorescence après photoblanchiment (*fluorescence recovery after photobleaching*) utilise la photodestruction pour créer un profil de concentrations non-stationnaire dans un échantillon fluorescent [102]. Initialement, l'échantillon présente une fluorescence homogène. Une impulsion de deux lasers focalisés au même point de l'échantillon crée une figure d'interférence avec des zones de forte intensité lumineuse et des zones d'obscurité d'une largeur de 1 à 50 μm [103]. L'intensité de cette impulsion est réglée pour détruire le fluorophore dans les zones éclairées en un temps d'environ 1 s. Ensuite, l'excitation est éteinte et l'évolution du profil de fluorescence est enregistrée en fonction du temps avec un seul laser d'intensité beaucoup plus faible. Le fluorophore diffuse vers les zones où il a été détruit. L'analyse du signal s'effectue habituellement par transformée de Fourier.

9.2 Mesure de coefficients de diffusion dans les microsystèmes

9.2.1 Dispersion de Taylor-Aris

Lorsqu'on introduit un fin profil de concentrations à l'intérieur d'un tube avec le liquide au repos, il diffuse librement. Si on introduit un écoulement par différence de pression, un profil de vitesses de type Poiseuille apparaît. La vitesse du liquide est maximale au centre de tube et nulle sur les parois, avec une forme parabolique dans le cas d'un tube de section circulaire. Dans le régime de temps courts par rapport à la diffusion, le profil de concentrations initial se déforme sur l'effet du champ de vitesses et un gradient de concentrations apparaît le long de la section du tube. Dans le régime de temps intermédiaires, ce gradient s'homogénéise sous l'effet de la diffusion selon la direction perpendiculaire au tube. Ce phénomène peut être utilisé pour mesurer le coefficient de diffusion car le coefficient de dispersion selon l'axe du tube est inversement proportionnel à D . Les premiers à décrire ce phénomène ont été Taylor [104, 105] et Aris [106], tandis que Righetti et collaborateurs l'ont mise en œuvre dans un capillaire de 50 μm de diamètre [107]. Récemment, Ajdari et collaborateurs ont étudié le phénomène dans des canaux microfluidiques de hauteur variable [108].

9.2.2 Méthode non-stationnaire de Culbertson

Culbertson et collaborateurs ont mesuré des coefficients de diffusion en enregistrant un profil de concentrations en fonction du temps dans un microsystème en verre [78]. Pour générer la condition initiale, ils utilisent un dispositif en croix qui permet de générer un profil initial de concentration d'une largeur typique de 200 μm en utilisant des champs électriques (*cf.* Figure 8.2). La variance σ^2 du profil est calculée pour chaque temps en utilisant un fit gaussien. Un ajustement linéaire de la fonction σ^2 *vs.* temps fournit le coefficient de diffusion. Aucune dispersion induite par le champ électrique est constatée et ce, sans utiliser un agent de suppression de l'électroosmose.

9.2.3 Flux en cisaillement

Récemment, Desmet et collaborateurs ont utilisé un flux en cisaillement pour générer le mouvement du liquide dans un microcanal comme alternative au flux par pression ou électroosmotique [109]. Ils ont déterminé dans ce système des coefficients de diffusion de fragments d'ADN simple brin dans des canaux de 100 nm [66].

9.2.4 Un dispositif stationnaire : le *T-sensor*

Dans le *T-sensor*, deux solutions sont injectées à flux constant dans les bras de microcanaux en forme de T (Figure 9.1a). Selon la composition de ces solutions, le *T-sensor* permet la mesure de coefficients de diffusion [110, 111], la quantification d'espèces en solution [111, 112] ainsi que la mesure de constantes cinétiques [113]. On se limitera ici à étudier le premier cas que l'on expose de manière plus détaillée par sa ressemblance avec notre méthode de mesure de coefficients de diffusion exposée dans l'Article 2.

Principe de la mesure de D

Pour la mesure de coefficients de diffusion dans le *T-sensor*, on injecte par les deux entrées une solution avec la molécule d'intérêt d'une part et une autre avec le tampon d'autre part. Le flux est créé par application d'une différence de pression ce qui induit à l'intérieur des canaux un profil de vitesse parabolique de type Poiseuille¹.

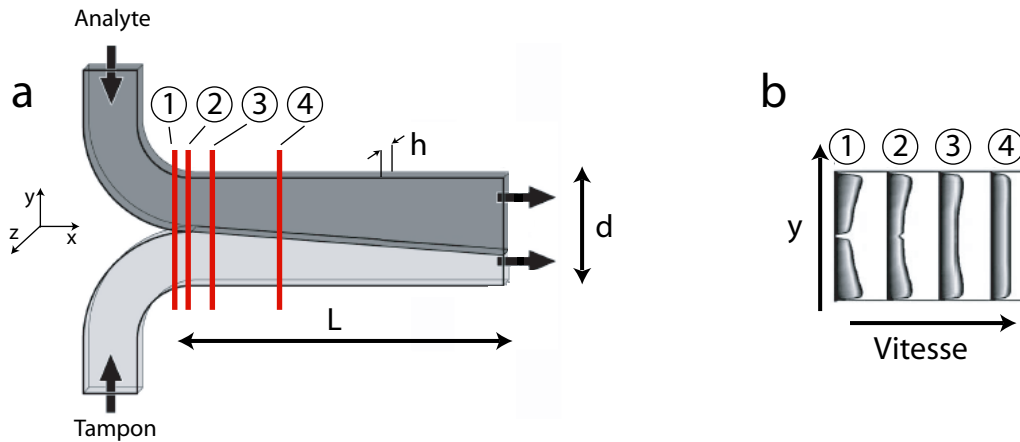


FIG. 9.1 – (a) Principe du *T-sensor*. Deux fluides sont introduits par deux canaux microfluidiques et s'écoulent côte à côte le long du canal principal. La présence d'un soluté (en grisé) dans un des canaux résulte en un élargissement du profil de concentration à partir duquel le coefficient de diffusion peut être extrait. Les dimensions typiques sont $L = 5$ mm, $d = 0.2 - 2$ mm, $h = 10$ μ m. (b) Profils de vitesses à mi-hauteur ($z = h/2$), calculés par des simulations d'éléments finis en trois dimensions, pour quatre positions le long de l'axe x . Les numéros sont en lien avec la figure (a). Repris avec modifications de [111] et [110].

¹Lorsque l'on applique une chute de pression ΔP sur une longueur L , le profil de vitesse interne d'un tube cylindrique de rayon R , rempli d'un fluide de viscosité η , est $v(r) = \frac{1}{4\eta} \frac{\Delta P}{L} (R^2 - r^2)$ où r est la distance au centre du tube [114].

Dans ce dispositif, la mesure du coefficient de diffusion se réalise de la façon suivante. On impose un certain débit d'injection Ψ [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$], ce qui permet de calculer la vitesse moyenne du liquide

$$\bar{v} = \frac{\Psi}{dh}, \quad (9.1)$$

en fonction des caractéristiques géométriques du canal principal de section rectangulaire (largeur d [m] et hauteur h [m]).

Une série d'approximations, que l'on discutera par la suite, conduit à considérer une vitesse constante v_x le long du canal principal et à négliger la diffusion selon les axes x et z . Le problème d'advection-diffusion à deux dimensions s'écrit alors, pour une espèce F de concentration F [mol L^{-1}]

$$\bar{v}_x \frac{\partial F(x, y)}{\partial x} = D \frac{\partial^2 F(x, y)}{\partial y^2}. \quad (9.2)$$

On choisit comme condition au bord une marche de concentration selon y

$$\begin{cases} F(0, y) = 0 & \text{pour } 0 < y < \frac{d}{2} \\ F(0, y) = F_0 & \text{pour } \frac{d}{2} < y < d. \end{cases} \quad (9.3)$$

En combinant (9.2) et (9.3), le profil de concentrations adopte une forme sigmoïde [115]

$$F(x, y) = \frac{1}{2} F_0 \left(1 - \operatorname{erf} \frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right), \quad (9.4)$$

où erf désigne la fonction d'erreur².

D'un point de vue expérimental, le profil de concentration $F(L, y)$ est enregistré pour différentes valeurs de $\bar{v}$ loin du point d'injection et ajusté selon l'équation (9.4) pour extraire le coefficient de diffusion.

Approximations

Il est nécessaire d'effectuer un certain nombre d'approximations avant d'écrire l'expression (9.2) qui conduit au résultat simple (9.4). Ainsi, l'équation complète décrivant le problème stationnaire d'advection-diffusion dans le *T-sensor* est

$$v_x(x, y, z) \frac{\partial F(x, y, z)}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) F(x, y, z), \quad (9.5)$$

où nous avons explicité la dépendance spatiale de la vitesse d'advection³, v_x , due au profil de vitesses hydrodynamique, et de la concentration F car le problème est ici rigoureusement tridimensionnel.

² $\operatorname{erf} z = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^z e^{-t^2} dt$.

³Dans le cas le plus général d'un écoulement, il faut considérer $\vec{v} = v_x \vec{i} + v_y \vec{j} + v_z \vec{k}$. Cependant, dans le régime à faible nombre de Reynolds de la microfluidique, les écoulements sont laminaires et les lignes de courant suivent la géométrie du canal. On a donc dans le canal principal du *T-sensor* $\vec{v} = v_x \vec{i}$. Le nombre de Reynolds, Re , est une quantité adimensionnelle qui quantifie l'importance relative des phénomènes diffusifs et convectifs dans le transport de la quantité de mouvement d'un fluide de viscosité η [$\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-1}$] et de densité ρ [kg m^{-3}] à la vitesse v sur une distance caractéristique L : $Re = \frac{\rho v L}{\eta}$.

Discutons d'abord la forme de $v_x(x, y, z)$, le profil de vitesse hydrodynamique à l'intérieur du canal principal. Kamholz *et al.* [110], ainsi que Beard [116] ont réalisé des simulations du profil de vitesses tridimensionnel dans le *T-sensor* par des méthodes d'éléments finis⁴. La Figure 9.1b, représente des profils $v_x(y)$, à $z = h/2$, pour des valeurs de x de plus en plus éloignées du point d'injection. Ces calculs numériques mettent en évidence la dépendance en x et y du profil de vitesses près du point d'injection. Suffisamment loin de celui-ci, à une distance $x \geq \ell_0$, on dit que le profil de vitesses est complètement développé : il ne dépend plus de x et adopte la forme représentée à la Figure 9.2. La loi d'échelle pour calculer ℓ_0 dépend fortement du rapport d'aspect d/h du canal principal. Dans le cas le plus classique où ce rapport n'est pas trop grand ($d/h \sim 10$), $\ell_0 \sim h$ est assimilé à la plus petite longueur [116]. En revanche, pour $d/h \sim 200$, situation communément rencontrée dans le *T-sensor* (*vide infra*), $\ell_0 \sim d$ où typiquement $d \sim 1$ mm [110].

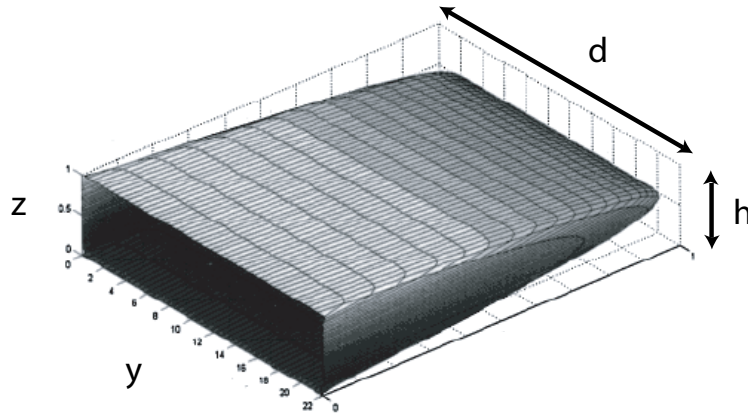


FIG. 9.2 – Simulation du profil de vitesses complètement développé ($x > \ell_0$) dans le *T-sensor* en fonction de y et z . Figure extraite de [111].

Pour les dispositifs à fort rapport d'aspect, le profil de vitesses complètement développé est, dans une bonne approximation, indépendant de y (Figure 9.2). Dans ce cas, et pour des valeurs $x \geq \ell_0$, (9.5) prend la forme

$$v_x(z) \frac{\partial F(x, y, z)}{\partial x} = D \left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2} \right) F(x, y, z), \quad (9.6)$$

où $v_x(z)$ présente un profil parabolique de type Poiseuille

$$v_x(z) = -\frac{6\bar{v}}{h^2}(z^2 - hz). \quad (9.7)$$

La dépendance en z de (9.7) est la source d'un effet qu'il est important de considérer car il peut introduire des artefacts dans la mesure de D . En condition aux limites de non-glissement pour la vitesse d'un fluide près d'une paroi, v_x s'annule pour $z = 0$ et $z = h$.

⁴La méthode d'éléments finis (*FEM* pour *Finite element method*) permet de résoudre numériquement une équation aux dérivées partielles avec des conditions aux bords dans une géométrie définie. Une fois que les conditions limites dans les surfaces ou segments qui définissent la géométrie sont fixées, l'espace est maillé par un ensemble de nœuds sur lesquels l'équation différentielle est résolue.

Intéressons nous à un soluté qui parcourt la distance L selon x dans le canal principal du T -sensor. S'il passe la plupart de son temps près de la paroi, son temps de séjour dans le canal principal sera bien supérieur à celui d'un soluté qui circule près du centre du canal. Pendant ce temps, il aura diffusé sur une distance caractéristique δy , selon y , qui sera aussi plus importante. Cet effet fait ainsi apparaître un profil de concentration, à l'interface des deux liquides injectés, qui a une forme d'ailes de papillon, comme ont proposé Kamholz *et al.* [111] et démontré expérimentalement Ismagilov *et al.* [117] (Figure 9.3).

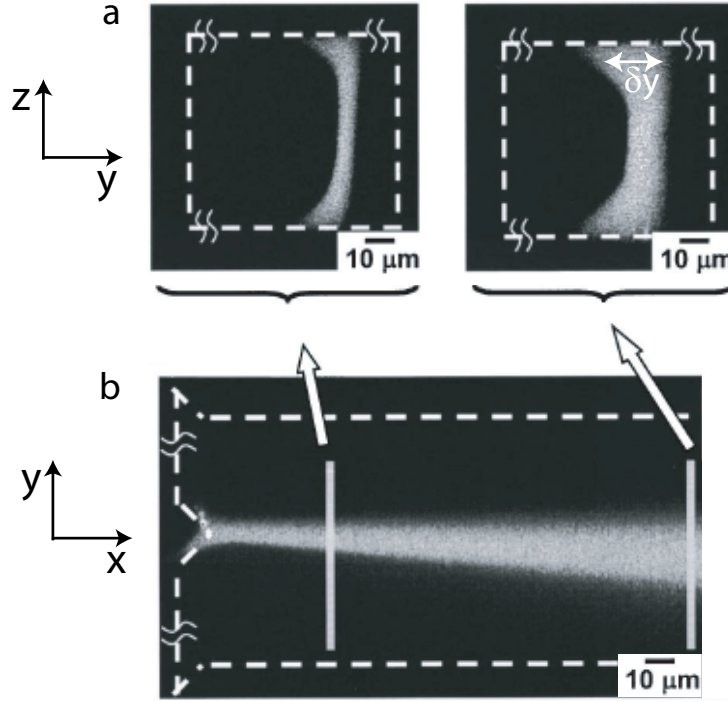


FIG. 9.3 – Images par microscopie confocale de fluorescence qui mettent en évidence la forme en demi-papillon de la zone de diffusion à l'interface entre les deux écoulements d'un T -sensor. Deux réactifs non fluorescents sont injectés chacun dans un bras du T -sensor. La cinétique de leur réaction étant contrôlée par la diffusion, le produit de la réaction, fluorescent, apparaît dès que les deux réactifs se rencontrent dans l'espace. Figure extraite de [117].

Cette effet papillon fausse les résultats expérimentaux lorsque l'acquisition du profil de concentrations est réalisé par microscopie de fluorescence classique, qui intègre le signal selon la hauteur du canal principal.

Pour pouvoir négliger cet effet, il faut que la durée de séjour de l'analyte dans le canal principal $t_{exp} = L/\bar{v}$ soit grande devant le temps d'exploration, par diffusion, de la hauteur h : $t_{diff,z} = h^2/2D$. Nous obtenons alors la condition

$$h \ll \sqrt{\frac{2DL}{\bar{v}}}. \quad (9.8)$$

Dans ce régime, on peut négliger le terme de diffusion $\partial^2/\partial z^2$ dans l'équation (9.6) et supposer la vitesse constante selon l'axe z , $v_x(z) = \bar{v}$.

Finalement, pour arriver à l'expression simplifiée (9.2), il est nécessaire de négliger le transport par diffusion selon l'axe x par rapport au transport advectif. Considérons toujours une distance L selon x . Le temps d'advection est, de nouveau, $t_{exp} = L/\bar{v}$ et le temps de diffusion selon x , $t_{diff,x} = L^2/2D$. La condition $t_{exp} \ll t_{diff,x}$ s'écrit alors

$$Pe = \frac{\bar{v}L}{2D} \gg 1, \quad (9.9)$$

où Pe est le nombre de Peclet. Dans cette situation, le terme $\partial^2/\partial x^2$ peut être négligé dans (9.6). Tenant compte des approximations (9.8), (9.9) et $x > \ell_0$, l'équation (9.5) prend la forme (9.2).

En combinant (9.8) et (9.9) on peut définir le domaine de valeurs du coefficient de diffusion que l'on peut mesurer dans un *T-sensor* de hauteur h et dont l'observation se réalise à une longueur L du point d'observation

$$\frac{h^2\bar{v}}{2L} \ll D \ll \frac{L\bar{v}}{2}. \quad (9.10)$$

Pour des géométries typiques du *T-sensor*, $h = 10 \mu\text{m}$, $L = 5 \text{ mm}$ et $d = 2.4 \text{ mm}$, il est possible d'imposer des débits entre 10 et 10^3 nL s^{-1} [118], ce qui, d'après (9.1), revient à des vitesses $\bar{v}$ entre 0.4 et 40 mm s^{-1} et alors

$$4 \times 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1} \ll D \ll 4 \times 10^{-6} \text{ m}^2\text{s}^{-1}. \quad (9.11)$$

Contraintes pour la mesure de constantes cinétiques

Pour des applications visant la détermination de cinétiques chimiques dans ce type de dispositif, il est nécessaire de calculer le domaine de temps de séjour accessibles dans le *T-sensor*. Salmon et collaborateurs ont réalisé ces mesures dans un dispositif avec un rapport d'aspect plus faible que celui de Kamholz et collaborateurs [113]. Dans leur cas, la largeur du canal principal était $d = 230 \mu\text{m}$ ce qui fixe la valeur de la longueur pour laquelle le profil de vitesses est complètement développé $\ell_0 = d$ et donc la valeur minimum de L , distance au point d'observation. Dans le *T-sensor*, le régime de temps couvert dépend des vitesses que l'on peut appliquer. Dans un dispositif en PDMS, la borne supérieure est limitée par la déformation de ce dernier lorsqu'on applique des pressions trop importantes tandis que la borne inférieure est fixée par la pression minimale que l'on peut appliquer de manière contrôlée. Ces limites se traduisent dans des vitesses linéiques comprises entre 0.4 et 40 mm s^{-1} . Dans notre dispositif, le régime de vitesses accessibles est de 5×10^{-3} à 0.5 mm s^{-1} , ce qui rend ces deux méthodes complémentaires à ce niveau. Cependant, le temps mort est donné par $t_m = \ell_0/v_{max}$, où ℓ_0 est la distance à partir de laquelle le profil de vitesses est complètement développé. Dans le *T-sensor*, il est difficile de descendre en dessous de $\ell_0 \sim 200 \mu\text{m}$ car il faut $\ell_0 \gg h$ et une épaisseur h trop petite poserait des problèmes de détection. Salmon et collaborateurs ont obtenu dans de telles conditions un temps mort d'environ $t_m \simeq 5 \text{ ms}$. Dans notre dispositif $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$, fixée par la largeur des murs séparant les canaux microfluidiques ce qui donne $t_m \simeq 80 \text{ ms}$. Cette largeur pourrait être diminuée en utilisant un dispositif fabriqué en verre sans diminuer h .

D'autre part, nous allons voir que pour un profil de vitesses électrophorétique, comme c'est le cas dans notre dispositif, la solution analytique n'est pas restreinte aucune des approximations considérées pour le *T-sensor* ((9.8) et (9.9)) car le profil est de type

bouchon et la diffusion selon l'axe d'injection n'est pas négligée. De plus, l'analyse du profil de diffusion dans l'espace de Fourier que nous proposons dans les Articles 2 et 3 découple les phénomènes de transport de la réaction chimique et permet la mesure de D dans des mélanges binaires et des constantes cinétiques dans les mélanges réactifs.

9.3 Mesure de coefficients de diffusion dans le micro-laboratoire

L'Article 2, soumis à *Anal. Chem.*, détaille la validation du microlaboratoire présenté au Chapitre 8 pour la mesure stationnaire de coefficients de diffusion. Le principe de l'expérience est le suivant : l'analyte fluorescent est introduit dans la chambre d'analyse par un canal d'injection en appliquant un champ électrique constant. Après un régime transitoire, un profil de concentration stationnaire résulte de la migration de l'analyte selon l'axe d'injection et de sa diffusion en deux dimensions. Cette figure est enregistrée par imagerie de fluorescence et analysée par transformée de Fourier pour extraire le coefficient de diffusion. On se limitera ici à résumer les points importants et on invite le lecteur à lire l'Article 2 (Chapitre 10) ainsi que sa partie supplémentaire (*Supporting Information*, Chapitre 11) qui intègrent cette thèse à part entière.

Une expression analytique pour le coefficient de diffusion : L'hypothèse que la vitesse de migration v_x est constante, homogène et dirigée selon x à l'intérieur de la chambre d'analyse rend le problème d'advection-diffusion strictement bidimensionnel. Il est alors possible de résoudre analytiquement dans l'espace de Fourier l'équation correspondante, indépendamment de la forme du profil de concentration au point d'injection (Section 10.2 de l'Article 2, p. 173). $\tilde{F}(x, q)$, transformée de Fourier selon y du profil de concentration stationnaire $F(x, y)$, est une fonction monoexponentielle de la position selon x :

$$\tilde{F}(x, q) = \tilde{F}(0, q)e^{-l_q x}, \quad (9.12)$$

où $\tilde{F}(0, q)$ est la transformée de Fourier du profil de concentration au point d'injection $F(0, y)$. L'ajustement des données expérimentales par l'équation (9.12) fournit l_q , qui est le taux de décroissance du mode de Fourier associé à la fréquence spatiale q [m^{-1}]. Le coefficient de diffusion, associé à cette fréquence q , est alors

$$D_q = \frac{l_q v_x}{l_q^2 - q^2}. \quad (9.13)$$

La vitesse de migration est effectivement constante dans la chambre d'analyse :

Le Paragraphe 10.4.1 de l'Article 2, p. 182, démontre que la vitesse de migration de l'analyte en tout point de la chambre est constante et homogène au delà de $x = \ell_0 \simeq 40 \mu\text{m}$. Cette vitesse s'écrit comme $v = (\mu + \mu_{EO})E$, où μ est la mobilité électrophorétique, μ_{EO} la mobilité électroosmotique et E le champ électrique. μ et μ_{EO} dépendent, dans le cas général, de la position dans l'espace.

L'homogénéité du champ électrique dans le dispositif est évaluée à l'aide de calculs numériques en utilisant des méthodes par éléments finis, puis vérifiée expérimentalement.

Le champ électrique s'avère constant, homogène et dirigé selon l'axe x au delà d'une distance $x = \ell_0$.

La mobilité électrophorétique μ est constante en tout point puisque le milieu d'analyse est homogène. L'absence de sources de dispersion associées à l'électroosmose permet de déduire que μ_{EO} est aussi constante et homogène dans le dispositif. En conclusion, la vitesse est constante et égale à v_x en tout point de la chambre d'analyse, à l'exception d'une bande de $40\ \mu\text{m}$ de largeur à l'intersection avec les canaux microfluidiques.

Extraction du coefficient de diffusion à partir du profil stationnaire de concentration : Tout d'abord, la procédure d'extraction du coefficient de diffusion dans l'espace de Fourier a été validée de deux manières (Paragraphe 10.4.3 de l'Article 2, p. 185) : i) en analysant un profil stationnaire de concentration simulé par des méthodes d'éléments finis et ii) en comparant, pour différentes expériences, la valeur de D extraite par transformée de Fourier, ou par ajustement, avec une fonction gaussienne, du profil stationnaire de concentration dans l'espace direct. Ensuite, les coefficients de diffusion obtenus par la méthode stationnaire proposée ont été comparés à ceux obtenus par deux méthodes alternatives : une mesure non-stationnaire dans le microdispositif et une autre reposant sur la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS). Toutes les valeurs sont concordantes. Enfin, les coefficients de diffusion de la fluorescéine, d'oligonucléotides simple brin marqués rhodamine-green et de fragments d'ADN double brin teints avec YOYO-1 ont été mesurés et un accord satisfaisant avec les résultats de la littérature a été trouvé.

Analyse d'un mélange binaire non-réactif : Lorsque l'on injecte deux espèces fluorescentes non-réactives possédant des coefficients de diffusion suffisamment distincts (typiquement un facteur 2), l'analyse en Fourier de leur profil stationnaire de concentration permet de :

- Différencier un mélange d'un composé pur.
- Identifier les composants d'un mélange binaire par leur coefficient de diffusion.
- Quantifier l'abondance relative des deux constituants du mélange.

Le Paragraphe 10.4.4 de l'Article 2, p. 187, met en œuvre ce principe pour un mélange de deux doubles brin d'ADN de 151 et 1257 paires de bases dont les coefficients de diffusion diffèrent d'un facteur quatre. Le caractère multi-échelle de l'analyse de Fourier montre ici sa puissance. Il permet d'identifier deux composants d'un même mélange sans séparation et sans qu'ils diffèrent dans ses propriétés de fluorescence, seulement par le coefficient de diffusion.

Correction d'éclairage : Pour révéler le profil de concentrations dans la chambre d'analyse, on utilise l'imagerie de fluorescence. Dans cette technique, pour atteindre une sensibilité suffisante, il est nécessaire de focaliser fortement la lumière d'excitation sur l'échantillon, ce qui crée des inhomogénéités d'éclairage sur le champ d'observation. Après transformée de Fourier, l'image de fluorescence obtenue est une convolution du profil de concentration —qui nous intéresse— et des inhomogénéités d'éclairage. La Section 11.7 du *Supporting Information* de l'Article 2, p. 208, explique comment la perturbation introduite par les inhomogénéités d'éclairage peut être facilement corrigée dans l'espace de Fourier. Lors de nos expériences, il n'est pas nécessaire d'enregistrer à chaque expérience une image qui quantifie ces inhomogénéités, ce qui permet un gain de temps considérable. Cette

correction dans l'espace de Fourier a constitué une amélioration majeure dans l'analyse des données. La seule correction d'éclairage dans l'espace direct n'a pas permis d'obtenir des résultats concordants pour la valeur du coefficient de diffusion entre les différentes fréquences spatiales q .

Chapitre 10

Article 2 : *Fourier analysis to measure diffusion coefficients on a continuous electrophoresis chip*

A. Estévez-Torres,[†] C. Gosse,^{§,*} T. Le Saux,[†] J.- F. Allemand,[#]
V. Croquette,[#] H. Berthoumieux,[†] A. Lemarchand,[‡] L. Jullien ^{†,*}

[†] *Département de Chimie, et [#] Département de Physique, Ecole Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France. E-mail : Ludovic.Jullien@ens.fr*

[§] *Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France. E-mail : charlie.gosse@lpn.cnrs.fr*

[‡] *Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, 4, place Jussieu, 75005, France.*

Abstract

We report a method to measure diffusion coefficients of fluorescent solutes in the 10^2 to 10^6 Da molecular weight range in a glass-PDMS chip. Upon applying a permanent electric field, the solute is introduced through a narrow channel into a wide analysis chamber where it migrates along the injection axis and diffuses in two-dimensions. The diffusion coefficient is extracted after 1D-Fourier transform of the resulting stationary concentration pattern. Analysis is straightforward, requiring no numerical integration nor velocity field simulation. The diffusion coefficients measured for fluorescein, rhodamine-green-labelled oligonucleotides, and YOYO-1-stained dsDNA fragments agree with the literature values and with our own fluorescence correlation spectroscopy measurements. As shown for 151 and 1257 base-pairs dsDNA mixtures, the present method allows to rely on diffusion to quantitatively characterize the nature and the composition of binary mixtures.

Running title : Continuous Measurement of Diffusion Coefficients

Keywords : PDMS, Finite Element Method, Electroosmosis, DNA, Oligonucleotide

10.1 Introduction

Phenomenologically expressing the friction with the medium, the molecular diffusion coefficient D depends on the size, the shape, and the charge distribution of the considered species. [1] However, despite its specificity, diffusion has not drawn much attention in the context of analysis. Indeed, D is not markedly sensitive to the detailed structure of molecules sharing a similar size. Consequently, the analysis of the diffusive behavior is generally not appropriate to study samples with numerous unknown components. Nevertheless, diffusion can efficiently discriminate two mixture components that significantly differ by their size, typically at least by a factor of two. In fact, the latter situation is often relevant in titrations of pharmaceutical or biological interest where one wants to access the relative proportions in two states of a ligand : free or bound to a large protein target. Thus measurements of diffusion coefficients relying on either NMR spectroscopy [2] or fluorescence emission [3,4] have been applied to library screening and lead identification. Moreover, an immunoassay relying on reagents mixing by diffusion has been developed to titrate small drug molecules in whole blood samples. [5] In this analytical context, Brownian motion is a particularly attractive process with respect to throughput and miniaturization. Indeed, a nanometer-size molecule in a typical liquid at room temperature has a diffusion coefficient in the few $10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ range, thus allowing D to be extracted in 1 s by observing molecular motion at the $20 \text{ }\mu\text{m}$ scale.

Among the many methods available to measure diffusion coefficients, [6–12] those requiring low sample amounts have to be favored when working with scarce biological material. From this point of view, techniques based on fluorescence emission are particularly attractive, allowing for measurements down to nanomolar concentrations. [9,10] Implemented for instance in Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), a first approach relies on observing the density fluctuations in an open volume containing a few molecules. Although powerful, this technique is intrinsically limited by its low concentration requirement, which hinders D extraction except for strongly fluorescent substrates. One may thus prefer a second and more macroscopic approach based on the temporal relaxation analysis of an out-of-equilibrium concentration profile. For example, in Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP), a light source of tunable power is used both to create the initial out-of-equilibrium condition and to read out the temporal evolution of the system. Recently, microfluidic devices have been used instead of photolysis to generate various out-of-equilibrium concentration profiles : [13–15] their geometry is compatible with epifluorescence microscopy and they only require minute sample amounts. In the T-sensor for instance, [13,16] two reactive solutions are injected at constant rate into the arms of either T or Y-shaped microchannels. Under conditions of strictly laminar and permanent flow, mixing is only governed by diffusion-reaction processes and the analysis of the concentration profile of the fluorescent solute along the channel may provide diffusion coefficients [13,16,17] and rate constants. [13,17]

In spite of the T-sensor design simplicity, the parabolic velocity profile generated by pressure-driven flows considerably complicates the reliable derivation of molecular parameters. [18–20] In particular, for each channel geometry and each flow rate, an accurate simulation of mass transport has to be performed to avoid artifacts. In the present account, we introduce an alternative device for measuring diffusion coefficients. One here analyzes the electric field-generated migration-diffusion pattern of fluorescent species in-

roduced into a microfabricated chamber using a narrow channel. As in a T-sensor, the concentration profiles are stationary, making signal integration possible in the case of dilute or poorly fluorescent solutes. However, the electric field-generated velocity profile is here plug-like and constant over the entire analysis area. Therefore, an exact analytic solution for the migration-diffusion pattern can be derived.

The stationary migration-diffusion pattern observed in our device is not a simple function of the space coordinates and the D derivation would be difficult in the direct space. We alternatively considered to analyze the experimental data in the Fourier space in which the extraction of the diffusion coefficients is easy and requires no simulation. Such a strategy has already been implemented to measure diffusion coefficients in FRAP experiments. [21, 22] However, Fourier transform has been rarely used to analyze diffusion or dispersion phenomena in 1D-separations. Indeed, Gaussian fit in the direct space remains the preferred approach. [7] In addition to the facilitated extraction of the diffusion coefficients, the Fourier approach offers two other advantages : (i) It is a multiscale analysis that allows, for example, to determine whether diffusion is length scale-dependent or not ; (ii) It is independent on the shape of concentration profiles. This last feature is particularly absent in Gaussian analysis, which can make diffusion coefficient measurement delicate in the case of non-regular peak shapes.

The manuscript is organized as follows. In the second section, we introduce the theoretical model subsequently used to extract the diffusion coefficients from the experimental data. The third section is devoted to the experimental part. In particular, we here characterize the microdevice features. The results and the corresponding discussion are given in the fourth section. We show that the diffusive behavior within the measurement chamber can be fruitfully investigated by 1D-Fourier transform analysis to yield accurate values of diffusion coefficients. We also address the issue of analyzing a binary mixture from observing the migration-diffusion process of its components. Conclusion is provided in the last section.

10.2 Theory

Figure 1 displays the principle of the present stationary approach to measure the diffusion coefficient of a fluorescent analyte $\mathbf{F}$. Experiments are performed in a $10\ \mu\text{m}$ thin microsystem where the $\mathbf{F}$ solution is in contact, through a $20\ \mu\text{m}$ narrow channel, with a $7.5\ \text{mm}$ wide square chamber filled with the migration medium (Figure 1a). Application of a permanent electric potential drop along the channel x -axis results in the continuous solute injection into the chamber : After a transient regime, a stationary migration-diffusion pattern is obtained (Figure 1b). Provided that the $\mathbf{F}$ velocity within the chamber can be measured, the analysis of this pattern yields the $\mathbf{F}$ diffusion coefficient.

To calculate analytically the stationary migration-diffusion pattern of $\mathbf{F}$, we consider the motion to occur in a 2D medium [23] defined by $0 \leq x \leq a$ and $-\infty < y < +\infty$. This medium is submitted to a uniform and permanent electric field $\vec{E} = E_x \vec{u}_x$ with $\vec{u}_x$ the unit vector along x . Species $\mathbf{F}$ migrates in the direction of increasing x with a velocity v_x and diffuses along x and y with a molecular diffusion coefficient D . The velocity field of the $\mathbf{F}$ analyte is uniform and parallel to the x -axis only beyond a characteristic distance ℓ_0 from the injection nozzle (*vide infra*) ; we thus set the x -origin at this point and restrict the following theoretical analysis to the downstream area.

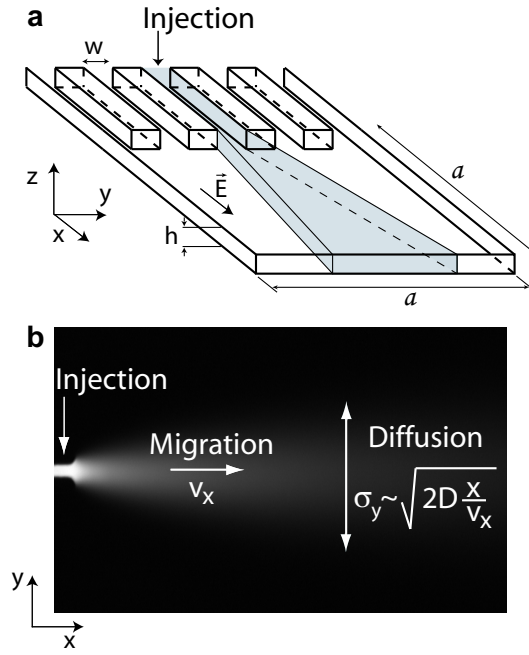


FIG. 10.1 – Principle of the measurement of a diffusion coefficient in a continuous electrophoresis chip. (a) The application of a voltage drop along the x -axis yields the sample introduction from a narrow ($w = 20 \mu\text{m}$) and thin ($h = 10 \mu\text{m}$) injection channel, into a wide ($a = 7.5 \text{ mm}$) square analysis chamber. (b) In the zone where the electric field $\vec{E}$ is uniform and parallel to the x -axis, $\vec{E} = E_x \vec{u}_x$, the solute $\mathbf{F}$ migrates at constant velocity v_x . After a transient regime, a stationary parabola-like migration-diffusion pattern is established with a typical width $\sigma_y \sim \sqrt{2D \frac{x}{v_x}}$ at abscissa x . In the present work, this migration-diffusion pattern is subsequently analyzed by spatial Fourier transform along y to provide the diffusion coefficient D after v_x measurement.

In the absence of any dispersive contributions, the stationary concentration profile $F(x, y)$ obeys the partial differential equation :

$$-v_x \frac{\partial F(x, y)}{\partial x} + D \left[\frac{\partial^2 F(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 F(x, y)}{\partial y^2} \right] = 0, \quad (10.1)$$

where the first term originates from $\mathbf{F}$ migration and the second term from $\mathbf{F}$ diffusion. The $F(0, y)$ concentration profile at $x = 0$ is used as a boundary condition. Its shape reflects the channel one broadened by molecular diffusion and migration due to out-of-axis electric fields between the injection nozzle and the zone of homogeneous velocity. We also admit that the concentration is fixed at $x = a$ and equal to $F(a, y)$.

The determination of the diffusion coefficient from the migration-diffusion pattern is much easier in the Fourier space. Thus we look for an expression of the Fourier transform of the concentration $F(x, y)$ with respect to y : $\tilde{F}(x, q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(x, y) e^{-iqy} dy$. Equation 10.1 yields :

$$\frac{\partial^2 \tilde{F}(x, q)}{\partial x^2} - \frac{v_x}{D} \frac{\partial \tilde{F}(x, q)}{\partial x} - q^2 \tilde{F}(x, q) = 0. \quad (10.2)$$

The general solution of the preceding equation reads :

$$\tilde{F}(x, q) = C_- \exp(\lambda_- x) + C_+ \exp(\lambda_+ x) \quad (10.3)$$

where the eigenvalues obey :

$$\lambda_{\pm} = \frac{1 \pm \sqrt{1 + 4D^2 q^2 / v_x^2}}{2D / v_x} \quad (10.4)$$

with $\lambda_- \leq 0$ and $\lambda_+ \geq 0$. The integration constants $C_{\pm}$ are deduced from the boundary conditions at $x = 0$ and $x = a$. In the present experiments, $(\lambda_+ - \lambda_-)a \gg 1$ and we restrict the analysis to small values of the abscissa ($x \ll a$). Then the second exponential in eq 10.3 can be neglected (see Supporting Information) :

$$\tilde{F}(x, q) = \tilde{F}(0, q) \exp\left(\frac{1 - \sqrt{1 + 4D^2 q^2 / v_x^2}}{2D / v_x} x\right), \quad 0 \leq x \ll a. \quad (10.5)$$

Additionally when the mass flux along x is dominated by migration (i. e. in the $\frac{2Dq}{v_x} \ll 1$ limit), the stationary 2D migration-diffusion pattern in eq 10.5 becomes : [24]

$$\tilde{F}(x, q) = \tilde{F}(0, q) \exp\left(-\frac{Dq^2}{v_x} x\right). \quad (10.6)$$

Thus the diffusion coefficient is straightforwardly extracted from the stationary migration-diffusion pattern obtained in the present approach. A spatial Fourier transform along y is first applied on the recorded concentration profile. Then a simple exponential fit directly gives access to D provided that the analyte velocity v_x is known.

10.3 Experimental Section

10.3.1 Reagents and Solutions

Fluorescein, Hepes, and 1 M NaOH solution are purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO) and YOYO-1 from Invitrogen (Carlsbad, CA). The single-stranded oligonucleotides rhg-13, rhg-27, and rhg-105, respectively 13, 27, and 105 bases long, are synthesized, rhodamine-green-labelled, and HPLC-purified by IBA (Göttingen, Germany; sequences given in Table S-2). Double-stranded DNA fragments, 151, 438, and 1257 bp in length, are synthesized by PCR using HPLC-grade primers from IBA and λ -DNA as a template (see Supporting Information). Agarose MP is purchased from Roche (Basel, Switzerland) and poly(dimethylacrylamide) (PDMA) of average molecular weight 3 MDa is a kind gift of J. Weber (Institut Curie, Paris, France). [25]

Solutions are prepared using water purified through a Direct-Q 5 (Millipore, Billerica, MA). Fluorescein (5 μ M), fluorescent oligonucleotides (10 μ M), and dsDNA are all dissolved in the 25/50 mM NaOH/Hepes pH 7.5 low conductivity buffer and quantified by UV absorption spectrometry. dsDNA is subsequently stained with YOYO-1 (5 μ M in YOYO-1; 1 :15 dye :bp molar ratio) and incubated 30 min at room temperature. To eliminate dye-induced DNA precipitates [26], a 10 min centrifugation at 14000 rpm is finally performed and the pellet discarded.

10.3.2 Chip Microfabrication

The device is composed of a circular glass cover-slip (0.17 mm thick, 40 mm diameter; Menzel-Gläser, Germany) and two ~ 3 mm thick cross-linked poly(dimethylsiloxane) (PDMS) layers. The elastomeric bottom stamp, in contact with the glass, contains the thin analysis chamber connected to six reservoirs through arrays of microchannels (Figures 2 and S-1). On top of it, a second PDMS stamp is used to shape four macroreservoirs that accommodate four electrodes and ensure a sufficient buffer volume to keep pH constant during the experiment.

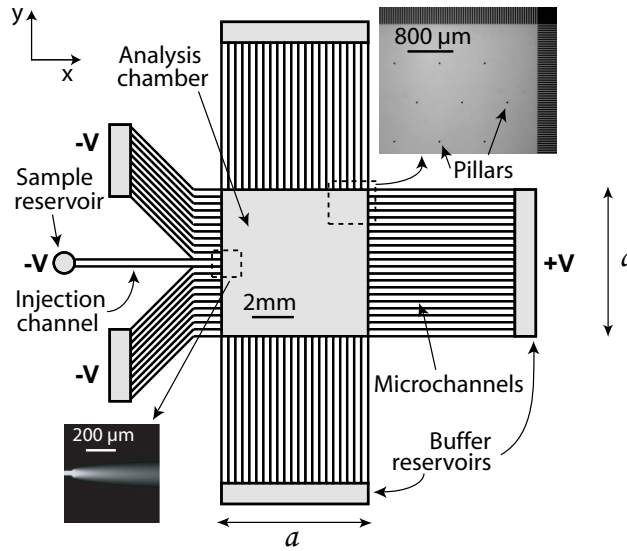


FIG. 10.2 – Top view of the microfabricated chip used for continuous electrophoresis. A uniform electric field $\vec{E} = E_x \vec{u}_x$ is generated in the analysis chamber by applying a voltage drop between the sample and buffer reservoirs on the left-side ($-V$) and the buffer reservoir on the right-side ($+V$). Highly resistive microfluidic channels ensure electric field homogeneity. [35–37] These channels also prevent electrolytically-generated bubbles and uncontrolled fluid flows to disturb measurements. $30 \mu\text{m}$ diameter posts, arranged on a hexagonal lattice with a spacing of $800 \mu\text{m}$, fill the analysis chamber and prevent it to collapse. [35] Application of a voltage drop between the buffer reservoirs along the y -axis can also be used to generate a uniform electric field along y in the analysis chamber for control time-based experiments.

The bottom layer fabrication is decomposed in two steps (see Supporting Information for a detailed protocol). First, a positive PDMS master with the microfluidic channels is obtained using classical soft lithography protocols [27]. The reservoirs are cut out under a stereomicroscope. Second, a negative epoxy master is fabricated by counter-molding of the PDMS master. It includes the reservoirs and the microfluidic channels and is used for routine production of the PDMS bottom layer, greatly reducing fabrication time. Eventually, the cured PDMS bottom layer and the cover-slip are oxidized in an air plasma cleaner (PDC-002, Harrick Plasma, Ithaca, NY) for 1 min at $2 - 3 \times 10^{-4}$ bar and gently brought into contact.

10.3.3 Device Filling, Final Assembly, and Storage

Experiments are performed in either 1 % (w/w) agarose or 0.1 % (w/w) PDMA, each medium being buffered with 25/50 mM NaOH/Hepes pH 7.5.

Filling the chip with an aqueous solution immediately after the preceding assembly makes the central chamber ceiling to collapse under capillary forces. Consequently, in order to decrease the surface hydrophilicity due to the plasma treatment, the assembled chip is cured for 45 min at 60°C, thus allowing uncrosslinked PDMS chains to rearrange. [28] Next, the air dissolved in the PDMS is pumped for 45 min at 50 mbar at room temperature and the filling medium is added to the six reservoirs, which results in the autonomous and controlled loading of the device. [29] Note that in the case of 1 % agarose, the chip is thermostated at 40°C during the filling step and subsequently cooled to 20°C. For 0.1 % PDMA, the device is first loaded with 1 % PDMA at room temperature and incubated overnight. Then, just before use, the medium is changed by suction for 0.1 % PDMA. Eventually, the 0.1 % PDMA solution is replaced by 1 % PDMA for overnight storage.

After completion of the filling operations, the PDMS top layer is cleaned with ethanol and placed over the bottom one to delimitate the four electrode compartments. The filled and assembled chips are stored, before and after use, in a water vapor-saturated atmosphere at 4°C. The 0.1 % PDMA devices present a longer life time than the agarose ones, up to several weeks.

10.3.4 Instrumentation

Four platinum electrodes (0.2 mm diameter ; Goodfellow, Lille, France) are placed inside the buffer reservoirs to generate orthogonal voltage drops. They are mounted on a plastic piece and connected through 1000 V resistant cables to two electrophoresis power supplies (E835 300 V and E815 1500 V ; Consort, Turnhout, Belgium). The two resulting electric fields are respectively directed along the x and y -axis. They can be switched on/off and their polarity inverted by a home-made device equipped with AQV258(A) photoMOS relays (Matsushita Electric Works, Osaka, Japan) and controlled by the acquisition software. The current in each line, in the 1 – 300 μ A range, is monitored with multimeters.

To dissipate Joule heating upon voltage application, the bottom glass surface of the chip is placed on a 0.8 mm thick copper slide in which a hole, 2 mm diameter, has been drilled for observation with the microscope. This copper slide is mounted on an aluminium block thermostated with a $\pm 0.2^\circ\text{C}$ precision by two thermoelectric Peltier coolers (CP 1.0-63-05L-RTV ; Melcor, Trenton, NJ). The temperature is monitored using a TCS610 thermistor (Wavelength Electronics) and the feed-back loop is driven by a MPT10000 temperature controller (Wavelength Electronics, Bozeman, MT) which receive settings from the computer through a usb-1208FS I/O board (Measurement Computing, Norton, MA). Under our experimental conditions, at 20°C, Joule heating is efficiently dissipated for electric currents below 300 μ A (see Figure S-6) ; this latter value corresponds to an electric field of $2.66 \times 10^4 \text{ Vm}^{-1}$ inside the analysis chamber (1000 V between the electrodes).

Epifluorescence imaging of the chip is achieved at 24 Hz on a home-made microscope equipped with a 100 W Xe lamp (LOT-Oriel, Palaiseau, France), a wide band hot mirror (Thorlabs, Newton, NJ), a set of filters (excitation HQ 495/30, dichroic 520 DCXR, emission HQ 560/80M ; Chroma Technology, Rockingham, VT), a 10 $\times$ objective (Fluar

NA 0.5 ; Zeiss, Le Pecq, France), and a CCD camera (CV-M4+CL 2/3" ; JAI, Copenhagen, Denmark). The field of view is ~ 1 mm. To check the linearity of the video signal, the microdevice was filled with increasing fluorescein concentrations and illuminated at low intensities, thus avoiding photobleaching. For the whole dynamic range of the camera, the response was linear between 0.5 and 20 μM . The quantum yield of fluorescence being constant in this dilution range, the signal in each pixel was therefore assumed to be directly proportional to the solute concentration.

Interfacing of the electric field and temperature controllers, as well as video acquisition, are performed by a home-made program written in C.

10.3.5 Finite Element Method Simulations

Electric potential and concentration profiles are simulated with the Finite Element Method software Comsol Multiphysics (Comsol, Stockholm, Sweden ; see Supporting Information). The size of the computation cell is equal to the field of view in y and 3 times longer in x . Additionally, the chamber entry is located such that the resistive channels represent one third of the total x -length.

First, the electric field is computed using the Gauss equation. The buffer is modelled as an isotropic and isothermal conductor where electroneutrality is verified at any point. The PDMS is considered to be totally insulating and thus a zero normal current boundary condition is set at its surface. For symmetry reasons, we also consider the lateral boundaries of the simulation cell, parallel to the x -axis, to be insulating (see Supporting Information). Finally, we apply imposed voltage boundary conditions at both channels entries and chamber exit.

Second, concentration profiles are obtained by solving the mass conservation equation for the analyte. For this last calculation, the results of the electrical simulation are introduced into the flux density expression, which accounts for both diffusion and electrophoretic migration. Concentration boundary conditions are imposed as follows : (i) Constant concentration at the entry of the injection channel ; (ii) Zero normal diffusive flux at the chamber exit ; (iii) Zero normal flux at the PDMS surface ; (iv) Null concentration at the entries of all the remaining resistive channels and on the borders of the simulation cell parallel to the x -axis (see Supporting Information).

10.3.6 Measurement of Diffusion Coefficient

All the loading analyte solutions contain 10 % (v/v) glycerol to prevent dilution in the buffer reservoir of the top PDMS layer. Typically, 1 μL volumes are loaded into the sample reservoir (Figure 2), allowing for 15 min to 1 h of continuous injection (depending on the applied voltage). Additionally, 0.1 % (w/w) PDMA is added to the sample when experiments are carried out in the presence of this polymer.

A stationary migration-diffusion pattern is generated by applying a permanent voltage drop between the two reservoirs located along the x -axis ; values between 10 and 1000 V result in electric fields between 266 and $2.66 \times 10^4 \text{ Vm}^{-1}$ in the analysis chamber. A source image is then recorded by averaging over typically 240 frames (total integration time of 10 s). The chip autofluorescence is subsequently subtracted to these data and noise reduction is obtained by performing a sliding average along the x -axis (typically over

10-pixel lines). Final corrected $I(x, y)$ images are 1024 or 512 pixels wide in y , which corresponds to on chip distances ℓ_y of 875.50 or 437.75 μm , respectively (Figure 3).

Discrete Fast Fourier Transform using periodic boundary conditions is next performed along y to yield a Fourier transformed image $\tilde{I}(x, n)$. Note that the n index accounts here for the $q_n = \frac{2\pi n}{\ell_y}$ discrete spatial frequency. Secondly, each Fourier mode is normalized by the zeroth Fourier mode to correct from illumination inhomogeneities (see Supporting Information) and data in the region of inhomogeneous electric field, up to $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ after the chamber entry, are discarded (*vide infra*; See also Figure S-8).

Each normalized Fourier mode is subsequently fitted with a two-parameters exponential function :

$$\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} = a_n e^{-l_n x}. \quad (10.7)$$

For each fit, residuals are calculated and the signal to noise ratio S/N is quantified as a_n divided by the maximal residual amplitude. Only the data satisfying $S/N > 2$ are retained for further analysis. Using eq 10.5, the diffusion coefficient D_n associated to the Fourier mode n is extracted from the exponential decay rate l_n as :

$$D_n = \frac{l_n v_x}{l_n^2 - q_n^2}. \quad (10.8)$$

where v_x is here the analyte velocity along x , measured after each experiment by recording the injection of a front of solute into the analysis chamber. More precisely, any fluorescent molecule is first washed away by transiently applying an electric field along y . Then, $\vec{E} = E_x \vec{u}_x$ is switched on and the displacement of the fluorescent profile along x is recorded. Finally, the front position is plotted versus time to yield v_x . [30]

Data treatment is completed by computing an average diffusion coefficient $\langle D \rangle$ as :

$$\langle D \rangle = \frac{\sum_{n=1}^N a_n l_n D_n}{\sum_{n=1}^N a_n l_n}, \quad (10.9)$$

where N is the number of fitted Fourier modes. The weighting reflects here that the confidence of an exponential fit is proportional to its curvature l_n and to its amplitude a_n . The corresponding standard deviation is hence evaluated as :

$$\sigma_{\langle D \rangle} = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N a_n l_n D_n^2}{\sum_{n=1}^N a_n l_n} - \langle D \rangle^2}. \quad (10.10)$$

10.3.7 Binary Mixture Analysis

In view of the linearity of the Fourier transform, the calculations in the theoretical section are also valid for a mixture of N non-interacting species. In particular, eqs 10.5 and 10.6 yield :

$$\tilde{F}(x, q) = \sum_{j=1}^N \tilde{F}_j(0, q) \exp \left(\frac{1 - \sqrt{1 + 4D_j^2 q^2 / v_{x,j}^2}}{2D/v_{x,j}} x \right) \quad (10.11)$$

and

$$\tilde{F}(x, q) = \sum_{j=1}^N \tilde{F}_j(0, q) \exp\left(-\frac{D_j q^2}{v_{x,j}} x\right) \quad (10.12)$$

for the Fourier transform of the total concentration profile. Thus migration-diffusion images for a binary mixture are acquired and processed as described for a pure sample. The total signal $I(x, y)$ is the sum of the contributions from both analytes $\mathbf{F}_j$, more precisely it is proportional to their concentration $F_j(x, y)$ multiplied by their brightness Q_j . Consequently, the normalized Fourier modes have now to be fitted with a biexponential function :

$$\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} = a_{1,n} e^{-l_{1,n}x} + a_{2,n} e^{-l_{2,n}x} \quad (10.13)$$

to extract both the individual diffusion coefficients $D_{j,n}$ as well as the relative proportion of the two components of the binary mixture.

We first select the pool of normalized Fourier modes that are appropriate for mixture analysis. All the normalized Fourier modes are fitted in parallel with a monoexponential and a biexponential function. All the modes giving satisfactory residuals with the simpler fit are discarded, the parameters extracted from their biexponential analysis being considered unreliable (Figure S-9). Typically, it only concerns the first and second Fourier modes.

Secondly, the diffusion coefficients $D_{j,n}$ are calculated using eq 10.8 and the measured average mixture velocity v_x . We here verified that the electrophoretic mobilities of both dsDNA samples are identical, as expected for free-draining polyelectrolytes migrating in free solution. [31,32] For other analytes, such as proteins, one would need to measure both individual $v_{x,j}$ prior to $D_{j,n}$ extraction.

Since $\tilde{F}_j(x, 0) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F_j(x, y) dy$ is proportional to the integrated $\mathbf{F}_j$ concentration over the device width, the relative proportions in the two species can be measured for $x \geq 0$ by the ratio α_{exp} :

$$\alpha_{exp} = \frac{\int_{-\infty}^{+\infty} F_1(x, y) dy}{\int_{-\infty}^{+\infty} F_2(x, y) dy} = \frac{\tilde{F}_1(x, 0)}{\tilde{F}_2(x, 0)} \quad (10.14)$$

In principle, α_{exp} can be evaluated at any position along the x -axis. In the following, we introduce a procedure to titrate the mixture at the origin i.e. to determine $\alpha_{exp} = \tilde{F}_1(0, 0)/\tilde{F}_2(0, 0)$.

The amplitudes of the $\tilde{F}_j(0, n)$ mode at the chamber entry are directly proportional to the preexponential amplitudes $a_{j,n}$:

$$a_{j,n} = \frac{Q_j}{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, 0)} \tilde{F}_j(0, n), \quad (10.15)$$

A first possibility to access $\tilde{F}_j(0, 0)$ should be to measure $a_{j,0}$. However, we saw above that biexponential fitting was not reliable for $n \leq 2$. Thus direct access to $a_{j,0}$ is not possible and an alternative road has here to be explored. We observed that the concentration profiles $F_j(0, y)$ were Gaussian (see Figure S-8e). Then we deduced their Fourier transform $\tilde{F}_j(0, n)$ to be also Gaussian. We consequently fit the dependence of the amplitudes $a_{j,n}$ on the mode index n with Gaussian functions and rely on their intersection with the

ordinates axis to extract $a_{1,0}$ and $a_{2,0}$. Eventually, using eqs 10.14 and 10.15, the ratio of the concentrations in $\mathbf{F}_1$ and $\mathbf{F}_2$ is computed as :

$$\alpha_{exp} = \frac{Q_2 a_{1,0}}{Q_1 a_{2,0}}. \quad (10.16)$$

10.3.8 FCS Experiments

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) experiments are performed on a home-built two-photon epi-illumination set-up (dichroic filter 680DCSPXR; Chroma Technology). [33] A 50 nM fluorescent solution is excited at 780 nm with a Ti:Sapphire laser (Mira 900; Coherent, Auburn, CA) using a 60 $\times$ objective (UPlan apo, NA 1.2; Olympus, Rungis, France). The fluorescence light, collected with the same objective and passed through an emission filter (560/80M; Chroma Technology), is then splitted to allow simultaneous acquisition on two avalanche photo-diodes (SPCM-AQR-14 APD; PerkinElmer, Wellesley, MA). For each run, the cross-correlation function from the two APDs signals is calculated by an ALV-6000 digital correlator (ALV, Langen, Germany). Thirty runs of 30 seconds are averaged to yield the final data. This last cross-correlation function is subsequently fitted with $G(t) = 1/[\bar{N}(1 + t/\tau_D)]$, where $\bar{N}$, the average number of molecules in the excitation volume, and $\tau_D = \omega_0^2/(8D)$, the solute diffusion time, are the two floating parameters. The diffusion coefficient D is finally extracted from τ_D using the calibrated laser beam-waist at the focal point ω_0 (here 430 nm).

10.3.9 Safety Considerations

YOYO-1 is a possible mutagen, caution should be held when manipulating it. High-voltages may cause electric shock, high-voltage resistant cables and grounded material must be used.

10.4 Results and Discussion

10.4.1 Velocity Homogeneity Inside the Analysis Chamber

The general expression for the velocity of the $\mathbf{F}$ solute inside the chamber is :

$$\vec{v} = [\mu(x, y, z) + \mu_{EO}(x, y, z)]\vec{E}, \quad (10.17)$$

where μ and μ_{EO} are the electrophoretic and electroosmotic mobilities of $\mathbf{F}$, respectively. To benefit from the simple data treatment relying on eq 10.5, $\vec{v}$ must be uniform and directed along x within the analysis chamber : $\vec{v} = v_x \vec{u}_x$. This assumption is fulfilled when (i) the electric field itself is uniform and directed along x and (ii) $\mu(x, y, z)$ and $\mu_{EO}(x, y, z)$ are constant within the chamber medium.

To generate a uniform electric field $\vec{E} = E_x \vec{u}_x$ in the analysis chamber of the present 10 μm high PDMS microfluidic device, we relied on the prism design of Huang et al. [34] The 7.5 mm side square chamber is connected to two sets of opposite electrode reservoirs by arrays of narrow channels, 7.5 mm long and 20 μm wide, spaced by 20 μm large PDMS walls. A homogeneous electric field can then be created in any direction by current injection through these microfluidic resistors (Figure 2). [35, 36] However, this design imposes E values to be twice larger inside the microfluidic channels than inside the chamber. It is thus impossible to obtain a constant electric field at the injection nozzle and we expect inhomogeneities to extend up to a distance ℓ_0 far from the resistive channels ends. Typically, ℓ_0 should correspond to the lateral periodicity of the microfluidic array. [38] Electric potential profiles were calculated by Finite Element Method simulations and found in good agreement with this estimate. The electric field is constant and directed along the x -axis everywhere beyond a $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ limit inside the chamber boundaries (Figure S-7). We checked on chip these predictions by recording the migration of long and thin bands of YOYO-1-stained 1257bp dsDNA. When prepared along y and eluted in the x direction, a stripe of this weakly diffusing fluorophore moves straight and stays normal to $\vec{u}_x$, thus confirming the field homogeneity and direction. As a consequence of the above computational and experimental investigations, the ℓ_0 limit was used to define the x -origin and all the points with negative abscissa were discarded before data treatment.

From eq 10.17, electrophoretic and electroosmotic mobilities must be also constant to obtain a uniform velocity field inside the chamber. This condition is fulfilled for the electrophoretic mobility as soon as the filling medium is homogeneous. In contrast, surface treatment is a key issue to get a constant electroosmotic mobility. Indeed it is well known from capillary electrophoresis experiments that analyte adsorption and heterogeneous charge density at the surface of bare columns result in uncontrolled electroosmosis and filling medium recirculations. [39, 40] In particular, our device is made of glass and PDMS and the lower and upper walls have consequently different physicochemical properties : without surface treatment, buffer flow at each interface will be different, leading to Taylor dispersion of the solute. [41–43] To circumvent these problems, two strategies have been implemented. Either we suppressed any hydrodynamic flow by working in a gel (experiments in 1 % (w/w) agarose) or we reduced and smoothed electroosmosis by adding a neutral wall-adsorbing polymer to the filling aqueous solution (experiments in 0.1 % (w/w) PDMA). By comparing the fluorescein electrophoretic velocity in the two media, the remaining electroosmotic mobility μ_{EO} in 0.1 % PDMA was, for all the

considered analytes, evaluated to be less than 10% of their apparent electrophoretic mobility. [40,44] Moreover, to quantify the electroosmotic dispersive contribution that could superimpose to Brownian diffusion, we also designed a series of control time-based experiments where the apparent diffusion coefficients are extracted from the time evolution along the y -axis of an x -invariant concentration profile. Measurements were performed either in the absence or in the presence of a transverse alternative electric field E_y (see Supporting Information). [7,42] The good agreement between the apparent diffusion coefficients extracted from both time-based as well as continuous experiments, with the two filling media, strongly supports the absence of any significant electric field-induced dispersion in the present systems. We can eventually conclude that the electrophoretic and electroosmotic mobilities are constant in the three-dimensions, which finally yields :

$$\vec{v} = v_x \vec{u}_x = (\mu + \mu_{EO}) E_x \vec{u}_x. \quad (10.18)$$

10.4.2 Diffusion Coefficient Measurement

Figure 3 displays a typical continuous experiment and the subsequent data treatment to extract the diffusion coefficient. A permanent voltage drop of 300 V is applied between the electrodes, which corresponds to $E_x = 8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$ inside the analysis chamber filled with NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer. A stationary migration-diffusion pattern establishes after a time delay in the order of ℓ_x/v_x , where $\ell_x \sim 800 \text{ }\mu\text{m}$ is the image length along x . Here, a solute velocity $v_x = 145 \text{ }\mu\text{ms}^{-1}$ results in a 5.5 s transient. The collected profile $I(x, y)$ of fluorescence intensity from the analyte is recorded (Figure 3a) and Fourier-transformed along the y -axis to obtain the x -spatial dependence of each discrete Fourier mode $\tilde{I}(x, n)$ (Figure S-8). To correct from illumination inhomogeneities as well as from $\mathbf{F}$ photobleaching during elution, we eventually divide each $\tilde{I}(x, n)$ by $\tilde{I}(x, 0)$ (see Figure 3b and Supporting Information).

The normalized Fourier modes $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ are subsequently fitted with monoexponential functions, yielding satisfactory residuals for all the investigated orders (Figure S-8). Once the velocity of $\mathbf{F}$ along x has been measured (see Experimental Section), each relaxation rate extracted from the exponential fit is used to calculate the diffusion coefficient D_n associated to the Fourier mode n (eq 10.8). Eventually, the average diffusion coefficient $\langle D \rangle$ is computed by averaging over n (see eq 10.9 in Experimental Section).

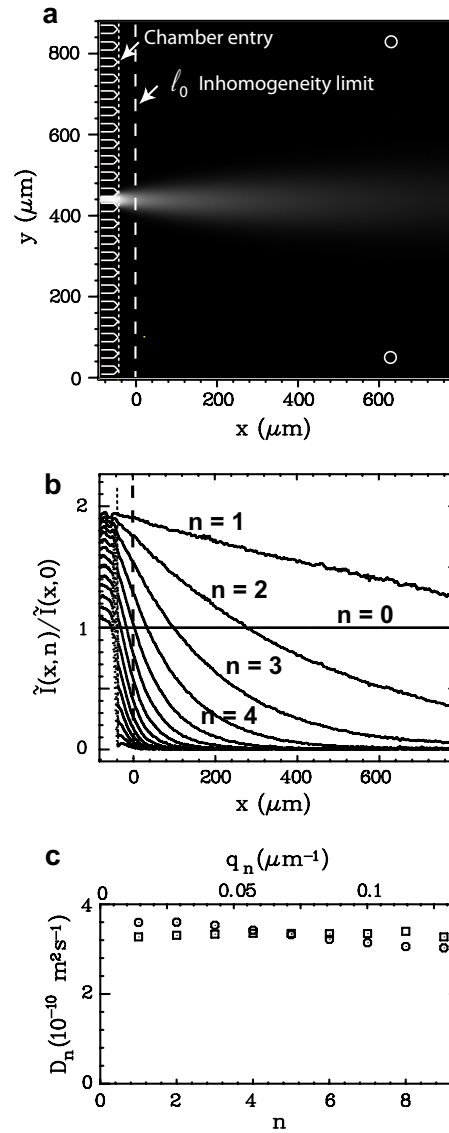


FIG. 10.3 – Successive steps of the 1D-Fourier transform analysis used to extract the diffusion coefficient of a fluorescent analyte from a continuous experiment. (a) Stationary migration-diffusion pattern for $5 \mu\text{M}$ fluorescein when an electric field of $8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$ ($v_x = 145 \mu\text{ms}^{-1}$) is applied left to right in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C . The microfabricated channels and pillars profiles are highlighted with solid lines. The vertical dotted line corresponds to the boundary between the resistive channels and the analysis chamber. The dashed line emphasizes the upstream limit for homogeneous electric field. (b) Spatial dependence along x of the $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ normalized Fourier modes resulting from Fourier transform along y of the preceding image. (c) Experimental ($\circ$) and simulated ($\square$) diffusion coefficients as a function of the Fourier index n (bottom scale) or of the spatial frequency q_n (upper scale). Data are obtained by monoexponential fitting of the above normalized Fourier mode, discarding all the points with a negative abscissa (i.e. left to the dashed line).

10.4.3 Validation Experiments

We have been concerned with two different aspects of validation experiments. We first attempted to validate the procedure for data processing used to extract the diffusion coefficient. In a second step, we compared the values of diffusion coefficients obtained with the present approach with the literature results as well as with our own results derived from other types of experiments.

Validation of the procedure for data processing

To evaluate our procedure for data processing, we generated by Finite Element Method (FEM) simulations and analyzed by Fourier transform the migration-diffusion concentration pattern of fluorescein. With regard to the experiment, such a simulation deals with an ideal behavior and does not depend on the illumination pattern at the sample. Figure 3c compares the experimental D_n values with the ones extracted from the FEM simulations. A fair agreement is observed which underlines in particular the relevance of the zeroth order correction for illumination inhomogeneities that assimilates $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ to $\tilde{F}(x, n)/\tilde{F}(x, 0)$ during data processing.

We also took advantage of the Gaussian shape of the profile of fluorescence emission at $x = 0$ (see Figure S-8e) to evaluate the relevance of the Fourier analysis to extract diffusion coefficients from experimental data. Results extracted either from Fourier transform or from Gaussian fitting, when the latter can be applied i.e. in the 1D limit, were in agreement within experimental error (see Table S-3).

Validation of the relevance and accuracy of the diffusion coefficient measurement

Equipped with a validated procedure for data processing, we started to analyze the values of the diffusion coefficients obtained with the present approach.

We first evaluated the interest of the present approach to characterize a diffusive behavior. Figure 3c displays the dependence of the diffusion coefficients D_n on the Fourier mode n for fluorescein in the buffer supplemented with 0.1 % (w/w) PDMA. Despite a 10 % dispersion of the data, that might result from incomplete illumination correction and/or slight velocity inhomogeneities, the D_n diffusion coefficients are constant over 9 Fourier modes, corresponding to a 15 to 140 μm spatial range. This result is in line with the anticipated purely diffusive process at all the length scales for fluorescein in an essentially free solution. [45] In addition, the extracted average value $\langle D \rangle = 340 \pm 30 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ of the diffusion coefficient fairly agrees with literature results (Table 2) [7].

Then we measured D for analytes with molecular weights between 330 and 8×10^5 Da to investigate the operating range and the measurement accuracy of the device. The results were subsequently analyzed with respect to control experiments and literature values. Table 1 first compares, for fluorescein and three rhodamine-green labelled single-stranded oligonucleotides, the average diffusion coefficients obtained with the present continuous method, with the ones from on chip zero-field time-based experiments (see Supporting Information) or FCS measurements. A 1 % agarose gel was here used to totally suppress electroosmosis. The three techniques provide coherent results within experimental error, hence validating the continuous measurement of diffusion coefficients in the absence of any

TAB. 10.1 – Averaged diffusion coefficients $\langle D \rangle$ ($10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) of fluorescein and rhodamine-green labelled oligonucleotides in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 1 % (w/w) agarose medium at 20°C. Measurements were performed on chip and by FCS. In the former case, values were extracted by Fourier transform analysis of continuous and zero-field time-based (see Supporting Information) experiments. Errors correspond to standard deviation.

	Fluorescein	rhg-13	rhg-27	rhg-105
Continuous ^a	310 ± 24	100 ± 10	77 ± 5	39 ± 4
Time-based ^b	320 ± 20	107 ± 6	75 ± 4	40 ± 2
FCS	350 ± 70	140 ± 20	86 ± 8	44 ± 5

^a Averaged from different experiments with v_x ranging from 10 to 150 μms^{-1} .

^b Experiments performed in absence of any electric field.

hydrodynamic flow. We next performed a series of experiments in the buffer supplemented with 0.1 % (w/w) PDMA (Table 2). As shown above, we obtained a satisfactory result for fluorescein with a diffusion coefficient only 10 % lower than the one determined by Culbertson et al. [7]. In the case of rhg-13, $\langle D \rangle$ was 40 % lower than the value computed from a scaling law proposed by Stellwagen and coworkers [32]. The observed discrepancy probably originates from fluorophore-labelling effects [46] and sequence-dependent contributions. Table 2 also displays diffusion coefficients measured for three YOYO-1-stained dsDNA in the 150–1500 bp range. The diffusion of duplex DNA has already been extensively studied [31, 32, 47]. All the existing values agree with the $D_{dsDNA} \sim A.N^{-0.672}$ scaling law, where A is a constant and N the fragment length in bp. [32] Likewise, our data could be fitted by $\langle D \rangle_{dsDNA} \sim A'.N^{-0.678}$ ($r^2 = 0.984$). The correct exponent obtained for this power law indicates that the 0.1 % (w/w) PDMA solution has poor sieving properties and essentially behaves as a free solution. However, we here obtained $A' \sim 2/3A$. This difference is probably associated to a YOYO-1-induced increase in the DNA persistence length as already reported for TOTO-1 stained dsDNA in 1 :5 dye :bp ratio [48].

TAB. 10.2 – Averaged diffusion coefficients $\langle D \rangle$ ($10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) of fluorescein, 13 bases long rhodamine-green-labelled oligonucleotide, and YOYO-1 stained dsDNA of different lengths (1 :15 dye :bp ratio) in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. Values from Fourier transform analysis of continuous and zero-field time-based (see Supporting Information) experiments are compared with literature ones. Errors correspond to standard deviation.

	Fluorescein	rhg-13	151bp	438bp	1257bp
Continuous	340 ± 30	110 ± 10	16 ± 2	9.1 ± 0.4	3.8 ± 0.7
Time-based	330 ± 10	106 ± 5	17 ± 2	8.6 ± 0.8	4.2 ± 0.3
Literature	380 ± 1^a	180 ± 20^b	26 ± 3^b	13 ± 1^b	6.4 ± 0.6^b

^a From Culbertson et al. [7], corrected at 20°C.

^b Data calculated using the $D_{ssDNA} = 7.38 \times 10^{-6} N^{-0.539}$ and $D_{dsDNA} = 7.73 \times 10^{-6} N^{-0.672}$ scaling laws given by Stellwagen et al. for non-labelled single stranded and double stranded DNA N bases long. [32]

For a fixed field of view, a wide range of diffusion coefficients can be explored by tuning v_x . The applied electric field is therefore a valuable experimental parameter, provided that $\langle D \rangle$ does not depend on it. To address the latter issue, we performed a series of continuous

experiments by applying electric fields between 6.7×10^2 and $1.6 \times 10^4 \text{ Vm}^{-1}$, resulting in velocities in the 13.5 to $324 \mu\text{ms}^{-1}$ range for rhg-13 in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C . Within experimental error, no significant difference was observed for the measured diffusion coefficients (Figure 4).

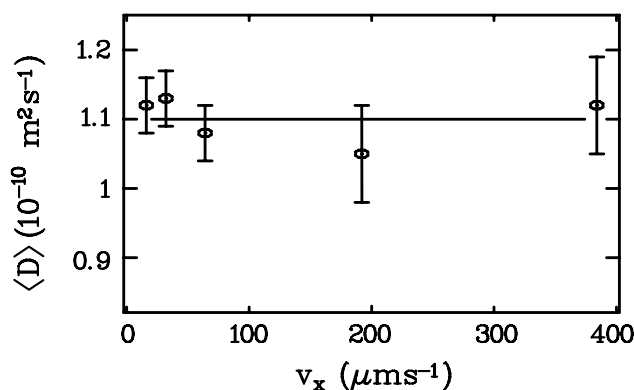


FIG. 10.4 – Dependence of the average rhg-13 diffusion coefficient on the analyte velocity v_x in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C . The horizontal line corresponds to the value obtained by averaging the results from the 5 different experiments.

With respect to potential high-throughput applications, one may here want to evaluate the time necessary to perform a single measurement. With the present instrumental set-up, the video images are acquired during 10 s for all the considered analytes but the durations of the whole experiment range from 13 to 40 s. Indeed, the migration-diffusion pattern does not establish instantaneously and a delay is required between the beginning of the injection and the image capture : Waiting-times vary according to molecular diffusion coefficients and electrophoretic mobilities, from 3 s for fluorescein to 30 s for $8 \times 10^5 \text{ Da}$ dsDNA. Due to similar physics and device sizes, such an analysis rate is in the same order of magnitude as for the T-sensor. Note that a significant improvement could result from reducing the width of the injection channel and the field of view of the camera.

10.4.4 Analysis of a Binary Mixture

From an analytical point of view, differentiating a mixture from a pure sample is a valuable issue. In some ligand-receptor titration experiments for example, each compound relative abundance is quantified using a diffusion coefficient-based identification. [2–4] Similar questions have also been addressed in FRAP experiments where labelled proteins are often involved in molecular assemblies of various sizes. [10] In these last cases, data were treated in the direct space, which required complex fitting algorithms. [49,50] Once again, 1D-Fourier transform analysis is more straightforward : A binary mixture can be characterized with a simple and robust biexponential fit.

To evaluate the present approach for analyzing binary mixtures, we performed a series of continuous experiments in 0.1 % (w/w) PDMA buffer. We used a mixture of two YOYO-1-stained dsDNA fragments, 151 and 1257bp long, with diffusion coefficients differing by a factor 4 (Table 2) making discrimination possible. [51]

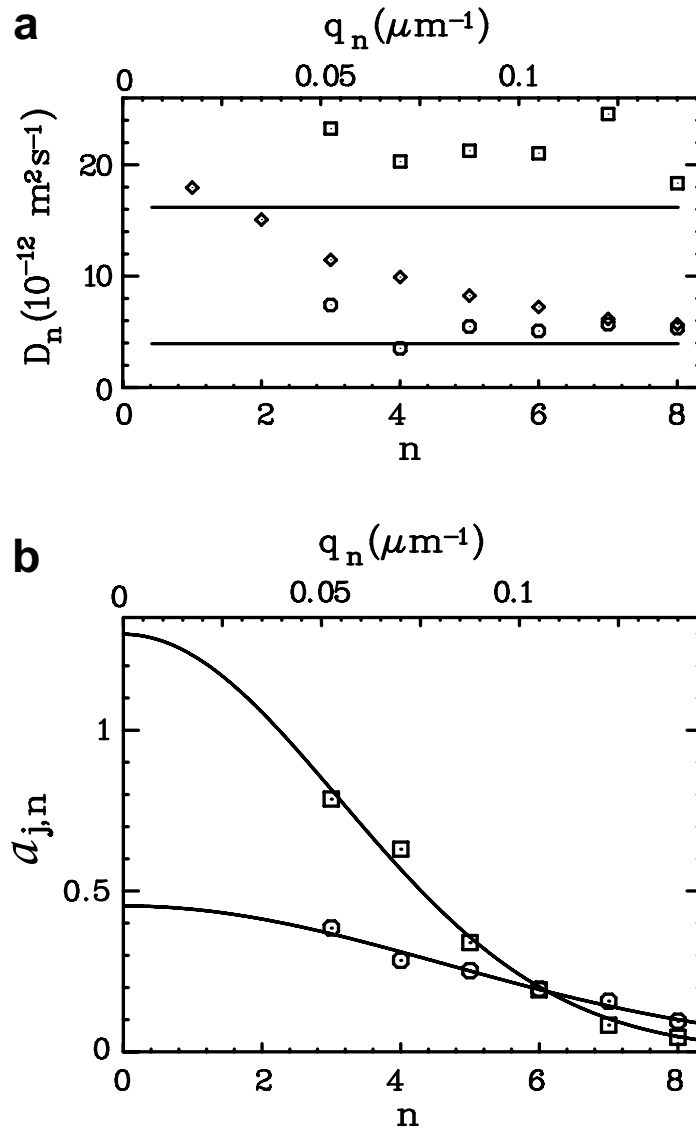


FIG. 10.5 – Analysis of a binary mixture composed of 151 and 1257bp YOYO-1-stained dsDNA (1 :15 dye :bp ratio) in relative abundance $\alpha = 2.2$. The corresponding stationary migration-diffusion pattern was obtained by applying an electric field $E_x = 266 \text{ Vm}^{-1}$ ($v_x = 4.8 \mu\text{ms}^{-1}$) in an analysis chamber filled with NaOH/Hepes 25/50 mM, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. (a) Diffusion coefficients as a function of the Fourier index n or of the spatial frequency q_n . Data were extracted by either monoexponential ($\diamond$) or biexponential fits ($\square$ for 151bp, $\circ$ for 1257bp) of the normalized Fourier modes. The horizontal lines correspond to the diffusion coefficients measured on pure samples (Table 2). (b) Corresponding dependence of the preexponential amplitudes resulting from the above biexponential fit. Solid lines correspond to Gaussian fits (see Experimental Section).

The normalized 1D-Fourier modes $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ extracted from the corresponding stationary migration-diffusion pattern were first fitted by monoexponential functions (eq 10.7). The results were not in line with the behavior of a single component as evidenced from the residuals (Figure S-8). Moreover, the extracted apparent diffusion coefficient

decreased with n (Figure 5a) : Close to the value expected for the fastest diffusive species for the lowest n values, it tends to the one associated with the slowest diffusive analyte at large enough n values.

Therefore we undertook the simultaneous determination of the diffusion coefficients for the two solutes by fitting the normalized Fourier modes with a biexponential function. [52] For a given Fourier mode, two relaxation rates were extracted and the corresponding $D_{n,1}$ and $D_{n,2}$ were computed using eq 10.8. For unambiguously non-monoexponential modes (i.e. for $n \geq 2$), the extracted values are in satisfactory agreement with the diffusion coefficients measured from pure 151 and 1257bp long-dsDNA samples (Figure 5a, Tables 2 and 3).

TAB. 10.3 – Analysis of two binary mixtures of YOYO-1-stained 151 and 1257bp dsDNA in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. α accounts for the actual relative abundance of the two fragments (151bp/1257bp). The experimental relative abundance α_{exp} and the average diffusion coefficients $\langle D \rangle_j$ (10^{-12} m²s⁻¹) are extracted from biexponential fits of the normalized Fourier modes. Errors correspond to standard deviation.

α	α_{exp}	$\langle D \rangle_{151bp}$	$\langle D \rangle_{1257bp}$
2.2	3 ± 1	21 ± 3	5 ± 1
0.7	0.5 ± 0.2	16 ± 6	4 ± 1

The quantitative analysis of a binary mixture in the Fourier space requires to make use of the amplitudes of the two exponential contributions. The relative abundance of two species with concentrations F_1 and F_2 can be written as by $\alpha = F_1/F_2$. In the present analysis of the fluorescence intensity in the Fourier space, the expression of α involves the brightnesses Q_j and the zeroth Fourier mode preexponential amplitudes $a_{j,0}$: $\alpha = Q_2/Q_1 \times a_{1,0}/a_{2,0}$ (see Experimental Section) and the $a_{j,0}$ were obtained by extrapolation of the Gaussian dependence of the $a_{j,n}$ values on n (Figure 5b). Additionally considering that YOYO-1 has a similar affinity per base pair for 151 and 1257bp long dsDNA fragments and that its brightness does not depend on the dsDNA length, we set $Q_2/Q_1 = 1$ when concentrations are defined in bp mol/L. Table 3 displays the results obtained from analyzing the composition of two different mixtures. For both the extracted α_{exp} values correspond to the expected relative abundance α within 30 %.

10.5 Conclusion

In this paper, we introduced a continuous method for measuring on chip the diffusion coefficient of fluorescent solutes. The solutes are punctually introduced into a PDMS/glass thin chamber where they migrate along an homogeneous constant velocity field generated by applying a potential drop. The solute diffusion mainly manifests itself in the direction normal to elution and the resulting stationary migration-diffusion pattern is recorded by video microscopy and subsequently analyzed in the Fourier space. A Fourier transform facilitates data processing by easily providing the diffusion coefficient whatever the initial concentration profile at the injection nozzle. Moreover, this powerful multiscale analysis can give valuable informations on length scale-dependent behaviors or molecular weight distributions.

We have first validated our method by measuring diffusion coefficients ranging from 3×10^{-10} to $4 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ associated to fluorescent species with molecular weights spanning between 330 and $8 \times 10^5 \text{ Da}$. We subsequently applied the present approach to straightforwardly discriminate a pure sample from a complex one. In particular, we showed that the components of a binary mixture could be identified and quantified from observing the diffusive behavior. This observation bears much significance in a pharmaceutical perspective where, during library screening, one aims at measuring without separation the relative proportion in two states of a ligand : free or bound to a given receptor.

10.6 Acknowledgement

We thank J. Wong-Ng and D. Chatenay (ENS, Paris) for their help in setting the counter-moulding fabrication technique ; J. Weber (Institut Curie, Paris) for the kind gift of PDMA ; J. Goulpeau, A. Ajdari (ESPCI, Paris), J.-L. Mergny, L. Lacroix, and A. Bourdoncle (MNHN, Paris) for insightful discussions ; A. Diguët for help in preliminary experiments. We are also indebted to the following people for their technical assistance : P. La Rizza (ENS) for electronics, J. Quintas da Silva (ENS) for mechanics, L. Bernardi (LPN) and S. Savarese (Comsol France) for Finite Element Method simulations. This work was supported by ACN 2003 "Cargos Moléculaires" and ACI-NMAC 2003 "Puces Cinétiques" grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (to L.J., C.G., J.-F.A., and A.L.) and two Ministère de la Recherche fellowships (to A.E.T. and H.B.).

10.7 Supplementary Material Available

A listing including the theoretical derivation of the Fourier transform of the concentration $F(x, y)$ with respect to y , the PCR protocol, a detailed microfabrication protocol, Finite Element Method simulations, a description of time-based experiments, and a detailed analysis to correct for illumination inhomogeneities is available as Supporting Information. Supplementary Tables provide the sequences of the rhodamine-green-labelled oligonucleotides and compare the diffusion coefficients extracted by either Fourier analysis or Gaussian fitting in the direct space. Figures complementary to Figures 3 and 5 are also presented. Current ordering information is found on any masthead page.

Bibliographie

- [1] Cantor, C. R. ; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*, Part II, Freeman, New York, 1980.
- [2] Chen, A. ; Shapiro, M. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 669A–675A.
- [3] Auer, M. ; Moore, K. J. ; Meyer-Almes, F. J. ; Guenther, R. ; Pope, A. J. ; Stoeckli, K. A. *Drug Discov. Today* **1998**, *3*, 457–465.
- [4] Kaufman, E. N. ; Jain, R. K. *J. Immunol. Meth.* **1992**, *155*, 1–17.
- [5] Hatch, A. ; Kamholz, A. E. ; Hawkins, K. R. ; Munson, M. S. ; Schilling, E. A. ; Weigl, B. H. ; Yager, P. *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 461–465.
- [6] Taylor, G. *Proc. R. Soc. London, Ser. A* **1953**, *219*, 186–203.
- [7] Culbertson, C.T. ; Jacobson, S.C. ; Ramsey, J.M. *Talanta* **2002**, *56*, 365–373.
- [8] Stilbs, P. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 2135–2137.
- [9] Elson E. L. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1985**, *36*, 379–406.
- [10] Sprague, B. L. ; McNally, J. G. *Trends Cell. Biol.* **2005**, *15*, 84–91.
- [11] Schurr, J. M. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1977**, *4*, 371–431.
- [12] Zhang, K. J. ; Briggs, M. E. ; Gammon, R. W. ; Sengers ; J. V. *Chem. Phys.* **1996**, *104*, 6881–6892.
- [13] Kamholz, A. E. ; Weigl, B. H. ; Finlayson, B. A. ; Yager, P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5340–5347.
- [14] Dertinger, S. K. W. ; Chiu, D. T. ; Jeon, N. L. ; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 1240–1246.
- [15] Cabrera, C. R. ; Finlayson, B. ; Yager, P. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 658–666.
- [16] Kamholz, A. E. ; Schilling, E. A. ; Yager, P. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 1967–1972.
- [17] Salmon, J.-B. ; Dubrocq, C. ; Tabeling, P. ; Charier, S. ; Alcor, D. ; Jullien, L. ; Ferrage, F. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3417–3424.
- [18] Ismagilov, R. F. ; Stroock, A. D. ; Kenis, P. J. A. ; Whitesides, G. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *76*, 2376–2378.
- [19] Beard, D. A. *J. Appl. Phys.* **2001**, *89*, 4667–4669.
- [20] Kamholz, A. E. ; Yager, P. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 155–160.
- [21] Tsay, T.-T. ; Jacobson, K. A. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 360–368.
- [22] Berk, D. A. ; Yuan, F. ; Leunig, M. ; Jain, R. K. *Biophys. J.* **1993**, *65*, 2428–2436.

- [23] The velocity field of the species $\mathbf{F}$ can be essentially considered as constant along z in the whole device (*vide infra*). The $\mathbf{F}$ concentration at the injection point is also independent on z . Thus the problem is rigorously bidimensional.
- [24] After identification of x with $v_x t$, the latter equation is equivalent to the time-dependent solution for unidimensional diffusion : $\tilde{F}(t, q) = \tilde{F}(0, q) \exp(-Dq^2 t)$.
- [25] For an example of synthesis protocol, see Cadix, A. ; Chassenieux, C. ; Lafuma, F. ; Lequeux, F. *Macromolecules* **2005**, *38*, 527–536.
- [26] Carlsson, C. ; Jonsson, M. ; Akerman, B. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 2413–2420.
- [27] Duffy, D. C. ; McDonald, J. C. ; Schueller, O. J. A. ; Whitesides, G.M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4974–4984.
- [28] Ng Lee, J. ; Park, C. ; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6544–6554.
- [29] Ito, T. ; Inoue, A. ; Sato, K. ; Hosokawa, K. ; Maeda, M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4759–4764.
- [30] See Gosse, C. ; Croquette, V. *Biophys. J.*, **2002**, *82*, 3314–3329.
- [31] Nkodo, A.E. ; Garnier, J.M. ; Tinland, B. ; Ren, H. ; Desruisseaux, C. ; McCormick, L.C. ; Drouin, G. ; Slater, G.W. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2424–2432.
- [32] Stellwagen, E. ; Lu, Y. ; Stellwagen, N. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11745–11750.
- [33] Gosse, C. ; Boutorine, A. ; Aujard, I. ; Chami, M. ; Kononov, A. ; Cogné-Laage, E. ; Allemand, J.-F. ; Li, J. ; Jullien, L. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6485–6497.
- [34] Huang, L. R. ; Tegenfeldt, J. O. ; Kraeft, J. J. ; Sturm, J. C. ; Austin, R. H. ; Cox, E. C. *Nature Biotechnol.* **2002**, *20*, 1048
- [35] Zhang, C.-X. ; Manz, A. *Anal Chem* **2003**, *75*, 5759–5766.
- [36] Huang, L. R. ; Tegenfeldt, J. O. ; Kraeft, J. J. ; Sturm, J. C. ; Austin, R. H. ; Cox, E. C. *Tech. Dig.-Int. Electron Devices Meet.* **2001**, 363–366.
- [37] The bowed channels located on the injection side of the device were shortened to compensate for width reduction, thus keeping their overall resistance constant.
- [38] In the same way, the pillars that sustain the PDMS chamber ceiling induce a perturbation of the order of their diameter (i.e. 30 μm).
- [39] Hjertén, S. *J. Chromatogr. A* **1985**, *347*, 191–198.
- [40] Doherty, E. A. S. ; Berglund, K. D. ; Buchholz, B. A. ; Kourkine, I. V. ; Przybycien ; T. M. ; Tilton, R. D. ; Barron, A. E. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2766–2776.
- [41] Andreev, V. P. ; Dubrovsky, S. G. ; Stepanov, Y. V. *J. Microcolumn Sep.* **1997**, *9*, 443–450.
- [42] Ross, D. ; Johnson, T.J. ; Locascio, L.E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2509–2515.
- [43] Bianchi, F. ; Wagner, F. ; Hoffmann, P. ; Girault, H. H. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 829–836.
- [44] Zhang, P. ; Ren, J. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *507* 179–184.
- [45] As evaluated from Mark-Houwink parameters (Heller, C. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 1962–1977), 0.1 % (w/w) PDMA approximately corresponds to the entanglement threshold for the 3 MDa polymer. Slight viscosity or steric effects might be present.

- [46] Pappaert, K. ; Biesemans, J. ; Clicq, D. ; Vankrunkelsven, S. ; Desmet, G. *Lab Chip* **2005**, *5*, 1104–1110.
- [47] Liu, M.K., Giddings, J.C. *Macromolecules* **1993**, *26*, 3576–3588.
- [48] Smith, D. E. ; Perkins, T. T. ; Chu, S. *Macromolecules* **1996**, *29*, 1372–1373.
- [49] Gordon, G. W. ; Chazotte, B. ; Wang, X. F. ; Herman, B. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 766–778.
- [50] Periasamy, N. ; Verkman, A. S. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 557–567.
- [51] In the present approach, the differentiation between two $\mathbf{F}_j$ species relies on their respective $D_j/v_{x,j}$ ratio. Using the Einstein equation $D_j = kT/\xi_j$, the electrophoretic mobility expression $\mu_j = z_j/\xi_j$, and eq 10.18, this discriminating factor develops as :

$$D_j/v_{x,j} = \frac{kT}{(z_j + \mu_{EO} \xi_j)E_x}$$

where ξ_j and z_j are the respective $\mathbf{F}_j$ solute molecular friction coefficient and charge. In principle, it should consequently always be possible to discriminate the two components in a binary mixture, even when dealing with uncharged species, by tuning the surface properties of the microdevice to generate an appropriate electroosmotic flow (see for instance : Liu, Y. ; Fanguy, J. C. ; Bledsoe, J. M. ; Henry, C. S. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5939–5944). Polyelectrolytes such as DNA behave like free-draining coils when submitted to an electric field in free solution. The preceding Nernst-Einstein relation does not apply anymore [31] and must be replaced by :

$$\{D_j/v_{x,j}\}_{free-draining} = \frac{kT}{(z_K + \mu_{EO} \xi_K)E_x} \times \xi_K \mathcal{A}.N_j^{-\nu}$$

where ξ_K and z_K are the respective Kuhn segment molecular friction coefficient and charge, and $\mathcal{A}.N_j^{-\nu}$ is a Zimm-type power law for D_j .

- [52] Note that a sum of two Gaussian functions failed to fit the stationary migration-diffusion pattern in the direct space, thus emphasizing the strength of Fourier data analysis.

Chapitre 11

Article 2 : *Supporting information*

A. Estévez-Torres,[†] C. Gosse,^{§,*} T. Le Saux,[†] J.- F. Allemand,[#]
V. Croquette,[#] H. Berthoumieux,[†] A. Lemarchand,[‡] L. Jullien ^{†,*}

[†] *Département de Chimie, et [#] Département de Physique, Ecole Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France. E-mail : Ludovic.Jullien@ens.fr*

[§] *Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France. E-mail : charlie.gosse@lpn.cnrs.fr*

[‡] *Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, 4, place Jussieu, 75005, France.*

11.1 Supporting Information

- Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentration $F(x, y)$ with respect to y ;
- PCR protocol for syntheses of the dsDNA fragments ;
- Detailed microfabrication protocol for the bottom PDMS layer ;
- Finite Element Method simulations ;
- Measurements of diffusion coefficients in time-based experiments ;
- Correction of the optical pattern in the Fourier space ;
- Supplementary Tables (Tables S-2 and S-3) ;
- Supplementary Figures (Figures S-6–S-9).

11.2 Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentration $F(x, y)$ with respect to y

We here detail the calculation of the migration-diffusion pattern in the Fourier space for the boundary conditions reported in the Main Text.

The integration constants $C_{\pm}$ in eq 3 are deduced from the boundary conditions : $F(0, y)$ at $x = 0$ and $F(a, y)$ at $x = a$. We find :

$$C_- = \frac{\exp(\lambda_+ a) \tilde{F}(0, q) - \tilde{F}(a, q)}{\exp(\lambda_+ a) - \exp(\lambda_- a)} \quad (11.1)$$

$$C_+ = \frac{\tilde{F}(a, q) - \exp(\lambda_- a) \tilde{F}(0, q)}{\exp(\lambda_+ a) - \exp(\lambda_- a)} \quad (11.2)$$

In the experimental conditions considered, $\lambda_+ a \gg 1$. Indeed $\lambda_+ a \geq v_x a / 2D$ from eq 4 and typical values for v_x , D and a are here 10^{-5}ms^{-1} , $10^{-10} \text{m}^2 \text{s}^{-1}$ and 10^{-2}m respectively : $\lambda_+ a \geq 5 \times 10^2$. Taking into account that $\lambda_- a \leq 0$, we write : $\exp(\lambda_+ a) - \exp(\lambda_- a) \simeq \exp(\lambda_+ a)$, $C_- \simeq \tilde{F}(0, q) - \tilde{F}(a, q) \exp(-\lambda_+ a)$ and $C_+ \simeq \exp(-\lambda_+ a) \tilde{F}(a, q) - \exp[(\lambda_- - \lambda_+)a] \tilde{F}(0, q)$. Eq 3 of the Main Text now provides :

$$\tilde{F}(x, q) = \tilde{F}(0, q) \{ \exp(\lambda_- x) - \exp[(\lambda_- a + \lambda_+(x - a))] \} + \tilde{F}(a, q) \exp[\lambda_+(x - a)] \quad (11.3)$$

Taking into account that $(\lambda_+ - \lambda_-)a > \lambda_+ a \gg 1$, we consequently derive eq 5 of the Main Text for small values of the abscissa, $x \ll a$.

11.3 PCR Protocol for Syntheses of the dsDNA Fragments

Double-stranded DNA was synthesized by PCR using λ -DNA (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) as a template. Three sets of primers (L1-R1, L4-R2, and L1-R2; HPLC grade from IBA, Göttingen, Germany; see Table S-1 for sequences) were selected with the Primer3 software [2] to obtain products of three different sizes (151, 438, and 1257bp, respectively). The reaction was carried out with the Expand High Fidelity PCR System (Roche Diagnostics, Meylan, France) following the manufacturer instructions. The products were subsequently purified by exclusion on either Chroma Spin TE-100 columns (BD Biosciences, Palo Alto, CA) for the 151bp and 438bp fragments or Chroma Spin TE-400 for the 1257bp ones. Finally, the samples were concentrated by ethanol precipitation, dissolved in 25/50 mM NaOH/Hepes pH 7.5 buffer, and analyzed by electrophoresis on a 1 % agarose gel. After quantification by UV spectrophotometry, the PCR yield could be estimated between 16 to 48 ng of DNA per μ L of initial PCR mix.

Table S-1. Names and sequences (5'-3' orientation) of the PCR primers used in this study.

Name		Sequence
L1		GACGATTCATAAGTTCCGCTGT
R1		GTTACGCCACCAGTCATCCT
L4		AAAGCCAGAACTCCCCGTAT
R2		GGTATTCCCCTCAGTGTCCAG

11.4 Detailed Microfabrication Protocol for the Bottom PDMS Layer

The device is composed of a circular glass cover-slip (0.17 mm thick, 40 mm diameter; Menzel-Gläser, Germany) and two ~ 3 mm thick cross-linked poly(dimethylsiloxane) (PDMS) layers (Figure S-1). The elastomeric bottom stamp, in contact with the glass, contains the thin analysis chamber connected to six reservoirs through arrays of microchannels. On top of it, a second PDMS stamp is used to shape four macroreservoirs accommodating four electrodes.

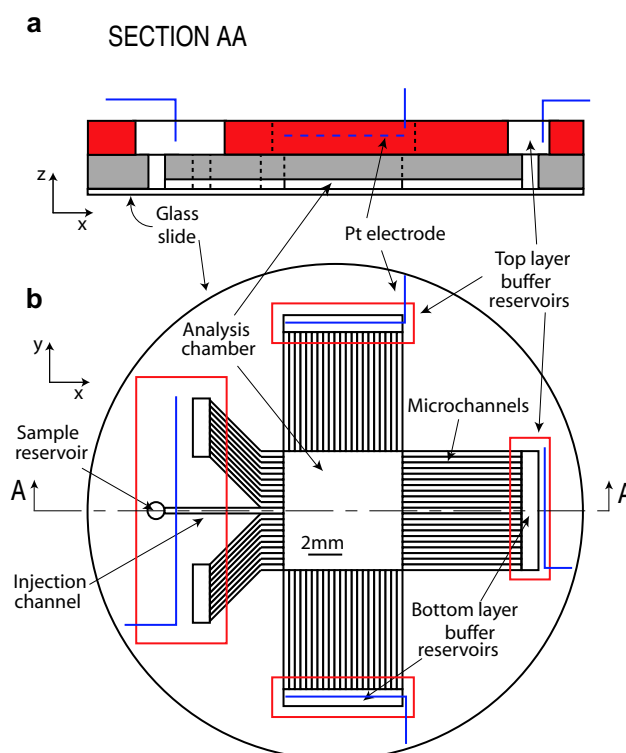


Figure S-1. Cross-section and top views of the two-layer electrophoresis device.

The bottom layer fabrication is decomposed in two steps. First, a positive PDMS master including the microfluidics channels and the reservoirs is obtained by classical soft-lithography protocols. Then, by counter-molding, it yields a negative epoxy master which is used for routine production of the PDMS bottom layer.

The initial PDMS master is obtained as follows : (i) The layout, designed with the L-edit CAD program (Tanner EDA, Monrovia, CA), is printed on a transparency at 25400 dpi resolution (Selba, Versoix, Switzerland) ; (ii) Features are transferred into a $10\ \mu\text{m}$ thick photoresist layer by optical lithography : AZ9260 (AZ Electronic Materials, Wiesbaden, Germany) is spin-coated on a 2" silicon wafer (IEMT, Warsaw, Poland) pretreated with Microposit Primer (Rohm and Haas Electronic Materials, Coventry, UK), 5 min insolation is then performed on a MJB3 aligner (i-line ; SUSS MicroTec, Garching, Germany), and channels are finally developed in AZ400K (Clariant, Frankfurt, Germany) ; (iii) The processed Si wafer is pretreated with trimethylchlorosilane (TMCS ; Acros Organics, Geel,

Belgium) vapor for 5 min ; (iv) PDMS base and curing agent (Bayer, Leverkusen, Germany) are mixed at a 10 :1 (w/w) ratio, poured onto the AZ9260 photoresist master, and degassed at 50 mbar ; (v) After baking at 60°C for 2 h, the polymerized replica is peeled off and the reservoirs are cut out under a stereomicroscope to yield the PDMS master mould.

In a second step, the epoxy master is fabricated as follows : epoxy crystal resin (Gedeo, Gemenos, France) is mixed following manufacturer instructions, poured onto the PDMS master mould, degassed, cured for 2 – 3 days at room temperature and eventually peeled off.

Then, to repeatedly fabricate PDMS bottom layer, the epoxy master mould is treated with TMCS vapor, filled with the PDMS mix, degassed and cured for 2 h at 60°C.

11.5 Finite Element Method Simulations

The profiles of electric potential and concentration are computed with the Finite Element Method software Comsol Multiphysics (Comsol, Stockholm, Sweden) using a simulation cell of length ℓ_x and width ℓ_y .

11.5.1 Electric Potential Computation

Laplace Equation

The electric field $\vec{E}$ is computed using the Gauss equation :

$$\text{div}(\vec{E}) = \frac{\rho}{\epsilon_r \epsilon_0} \quad (11.4)$$

where ρ is the local charge density and $\epsilon_r \epsilon_0$ the medium permittivity. $\rho = 0$ results from modelling the buffer as an isotropic and isothermal conductor where electroneutrality is verified at any point. Then the definition $\vec{E} = -\text{grad}V$ for the electric potential V yields the Laplace equation that is solved by Comsol Multiphysics :

$$\Delta V = 0. \quad (11.5)$$

Boundary Conditions for the Electric Field

- The PDMS is considered to be totally insulating. Thus a zero normal current boundary condition is set at its surface :

$$\vec{J} \cdot \vec{n} = 0, \quad (11.6)$$

where $\vec{J}$ is the current density vector and $\vec{n}$ the unit vector normal to any surface (Figure S-2a).

- The lateral boundaries of the simulation cell, parallel to the x -axis, are also set as insulating. Indeed, considering the chamber as an infinite arrays of channels, periodicity imposes $E_y(x, \ell_y/2) = E_y(x, -\ell_y/2)$ whereas symmetry with respect to the x -axis yields $E_y(x, \ell_y/2) = -E_y(x, -\ell_y/2)$, hence resulting in $E_y(x, \ell_y/2) = E_y(x, -\ell_y/2) = 0$.
- We impose fixed voltage boundary conditions at both channels entries and chamber exit.

11.5.2 Concentration Profile Computation

Migration-Diffusion Equation

The equation to be solved by the Finite Element Method software can easily be derived from the equation of matter conservation :

$$\text{div}(\vec{J}_F) = \frac{\partial F}{\partial t} \quad (11.7)$$

where F is the analyte concentration and $\vec{J}_F$ its flux density. Taking into account both diffusion and electrophoretic migration ($\vec{J}_F = -D\text{grad}F + F\mu\vec{E}$) under stationary conditions (i.e. with $\partial F/\partial t = 0$), it yields the classical migration-diffusion equation :

$$\text{div}(-D\text{grad}F + F\mu\vec{E}) = 0. \quad (11.8)$$

Boundary Conditions for the Analyte

- We adopt a constant concentration at the entrance of the injection channel as the boundary condition and we set $F = F_0$ (Figure S-2b).
- Concerning the chamber exit, we consider that the analyte peak broadening along the x -axis results in a smooth concentration gradient at the chamber exit, leading to neglect the diffusive flux in front of the analyte transport by electrophoresis. Thus we selected the zero diffusive flux condition in Comsol Multiphysics :

$$-D \vec{\text{grad}} F \cdot \vec{u}_x = 0. \quad (11.9)$$

that was validated *a posteriori*.

- The PDMS is impermeable ; A boundary condition of zero normal flux is set at its surface :

$$\vec{J}_F \cdot \vec{n} = 0 \quad (11.10)$$

- Eventually, we impose a null solute concentration at the lateral edges of the simulation cell, i.e. parallel to the x -axis, and at all the remaining channels entries. It is *a priori* justified by the fact that those areas are very far from the migration-diffusion parabola-like pattern.

11.5.3 Results and Hypothesis Evaluation

The potential values at both edges of the simulation cell were calculated to yield a $E_x = 8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$ electric field inside the analysis chamber. For computation, we used the diffusion coefficient D and apparent electrophoretic mobility μ of fluorescein that we measured on chip : $340 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ and $18.1 \times 10^{-9} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectively.

Size of the Simulation Cell

The characteristic lengths ℓ_x and ℓ_y have been chosen to minimize artifacts from the boundary effects. Typical experimental images have a 1024×1024 pixels size, which corresponds, on chip, to a $875.50 \mu\text{m}$ side square. Thus we chose a simulation cell of width $\ell_y = 880 \mu\text{m}$ and adopted a cell length $\ell_x = 3\ell_y$.¹ We additionally located the chamber entry such that the resistive channels represent one third of the total x -dimension.

Electric Field Homogeneity

Figure S-2c displays the results of the electric potential simulation. A $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ inhomogeneity limit clearly appear when plotting the electric field x -component (Figure S-2e) around the chamber entry.

¹A larger simulation area with $\ell_y = 1280 \mu\text{m}$ yields similar values of the electric potential and of the concentration (the discrepancy is smaller than 2 % ; Figure S-3a and b) which underlines the absence of any artifact related to the finite size of the computation area.

Implementing the Appropriate Migration-Diffusion Equation in Comsol Multiphysics

Eq 11.8 can be developed in :

$$-D.\Delta F + \mu.div(F.\vec{E}) = 0, \quad (11.11)$$

which yields :

$$-D.\Delta F + \mu[\vec{E}.gradF + F.div(\vec{E})] = 0. \quad (11.12)$$

Assuming the electroneutrality verified throughout the buffer, i.e. $div(\vec{E}) = 0$ (eq 11.4), it finally writes :

$$-D.\Delta F + \mu\vec{E}.gradF = 0. \quad (11.13)$$

From a mathematical point of view, eqs 11.8 and 11.13 are equivalent. However, we observed that the results of the simulations differ, depending on which implementation mode was selected in Comsol Multiphysics. Indeed, as the *conservative* option, corresponding to eq 11.9, yields acceptable results, the *non-conservative* option, corresponding to eq 11.13, result in abnormal solute accumulation at the injection nozzle. Additionnally, in this last case, we noticed that the fluorescein concentration tends towards the one found by the *conservative* solver when the mesh was refined. Consequently, we hypothesized some technical origin for the discrepancy between the two computing strategies. It was further confirmed by plotting the electric field divergent : $div(\vec{E})$ is not always null and can even reach non-negligeable values around angular edges of insulating materials. Consequently, eq 11.13 does not correspond anymore to eq 11.8 and the *non-conservative* solving option should be avoided to address this kind of coupled equations system.

Validity of the Null Concentration Boundary Condition

For computing the concentration profile, we impose a null solute concentration at the lateral boundaries of the simulation area. To validate this hypothesis, we calculated the normalized concentration in a larger cell and plotted the results along what would be the edge of the normal simulation cell (Figure S-3c). F/F_0 values below 0.01 % confirm the absence of any analyte at this location and thus validate the present boundary condition.

Validity of the Zero-Diffusive Flux Boundary Condition

To check if Eq 11.9 is an appropriate boundary condition for simulations of concentration profiles, we applied the strategy used in the preceding subsection. The diffusive and the convective flux, calculated in a larger cell, are compared for positions corresponding to the normal cell edge (Figure S-3d). $D\partial C/\partial x$ always represents less than a few percents of the total analyte flux along x , hence validating the zero diffusive flux boundary condition implemented in Comsol for the chamber exit.

Diffusion Coefficient Extraction by Fourier Transform Analysis

Figure S-2d displays the simulated concentration profiles used for Fourier modes computation and subsequent D_n extraction, resulting in Figure 3c of the Main Text.

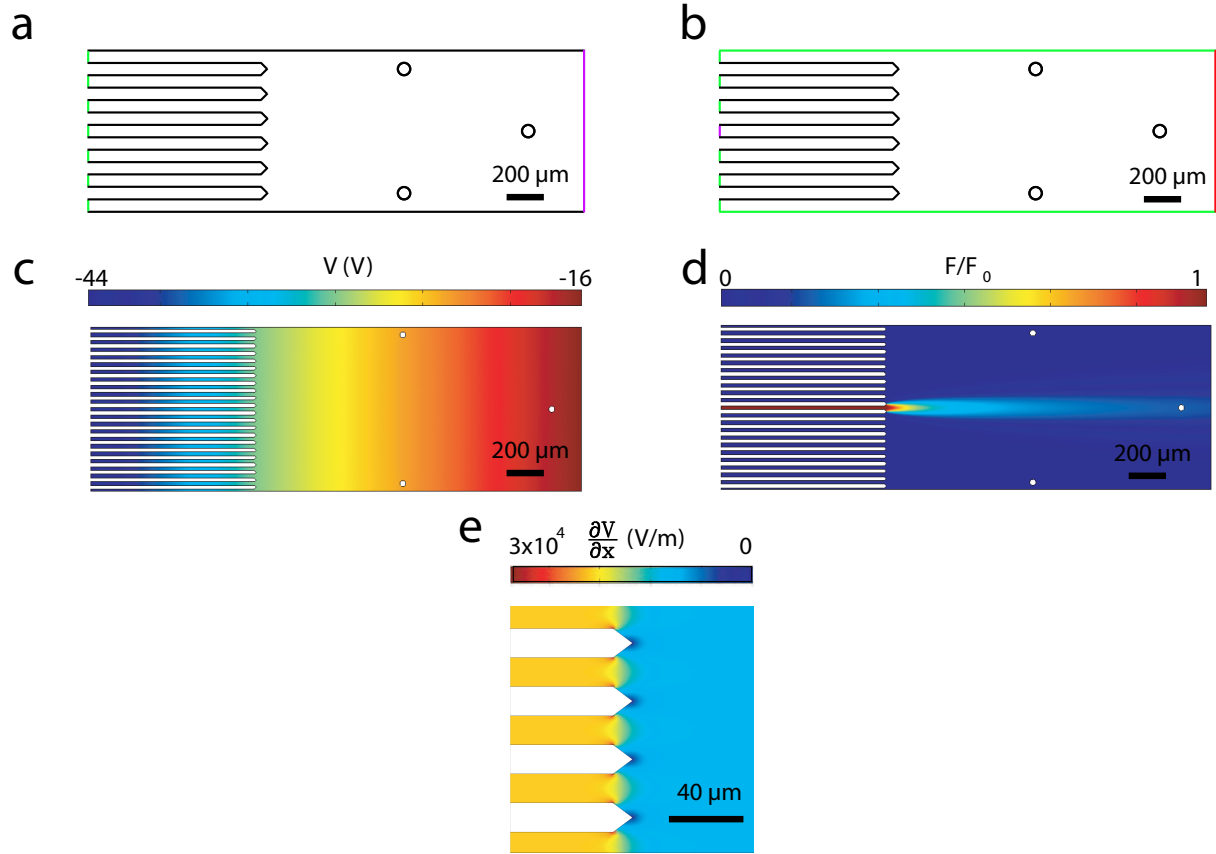


Figure S-2. Finite element method simulations of the experiment presented in Figure 3 of the Main Text : Fluorescein at a concentration $F_0 = 5 \mu\text{M}$ is injected under a 300 V potential drop in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. The simulation cell is 880 μm wide and 2640 μm long. (a) Boundary conditions for the electric field : (—) corresponds to electric insulation and (—) and (—) to imposed voltages, -44 V and -16 V , respectively. These two last values were simply computed assuming that the resistance per unit length in the channels is double than in the chamber. To improve readability, the scheme is not to scale. (b) Boundary conditions for the analyte : (—) corresponds to a zero normal flux, (—) to a zero diffusive flux, and (—) and (—) to imposed concentrations, 0 and F_0 , respectively. The scheme is not to scale. (c) Values of the electric potential in the analysis chamber. (d) Migration-diffusion pattern for the solute (concentration is normalized by F_0). (e) Zoom on the $\partial V / \partial x$ inhomogeneities at the injection nozzle.

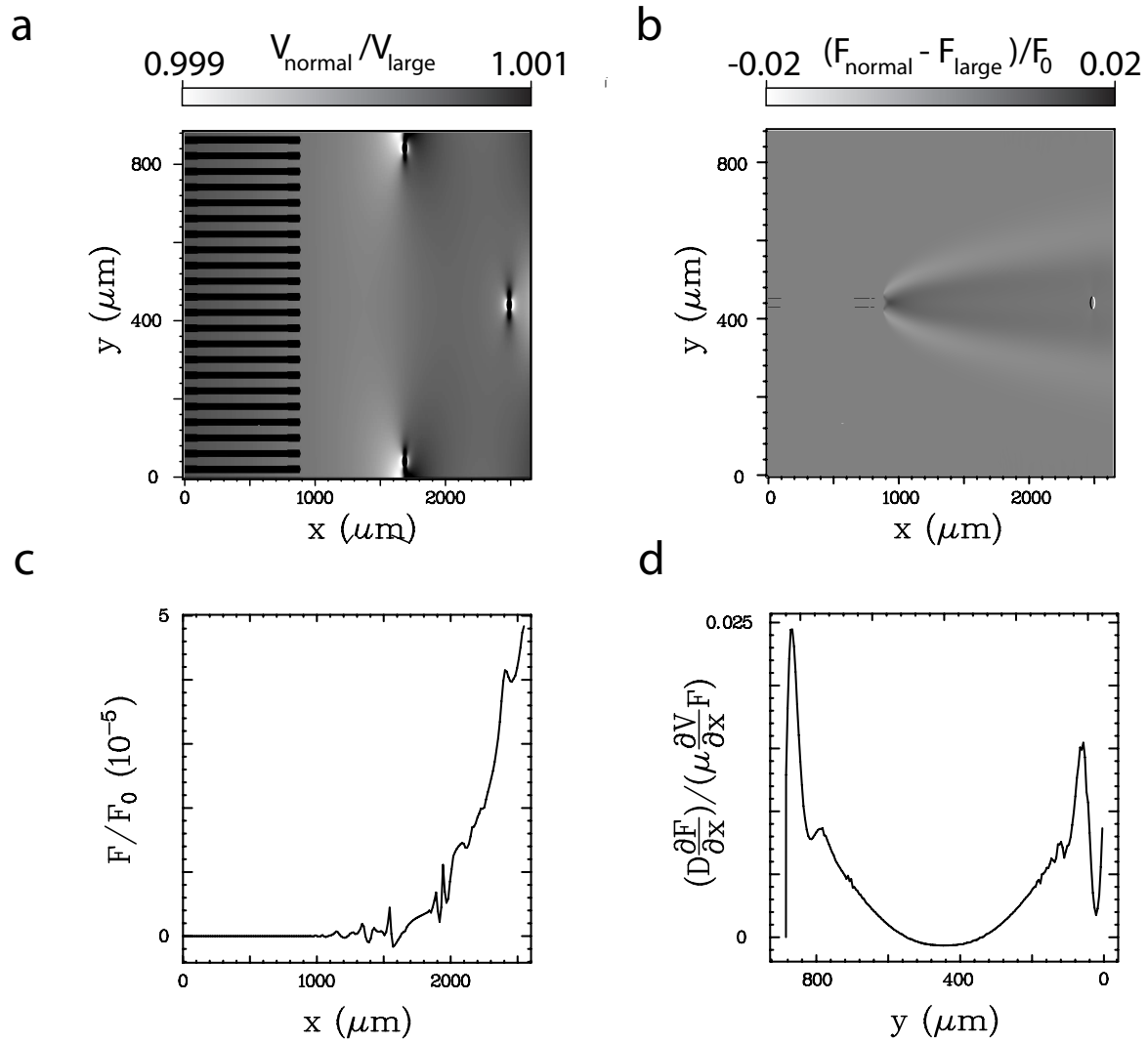


Figure S-3. Validation of the hypotheses underlying the boundary conditions used for finite element model simulations. Computations are performed in a cell of either the normal size, $880 \mu\text{m}$ wide and $2640 \mu\text{m}$ long, or ~ 1.45 larger, $1280 \mu\text{m}$ wide and $3840 \mu\text{m}$ long. $5 \mu\text{M}$ fluorescein is injected under a 300 V potential drop in NaOH/Hepes $25/50 \text{ mM}$ pH 7.5 , 0.1% (w/w) PDMA buffer at 20°C . (a) Comparison between the electric potentials found for the two different simulation cell sizes. Values obtained in the larger cell were divided by the ones obtained in the normal one. (b) Comparison between the solute migration-diffusion patterns computed with the two different simulation cell sizes. Normalized values obtained in the normal cell were subtracted to the ones obtained in the larger one. (c) Dependence along x of the concentration F ; values are calculated at $y = 440 \mu\text{m}$ in the large cell. (d) Dependence along y of the ratio between the x -components of the diffusive and convective flux; values are calculated at $x = 1760 \mu\text{m}$ in the large cell.

11.6 Measurements of Diffusion Coefficients in Time-Based Experiments

In this work, we did not only perform continuous stationary experiments as reported in the Main Text. We also designed and performed time-based experiments in which the spreading along the y -axis of an initial concentration profile generated along the x -axis is analyzed over time.

We performed two types of time-based experiments. In the zero-field time-based experiments, the initial condition along x relaxes by diffusion in the absence of any electric field. In E_y -field time-based experiments, we additionally apply an alternative electric field along y during the experiment : Migration now superimposes to diffusion. The comparison between the diffusion coefficients measured in both experiments allows us to evaluate any possible electric field-induced dispersion that could superimpose to the Brownian motion in the present device.

11.6.1 Theory

Time-based experiments start by continuously applying an electric field E_x along the x -axis to generate a stationary migration-diffusion pattern in the $\mathbf{F}$ species. After E_x is switched off, the evolution of a concentration profiles along y , averaged over a characteristic length Δx ($\sim 10 \mu\text{m}$), is followed over time. With diffusion coefficients $D \sim 10^{-10} - 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ and velocity along x $v_x \sim 10^{-4} \text{ ms}^{-1}$, $\frac{D}{v_x} q^2 \Delta x \ll 1$ and thus $\tilde{F}(x, q)$ is constant at the Δx length scale : Migration dominated diffusion along x for generating the initial condition which can be therefore considered as independent on x . Then the problem becomes unidimensional.

We consequently adopt eq 11.14 to model the subsequent relaxation of the preceding initial condition by diffusion–migration :

$$\frac{\partial F(y, t)}{\partial t} = -v_y \frac{\partial F(y, t)}{\partial y} + D \frac{\partial^2 F(y, t)}{\partial y^2} \quad (11.14)$$

where v_y designates the velocity of $\mathbf{F}$ along y .² Introducing the spatial Fourier transform along y , $\tilde{F}(q, t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} F(y, t) e^{-iqy} dy$, we derive the solution of eq 11.14 in the Fourier space :

$$\tilde{F}(q, t) = \tilde{F}(q, 0) \exp(-Dq^2 t) \exp(iqv t) \quad (11.15)$$

where $\tilde{F}(q, 0)$ is the Fourier transform of the initial condition $F(y, 0)$. The amplitude of eq 11.15 :

$$|\tilde{F}(q, t)| = |\tilde{F}(q, 0)| \exp(-Dq^2 t) \quad (11.16)$$

shows that D can be simply extracted from an exponential fit in zero-field and E_y -field time-based experiments.

²We apply a squared time-periodic electric field yielding $v(t) = v_y$ (for $0 \leq t \leq T/2$) and $v(t) = -v_y$ (for $T/2 \leq t \leq T$) in the E_y -field time-based experiment. Then v_y remains only constant over half a period T but the final solution of eq 11.14 does not change for a nonreactive species.

11.6.2 Data Acquisition

As explained in the Experimental Section of the Main Text, we first generate the initial condition by applying a strong electric field E_x , several kVm^{-1} , along the x -axis (Figure S-4a). At $t = 0$, E_x is switched off and the diffusion of the analyte along the y -axis is analyzed over time, either in the absence of any electric field (zero-field time-based experiments; Figure S-4b) or in the presence of an electric field E_y of several kVm^{-1} oscillating at a few Hz along the y -axis (E_y -field time-based experiments; Figure S-4c). The fluorescence intensity along y averaged over a characteristic length Δx ($\sim 10 \mu\text{m}$) is subsequently plotted as a function of time (Figures S-4b and S-4c). The diffusion coefficient is eventually extracted from fitting experimental data with eq 11.16 after fast Fourier transform analysis.

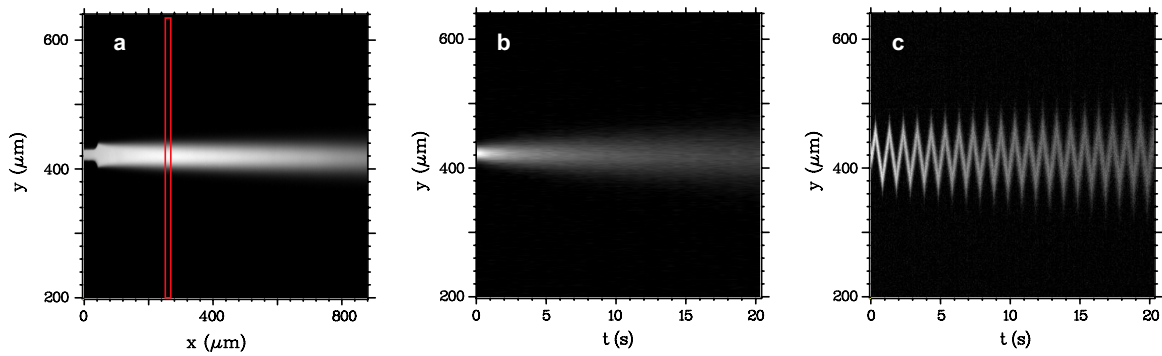


Figure S-4. Time-based experiments illustrated with $5 \mu\text{M}$ YOYO-1 stained 151bp dsDNA (1 :15 dye :bp ratio) in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1% (w/w) PDMA buffer at 20°C . (a) Initial condition resulting from application of $E_x = 8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$. (b) Time-evolution of a free diffusing y -profile. To reduce noise, averaging is performed over $\Delta x = 10$ pixels (red rectangle in the preceding pannel). (c) Time-evolution of the same y -profile when a 1 Hz alternative electric field $E_y = 8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$ is applied along the y -axis.

11.6.3 Results and Discussion

Figures S-4b and S-4c display the results for the weakly diffusing YOYO-1 stained 151bp dsDNA in zero-field and E_y -field time-based experiments. After 1D-Fourier transform analysis, we extracted the same $17 \pm 2 \times 10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ value of the diffusion coefficient from both measurements.

The D_0 diffusion coefficient obtained from the zero-field time-based experiment directly reflects Brownian motion : $D_0 = D_{\text{Brown}}$. In contrast, additional phenomena might affect the corresponding value D_{E_y} extracted from the E_y time-based experiment. First, the different zeta-potentials of the lower and upper chamber walls may induce a linear dependence on z of the fluid flow that gives rise to a Taylor contribution D_{Taylor} to the diffusive behavior. Analyte adsorption and material heterogeneities could additionally generate variations of fluid velocity in the x - y plane yielding a supplementary convective contribution to the diffusive relaxation : $D_{\text{convection}}$. Thus two electric field-induced dispersions are expected to superimpose to the Brownian motion in the E_y -field time-based

experiment : [4]

$$D_{E_y} = D_{Brown} + D_{Taylor} + D_{convection}. \quad (11.17)$$

The fair agreement obtained here between the diffusion coefficients measured in Figure S-4b and S-4c suggests $\frac{D_{Taylor}+D_{convection}}{D_{Brown}} \ll 1$. Hence we conclude from this series of experiments that electroosmotic mobility is constant inside the analysis chamber.

11.7 Correction of the Optical Pattern in the Fourier Space

11.7.1 Exact Theoretical Computation

The fluorescence emission from the measurement chamber reflects the concentration $F(x, y)$ in analyte $\mathbf{F}$.³ In relation to illumination and collection of fluorescence emission, the amount of light collected on each camera pixel $I(x, y)$ depends on the intensity of the excitation light at the device but also on the photon collection efficiency for the CCD sensor area of the camera. We eventually write :

$$I(x, y) = Q_F F(x, y) P(x, y) \quad (11.18)$$

where we introduced $P(x, y)$ as an optical pattern function characterizing the set-up.

In the ideal case, $P(x, y)$ is a constant over the focal plane. Then $I(x, y)$ and $F(x, y)$ exhibit a same functional dependence on x and y and the diffusion coefficient can be directly extracted from fitting the dependence of $\tilde{I}(x, q)$ on x with eq 5 of the Main Text. In contrast, the present instrumental set-up favors a wide field of view together with a good level of sensitivity. The light source is correspondingly strongly focussed, which yields illumination inhomogeneities : $P(x, y)$ exhibits a 20 to 30 % variation over the ~ 1 mm field of view (Figure S-5a and S-5b). Further analysis is therefore required to extract the diffusion coefficient from the spatial dependence of $\tilde{I}(x, q)$.

Eq 11.19 shows that the discrete⁴ Fourier transform $\tilde{I}(x, n)$ is a convolution product between the corresponding terms $\tilde{F}(x, n)$ and $\tilde{P}(x, n)$ associated to the $\mathbf{F}$ concentration profile and to the optical pattern function respectively :

$$\tilde{I}(x, n) = Q_F \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \tilde{F}(x, n - k) \tilde{P}(x, k) \quad (11.19)$$

or

$$\tilde{I}(x, n) = Q_F \sum_{k=0}^n \tilde{F}(x, n - k) \tilde{P}(x, k) \quad (11.20)$$

³At the present $\mathbf{F}$ concentrations, the molecular brightness Q_F of $\mathbf{F}$ is constant and inner filter effects are absent. [3]

⁴We apply on the recorded $I(x, y)$ function a discrete Fourier transform defined as :

$$\tilde{I}(x, n) = \frac{1}{\ell_y} \sum_{y=0}^{\ell_y-1} I(x, y) e^{-iq_n y} = \frac{1}{\ell_y} \sum_{y=0}^{\ell_y-1} I(x, y) e^{-2\pi i n \frac{y}{\ell_y}}$$

where $q_n = 2\pi n / \ell_y$ is the spatial frequency associated to the Fourier mode n and ℓ_y the image size along y , in pixels.

because $\tilde{F}(x, n)$ and $\tilde{P}(x, n)$ are only defined for $n \geq 0$. We eventually derive :⁵

$$\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} = \frac{\tilde{F}(x, n)}{\tilde{F}(x, 0)} + \sum_{k=1}^n \frac{\tilde{F}(x, n-k)}{\tilde{F}(x, 0)} \times \frac{\tilde{P}(x, k)}{\tilde{P}(x, 0)}. \quad (11.21)$$

11.7.2 Evaluation of the Zeroth Order Correction

The second term in the right hand of the eq 11.21 complicates the extraction of the diffusion coefficient from the $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ spatial dependence. Indeed, the simple exponential dependence given in eq 5 of the Main Text only applies for $\tilde{F}(x, n)$. In the following, we measure $\tilde{P}(x, n)/\tilde{P}(x, 0)$ to evaluate at which order $\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)}$ has to be corrected to facilitate analysis without introducing any detrimental error.

Figures S-5a and S-5b display the epifluorescence image $P(x, y)$ from the analysis chamber homogeneously filled with 5 μ M fluorescein in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5. Figure S-5c shows the corresponding spatial dependence along x of the $\tilde{P}(x, n)/\tilde{P}(x, 0)$ normalized Fourier modes resulting from the Fourier transform along y . The $\tilde{P}(x, n)/\tilde{P}(x, 0)$ terms rapidly decrease from 0.08 for $n = 1$ to nearly 0.01 for $n \geq 2$.

The latter observation suggests to analyze our images at the zeroth order by identifying :

$$\frac{\tilde{F}(x, n)}{\tilde{F}(x, 0)} = \frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} \quad (11.22)$$

However, to evaluate the corresponding level of approximation, we also computed first-order corrected concentration functions as :

$$\frac{\tilde{F}(x, n)}{\tilde{F}(x, 0)} = \frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} - \frac{\tilde{F}(x, n-1)}{\tilde{F}(x, 0)} \times \frac{\tilde{P}(x, 1)}{\tilde{P}(x, 0)} \quad (11.23)$$

Figure S-5d displays for both corrections the diffusion coefficients extracted from analysis of the data shown in Figure 4b. The agreement between both orders of analysis improves with the mode index n and is always better than our 10% estimation for the experimental errors (Table 1 and 2).

In the present work, we correspondingly retained the simplest zeroth Fourier mode normalization for data analysis to extract diffusion coefficients from the recorded images : The normalized Fourier modes $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ are fitted with the $\frac{\tilde{F}(0, n)}{\tilde{F}(0, 0)} \exp\left(\frac{1 - \sqrt{1 + 4D^2 q^2 / v_x^2}}{2D/v_x} x\right)$ function.

⁵For a mixture, $I(x, y)$ results from the contributions of all the $\mathbf{F}_j$ analytes and eq 11.21 becomes :

$$\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} = \frac{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, n)}{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, 0)} + \sum_{k=1}^n \frac{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, n-k)}{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, 0)} \times \frac{\tilde{P}(x, k)}{\tilde{P}(x, 0)}$$

for $n \geq 1$, yielding at zeroth order (*vide infra*) :

$$\frac{\tilde{I}(x, n)}{\tilde{I}(x, 0)} = \frac{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, n)}{\sum_j Q_j \tilde{F}_j(x, 0)}.$$

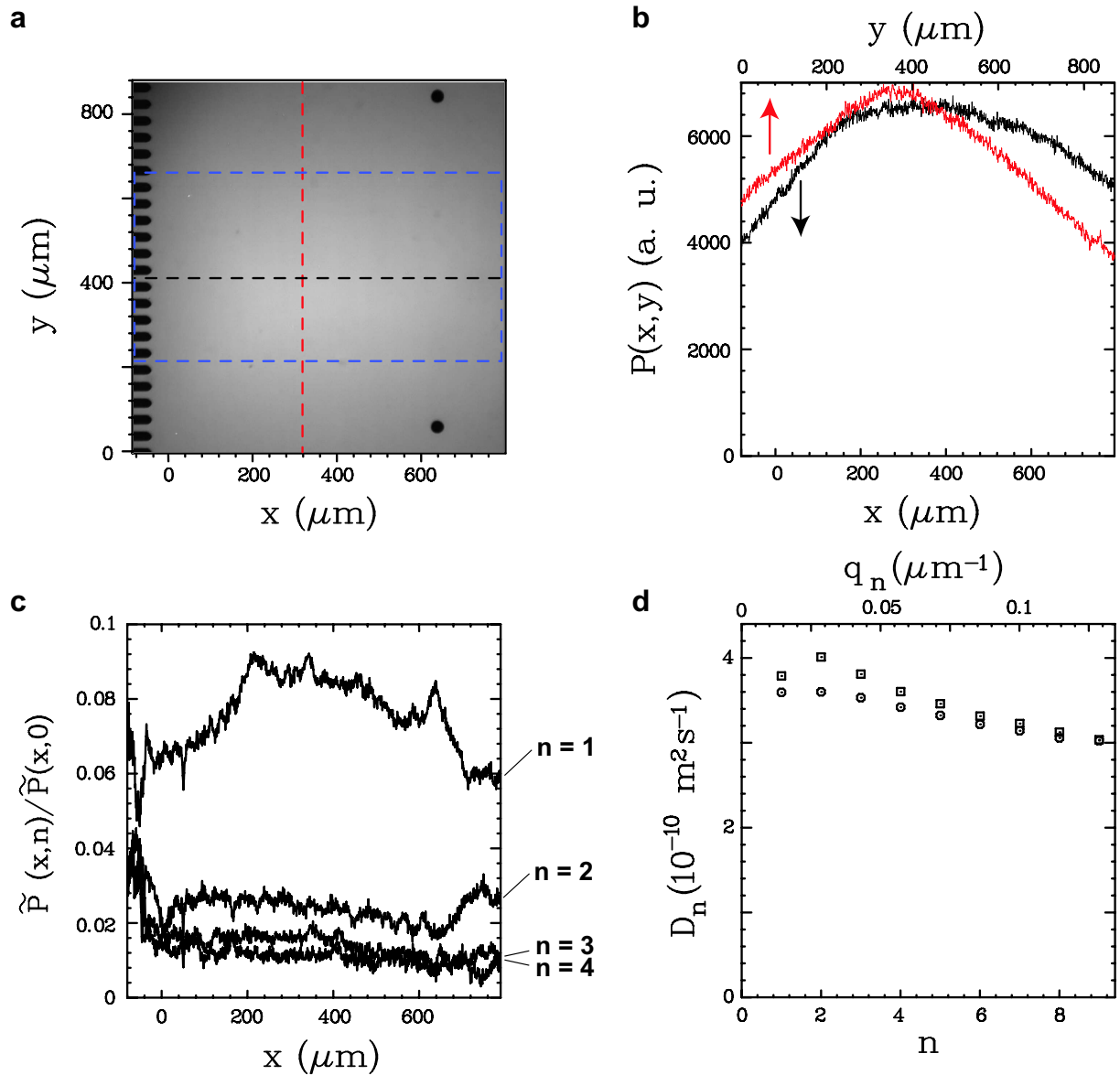


Figure S-5. Measurement of the illumination inhomogeneities and evaluation of the correction by zeroth Fourier mode normalization. (a) Epifluorescence image $P(x, y)$ from the analysis chamber homogeneously filled with $5 \mu\text{M}$ fluorescein in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA at 20°C . The blue dashed rectangle defines the area used for subsequent data treatment. (b) Intensity profiles along x (—) and y (—), respectively at the positions indicated by the dashed black and red lines in the preceding panel. (c) Spatial dependence along x of the $\tilde{P}(x, n)/\tilde{P}(x, 0)$ normalized Fourier modes resulting from the Fourier transform along y of the chamber image ($\ell_y = 512$ pixels). (d) Dependence of diffusion coefficients on Fourier index n (bottom scale) or of the spatial frequency q_n (upper scale). Data were extracted from monoexponential fit of Figure 3b of the Main Text, either with a zeroth ($\circ$) or first ($\square$; $\tilde{P}(x, 1)/\tilde{P}(x, 0) = 0.08$ from c) order correction (see eqs 11.22 and 11.23). See Text.

11.8 Supplementary Tables

Table S-2. Sequences (5'-3' orientation) of the rhodamine-green labelled single-stranded oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
rhg-13	rhg-TCCTTTGTTTGTG
rhg-27	rhg-TAGTATTATCTTACACAAACAAAGGAG
rhg-105	rhg-TAGTATTATCTTACACAAACAAAGGAGAATAAAATGAAAAC -GATTAATCTGAACGCTGCAGTTAAACTAAATGCTTCAATGGT -AAATATGATGAAACTATGTGG

Table S-3. Averaged diffusion coefficients $\langle D \rangle$ ($10^{-12} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$) for fluorescein, a 13 bases long rhodamine-green labelled oligonucleotide, and YOYO-1 stained dsDNA of different lengths (1 :15 dye :bp ratio) in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. Measurements were performed in zero-field time-based experiments and were analyzed by either Fast Fourier Transform or Gaussian fitting in the direct space. Errors correspond to standard deviation.

Analysis method	Fluorescein	rhg-13	151bp	438bp	1257bp
FFT	330 ± 10	106 ± 5	17 ± 2	8.6 ± 0.8	4.2 ± 0.3
Gaussian	330 ± 30	103 ± 5	19 ± 2	9.2 ± 0.4	4.4 ± 0.4

11.9 Supplementary Figures

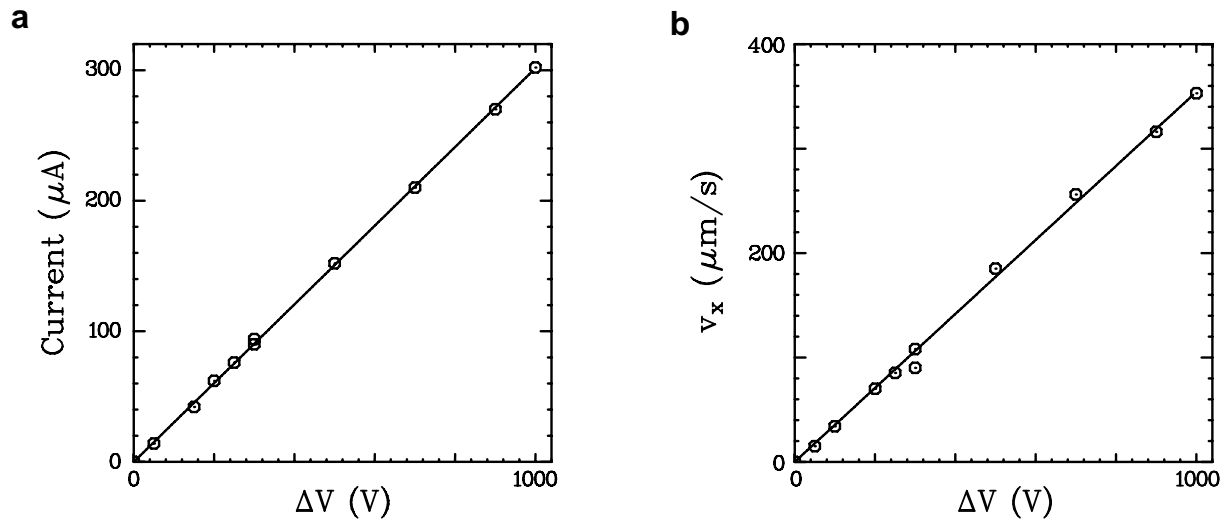


Figure S-6. Electric current (a) and migration velocity for fluorescein (b) as a function of the voltage drop applied between the two reservoirs located along the x axis. The microscope stage was thermostated at 20°C and the chip was filled with NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 1 % (w/w) agarose medium. The linearity observed in both figures underlines the absence of any departure from the preset temperature : Heat produced by Joule effect is efficiently dissipated even at the highest applied voltages.

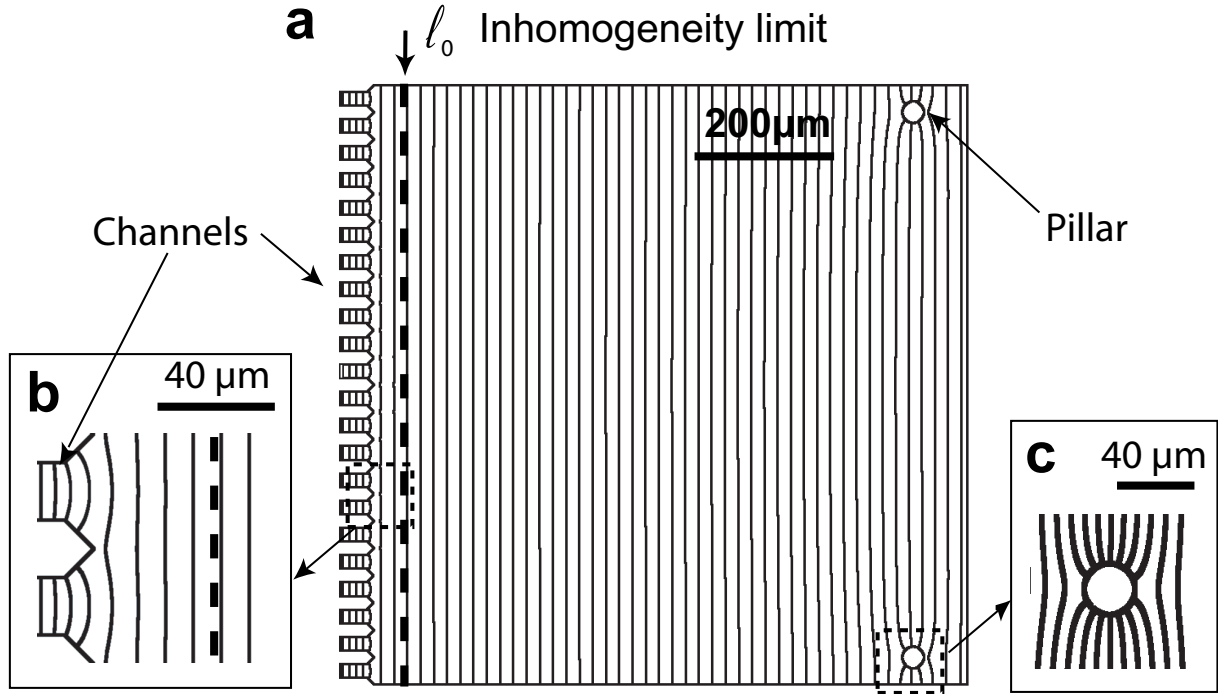


Figure S-7. Isopotentials of the electric field calculated by Finite Element Method simulations. (a) Area corresponding to the camera field of view. Each line accounts for a 2% variation. (b) and (c) Respective zooms at the boundary between the channels and the chamber and around a pillar. Each line corresponds to a 1% variation. After a distance $\ell_0 = 40 \mu\text{m}$ (dashed line), the electric field is essentially homogeneous and parallel to the x -axis.

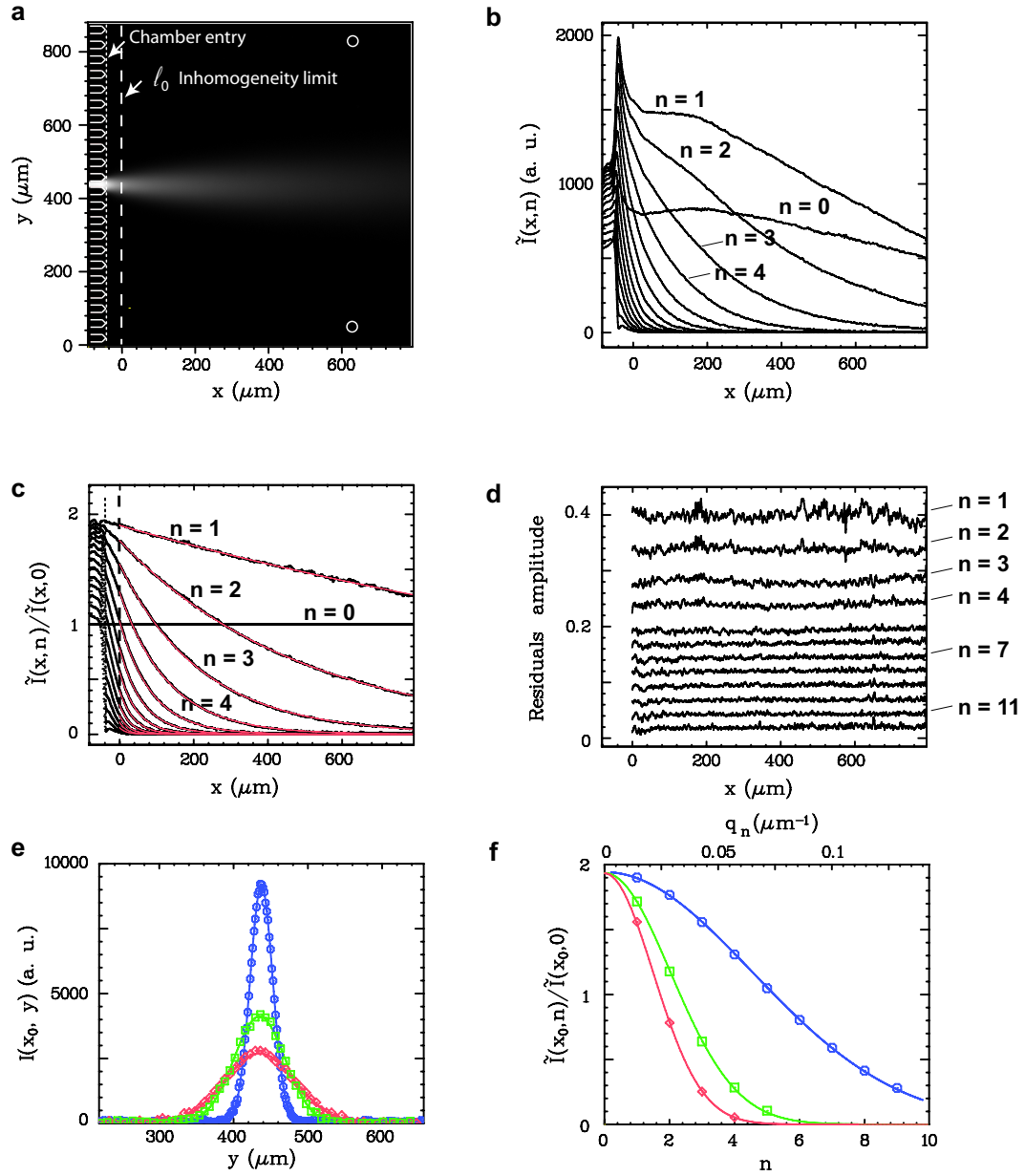


Figure S-8. Detailed data treatment for the diffusion coefficient measurement by 1D-Fourier transform analysis. (a) Stationary migration-diffusion pattern obtained for $5 \mu\text{M}$ fluorescein when an electric field of $8 \times 10^3 \text{ Vm}^{-1}$ ($v_x = 145 \mu\text{ms}^{-1}$) is applied left to right in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C . (b) Spatial dependence along x of the Fourier modes resulting from the Fourier transform of the preceding image along y . (c) Fourier mode normalization by the zeroth Fourier mode. The truncated $\tilde{I}(x, n)/\tilde{I}(x, 0)$ data are fitted by monoexponentials (—). (d) Corresponding residuals. To improve readability, a vertical offset was added. (e) Intensity profiles along y at $x_0 = 0$ ($\circ$), 200 ($\square$), and $400 \mu\text{m}$ ($\diamond$). All the three data sets are satisfactorily fitted by a Gaussian function. (f) Corresponding normalized Fourier amplitudes plotted as a function of the Fourier index n . Gaussian fits are again appropriate.

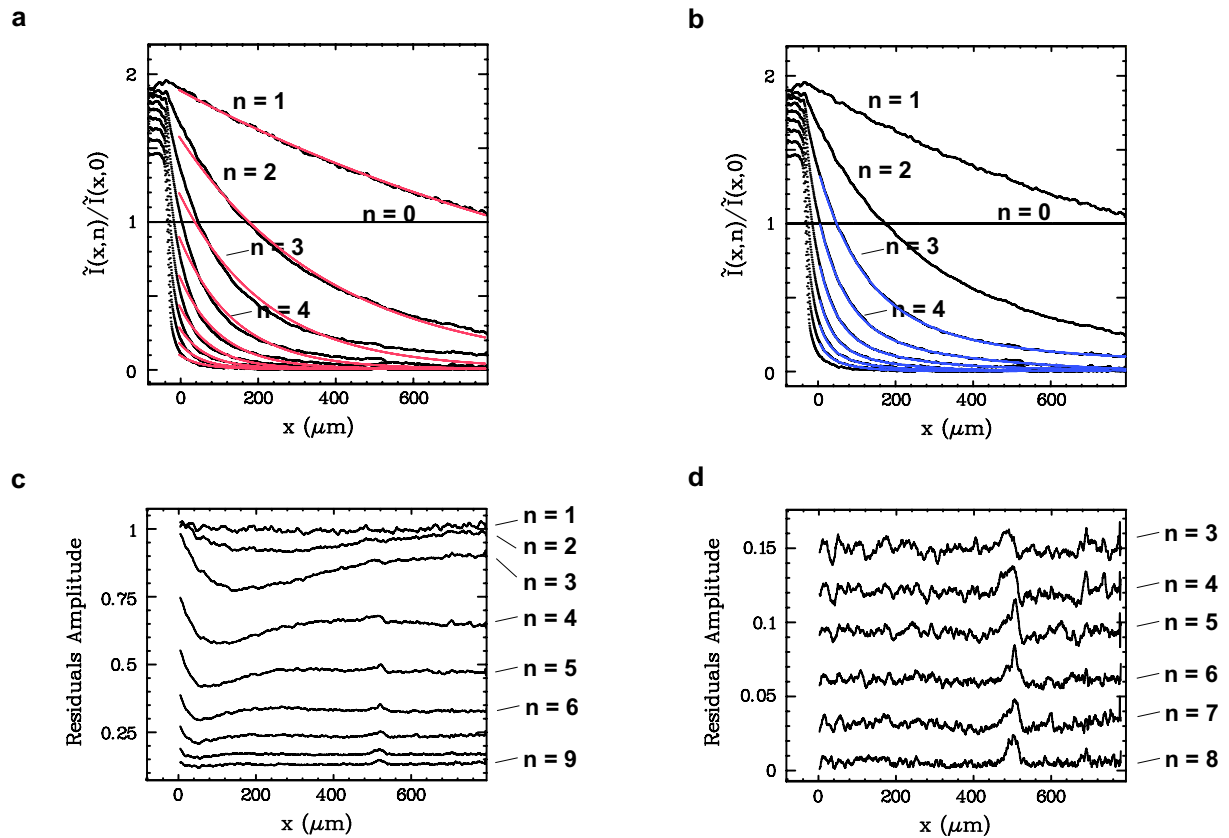


Figure S-9. Comparison of the mono and biexponential fitting procedures for analysis of a binary mixture. The stationary migration-diffusion pattern was obtained by applying an electric field $E_x = 266 \text{ Vm}^{-1}$ ($v_x = 4.8 \mu\text{ms}^{-1}$) left to right in NaOH/Hepes 25/50 mM pH 7.5, 0.1 % (w/w) PDMA buffer at 20°C. The binary mixture was composed of two dsDNA, 151 and 1257bp long stained with YOYO-1 (1 :15 dye :bp) and in relative abundance $\alpha(151\text{bp}/1257\text{bp}) = 2.2$. (a) Monoexponential and (b) biexponential fits of the spatial dependence in x of the normalized Fourier modes. (c) and (d) residuals corresponding to the mono and biexponential fits, respectively. To improve readability, a vertical offset was added.

Bibliographie

- [1] Powers, D. *Boundary Value Problems*, 4th ed. ; Academic Press : San Diego ; 1999.
- [2] [http ://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi/](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3.cgi/)
- [3] Valeur, B. *Molecular Fluorescence* ; Wiley-VCH : Weinheim ; 2002
- [4] Giddings J. C. *Unified Separation Science* ; Wiley : New York ; 1991.

Chapitre 12

Article 3 : Fourier transform for simple analysis of the reaction diffusion dynamics in a microsystem

L'Article 3 profite de l'analyse par transformée de Fourier développé dans l'Article 2 pour extraire des informations cinétiques d'un mélange réactif injecté à l'équilibre dans la chambre du microlaboratoire. La source de hors-équilibre qui révèle la cinétique provient de la différence entre les coefficients de diffusion du réactif et du produit. Dans l'Article 2 nous avons utilisé la transformée de Fourier pour montrer que les phénomènes étudiés présentaient un caractère diffusif à toutes les fréquences spatiales q et nous avons donc analysé chacune de ces fréquences indépendamment. Par contre, dans l'Article 3, ce comportement est acquis et nous analysons toutes les fréquences de Fourier comme un ensemble de données expérimentales indépendantes. Les constantes cinétiques d'une réaction $A + B \rightleftharpoons C$ (notée dans l'article $R + \mathcal{R} \rightleftharpoons P$) peuvent être alors extraites car leur contribution à la relaxation des modes de Fourier varie comme q^0 tandis que la contribution diffusive varie comme q^2 .

Fourier Transform for Simple Analysis of the Reaction Diffusion Dynamics in a Microsystem

André Estévez-Torres,[†] Thomas Le Saux,[†] Charlie Gosse,[‡] Annie Lemarchand,[§] Anne Bourdoncle,[†] Ludovic Jullien^{*,†}

¹ Département de Chimie, UMR CNRS ENS Université Paris6 8640, Ecole Normale Supérieure, 24, rue Lhomond, F-75005 Paris, France, ² Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France, and ³ Université Pierre et Marie Curie Paris6, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, UMR CNRS 7600, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.

RECEIVED DATE (automatically inserted by publisher); E-mail Address Ludovic.Jullien@ens.fr

To characterize associations between two (or more) components is of major significance in Chemistry and Biology.ⁱ As an example, we examine in the following pairing between two complementary oligonucleotides, **R** and **R**, yielding the corresponding double stranded DNA **P**. Thermodynamics (e.g. the association constant) is here fundamental for characterization but dynamic properties (rate constants, diffusion coefficients) can also be important: Beyond concentrations at equilibrium only, they convey a rich body of information. In particular, the latter information can be fruitfully used to apply highly selective analytical or separation strategies.ⁱⁱ

Different experiments are generally designed to individually derive thermodynamic or rate constants as well as diffusion coefficients. Indeed only a few “integrated” approaches such as Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS)ⁱⁱⁱ and Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)^{iv} may directly provide the whole collection of thermodynamic and dynamic parameters governing associations. Although elegant, powerful and non invasive, these approaches suffer from demanding requirements (concentration in interacting components, nature of fluorescent probes, range of accessible rate constants, effort to extract data,...).

Several microsystems have been recently introduced to enlarge the pool of integrated approaches for *in vitro* applications.^v As in FRAP but with less constraints, the information is extracted from observing the relaxation of out-of-equilibrium concentration profiles. The concentration profiles are here advantageously stationary in time. In particular, averaging over time can be performed to improve the signal to noise ratio and the behavior of diluted as well as poorly fluorescent samples can be investigated. Nevertheless, as in FRAP, data analysis with the current designs still remains a matter of experts requiring involved analytical or numerical calculations. In the present communication, we retain the basic principle of the preceding microsystems. In contrast, we modify the design and the protocol for data processing to make as simple as possible the derivation, from a single experiment, of a whole set of thermodynamic and kinetic parameters ruling associations in solution.

Figure 1 displays the present measurement microdevice. A uniform electric field relying on a current injection design^{vi} is used to continuously introduce by electrophoresis and/or electroosmosis an equilibrated mixture of **R**, **R** and **P** from a narrow channel into a wide chamber. There, the solutes diffuse and migrate at constant velocity over the entire analysis area.

which is imaged with a camera.. After a transient regime a stationary reaction-migration-diffusion pattern obtained.

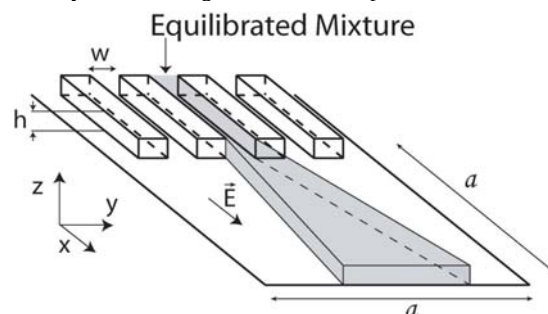


Figure 1. Principle of a microsystem to continuously investigate the dynamics of reactions coupled with diffusion. A voltage drop along the x-axis is applied to introduce an equilibrated solution of interacting components from a narrow ($w = 20 \mu\text{m}$) and thin ($h = 10 \mu\text{m}$) injection channel, into a wide ($a = 7.5 \text{ mm}$) square analysis chamber filled with the migration medium which is submitted to a uniform electric field E parallel to the x-axis. After a transient regime, a stationary reaction-diffusion-migration pattern is established.

With regards to current approaches, the analysis of the present stationary reaction-migration-diffusion pattern is considerably facilitated from a theoretical point of view. Indeed the velocity profiles of the mixture components are plug-like instead of being parabolic. We also take advantage of the steady-state of the experiment to adopt conditions in which chemical reactions do not complicate the kinetic analysis: If the reagent **R** is in excess over **R** and **P** and if **R** is present in the measurement chamber at the same concentration as in the injection solution, the bimolecular association can be reduced to a simple chemical exchange between **R** and **P**. Under the latter conditions, it is possible to analytically solve the equations governing the dynamics of the reaction-migration-diffusion process.

The resulting stationary solution is not a trivial function in the space of the recorded image. In contrast, it is a simple collection of biexponential functions in the Fourier space that is used to perform the calculations (see Supporting Information). Thus we first perform a spatial Fourier transform of the recorded image before analyzing the stationary reaction-migration-diffusion pattern.^{vii} Then, whatever the relative brightness of **R** and **P**, the whole collection of thermodynamic and dynamic parameters governing their association can be easily extracted from a global

[†] Ecole Normale Supérieure

[‡] LPN-CNRS

[§] Université Pierre et Marie Curie Paris6

robust biexponential fit, provided that the ratio of their diffusion coefficient to their velocity are different.

To evaluate the present approach, we examined the dynamics of pairing between a Texas-Red-labeled 9bp long oligonucleotide Tex-TGT9 (**R**) with a non labeled 100bp long oligonucleotide 1ACA100 (**R**) bearing a complementary sequence (see Supporting Information) to yield the corresponding Texas-Red-labeled dsDNA (**P**). We independently measured with steady-state fluorescence emission (i) the association constant K , by titration and (ii) the rate constants k and k' respectively associated to the formation and the dissociation of the dsDNA, with a conventional stopped flow device equipment. The experiments were performed at 293 K.

Figure 2a displays the stationary reaction-migration-diffusion pattern resulting from introduction of an equilibrated mixture of **R** and **R** into the measurement chamber homogeneously filled with an **R** solution in a pH 7.5 Hepes buffer containing 25 mM Na^+ and 1.25 Mg^{2+} and a small amount of neutral wall-adsorbing polymer (0.1 % (w/w) PDMA).^{viii} Figure 2b displays the Fourier transform along y of the image recorded in Figure 2a. Each curve reflects the evolution of the fluorescence profile along y as a function of x (or similarly t). This evolution is evaluated at different length scales along y , which eventually yields not only one but a bundle of curves: The Fourier modes of the fluorescence signal (see Supporting Information).

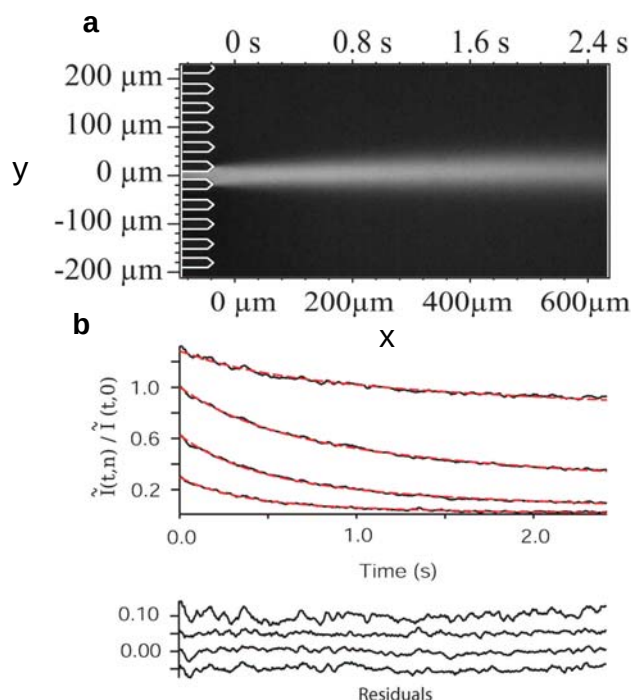


Figure 2. (a) Experimental realization of a microsystem to continuously investigate the dynamics of reactions coupled with diffusion. An equilibrated mixture of 1 μM Tex-TGT9 (**R**) – 10 μM 1ACA100 (**R**) is injected in the chamber filled with 10 μM 1ACA100. Space along x is converted into time using $x=vt$ where v designates the average velocity of the exchanging **R** and **P** states (here $250 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). (b) time dependency and global fit of the normalized Fourier modes 1-4 resulting from Fourier transform along y of the image displayed in (a). The length scales (in μm) associated to the Fourier modes were 34 μm (1), 17 μm (2), 12 μm (3), and 9 μm (4). Fit residuals were offset in the sake of clarity.

As anticipated, the signal profile associated to the fluorescent species **R** and **P** decrease and enlarge when the distance x (or similarly the time t) increases from the injection channel (Figure 2a). In Figure 2b, the amplitudes of the Fourier modes

correspondingly decreases as a function of time. The decay time directly reflects the duration for diffusing and it thus gets faster when length scales become smaller.

Introducing the values of the diffusion coefficient and velocity of **R** ($d_R = 153 \pm 10 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $v_R = 250 \pm 20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) and **P** ($d_P = 43 \pm 4 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $v_P = 250 \pm 20 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) measured in a preliminary experiment, the global fit of the Fourier modes yielded, $k_1 = 1.2 \pm 0.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_2 = 3.3 \pm 0.5 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($k_1/k_2 = 4 \pm 1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), and $Q = 0.7 \pm 0.2$ for the relative brightness of **P** with regards to **R** (average over two series of experiments performed at 1 μM for the initial concentration in **R** and 10 μM and 3 μM in **R** respectively). In particular, these results satisfactorily compared with the independent determinations that gave $k_1 = 1.9 \pm 0.1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_2 = 3.8 \pm 0.1 \cdot 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ($k_1/k_2 = 5.0 \pm 0.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), $K = 3.4 \pm 0.6 \cdot 10^5$, $Q = 0.75 \pm 0.02$.

Thus the present continuous integrated approach seems appropriate to simply derive the whole set of thermodynamic and kinetic parameters ruling associations in solution. Requiring only a tiny amount of sample (1 pmol of Tex-TGT9), it could be particularly relevant for pharmaceutical and biological applications. Regarding such a perspective, we accessed to a chemical relaxation time in the second range with the present experimental system. In fact, our approach should be appropriate to easily measure relaxation times down to the 1-10 ms range by optimizing the instrumental set up. One should reduce the width of the injection channel and enlarge the magnification of the microscope objective to observe diffusion at shorter spatial scales. Then it would be necessary to correspondingly decrease the width of the channels required to yield a uniform electric field in the current injection design.

ACKNOWLEDGMENT. We thank J.-L. Mergny, L. Lacroix, V. Croquette, J.-F. Allemand and H. Berthoumieux for insightful discussions. This work was supported by ACN 2003 "Cargos Moléculaires" and ACI-NMAC 2003 "Puces Cinétiques" grants from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (to L.J., C.G., and A.L.) and a Ministère de la Recherche fellowships (to A.E.T.).

Supporting Information Available: The theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentrations in **R** and **P**, the extraction of the dynamic parameters from the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal, the oligonucleotide sequences, the preparation of the solutions, the independent determinations of the thermodynamic constant K and of the rate constants k and k' . This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES. References are placed at the end of the manuscript. Authors are responsible for the accuracy and completeness of all references. Examples of the recommended formats for the various reference types can be found at http://pubs.acs.org/cgi-bin/submission_gen/readmeJACSCComMSW97.pl?Journal=jacsat. Detailed information on reference style can be found in *The ACS Style Guide*, 2nd ed., available from Oxford Press.

Authors are required to submit a graphic entry for the Table of Contents (TOC) that, in conjunction with the manuscript title, should give the reader a representative idea of one of the following: A key structure, reaction, equation, concept, or theorem, etc., that is discussed in the manuscript. The TOC graphic should be no wider than 4.72 in. (12 cm) and no taller than 1.81 in. (4.6 cm).

Insert Table of Contents artwork here

ABSTRACT FOR WEB PUBLICATION (Word Style "BD_Abstract"). Authors are required to submit a concise, self-contained, one-paragraph abstract for Web publication.

ⁱ Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*, Part II, Freeman, New York, 1980.

ⁱⁱ (a) Charier, S.; Meglio, A.; Alcor, D.; Cogné-Laage, E.; Allemand, J.-F.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15491-15505. (b) Alcor, D.; Croquette, V.; Jullien, L.; Lemarchand, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 8276-8280.

ⁱⁱⁱ (a) Elson, E. L.; Magde, D. *Biopolymers*, **1974**, *13*, 1-27; (b) Magde, D.; Elson, E. L.; Webb, W. W. *Biopolymers*, **1974**, *13*, 29-61.

^{iv} (a) Axelrod, D.; Koppel, D. E.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W. W. *Biophys. J.*, **1976**, *16*, 1055-1069; (b) Koppel, D. E.; Axelrod, D.; Schlessinger, J.; Elson, E.; Webb, W. W. *Biophys. J.*, **1976**, *16*, 1315-1329.

^v Kamholz, A. E.; Weigl, B. H.; Finlayson, B. A.; Yager, P. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5340-5347 ; Salmon, J. B.; Dubrocq, C.; Tabeling, P.; Charier, S.; Alcor, D.; Jullien, L.; Ferrage, F. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 3417-3424.

^{vi} Huang, L. R. ; Tegenfeldt, J. O. ; Kraeft, J. J. ; Sturm, J. C. ; Austin, R. H. ; Cox, E. C. Technical Digest of International Electron Devices Meeting, **2001**, 363-366.

^{vii} Berk, D. A. ; Yuan, F. ; Leunig, M. ; Jain, R. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 1785-1790.

^{viii} This additive smoothes electroosmosis and correspondingly reduce dispersion that could be detrimental to extract diffusion coefficients. In contrast, it does not interfere with the association process at the corresponding concentration.

Chapitre 13

Article 3 : *Supporting information*

A. Estévez-Torres,[†] T. Le Saux,[†] C. Gosse,[§] A. Lemarchand,[‡], A. Bourdoncle,[†] L. Jullien ^{†,*}

[†] *Ecole Normale Supérieure, Département de Chimie, UMR CNRS ENS Université Paris6 8640, 24, rue Lhomond, 75005 Paris, France. E-mail : Ludovic.Jullien@ens.fr.*

[§] *Laboratoire de Photonique et de Nanostructures, LPN-CNRS, Route de Nozay, 91460 Marcoussis, France.*

[‡] *Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Laboratoire de Physique Théorique de la Matière Condensée, UMR CNRS 7600, 4, place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.*

13.1 Supporting Information

- Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentrations $R(x, y)$ and $P(x, y)$ with respect to y ;
- Extraction of the dynamic parameters from the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal ;
- Oligonucleotide sequences ;
- Preparation of the solutions ;
- Independent extraction of the thermodynamic constant K and the rate constants k_1 and k_2 by fluorescence spectroscopy ;

13.2 Theoretical derivation of the expression of the Fourier transform of the concentrations $R(x, y)$ and $P(x, y)$ with respect to y

13.2.1 The model

We consider a reactive system with three species $\mathbf{R}$, $\mathcal{R}$ and $\mathbf{P}$ involved in the chemical reaction (13.1) :



k_1 and k_2 designate the rate constants associated to the forward and backward reactions respectively. We suppose that the reactant $\mathcal{R}$ is in great excess with respect to $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ ($\mathcal{R} \gg R$ and $\mathcal{R} \gg P$) and has a constant uniform concentration. We correspondingly introduce $\kappa_1 = k_1 \mathcal{R}$ as an effective rate constant for the forward reaction (13.1). Under such conditions, reaction (13.1) reduces to the simple two-state exchange process (13.2) between $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$:



To calculate the stationary migration-diffusion pattern of the concentrations in $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ described in the Main Text, we assume that their motion occurs in a two-dimensional (2D) medium defined by $(0 \leq x \leq L, -\infty < y < +\infty)$. This medium is submitted to a uniform constant electric field $\vec{E} = E\vec{u}_x$, where $\vec{u}_x$ is the unit vector along x . The diffusion coefficients of species $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ are respectively denoted d_R and d_P and their velocities (along x axis) v_R and v_P . $\vec{E}$ is chosen to impose the migration of the averaged species $\{\mathbf{R}, \mathbf{P}\}$ in the direction of increasing x . Considering a $\{\mathbf{R}, \mathbf{P}\}$ source located at the origin $(x = 0, y = 0)$ associated to equilibrium concentration profiles, $R(0, 0)$ and $P(0, 0)$, we look for stationary concentrations, $R(x, y)$ and $P(x, y)$, obeying the following partial differential equations :

$$-v_R \frac{\partial R(x, y)}{\partial x} + d_R \left[\frac{\partial^2 R(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 R(x, y)}{\partial y^2} \right] - \kappa_1 R(x, y) + k_2 P(x, y) = 0 \quad (13.3)$$

$$-v_P \frac{\partial P(x, y)}{\partial x} + d_P \left[\frac{\partial^2 P(x, y)}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 P(x, y)}{\partial y^2} \right] + \kappa_1 R(x, y) - k_2 P(x, y) = 0 \quad (13.4)$$

Eqs. (13.3, 13.4) are solved after Fourier transform along y leading to

$$\frac{\partial^2 \tilde{R}(x, q)}{\partial x^2} - \frac{v_R}{d_R} \frac{\partial \tilde{R}(x, q)}{\partial x} - \left(q^2 + \frac{\kappa_1}{d_R} \right) \tilde{R}(x, q) = -\frac{k_2}{d_R} \tilde{P}(x, q) \quad (13.5)$$

$$\frac{\partial^2 \tilde{P}(x, q)}{\partial x^2} - \frac{v_P}{d_P} \frac{\partial \tilde{P}(x, q)}{\partial x} - \left(q^2 + \frac{k_2}{d_P} \right) \tilde{P}(x, q) = -\frac{\kappa_1}{d_P} \tilde{R}(x, q) \quad (13.6)$$

where $\tilde{R}(x, q) = 1/\sqrt{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} R(x, y) e^{-iqy} dy$ and $\tilde{P}(x, q) = 1/\sqrt{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} P(x, y) e^{-iqy} dy$.

We restrict our analysis to a regime where diffusion along x is negligible with respect to migration :¹

$$\frac{\partial^2 \tilde{R}}{\partial x^2} \ll \frac{v_R}{d_R} \frac{\partial \tilde{R}}{\partial x} \quad (13.7)$$

$$\frac{\partial^2 \tilde{P}}{\partial x^2} \ll \frac{v_P}{d_P} \frac{\partial \tilde{P}}{\partial x} \quad (13.8)$$

Introducing the velocity along x axis of the averaged species $\{\mathbf{R}, \mathbf{P}\}$, $\overline{v_{\{R,P\}}} = \frac{1}{1+K}v_R + \frac{K}{1+K}v_P$ ($K = \frac{\kappa_1}{k_2}$ designate the apparent thermodynamic constant associated to the reaction (13.2)), Eqs.(13.5,13.6) become :

$$\frac{\partial \tilde{R}(t, q)}{\partial t} = -\frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_R} (d_R q^2 + \kappa_1) \tilde{R}(t, q) + \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_R} k_2 \tilde{P}(t, q) \quad (13.9)$$

$$\frac{\partial \tilde{P}(t, q)}{\partial t} = \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_P} \kappa_1 \tilde{R}(t, q) - \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_P} (d_P q^2 + k_2) \tilde{P}(t, q) \quad (13.10)$$

where $t = x/\overline{v_{\{R,P\}}}$ establishes the conversion between time t and space x . Eventually, we introduce into Eqs.(13.11,13.12) the variables $\mathfrak{k}_1 = \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_R} \kappa_1$, $\mathfrak{k}_2 = \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_P} k_2$, $\mathfrak{d}_R = \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_R} d_R$, and $\mathfrak{d}_P = \frac{\overline{v_{\{R,P\}}}}{v_P} d_P$ to simplify the expressions in Eqs.(13.9,13.10) :

$$\frac{\partial \tilde{R}(t, q)}{\partial t} = -(\mathfrak{d}_R q^2 + \mathfrak{k}_1) \tilde{R}(t, q) + \mathfrak{k}_2 \tilde{P}(t, q) \quad (13.11)$$

$$\frac{\partial \tilde{P}(t, q)}{\partial t} = \mathfrak{k}_1 \tilde{R}(t, q) - (\mathfrak{d}_P q^2 + \mathfrak{k}_2) \tilde{P}(t, q) \quad (13.12)$$

The latter linear system admits solutions in the form :

$$\tilde{R}(t, q) = R_+ e^{\lambda_+ t} + R_- e^{\lambda_- t} \quad (13.13)$$

$$\tilde{P}(t, q) = P_+ e^{\lambda_+ t} + P_- e^{\lambda_- t} \quad (13.14)$$

where the eigenvalues obey :

$$\lambda_{\pm} = -\frac{1}{2} [(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2) + (\mathfrak{d}_R + \mathfrak{d}_P) q^2] \pm \frac{1}{2} \sqrt{[(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2) + (\mathfrak{d}_R - \mathfrak{d}_P) q^2]^2 + 4(\mathfrak{d}_P - \mathfrak{d}_R) q^2 \mathfrak{k}_2} \quad (13.15)$$

and where the amplitude in Eqs.(13.13,13.14) are given by :

$$R_+ = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[-(\mathfrak{d}_R q^2 + \mathfrak{k}_1 + \lambda_-) \tilde{R}(0, q) + \mathfrak{k}_2 \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.16)$$

$$R_- = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{d}_R q^2 + \mathfrak{k}_1 + \lambda_+) \tilde{R}(0, q) - \mathfrak{k}_2 \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.17)$$

$$P_+ = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[\mathfrak{k}_1 \tilde{R}(0, q) - (\mathfrak{d}_P q^2 + \mathfrak{k}_2 + \lambda_-) \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.18)$$

¹The following relations correspond to the conditions : $\frac{L_x v_R}{d_R} \gg 1$ and $\frac{L_x v_P}{d_P} \gg 1$ where L_x designate the image length along the x-axis.

$$P_- = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[-\mathfrak{k}_1 \tilde{R}(0, q) + (\mathfrak{d}_P q^2 + \mathfrak{k}_2 + \lambda_+) \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.19)$$

where $\tilde{R}(0, q)$ and $\tilde{P}(0, q)$ are the Fourier transforms of the initial conditions $R(0, y)$ and $P(0, y)$. Upon considering that the Fourier transforms $\tilde{R}(0, q)$ and $\tilde{P}(0, q)$ are associated to initial conditions $R(0, y)$ and $P(0, y)$ at equilibrium with regards to reaction (13.2), Eqs.(B.48–B.48) transform into Eqs.(13.20–13.23) :

$$R_+ = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[-(\mathfrak{d}_R q^2 + \lambda_-) \tilde{R}(0, q) \right] \quad (13.20)$$

$$R_- = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{d}_R q^2 + \lambda_+) \tilde{R}(0, q) \right] \quad (13.21)$$

$$P_+ = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[-(\mathfrak{d}_P q^2 + \lambda_-) \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.22)$$

$$P_- = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{d}_P q^2 + \lambda_+) \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.23)$$

13.2.2 Analysis of the theoretical predictions

The expression of the eigenvalues given in Eqs.(13.15) can be much simplified according to the relative values of the apparent relaxation rate of the reaction (13.2), $(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2)$, and of the apparent rate $(\mathfrak{d}_R - \mathfrak{d}_P)q^2$ governing the difference of behavior of $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ with regards to diffusion at the q spatial scale :

- If $(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2) \ll (\mathfrak{d}_R - \mathfrak{d}_P)q^2$ (“chemistry is much slower than diffusion”), the mixture seems non reactive; its components $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ diffuse independently with apparent diffusion coefficients $\mathfrak{d}_R$ and $\mathfrak{d}_P$ respectively : $\tilde{R}(t, q) \simeq \tilde{R}(0, q) \exp(-\mathfrak{d}_R q^2 t)$ and $\tilde{P}(t, q) \simeq \tilde{P}(0, q) \exp(-\mathfrak{d}_P q^2 t)$ at zeroth order ;
- If $(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2) \gg (\mathfrak{d}_R - \mathfrak{d}_P)q^2$ (“chemistry is much faster than diffusion”), the reactive mixture behaves as a single component with an apparent diffusion coefficient $\frac{1}{2}(\mathfrak{d}_R + \mathfrak{d}_P)$: $\tilde{R}(t, q) \simeq \tilde{R}(0, q) \exp[-\frac{1}{2}(\mathfrak{d}_R + \mathfrak{d}_P)q^2 t]$ and $\tilde{P}(t, q) \simeq \tilde{P}(0, q) \exp[-\frac{1}{2}(\mathfrak{d}_R + \mathfrak{d}_P)q^2 t]$ at zeroth order with $\tilde{R}(0, q) = \frac{\mathfrak{k}_2}{\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2} [\tilde{R}(0, q) + \tilde{P}(0, q)]$ and $\tilde{P}(0, q) = \frac{\mathfrak{k}_1}{\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2} [\tilde{R}(0, q) + \tilde{P}(0, q)]$ designating the average concentrations in $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ respectively.

Both preceding situations can be used to derive the thermodynamic information of the reaction (13.2) that is contained either in the relative amplitudes of the biexponential decay (slow exchange regime) or in the average apparent diffusion coefficient (fast exchange regime). In contrast, none of the preceding simplifying situations is appropriate to reach the kinetic information contained in the $\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2$ term.²

To extract the kinetic information from observing the diffusion process, one may notice that both eigenvalues, λ_+ and λ_- , do not contain the $\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2$ term at leading order in the slow exchange regime ($\lambda_+ \approx -\mathfrak{d}_P q^2$ and $\lambda_- \approx -\mathfrak{d}_R q^2$). In contrast, λ_- does contain the kinetic information at leading order in the fast exchange regime ($\lambda_+ \approx -\frac{1}{2}(\mathfrak{d}_P + \mathfrak{d}_R)q^2$ and $\lambda_- \approx -(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2)$) but the associated amplitudes R_- and P_- scale as zero. In fact, the preceding asymptotic regimes suggest the regime $(\mathfrak{k}_1 + \mathfrak{k}_2) \approx (\mathfrak{d}_R - \mathfrak{d}_P)q^2$ to be appropriate to evidence kinetics by observing the temporal evolution of the diffusion profile. Under

²In the slow exchange regime, $\frac{\tilde{R}(0, q)}{\tilde{P}(0, q)}$ gives only access to the ratio $\frac{\mathfrak{k}_1}{\mathfrak{k}_2}$.

such conditions, both eigenvalues λ_+ and λ_- equally depend on chemistry and diffusion, and the corresponding amplitudes, R_+ and R_- on one hand and P_+ and P_- on the other hand, exhibit similar values because λ_+ and λ_- are at the closest in this regime (see Eqs.(13.20–13.23)).

13.3 Extraction of the dynamic parameters from the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal

13.3.1 Theoretical expression of the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal

Introducing $\mathcal{Q}_R$ and $\mathcal{Q}_P$ as the brightness of $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ respectively, the theoretical q-dependence of the stationary reaction-migration-diffusion pattern of the fluorescence signal recorded by the camera in the Fourier space $\tilde{\mathcal{F}}(t, q)$ can be derived from Eqs.(13.13–13.14) and Eqs.(13.20–13.23) :

$$\tilde{\mathcal{F}}(t, q) = \mathcal{F}_+ e^{\lambda_+ t} + \mathcal{F}_- e^{\lambda_- t} \quad (13.24)$$

with

$$\mathcal{F}_+ = -\frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{D}_R q^2 + \lambda_-) \mathcal{Q}_R \tilde{R}(0, q) + (\mathfrak{D}_P q^2 + \lambda_-) \mathcal{Q}_P \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.25)$$

$$\mathcal{F}_- = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{D}_R q^2 + \lambda_+) \mathcal{Q}_R \tilde{R}(0, q) + (\mathfrak{D}_P q^2 + \lambda_+) \mathcal{Q}_P \tilde{P}(0, q) \right] \quad (13.26)$$

where the expression of λ_+ and λ_- are given by Eqs.(13.15).

In practice, the $\tilde{\mathcal{F}}(t, q)$ pattern is normalized by the zeroth mode $\tilde{\mathcal{F}}(t, 0)$ which is equal to $\mathcal{Q}_R \tilde{R}(0, 0) + \mathcal{Q}_P \tilde{P}(0, 0)$ to correct from any illumination inhomogeneity or photobleaching :

$$\frac{\tilde{\mathcal{F}}(t, q)}{\tilde{\mathcal{F}}(t, 0)} = \mathcal{F}_{+,norm} e^{\lambda_+ t} + \mathcal{F}_{-,norm} e^{\lambda_- t} \quad (13.27)$$

with

$$\mathcal{F}_{+,norm} = -\frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{D}_R q^2 + \lambda_-) \mathcal{I}_R + (\mathfrak{D}_P q^2 + \lambda_-) \mathcal{I}_P \right] \mathcal{G}(0, q) \quad (13.28)$$

$$\mathcal{F}_{-,norm} = \frac{1}{(\lambda_+ - \lambda_-)} \left[(\mathfrak{D}_R q^2 + \lambda_+) \mathcal{I}_R + (\mathfrak{D}_P q^2 + \lambda_+) \mathcal{I}_P \right] \mathcal{G}(0, q) \quad (13.29)$$

where we introduced the respective fractionary fluorescence intensity of $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$:

$$\mathcal{I}_R = \frac{\mathcal{Q}_R R(0, 0)}{\mathcal{Q}_R R(0, 0) + \mathcal{Q}_P P(0, 0)} = \frac{1}{1 + QK} \quad (13.30)$$

$$\mathcal{I}_P = \frac{\mathcal{Q}_P P(0, 0)}{\mathcal{Q}_R R(0, 0) + \mathcal{Q}_P P(0, 0)} = \frac{QK}{1 + QK} \quad (13.31)$$

with $Q = \frac{Q_P}{Q_R}$, the relative brightness of **P** with regard to **R**, and the q -dependent function $\mathcal{G}(0, q) = \frac{\tilde{R}(0, q)}{\tilde{R}(0, 0)} = \frac{\tilde{P}(0, q)}{\tilde{P}(0, 0)}$ reflecting the geometry of the channel at the entry of the measurement chamber and which does not depend on the solute nature.³

13.3.2 Extraction of the dynamic parameters

Seven parameters characterize the association dynamics between **R**, **R** and **P** : d_R , d_P , v_R , v_P , $\kappa_1 = k_1\mathcal{R}$, k_2 ,⁴ and Q . The biexponential fit of the experimental data provides four independent observables : λ_+ , λ_- , $\mathcal{F}_{+,norm}$, and $\mathcal{F}_{-,norm}$ which are functions of the preceding seven parameters. Thus, it is necessary to preliminarily determine three of them or, similarly, two of them and an additional observable, to retrieve the remaining dynamic information from fitting the experimental data.

In the present microsystem, d_R and v_R are easily accessible parameters to proceed for fitting. Indeed, they can be easily measured during a preliminary experiment performed with **R** only. In addition, $\overline{v_{\{R,P\}}}$ which depends on v_R , v_P , and K ($\overline{v_{\{R,P\}}} = \frac{1}{1+K}v_R + \frac{K}{1+K}v_P$) can be also measured during the introduction step of the equilibrated mixture in **R**, **R** and **P** by recording the injection of the fluorescent front of the mixture into the analysis chamber.

Then, the global fit of the experimental data provides d_P , v_P , $\kappa_1 = k_1\mathcal{R}$, k_2 , and Q .

13.4 Oligonucleotide sequences

Table S-1. Sequences (5'-3' orientation) of the oligonucleotides used in this study. Complementary sequence of 1ACA100 to TGT9 is shown in bold and the position of the mismatch underlined.

Name	Sequence
Tex-TGT9	Texas-red-CTTTGTTTG
1ACA100	TAGTATTATCTTACAT <u>TAAACAAAG</u> GAGAATAAAATGAAAAC -GATTAATCTGAACGCTGCAGTTAAACTAAATGCTTCAATGGT -AAATATGATGAAACTA
TGT13	TCCTTTGTTTGTG

³In the present microsystem, the initial condition is not taken at the entry of the measurement chamber but at the abscissa where the electric field is constant. Thus $\mathcal{G}(0, q)$ reflects not only the shape of the channel, but also the broadening by molecular diffusion and migration due to out-of-axis electric fields between the injection nozzle and the zone of homogeneous velocity for the species *R* and *P* respectively. We demonstrated in a previous report that the width of the corresponding initial condition was gaussian with a typical 60 μm half-width that did not depend on the solute for the investigated samples of oligonucleotides and dsDNA.

⁴ K can be calculated from k_1 and k_2 .

13.5 Preparation of the solutions

Fluorescein, Hepes, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ and 1 M NaOH solution were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Low molecular weight DNA from salmon sperm was purchased from Fluka. Single-stranded oligonucleotides Tex-TGT9 (texas-red-labelled in 5' position) and 1ACA100, respectively 9, and 100 bases long, were synthesized, and HPLC-purified by IBA (Göttingen, Germany; sequences given in Table S-1). Poly(dimethylacrylamide) (PDMA) of average molecular weight 3 MDa was a kind gift of J. Weber (Institut Curie, Paris, France).

Solutions were prepared using water purified through a Direct-Q 5 (Millipore, Billerica, MA). A 1 mg/mL stock solution of salmon sperm DNA was sonicated for 15' and stored at 4 °C. Stock solutions of oligonucleotides (100 μM) were dissolved in 25/50 mM NaOH/Hepes pH 7.5 low conductivity buffer and quantified with a UV absorption spectrometer (Uvikon) at 260 nm and 20 °C using the extinction coefficients given by the manufacturer.

13.6 Independent extraction of the thermodynamic constant K and the rate constants k_1 and k_2 by fluorescence spectroscopy

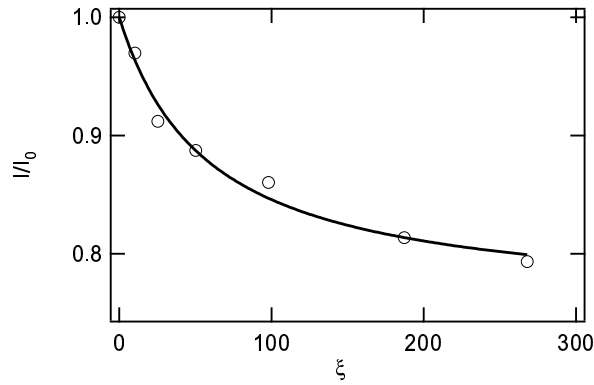
Fluorescence measurements were performed on a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorimeter using a quartz cuvette with a 1 cm optical path in 25/50 mM NaOH/Hepes, 1.25/5 mM $\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Hepes pH 7.5, buffer supplemented with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sonicated DNA salmon sperm to prevent oligonucleotide adsorption and 0.1% (w/w) PDMA at 20° C. Excitation and emission wavelengths were set at 587 and 612 nm, respectively, with a bandwidth of 4 nm. The cuvette was sonicated 15 minutes in a 1% (v/v) solution of Hellmanex soap (Hellma, Germany) after every experiment.

13.6.1 Thermodynamic measurements

400 μL of 50 nM Tex-TGT9 were equilibrated at 20° C. The decrease in fluorescence intensity was recorded while increasing concentrations of 1ACA100 were added at constant Tex-TGT9 concentration. Data were then analyzed on the basis of reaction (13.1), for which the following formula can be easily obtained

$$\frac{I}{I_0} = 1 - \frac{1}{2}(1 - Q) \left\{ \left(1 + \xi + \frac{1}{KR_0} \right) - \sqrt{\left(1 + \xi + \frac{1}{KR_0} \right)^2 - 4\xi} \right\} \quad (13.32)$$

where I is the fluorescence intensity at equilibrium when $\xi = \frac{\mathcal{R}}{R_0}$ equivalents of species $\mathcal{R}$ (here 1ACA100) have been added to the solution. I_0 is the intensity at the beginning of the experiment, R_0 is the initial concentration of Tex-TGT9 and $Q = Q_R/Q_P$ the brightness ratio between $\mathbf{P}$ and $\mathbf{R}$. R_0 being known, we extract K and Q by a least-squared fit. Results are displayed in Figure S-1.



S-1 Normalized fluorescence intensity at equilibrium *vs.* the number of equivalents of 1ACA100 added to a 50 nM Tex-TGT9 solution. Solid line correspond to fit according to eq 13.32. We extracted $K = 3.4 \pm 0.6 \times 10^5$ and $Q = 0.75 \pm 0.02$.

13.6.2 Kinetic measurements

We used an Applied Photophysics RX2000 rapid kinetic stopped flow accessory. Two 200 μL solutions, A and B, were mixed with typical dead times of 100 ms and the fluorescence intensity was recorded over time at 10 or 100 Hz. In association experiments, solution A contained Tex-TGT9 and solution B 1ACA100 (final concentrations 50 nM and 10 μM , respectively). In dissociation experiments, solution A contained an equilibrated mixture of Tex-TGT9+1ACA100 (final concentrations 50 nM and 10 μM , respectively) and solution B an unlabelled oligonucleotide (TGT13) having a strong affinity for the complementary (final concentration 50 μM).

Analysis of association experiments

The association reaction (13.1) reduces to (13.2) when the concentration of $\mathcal{R}$ is in excess related to $\mathbf{R}$. The conservation equation of reaction (13.2) in a homogeneous solution writes then as

$$\frac{dR(t)}{dt} = -\kappa_1 R(t) + k_2 P(t). \quad (13.33)$$

Considering the initial condition $R(0)$ and conservation of matter $R(t) + P(t) = R(0)$, Eq. (13.33) has the solution

$$R(t) = R(\infty) + [R(0) - R(\infty)]e^{-t/\tau} \quad (13.34)$$

where R_∞ is the concentration of $\mathbf{R}$ at $t = \infty$ and $\tau = (\kappa_1 + k_2)^{-1}$. Writing the normalized fluorescence intensity as $I(t)/I(0) = R(t) + QP(t)$ finally yields :

$$\frac{I(t)}{I(0)} = a + (1 - a)e^{-t/\tau} \quad (13.35)$$

where τ and a (related to Q and R_∞) are the fitting parameters. Results are displayed in Figure S2a.

Analysis of dissociation experiments

To determine k_2 we performed displacement experiments in which the unlabeled oligonucleotide 13TGT ($\mathbf{R}_{NF}$) hybridized with 1ACA100 ($\mathcal{R}$) and replaced Tex-TGT9 ($\mathbf{R}$) in the fluorescent duplex $\mathbf{P}$ to form a non-fluorescent duplex ($\mathbf{P}_{NF}$). The corresponding kinetic scheme can be written :



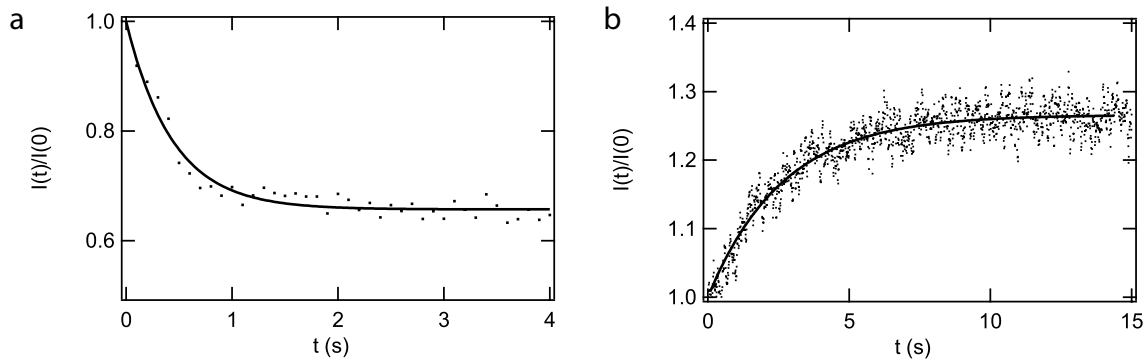
When the concentrations are chosen to make the dissociation of the fluorescent duplex $\mathbf{P}$ rate-limiting with regards to the subsequent formation of non-fluorescent duplex $\mathbf{P}_{NF}$, the time dependence of the $\mathbf{R}$ concentration is given by :

$$R(t) = R(\infty) + [R(0) - R(\infty)]e^{-k_2 t} \quad (13.38)$$

where $R(0)$ and $R(\infty)$ are the initial and final equilibrium concentrations of species $\mathbf{R}$. Again, writing the fluorescence intensity proportional to the concentration of species $\mathbf{R}$ and $\mathbf{P}$ yields :

$$\frac{I(t)}{I(0)} = a + (1 - a)e^{-k_2 t} \quad (13.39)$$

where b and k_2 are the fitting parameters. Results are displayed in Figure S-2b.



S-2 Normalized fluorescence intensity for the association (a) and dissociation (b) of 50 nM Tex-TGT9 + 10 μM 1ACA100. Solid lines correspond to monoexponential fits according to eq 13.35 and 13.39 respectively. We extracted (a) $\tau = 2.3 \pm 0.1 \text{ s}^{-1}$ and (b) $k_2 = 0.38 \pm 0.01 \text{ s}^{-1}$.

Conclusion et perspectives

L'objectif initial de cette thèse était de séparer deux espèces chimiques en utilisant l'électrodifusion, une technique reposant sur la cinétique chimique. Pour ce faire nous avons abordé trois volets : moléculaire, instrumental et théorique.

Dans le premier volet, nous avons étudié en détail la réaction d'hybridation entre deux oligonucléotides. Nous avons d'abord proposé une approche pour prévoir les constantes cinétiques de cette réaction avec un effort expérimental minimum et nous avons construit une banque d'oligonucléotides avec des constantes cinétiques variées. Ces travaux nous ont permis de concevoir, en collaboration avec le Museum national d'histoire naturelle, une nouvelle sonde oligonucléotidique fluorescente à motif quadruplexe (G4-MB) permettant une discrimination cinétique lorsqu'elle s'hybride à une séquence complémentaire parfaite ou mésappariée. Nous avons également étudié le mécanisme de cette dernière réaction et prouvé que l'oligonucléotide complémentaire s'hybride sur la boucle du G4-MB structuré avant de s'ouvrir pour former l'espèce double brin. Enfin, nous avons proposé une méthode originale pour réduire la mobilité électrophorétique de l'ADN lors de la réaction d'hybridation.

Cette thèse a eu une composante instrumentale importante. D'un côté, nous avons construit un microscope d'épifluorescence avec une platine thermostatée. De l'autre, nous avons conçu et fabriqué un microlaboratoire originel qui permet l'application de champs électriques homogènes en deux dimensions pour créer des profils de concentration stationnaires ou non-stationnaires. Dans ce dispositif, nous avons abordé l'étude quantitative du couplage entre transport et cinétique chimique dans un ordre de difficulté croissante. Nous avons d'abord déterminé des coefficients de diffusion en régime stationnaire pour des analytes entre 10^2 et 10^6 Da de masse moléculaire. Ensuite, nous avons quantifié les concentrations relatives des constituants d'un mélange binaire quand leur coefficient de diffusion diffère d'un facteur quatre. Enfin, une mesure stationnaire de constantes cinétiques fondée sur la diffusion à partir d'un mélange à l'équilibre a été réalisée. Si la séparation par électrodifusion n'a pas pu être démontrée expérimentalement, tous les outils pour le faire ont été mis aux point.

Finalement, les phénomènes couplant transport et réaction chimique ont été abordés sous un cadre théorique commun, celui des équations de réaction de diffusion. Nous avons profité de la simplicité du profil de vitesse électrophorétique à l'intérieur du microlaboratoire pour obtenir des solutions analytiques de ces équations dans l'espace de Fourier. Cette analyse, à caractère multi-échelle, découple transport et réaction chimique et permet d'extraire les coefficients de diffusion et les constantes cinétiques d'un mélange réactif.

Le microlaboratoire réalisé au cours de ce travail constitue une plateforme idéale pour étudier des phénomènes de réaction-diffusion couplés à une excitation périodique pour mettre au point des méthodes de séparation fondées sur la cinétique chimique. Outre

l'électrodifusion en champ électrique alternatif, il est envisagé de rajouter une excitation thermique périodique pour générer un mouvement orienté.

Annexe A

Protocoles de mesure de constantes cinétiques d'hybridation par spectroscopie de fluorescence

A.1 Chemicals

Labelled (Rhodamine Green and Texas Red) and unlabelled oligonucleotides were synthesised and HPLC purified by IBA (Göttingen, Germany). DNA salmon sperm was purchased from Fluka (St Louis, Mo, USA) and subsequently sonicated. NaOH 1 M solution, solid Hepes and $\text{Mg}(\text{OH})_2$ were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, Mo, USA). Triton-X100 was purchased from Boheringer (Mannheim GmbH, Germany). Solutions were prepared using water purified through a Direct-Q5 (Millipore, Molsheim, France). Buffer solutions NaHepes (NaOH/Hepes 25/50 mM, pH 7.5) and MgHepes ($\text{Mg}(\text{OH})_2$ /Hepes 50/200 mM pH 7.5) were prepared as stock solutions. To prepare MgHepes, $\text{Mg}(\text{OH})_2$, Hepes and water were mixed in correct amounts and laid overnight before obtaining a clear solution in order to overcome solubility problems found with the preparation. Triton-X100 solutions were prepared by dilution of a stock solution 10% (w/w). Stock solutions of oligonucleotides were prepared in water. Typical concentrations were 1 mM and 100 μM for non-labelled and labelled oligonucleotides.

A.2 Analysis of thermodynamic data with HyTher server

Thermodynamic calculations to get the standard reaction enthalpy, $\Delta_r H^\circ$, and entropy $\Delta_r S^\circ$ for the hybridization reactions were performed using the module called "Calculation of the hybridization thermodynamics for a given duplex" in the "Prediction of Nucleic Acid Hybridization Thermodynamics Server" (<http://ozone3.chem.wayne.edu>). This module predicts thermodynamic parameters for DNA/DNA, DNA/RNA and RNA/RNA interactions. DNA/DNA option was chosen as hybridization type. 0.025 M of the monovalent cation was set as hybridization condition. The server provides $\Delta_r H^\circ$ and $\Delta_r S^\circ$ values from nearest-neighbor calculation. Both parameters are supposed to be independent of the temperature. Subsequently, the standard reaction free enthalpy, $\Delta_r G^\circ$,

and the equilibrium constant, K , were calculated at a different temperatures using

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T \Delta_r S^\circ \quad (\text{A.1})$$

and

$$K = e^{-\Delta_r G^\circ / RT}. \quad (\text{A.2})$$

A.3 Absorbance measurements

Absorbance measurements were performed on a UV spectrophotometer (Uvikon) using 1 cm pathlength quartz cuvettes (Hellma, Germany). Concentrations of labelled and unlabelled oligonucleotides stock solutions were calculated from its absorbance at 260 nm in water at 20 °C using the extinction coefficients given by the manufacturer.

A.4 Fluorescence Measurements

Fluorescence measurements were performed on a Photon Technology International LPS 220 spectrofluorimeter using a quartz cuvette with a 1 cm optical path. All fluorescence measurements were performed in the given working buffer supplemented with 10 µg/mL sonicated DNA salmon sperm to prevent oligonucleotide adsorption. For the slowest kinetics (50s), the measurement were manually performed, whereas the fastest ones were performed using an Applied Photophysics RX2000 rapid kinetic stopped flow accessory. In the manual experiences, association rates were measured by equilibrating 50 nM of the fluorescence labelled oligonucleotide in 400 µL of buffer at a given temperature and then suddenly adding a solution containing the complementary oligonucleotide (typically 2-10 µL of concentrated solutions were added). Once association equilibrium was reached, dissociation rates were measured by adding a non-labelled oligonucleotide solution (usually TGT13) having a strong affinity for the complementary strand to displace the equilibrium towards the free labelled oligonucleotide. After every experiment, the cuvette was sonicated 15 minutes in a 1% (v/v) solution of Hellmanex soap (Hellma, Germany). In the stopped flow experiments, association rates were measured by mixing two 200 µL solutions : one containing the labelled oligonucleotide and the other containing its complementary. Dissociation rates were also measured by mixing two solutions : one containing the double strand equilibrated and the other containing an unlabelled oligonucleotide (TGT13) having a strong affinity for the complementary. In the stopped flow protocol, the final concentration of the oligonucleotides in the cuvette is the same as in the experiments performed manually. Rhodamine-green labelled oligonucleotides were excited at 507 nm and their emission were measured at 532 nm. Texas-red wavelengths for excitation and emission were 587 and 612 nm. Bandwidths of 4 nm were used in all experiments.

A.5 Analysis of Kinetic data

k_1 and k_2 values were determined from association and dissociation fluorescence experiments respectively. They were extracted by exponential fit of the time dependent fluo-

rescence intensity $I(t)$. In the association experiments, the fluorescence intensity before addition of the complementary oligonucleotide, I_0 , was first recorded. Then, x equivalents of the complementary oligonucleotide were added at $t = 0$. The temporal dependence of the normalized fluorescence intensity, $I(t)/I_0$, was fitted by,

$$\frac{I(t)}{I_0} = m_1 + m_2 e^{-m_3 t}, \quad (\text{A.3})$$

where, comparing (A.3) and (2.27), we can calculate the ratio Q_C/Q_A , et $m_3 = (k_1 B + k_2)^{-1}$. In dissociation experiments, an oligonucleotide having more affinity for the complementary strand was added to the reactive medium at $t = 0$ and the temporal dependence of the normalized fluorescence intensity, $I(t)/I_0$, was fitted by,

$$\frac{I(t)}{I_0} = m_1 + m_2 (1 - e^{-m_3 t}), \quad (\text{A.4})$$

where m_i are the fitting parameters and $m_3 = k_2$.

Annexe B

Rappels sur le transport et le couplage avec la réaction chimique

Cet annexe, résout les équations de type réaction-transport correspondantes aux différents types d'expériences qui peuvent être réalisés dans le microlaboratoire (*cf.* Section 8.8, p. 155). On applique systématiquement la transformée de Fourier pour obtenir des solutions analytiques. On s'intéresse à la détermination de coefficients de diffusion et des constantes cinétiques en analysant les comportements des solutions dans l'espace de Fourier.

B.1 Introduction

D'un point de vue macroscopique, une molécule en solution, ou plus précisément un ensemble de molécules (de l'ordre du nombre d'Avogadro) de structure identique, est soumis à des phénomènes de transport qui la contraignent à se déplacer et à des réactions chimiques qui produisent un changement de structure. Ces réactions peuvent conduire éventuellement à des changements dans les propriétés de transport ou dans la réactivité de l'espèce chimique. Avec ces deux ingrédients que sont le transport et la chimie, ainsi qu'au travers de leur couplage, l'évolution a permis d'atteindre des systèmes chimiques très complexes qui accomplissent des tâches : les systèmes vivants.

Avant de commencer, rappelons juste qu'en termes très simples on peut décrire un liquide comme un ensemble des molécules ayant une énergie thermique du même ordre que dans l'état gazeux et une densité semblable à celle d'un solide. Ainsi la longueur de parcours moyen et le temps entre deux collisions sont petits. Une molécule en solution, à température ambiante, est donc soumise à une très grande quantité de chocs d'amplitude et direction aléatoire ce qui lui donne un mouvement en marche aléatoire en trois dimensions que l'on appelle mouvement Brownien. Ce type de mouvement a été pour la première fois observé par Brown en 1827 sur des grains de pollen de taille micrométrique, expliqué théoriquement par Einstein 1905 et ce modèle vérifié quantitativement par Perrin [119]. A l'échelle de la molécule unique, il s'agit largement de la force génératrice de mouvement dominante.

Revenant au macroscopique, l'application de champs externes contribue aussi au mouvement des molécules en solution via un paramètre de couplage. Ainsi l'application d'un champ électrique constant $\vec{E}$ entraîne la mise en mouvement d'espèces chimiques chargées,

c'est le cas d'électrophorèse. Il produit le mouvement d'un liquide ionique dans son ensemble lorsqu'il est contenu entre deux surfaces chargées parallèles au champ électrique. C'est le cas de l'électroosmose. La présence d'un gradient de champ électrique induit du mouvement dans des particules et molécules non chargées mais polarisables. Le champ gravitationnel même insignifiant à l'échelle d'une molécule entraîne le liquide tout entier par des effets de pression hydrostatique. En général toute force extérieure générant un mouvement d'ensemble dans le liquide entraînera et sera donc couplé au transport des molécules en solution.

Ces phénomènes qui sont très complexes au niveau moléculaire et pour des temps courts, deviennent relativement plus simples à traiter avec une approche macroscopique qui néglige les phénomènes transitoires. Ainsi, au sein d'un liquide les forces de friction moléculaire, dues à l'agitation thermique sont très importantes ce qui fait que le régime stationnaire est vite attendu et que l'on obtient une vitesse limite constante. Écrivons la loi fondamentale de la dynamique considérant une force extérieure constante $\vec{F}_{ext}$ agissant sur la molécule et une force de friction proportionnelle à la vitesse $\vec{v}$ de cette dernière,

$$\vec{F} = m \frac{d\vec{v}}{dt} = \vec{F}_{ext} - \xi \vec{v} \quad (\text{B.1})$$

où le terme différentiel est appelé terme inertiel et ξ [kg s^{-1}] est le coefficient de friction de la molécule. $\xi \sim 6\pi\eta R$, où $\eta \sim 10^{-4} \text{ kg s}^{-1}\text{m}^{-1}$ pour l'eau et $R \sim 1 \text{ nm}$ pour une molécule organique typique, nous obtenons $\xi \sim 10^{-12} \text{ kg s}^{-1}$. Aux temps longs (caractérisés par le temps inertiel $\tau_i = m/\xi \sim 10 \text{ ps}$ en prenant $m \sim 10^3 \text{ Da}$), la molécule atteint une vitesse limite et constante donnée par

$$\vec{v}_{lim} = \frac{\vec{F}_{ext}}{\xi} = u \vec{F}_{ext} \quad (\text{B.2})$$

où $u = \xi^{-1}$ [kg^{-1}s] est la mobilité de la molécule. Au delà du temps inertiel, on se place dans le cadre d'une réponse linéaire entre la force extérieure et la vitesse acquise par la molécule.

Dans le cas d'une force externe due à un champ électrique constant — ce qui nous intéresse plus particulièrement —, $\vec{F}_{ext} = ez\vec{E}$ où e est la charge élémentaire et z le nombre de charges dans la molécule. Nous définissons ainsi la mobilité électrophorétique $\mu = zeu$ [C s kg^{-1}] ou [$\text{V m}^2\text{s}^{-1}$] et nous écrivons

$$\vec{v} = \mu \vec{E} \quad (\text{B.3})$$

où nous avons supprimé l'indice *lim* car on ne considérera que des temps longs par rapport à τ_i .

B.2 Flux de matière et transport

Le terme mouvement brownien s'applique, comme nous l'avons dit précédemment, pour décrire la marche aléatoire d'une molécule soumise aux chocs thermiques des molécules qui l'entourent. Dans une solution de concentration homogène, ce mouvement n'induit pas de transport net de l'ensemble des molécules. Par contre, dans le cas d'inhomogénéités de concentration — c'est-à-dire de gradients — le mouvement brownien va

être source d'un transport que l'on appelle diffusion. Nous considérons ici une force externe $\vec{F}$, qui dérive d'un gradient de potentiel chimique μ [J] — à ne pas confondre avec la mobilité électrophorétique aussi notée μ —

$$\mu = \mu^{ext} + \mu^\circ + RT \ln \frac{C}{C^\circ} + RT \ln \gamma, \quad (\text{B.4})$$

où les termes correspondent à la contribution d'un champ externe, à l'état de référence de la solution associé à la concentration C° , à la contribution liée à la concentration et l'écart à l'idéalité, respectivement, R étant la constante des gaz parfaits et γ le coefficient d'activité du soluté. Si l'on néglige γ , la force générée par le gradient de potentiel chimique est

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}\mu = -\vec{\nabla}\mu^{ext} - \vec{\nabla}\mu^\circ - RT \frac{\vec{\nabla}C}{C}. \quad (\text{B.5})$$

En considérant la vitesse associée à cette force dans le cadre d'une réponse linéaire

$$\vec{v} = \frac{\vec{F}}{\xi} \quad (\text{B.6})$$

et en écrivant le flux de matière $\vec{J}$ [mol m⁻²s⁻¹] associé

$$\vec{J} = C\vec{v} = -\frac{C}{\xi} \left(\vec{\nabla}\mu^{ext} - \vec{\nabla}\mu^\circ \right) - \frac{RT}{\xi} \vec{\nabla}C \quad (\text{B.7})$$

Ce qui peut être écrit de façon condensée comme

$$\vec{J} = \vec{v}C - D\vec{\nabla}C, \quad (\text{B.8})$$

où $\vec{v}$ désigne ici la vitesse moyenne due à la combinaison des champs externes et des effets chimiques, mais sans tenir compte des gradients de concentration. Elle s'écrit comme

$$\vec{v} = -\frac{1}{\xi} \left(\vec{\nabla}\mu^{ext} - \vec{\nabla}\mu^\circ \right). \quad (\text{B.9})$$

Le deuxième terme de (B.8), proportionnel au gradient de concentration est le terme diffusif et $D = RT/\xi$ le coefficient de diffusion [m²s⁻¹].

B.3 Étude de quelques cas concrets

Quand on veut étudier l'effet du transport, et éventuellement de la réaction chimique, sur les profils de concentration dans l'espace et dans le temps, on peut écrire l'équation de continuité qui n'est autre chose que la conservation de la matière en tout point :

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \vec{\nabla}\vec{J} = \sigma, \quad (\text{B.10})$$

qui exprime que les variation de concentration d'une espèce donnée dans un point de l'espace (C est une fonction du temps et des trois coordonnées de l'espace) plus la contribution des flux qui amènent de la matière à ce point est égale au terme de source σ , relatif à la réaction chimique.

Jusqu'à présent, nous avons dégagé des équations qui ont une forme simple et qui sont très générales. Par la suite, nous allons voir quelques cas simples que nous avons utilisé pour analyser nos expériences.

B.3.1 Diffusion 1D

Nous considérons un milieu infini à une dimension dans lequel on dépose au temps $t = 0$ une concentration de la forme $C(x, 0)$ non homogène selon x . Du fait des gradients de concentration, un flux diffusif va apparaître tendant à égaliser la concentration de l'espèce C en tout point. L'évolution de cette concentration avec le temps obéit, en combinant (B.8) et (B.10)

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} - D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} = 0 \quad (\text{B.11})$$

La combinaison de l'équation différentielle précédente et de la condition initiale $C(x, 0)$ nous donne accès à l'expression de $C(x, t)$. Dans le cas précis où la condition initiale prend la forme d'une gaussienne de variance initiale σ_0^2 , la solution de (B.11) est une fonction gaussienne de la forme

$$C(x, t) = \frac{n}{\sqrt{2\pi(2Dt + \sigma_0^2)}} \exp\left(-\frac{x^2}{2(2Dt + \sigma_0^2)}\right), \quad (\text{B.12})$$

où n est le nombre total de moles de l'espèce C.

C'est avec cette fonction que l'on quantifie la diffusion dans de nombreux cas tels que l'électrophorèse ou la chromatographie. Dans ces techniques, la condition initiale est donnée par un *pic* dont la forme peut être souvent assimilée à une gaussienne. Cependant, nous avons un outil mathématique simple qui nous donne la solution de (B.11) pour n'importe quelle forme de la condition initiale.

La transformée de Fourier est une transformation mathématique qui associe à une fonction f , dépendant de la variable x , une autre fonction $\tilde{f}$, dépendant de la variable q , et on dit que x et q sont des variables conjuguées. Elle est définie comme

$$TF[f(x)] = \tilde{f}(q) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-iqx} dx. \quad (\text{B.13})$$

Elle possède une propriété très intéressante pour la résolution d'équation différentielles car

$$TF\left[\frac{df(x)}{dx}\right] = -iq\tilde{f}(q) \quad (\text{B.14})$$

comme il peut être démontré par dérivation de (B.13) et intégration par parties. L'application d'une transformée de Fourier selon x dans (B.11) donne

$$\frac{\partial \tilde{C}(q, t)}{\partial t} = -Dq^2 \tilde{C}(q, t) \quad (\text{B.15})$$

ce qui a comme solution immédiate

$$\tilde{C}(q, t) = \tilde{C}(q, 0) \exp(-Dq^2 t) \quad (\text{B.16})$$

où $\tilde{C}(q, 0) = TF[C(x, 0)]$ est la transformée de Fourier de la condition initiale. Nous voyons que, dans l'espace de Fourier, la diffusion se manifeste comme une relaxation temporelle monoexponentielle pour chaque valeur de la variable de Fourier q . Le temps caractéristique qui est associé est $\tau_{diff} = (Dq^2)^{-1}$ [s]. La forme de la condition de initiale ne se répercute dans l'espace de Fourier que dans les amplitudes initiales des exponentielles.

B.3.2 Diffusion et advection 1D

Nous envisageons à présent un milieu infini unidimensionnel dans lequel l'espèce C est soumise à la vitesse constante v qui peut avoir une source électrophorétique, hydrodynamique ou autre. On exprime toujours la condition initiale sous la forme générale $C(x, 0)$. D'après les (B.10) et (B.8) nous avons

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} + v \frac{\partial C(x, t)}{\partial x} - D \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} = 0. \quad (\text{B.17})$$

Nous pouvons appliquer le changement de variable $y = x - vt$, ce qui revient à prendre un référentiel en mouvement à la vitesse v et ramène (B.17) au cas de la seule diffusion. D'autre part, en appliquant une transformée de Fourier à l'(B.17) nous obtenons

$$\frac{\partial \tilde{C}(q, t)}{\partial t} = (iqv - Dq^2) \tilde{C}(q, t) \quad (\text{B.18})$$

et la solution s'écrit

$$\tilde{C}(q, t) = \tilde{C}(q, 0) \exp(-Dq^2 t) \exp(iqv t) \quad (\text{B.19})$$

Ce qui implique que l'advection à la vitesse constante v se traduit dans l'espace de Fourier comme une composante sinusoïdale de temps caractéristique $\tau_{adv} = (qv)^{-1}$ [s].

B.3.3 Relaxation due à la réaction chimique

Considérons la réaction chimique entre deux espèces A et B pour donner une troisième espèce C. Ce type de réaction est très répandu en Chimie comme en Biologie avec comme exemple caractéristique les interactions *host-guest* type ligand-protéine. Elle s'écrit



Supposons à présent que ces entités ne diffusent pas. L'équation qui décrit l'évolution du système chimique vers l'équilibre est d'après (B.10)

$$\frac{dA(t)}{dt} = -k_1 B(t) A(t) + k_2 C(t) \quad (\text{B.21})$$

$$\frac{dB(t)}{dt} = -k_1 B(t) A(t) + k_2 C(t) \quad (\text{B.22})$$

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_1 B(t) A(t) - k_2 C(t) \quad (\text{B.23})$$

Les équations précédentes constituent un système d'équations différentielles non-linéaires à cause du produit $B(t) \times A(t)$ et on ne dispose pas d'outils analytiques pour les résoudre. Dans l'approximation où la concentration de l'espèce B est constante et égale à B et en prenant la notation $\kappa_1 = k_1 B$ nous avons

$$\frac{dA(t)}{dt} = -\kappa_1 A(t) + k_2 C(t) \quad (\text{B.24})$$

$$\frac{dC(t)}{dt} = \kappa_1 A(t) - k_2 C(t), \quad (\text{B.25})$$

qui est maintenant un système d'équations différentielles linéaires que l'on peut écrire sous la forme

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} A(t) \\ C(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -\kappa_1 & k_2 \\ \kappa_1 & -k_2 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A(t) \\ C(t) \end{pmatrix}, \quad (\text{B.26})$$

dont la solution générale s'écrit

$$\begin{aligned} A(t) &= a_+ \exp(\lambda_+ t) + a_- \exp(\lambda_- t) \\ C(t) &= c_+ \exp(\lambda_+ t) + c_- \exp(\lambda_- t). \end{aligned} \quad (\text{B.27})$$

Où $\lambda_{\pm}$ sont les valeurs propres de la matrice associée à (B.26). On trouve

$$\lambda_+ = 0 \quad (\text{B.28})$$

$$\lambda_- = -(\kappa_1 + k_2). \quad (\text{B.29})$$

Pour fixer les conditions aux limites, on considère qu'à l'instant initial on a $A(t=0) = A_0$ et $C(t=0) = C_0$. Au bout d'un temps infini, l'équilibre chimique sera atteint¹ et $A(t=\infty) = A_{\infty}$, $C(t=\infty) = C_{\infty}$. En introduisant ces conditions aux limites dans (B.28), on obtient

$$\begin{aligned} A(t) &= A_{\infty} + (A_0 - A_{\infty}) \exp(-(\kappa_1 + k_2)t) \\ C(t) &= C_{\infty} + (C_0 - C_{\infty}) \exp(-(\kappa_1 + k_2)t) \end{aligned} \quad (\text{B.30})$$

C'est à dire que la concentration de chaque espèce évolue vers la concentration d'équilibre (indice ∞) avec un temps caractéristique qu'on appelle temps de relaxation de la chimie $\tau_{chimie} = (\kappa_1 + k_2)^{-1}$.

B.3.4 Diffusion et advection 1D + réaction

Cas général

Nous considérons un milieu unidimensionnel infini ($-\infty \leq x \leq \infty$) dans lequel se produit la réaction chimique



Au temps initial, A et C ont les profils de concentration

$$A(x, t=0) = A(x, 0) \quad \text{et} \quad C(x, t=0) = C(x, 0) \quad (\text{B.32})$$

Nous admettons que la concentration en B est constante et on note $\kappa_1 = k_1 B$. On note D et d les coefficients de diffusion des espèces A et C et V et v leur vitesses, constantes en tout point. Reprenant (B.10) et (B.8), nous avons le système d'équations

$$\frac{\partial A}{\partial t} + V \frac{\partial A}{\partial x} - D \frac{\partial^2 A}{\partial x^2} = -\kappa_1 A + k_2 C \quad (\text{B.33})$$

$$\frac{\partial C}{\partial t} + v \frac{\partial C}{\partial x} - d \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \kappa_1 A - k_2 C \quad (\text{B.34})$$

¹En notant la constante d'équilibre $K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{C_{\infty}}{A_{\infty} B}$ nous obtenons $A_{\infty} = \frac{k_2}{\kappa_1 + k_2}$ et $C_{\infty} = \frac{\kappa_1}{\kappa_1 + k_2}$

Après transformée de Fourier, nous obtenons

$$\begin{aligned}\frac{d\tilde{A}}{dt} &= -(\kappa_1 - iVq + Dq^2)\tilde{A} + k_2\tilde{C} \\ \frac{d\tilde{C}}{dt} &= \kappa_1\tilde{A} - (k_2 - ivq + dq^2)\tilde{C}.\end{aligned}\quad (\text{B.35})$$

Pour résoudre ce système d'équations différentielles linéaires, nous adoptons un point de vue matriciel. Ainsi, la matrice associée à (B.35) est

$$\mathcal{M} = \begin{pmatrix} -(\kappa_1 - iVq + Dq^2) & k_2 \\ \kappa_1 & -(k_2 - ivq + dq^2) \end{pmatrix} \quad (\text{B.36})$$

Et la solution de (B.35) s'écrit comme

$$\begin{aligned}\tilde{A} &= a_+ \exp(\lambda_+ t) + a_- \exp(\lambda_- t) \\ \tilde{C} &= c_+ \exp(\lambda_+ t) + c_- \exp(\lambda_- t)\end{aligned}\quad (\text{B.37})$$

où $\lambda_{\pm}$ sont les valeurs propres de la matrice $\mathcal{M}$ qui sont calculées comme les racines de l'équation $\det(\mathcal{M} - \lambda \mathbb{1}) = 0$,

$$\begin{vmatrix} -(\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda) & k_2 \\ \kappa_1 & -(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda) \end{vmatrix} = 0 \quad (\text{B.38})$$

On obtient

$$\lambda_{\pm} = -\frac{1}{2} (i(V + v)q + (D + d)q^2 + \kappa_1 + k_2) \pm \frac{1}{2} \Delta \quad (\text{B.39})$$

et

$$\Delta = \sqrt{(i(V - v)q + (D - d)q^2)^2 + 2(\kappa_1 - k_2)(i(V - v)q + (D - d)q^2) + (\kappa_1 + k_2)^2} \quad (\text{B.40})$$

Les vecteurs propres $\vec{X}_{\pm}$ associés à chaque valeur propre se calculent comme

$$(\mathcal{M}_{1D} - \lambda_{\pm} \mathbb{1})\vec{X}_{\pm} = \vec{0} \quad (\text{B.41})$$

Nous pouvons choisir par exemple

$$\begin{aligned}\vec{X}_+ &= \begin{pmatrix} x_{+,1} \\ x_{+,2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_2 \\ \kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+ \end{pmatrix} \\ \vec{X}_- &= \begin{pmatrix} x_{-,1} \\ x_{-,2} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_- \\ \kappa_1 \end{pmatrix}\end{aligned}\quad (\text{B.42})$$

Ce qui nous permet d'écrire la solution générale (B.38) comme une combinaison linéaire des vecteurs propres

$$\begin{pmatrix} \tilde{A}(q, t) \\ \tilde{C}(q, t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{+,1} & x_{-,1} \\ x_{+,2} & x_{-,2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} ue^{\lambda_+ t} \\ we^{\lambda_- t} \end{pmatrix} \quad (\text{B.43})$$

où u et w sont des constantes — vis-à-vis de la variable t — qui dépendent de q et sont fixées par les conditions initiales. En combinant (B.42) et (B.43)

$$\tilde{A}(q, t) = k_2 ue^{\lambda_+ t} + (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+) we^{\lambda_- t} \quad (\text{B.44})$$

$$\tilde{C}(q, t) = (k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-) ue^{\lambda_+ t} + \kappa_1 we^{\lambda_- t}. \quad (\text{B.45})$$

Considérant les conditions initiales (B.32), nous obtenons

$$u = \frac{\tilde{A}(q, 0)\kappa_1 - \tilde{C}(q, 0)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} \quad (\text{B.46})$$

$$w = \frac{\tilde{C}(q, 0)k_2 - \tilde{A}(q, 0)(\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} \quad (\text{B.47})$$

Ce qui donne finalement pour les amplitudes devant chaque terme exponentiel dans (B.38) et avec les conditions initiales considérées :

$$\begin{aligned} a_+ &= \frac{\left(\tilde{A}(q, 0)\kappa_1 - \tilde{C}(q, 0)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)\right)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} k_2 \\ a_- &= \frac{\left(\tilde{C}(q, 0)k_2 - \tilde{A}(q, 0)(\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)\right)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} (k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-) \\ c_+ &= \frac{\left(\tilde{A}(q, 0)\kappa_1 - \tilde{C}(q, 0)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)\right)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+) \\ c_- &= \frac{\left(\tilde{C}(q, 0)k_2 - \tilde{A}(q, 0)(\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)\right)}{k_2\kappa_1 - (\kappa_1 - iVq + Dq^2 + \lambda_+)(k_2 - ivq + dq^2 + \lambda_-)} \kappa_1 \end{aligned} \quad (\text{B.48})$$

Nous avons ainsi, après un calcul un peu fastidieux, obtenu une solution analytique dans l'espace de Fourier pour le cas de la réaction (B.31) avec la seule hypothèse que la concentration de l'espèce B soit constante, ce qui est nécessaire pour linéariser les termes de source dans (B.34). Le couplage entre la diffusion, l'advection et une réaction chimique qui convertit l'espèce A en C ayant des coefficients de diffusion et vitesses différentes s'exprime sous la forme relativement simple (B.43) : les transformées de Fourier des concentrations sont des combinaisons linéaires d'exponentielles décroissantes, dont les taux de décroissance dépendent de D , d , V , v , κ_1 et k_2 et les amplitudes associées dépendent aussi des conditions initiales.

Ainsi, dans une perspective analytique de mesure de ces paramètres associées aux espèces A et C, un fit biexponentiel devrait permettre d'avoir accès à une paire d'entre eux moyennant la connaissance des autres. Par exemple, de mesurer la cinétique chimique connaissant les coefficients de diffusion et les vitesses des deux espèces isolées, comme c'est expliqué au Chapitre 12.

Nous allons dans la suite considérer quelques cas particuliers du cas que l'on vient d'exposer.

Advection rapide par rapport à la diffusion et à la réaction chimique

Nous envisageons ici le cas dans lequel le temps caractéristiques de la chimie et de la diffusion sont lents par rapport à l'advection. Nous écrivons cette limite comme

$$\kappa_1 + k_2 + (D - d)q^2 \ll (V - v)q \quad (\text{B.49})$$

Après développement limité² de (B.40), nous avons

$$\Delta \simeq (i(V - v)q + (D - d)q^2(\kappa_1 - k_2)) \quad (\text{B.50})$$

ce qui combiné avec (B.39) donne dans ce cadre d'approximations

$$\lambda_+ \simeq -k_2 - dq^2 - ivq \quad (\text{B.51})$$

$$\lambda_- \simeq -\kappa_1 - Dq^2 - iVq \quad (\text{B.52})$$

En incorporant (B.49) aux équations (B.48) nous obtenons enfin une expression très simple

$$\tilde{A} \simeq \tilde{A}(q, 0) \exp(-(\kappa_1 + Dq^2)t) \exp(-iVqt) \quad (\text{B.53})$$

$$\tilde{C} \simeq \tilde{C}(q, 0) \exp(-(k_2 + dq^2)t) \exp(-ivqt) \quad (\text{B.54})$$

Dans le cas où l'advection est franchement plus rapide que la chimie et la diffusion, les phénomènes se découplent, l'advection introduit une modulation sinusoïdale dans la relaxation des modes de Fourier (terme exponentiel imaginaire) qui elle est gouvernée par la valeur des constantes cinétiques et des coefficients de diffusion.

Réaction chimique rapide par rapport à la diffusion et la migration

Si l'on considère le cas

$$|i(V - v)q + (D - d)q^2| \ll \kappa_1 + k_2 \quad (\text{B.55})$$

Le développement de (B.40) au premier ordre donne

$$\Delta \simeq (\kappa_1 + k_2) + \frac{\kappa_1}{\kappa_1 + k_2} (i(V - v)q + (D - d)q^2) + \frac{k_2}{\kappa_1 + k_2} (i(V - v)q + (D - d)q^2) \quad (\text{B.56})$$

ce qui conduit à

$$\lambda_+ \simeq -(\chi_A D + \chi_C d)q^2 - i(\chi_A V + \chi_C v)q \quad (\text{B.57})$$

$$\lambda_- \simeq -(\kappa_1 + k_2) - (\chi_C D + \chi_A d)q^2 - i(\chi_C V + \chi_A v)q \quad (\text{B.58})$$

où χ_i est la fraction molaire à l'équilibre de l'espèce i qui s'écrit comme

$$\chi_A = \frac{k_2}{\kappa_1 + k_2} \quad \text{et} \quad \chi_C = \frac{\kappa_1}{\kappa_1 + k_2} \quad (\text{B.59})$$

²En réorganisant (B.40), nous avons

$$\Delta = i(V - v)q \sqrt{\left(1 + \frac{(D - d)q^2}{i(V - v)q}\right)^2 + 2\frac{\kappa_1 - k_2}{i(V - v)q} + 2\frac{(\kappa_1 - k_2)(D - d)q^2}{i(V - v)q} + \left(\frac{\kappa_1 + k_2}{i(V - v)q}\right)^2}$$

En négligeant les termes d'ordre supérieur ou égal à 2

$$\Delta \simeq i(V - v)q \sqrt{1 + 2\frac{(D - d)q^2}{i(V - v)q} + 2\frac{\kappa_1 - k_2}{i(V - v)q}}$$

ce qui après développement limité donne (B.50).

En introduisant (B.57) et (B.58) dans les équations (B.44) à (B.47), nous obtenons au premier ordre

$$\tilde{A} \simeq \tilde{A}(q, 0) \exp(-(\chi_A D + \chi_C d)q^2 t) \exp(-i(\chi_A V + \chi_C v)qt) \quad (\text{B.60})$$

$$\tilde{C} \simeq \tilde{C}(q, 0) \exp(-(\chi_A D + \chi_C d)q^2 t) \exp(-i(\chi_A V + \chi_C v)qt) \quad (\text{B.61})$$

Ce qui se traduit par le fait que l'on a une espèce moyenne $\{A, B\}$ qui diffuse avec le coefficient de diffusion $(\chi_A D + \chi_C d)$ et migre avec la vitesse $(\chi_A V + \chi_C v)$. Ceci s'explique bien car la réaction chimique étant rapide vis-à-vis des deux phénomènes de transport, à l'échelle de temps de ceux-ci on ne voit qu'une espèce moyenne caractérisée par les populations à l'équilibre de la réaction (B.31). Dans ce régime, il n'est pas possible de déterminer les constantes cinétiques mais seulement la constante thermodynamique $K = k_1/k_2$ si D , d , V et v sont connus.

B.3.5 Diffusion 1D + réaction

Cas général

Prenons maintenant le cas en absence d'advection. On rappelle que l'on dépose une certaine condition initiale des espèces A et C (par exemple un pic) qui diffusent avec des coefficients de diffusion D et d et réagissent selon (B.31). Nous pouvons comprendre que le couplage diffusion-réaction va faire émerger un comportement différent qu'en absence de réaction chimique : il existe une source de non-équilibre qui est la différence de coefficient de diffusion des deux espèces. Nous allons ici reprendre les résultats obtenus dans la section précédente. Ainsi, la solution analytique du problème est celle des équations (B.44), (B.39) et (B.48) en prenant juste $v = V = 0$. Nous pouvons considérer deux cas limites.

Réaction chimique rapide par rapport à la diffusion

Ceci revient à l'expression (B.55). Dans ce cas là, comme dans (B.60) nous observerons une seule espèce moyenne diffusant avec le coefficient moyen $(\chi_A D + \chi_C d)$.

Diffusion rapide par rapport à la réaction chimique

Dans le cas où la chimie est lente par rapport à la diffusion, c'est à dire

$$\kappa_1 + k_2 \ll (D - d)q^2 \quad (\text{B.62})$$

En introduisant (B.62) dans (B.40) avec $v = V = 0$ on obtient au premier ordre³

$$\Delta \simeq (D - d)q^2 + (\kappa_1 - k_2) \quad (\text{B.63})$$

³On exprime (B.40) comme

$$\Delta = (D - d)q^2 \sqrt{1 + 2 \frac{\kappa_1 - k_2}{(D - d)q^2} + \left(\frac{\kappa_1 - k_2}{(D - d)q^2} \right)^2}.$$

En négligeant le dernier terme et après développement limité de la racine, on obtient au premier ordre (B.63).

Ce qui introduit dans (B.39) donne

$$\lambda_+ = -k_2 - dq^2 \quad (\text{B.64})$$

$$\lambda_- = -\kappa_1 - Dq^2 \quad (\text{B.65})$$

Et en prenant compte des amplitudes préexponentielles (B.48)

$$\tilde{A} \simeq \tilde{A}(q, 0) \exp(-(\kappa_1 + Dq^2)t) \quad (\text{B.66})$$

$$\tilde{C} \simeq \tilde{C}(q, 0) \exp(-(k_2 + dq^2)t) \quad (\text{B.67})$$

Et, en principe, ce cas de figure nous donne une signature de la cinétique chimique dans le temps de relaxation associé au mode de Fourier q . Cependant il ne faut pas oublier que pour arriver à (B.67), nous avons réalisé l'approximation (B.62) et que la contribution de la cinétique à la relaxation est ici adonc très faible. Dans ce cas là, la solution s'exprime comme

$$\tilde{A} \simeq \tilde{A}(q, 0) \exp(-Dq^2t) \quad (\text{B.68})$$

$$\tilde{C} \simeq \tilde{C}(q, 0) \exp(-dq^2t). \quad (\text{B.69})$$

Ce qui, comparé à (B.16), est la signature de deux espèces non réactives qui diffusent avec des coefficients de diffusion D et d respectivement.

Conclusion

Dans ce cas étudié ici, correspondant à l'approximation 1D des expériences présentées au Chapitre 12, la mesure de la cinétique est seulement possible lorsque les temps de relaxation de la réaction chimique et de la diffusion sont comparables $(\kappa_1 + k_2) \sim (D - d)q^2$. Il faut dans ce cas analyser les données expérimentales à l'aide des expressions (B.38), (B.39) et (B.40), ce que nous avons fait dans l'Article 3.

B.3.6 Diffusion 2D et advection 1D

Cette partie est détaillée dans la Section 2 de l'Article 2.

Annexe C

Détails sur le phénomène d'électrodifusion

C.1 Historique

Nous reprenons ici le phénomène d'électrodifusion dans une perspective historique. La lecture des travaux étudiant ce sujet illustre comment, en Science, un même phénomène peut être redécouvert par des communautés différentes et sous des angles variés au fil du temps.

L'application d'un champ électrique périodique sur un système chimique en réaction a été proposée pour la première fois par Mysels en 1956 [120]. Dans ce travail, Mysels décrit le phénomène de dispersion qui apparaît lorsque l'on couple une réaction chimique impliquant un échange entre états différemment chargés à la présence d'un champ électrique, périodique ou non. Il appelle ce phénomène électrodifusion et propose la détermination de constantes cinétiques en mesurant le coefficient de diffusion d'une espèce réactive en présence et en l'absence de champ.

Considérons une espèce, en échange entre deux états A et C de mobilités respectives μ_A et μ_C



soumise à un champ électrique d'amplitude E . À l'aide d'une description microscopique du système, Mysels détermine l'expression du coefficient de dispersion en passant par le calcul de la fonction distribution des distances parcourues au sein d'une population de molécules pendant une étape élémentaire $A \rightarrow C$ où $C \rightarrow A$.

Dans le cas d'un champ constant, la distance parcourue par une molécule dans l'état i (A ou C) est $l_{migr} = \mu_i E \tau_i$ et elle est seulement limitée par le temps de vie τ_i de la molécule dans l'état i . Mysels aboutit finalement à ¹

$$D_{disp} = E^2 (\mu_A - \mu_C)^2 \frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2)^3} \quad (C.2)$$

où nous avons pris $\tau_A = k_1^{-1}$ et $\tau_C = k_2^{-1}$.

¹Mysels obtient en réalité (C.2) à un facteur deux près car son calcul est approché comme l'a noté Giddings [121].

En présence d'un champ électrique alternatif de période T [s], la distance parcourue par la molécule dans une direction donnée dépend de la valeur relative de $T/2$ par rapport à τ_i . Ainsi, si $T/2 > \tau_i$ alors $l_{migr} = \mu_i E \tau_i$ et inversement, si $T/2 < \tau_i$ alors $l_{migr} = \mu_i E T/2$. Il en résulte une expression différente de D_{disp} :

$$D_{disp} = E^2 (\mu_A - \mu_C)^2 \frac{k_1 k_2}{(k_1 + k_2)^3} \left[\frac{1}{2(1 + \frac{\omega^2}{(k_1 + k_2)^2})} \right], \quad (C.3)$$

où $\omega = 2\pi/T$ [rad s⁻¹] est la pulsation du champ électrique.

Peu de temps après les travaux de Mysels, Bak et Kauman dérivent les équations (C.2) et (C.3) avec un point de vue macroscopique en utilisant des équations de réaction-diffusion [122, 123]. Ces travaux ont permis de raffiner de la théorie de l'électrodifusion [124–126].

Dans tous les articles théoriques précédents, la seule application évoquée pour l'électrodifusion est la détermination de constantes cinétiques. Toutefois, Breuer en 1962 [127] propose d'utiliser l'électrodifusion en champ électrique alternatif pour la séparation d'isotopes, mais sa suggestion reste sans suite. En effet, en présence d'un champ électrique, la dispersion due à l'électroosmose domine la diffusion [128] ; on ne disposait pas à l'époque de méthodes robustes de contrôle de l'électroosmose.

Bowden en 1965 [129] et Chatwin en 1975 [130] reprennent l'analyse du même type de phénomène dispersif dans un tout autre contexte : la dispersion de Taylor dans des systèmes présentant des écoulements de cisaillement tels que dans les estuaires et les zones côtières. De nouveau, ce phénomène de dispersion en champ alternatif réapparaît avec Van Den Broeck en 1990 dans le cadre d'une présentation générale de la dispersion de Taylor [131, 132]. Encore une fois, si la physique de ces processus est la même que celle impliquée dans l'électrodifusion — seule la nature du champ de vitesses change — aucune application à la chimie n'est évoquée.

C.2 Analyse de l'électrodifusion en deux composantes

D'après (C.3), nous pouvons écrire la contribution des constantes cinétiques sur D_{disp} comme un produit de deux termes

$$\frac{D_{disp}}{E^2 (\mu_A - \mu_C)^2} = D_\infty \times F_T \quad (C.4)$$

où

$$D_\infty = \frac{\kappa_1^i k_2^i}{(k_1^i + k_2^i)^3} \quad (C.5)$$

est la contribution de la réaction chimique à la dispersion quand la fréquence du champ est nulle (Figure C.1 a) et

$$F_T = \frac{1}{2(1 + \frac{\omega^2}{(\kappa_1^i + k_2^i)^2})} \quad (C.6)$$

est une fonction de coupure qui prend de valeurs non nulles quand $\kappa_1^i + k_2^i \geq \omega$ (Figure C.1 b). Le produit de ces deux termes est une fonction qui a un seul maximum en fonction de κ_1^i et k_2^i (Figure C.1 c) à la position

$$\kappa_1^R = k_2^R = \frac{\omega}{2}. \quad (\text{C.7})$$

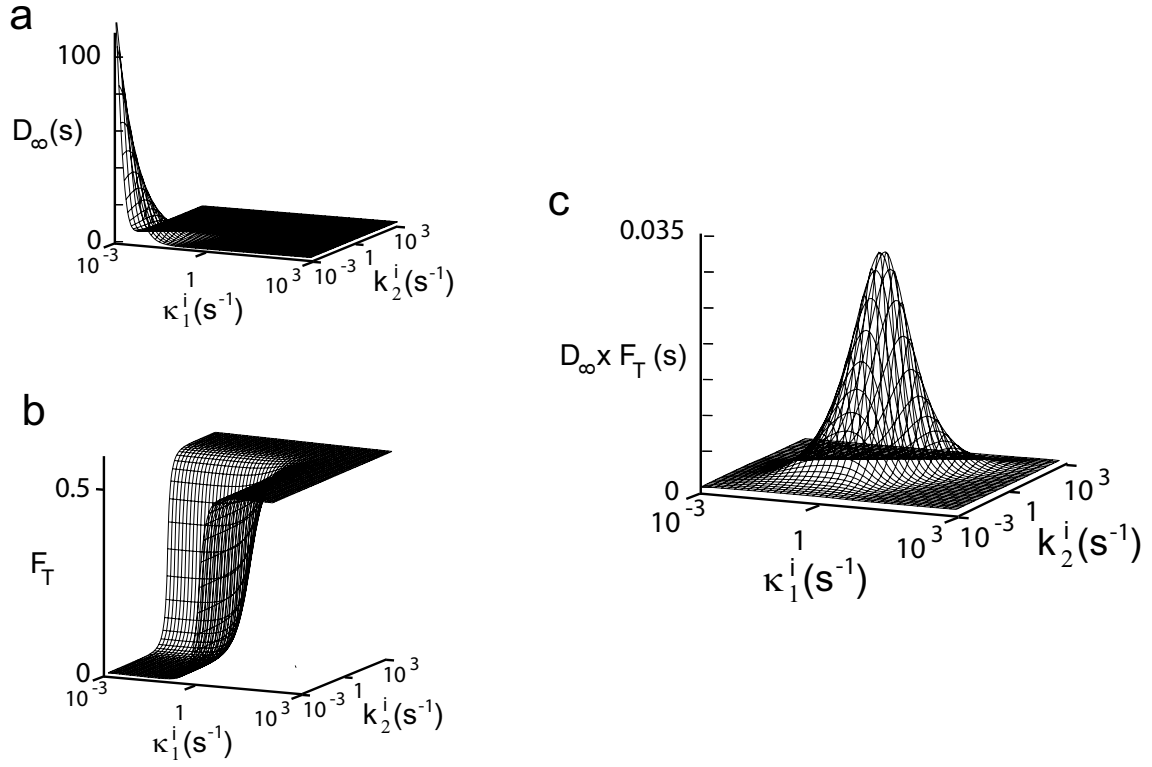


FIG. C.1 – Tracés correspondant aux équations (C.5) (a), (C.6) (b) et (C.4) (c) pour $\omega = 2 \text{ rad s}^{-1}$.

Annexe D

Construction d'un microscope d'épifluorescence

L'observation des différents profils de diffusion, réaction et migration dans ce travail a été réalisé par microscopie de fluorescence. Pour ce faire, nous avons construit un microscope d'épifluorescence. Un montage d'épifluorescence se caractérise par le fait que la même lentille (un objectif de microscope en l'occurrence) est utilisée pour focaliser la lumière d'excitation et pour récupérer le signal d'émission de fluorescence. Pour distinguer entre les deux signaux, on profite du décalage spectral entre la bande d'absorption et d'émission d'un fluorophore, d'environ 15 à 40 nm, et d'un jeu de filtres.

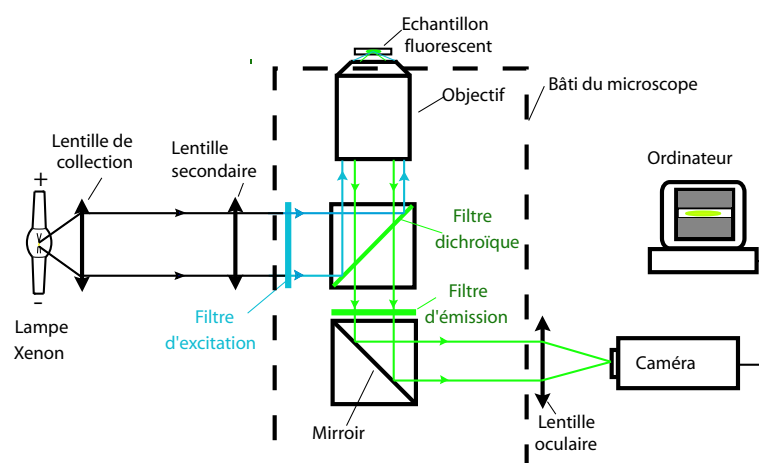


FIG. D.1 – Schéma du microscope d'épifluorescence utilisé. Le rectangle pointillé est le bâti du microscope (*cf.* Figure D.2) qui supporte le cube contenant les trois filtres, le miroir inférieur, l'objectif et la platine.

Le montage est constitué d'une source lumineuse blanche, d'un jeu de filtres, d'un objectif de microscope, d'une caméra et d'une série de lentilles. La lumière blanche est d'abord focalisée convenablement avec deux lentilles, puis filtrée avec un filtre passe-bande (filtre d'excitation) et renvoyée à 90° vers l'objectif, par un filtre dichroïque. L'échantillon est ainsi excité dans une plage de longueur d'ondes délimitée par le filtre d'excitation. La fluorescence émise est collectée par le même objectif, puis traverse le miroir dichroïque et

un deuxième filtre passe bande (filtre d’émission) qui a un recouvrement nul avec le filtre d’excitation pour bloquer les réflexions parasites de la lumière d’excitation, beaucoup plus puissantes que le signal de fluorescence. La lumière de fluorescence est finalement focalisée sur la partie sensible de la caméra à l’aide d’une lentille placée à la focale.

Les éléments optiques ont été alignés avec des pièces d’optomécanique Thorlabs, placées dans le bâti du microscope présenté à la Figure D.2. Le détail des parties est :

- Source d’illumination : Lampe Xe 100 W (LOT-Oriel, Palaiseau, France).
- Lentille de collection : plane-concave $f = 40$ mm.
- Miroir chaud Thorlabs. Bande passante 400-700 nm. Bloque les IR et protège les éléments optiques.
- Lentille secondaire : plane-concave $f = 200$ mm.
- Jeu de filtres. Rhodamine green : excitation HQ 495/30, dichroïque 520 DCXR, émission HQ 560/80M. Texas-red : excitation HQ 580/20, dichroïque Q595lp, émission HQ 630/60. Chroma Technology, Rockingham, VT. Chaque jeu monté dans un cube Thorlabs.
- Miroir d’argent Thorlabs.
- Lentille oculaire plane-concave $f = 100$ mm.
- Caméra CCD CV-M4+CL 2/3” (JAI, Copenhagen, Denmark).
- Objectifs. 10× Fluar NA 0.5, Zeiss ; ou 20× Plan Apo NA 0.75 Nikon.
- Platine de microscope Olympus U-SVRM.

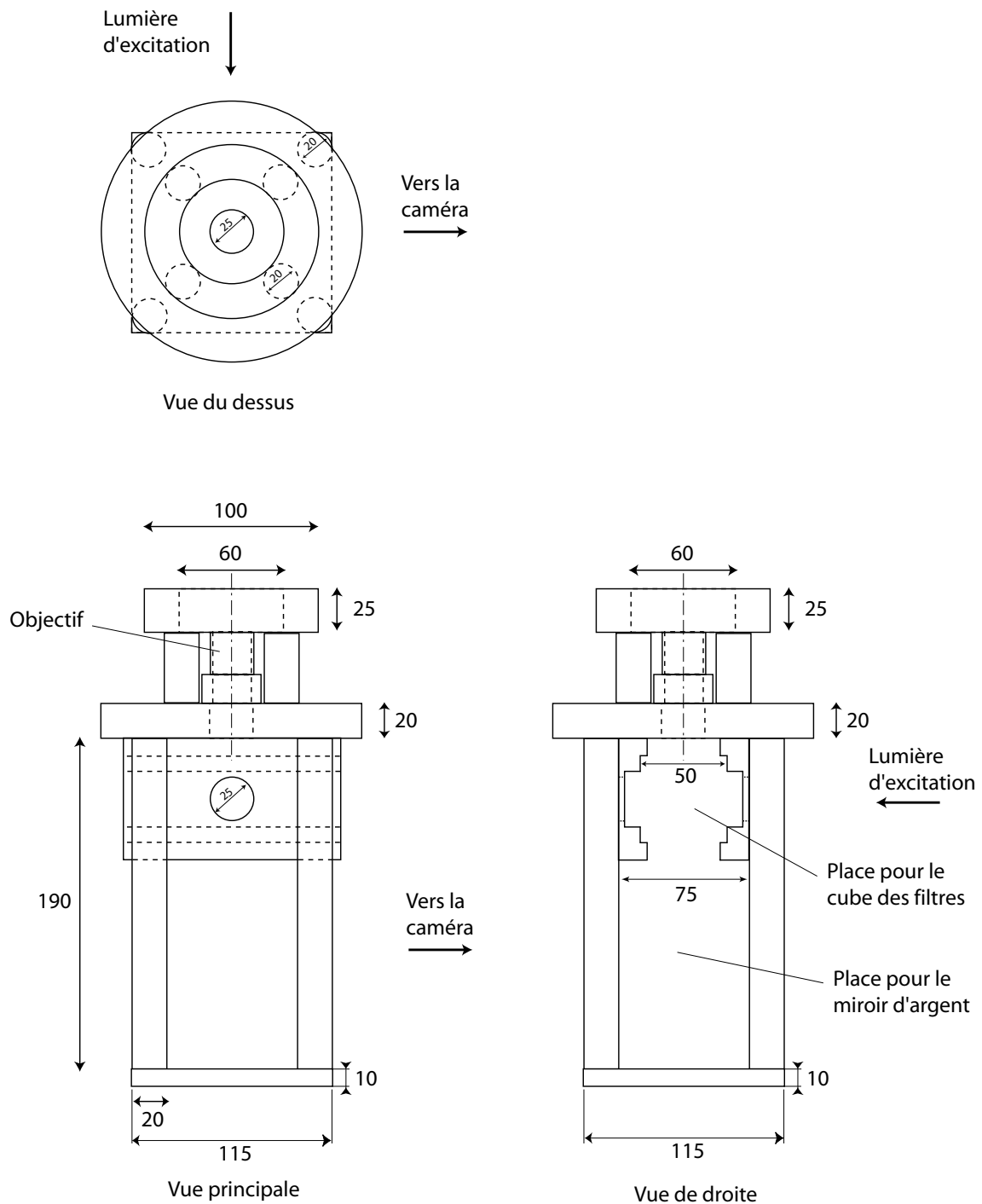


FIG. D.2 – Vue du dessus (haut), vue principale et vue de droite (droite) du bâti du microscope réalisé lors de cette thèse. Toutes les pièces sont usinées en duralumin et reliées par des vis M6.

Annexe E

Protocole de fabrication du chip en PDMS avec un moule en époxy

E.1 Obtention of the PDMS master

- Take a Si + resin microfabricated master. Let it in trimethylchlorosilane vapor for 5'. Then, pour PDMS and let cure in oven at 70 ° C for 2 h (with resin AZ100 more than 2 h will make master break for a 10 μ m high motif). For 30 μ m high motif, let PDMS cure at room temperature.
- Very carefully peel off PDMS
- Under binocular very patiently and carefully cut out reservoirs with a scalpel. A good trick is to use tape as a guide for making a straight cut in PDMS. Typically, one master takes 1 h of work. For circular reservoirs, paint them with permanent ink to be able to see it, then pinch them with a cylindric tube. Best way to clean final work is to use tape (3M semi transparent one, even if it can let fluorescent traces). Store PDMS master in a labeled small petri dish.

E.2 Fabrication of epoxy mould

- Prepare small Petri dishes (5.5 mm diameter) with a sheet of PDMS $\sim$ 3 mm high. When you made them, best is to let cure PDMS for 1-several hours at room temperature (bubbles go out) then oven at 70 ° C for several hours.
- Place carefully tape-cleaned PDMS master on the PDMS sheet (microfluidic motifs on top). You must see PDMS-PDMS clear adhesion.
- Prepare epoxy resin (Crystal Resin, Gedeo, Gemenos, France; bought at BHV, Paris) by mixing component A and B in 2 :1 (w :w) ratio, centrifugate 2 min at 2000 rpm. (26 mL were used for making 2 typical epoxy moulds, more will be necessary for reservoirs.)
- Pour epoxy resin on PDMS master starting by filling reservoirs. Then fill the petri dish till PDMS master is covered by a layer of epoxy resin 2-3 mm thick.
- Helped by a small metal bar, remove bubbles from reservoirs (not from microfluidic motifs, you may harm them) Then take the whole to water vacuum pump for 10' at 50 mbar. After vacuum is removed bubbles virtually vanish.
- Let the petri dish on a plastic box curing at room temperature for 24 h. You get a

semi-rigid resin that you can take off from petri dish with a scalpel. Be very careful doing this task, wear always protective glasses because scalpel breaks very often. Try not to bend the resin because it is not yet fully rigid.

- Remove the PDMS sheet covering the PDMS master. Then, carefully remove the master from epoxy resin. Take your time not to make the channels/pilars break under stress.
- You can keep the PDMS master and use it again for making more epoxy resin moulds. Even if a sort of greasy very thin layer have been observed to stay on PDMS master after this treatment.
- Bake the epoxy mould in oven at 70 ° C for 24 h. It will get soft.
- Let the epoxy mould to harden at room temperature for 24 h.

E.3 Use of epoxy moulds

- Clean the epoxy mould with filtered ethanol and dry it with nitrogen.
- Treat the epoxy mould with trimethylchlorosilane. Note : It has been observed that during first 2-3 uses of epoxy moulds, peeling off is particularly difficult. We recommend to apply air plasma cleaner for 1 min to the mould before treating it with trimethylchlorosilane vapor. Special care and patience must be made when peeling off first time.
- Mix 1 :10 (weight :weight) of linker :base PDMS (It has been observed than a 1 :5 mix, giving more rigid PDMS, is more difficult to peel). You need less than 5 g of mixture for filling one typical epoxy mould. Mix them well with a spatule from bottom to top and centrifugate it for 2' at 2000 rpm.
- Pour the mixture carefully on the epoxy mould. Verify that the liquid level is slightly over reservoir level. With a small metal bar wet the top of the reservoirs. Never use this bar to remove bubbles from microfluidic motif, you will scratch. Best way to remove bubbles is to let it in water vacuum pump for 5-10'. Many bubbles will appear but after vacuum stops they disappear (let 5-10' at room pressure).
- Take fully bubble free PDMS into oven for 2 h. Do not go over this limit for first uses of epoxy moulds (PDMS gets very rigid and peel off does not work).

Annexe F

Formules chimiques des composés utilisés

F.1 Bases de l'ADN

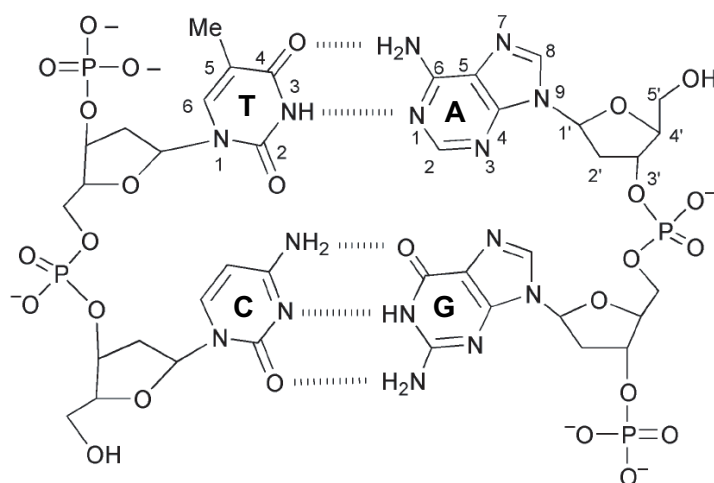


FIG. F.1 – Appariement de Watson et Crick entre les bases de l'ADN. A : adénine, T : thymine, C : cytosine, G, guanine. Figure extraite de [133]

F.2 Fluorophores

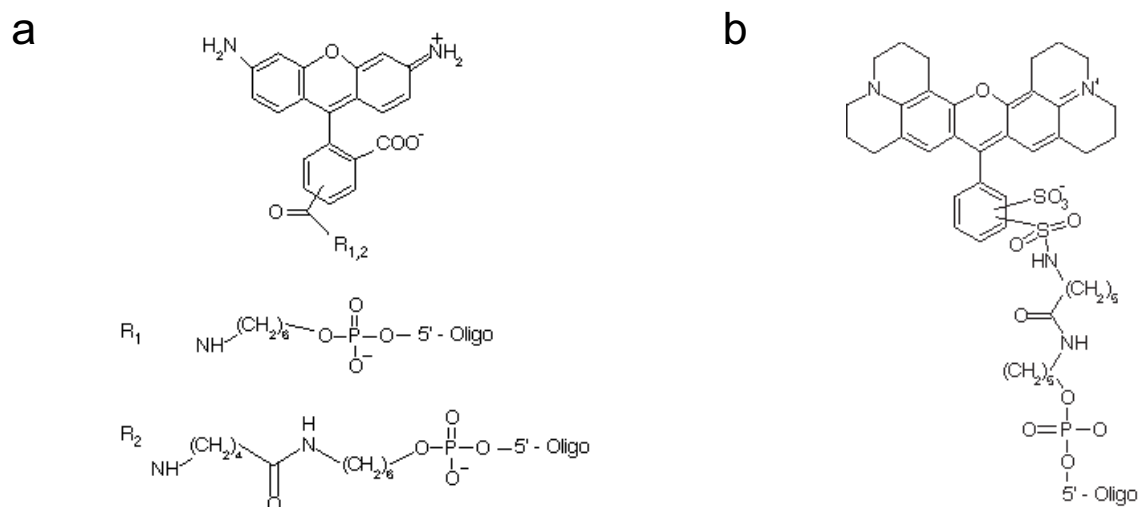


FIG. F.2 – (a) Rhodamine-green et (b) texas-red. Reliés à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide. Figures extraites de IBA : www.iba-go.com.

F.3 Modification des oligonucléotides

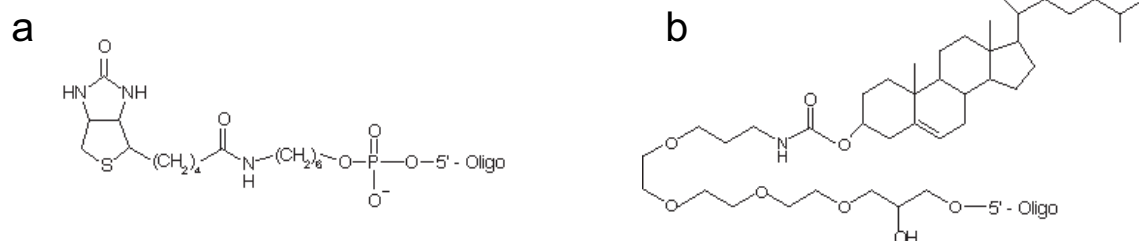


FIG. F.3 – (a) Biotine, (b) cholestéryl. Reliés à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide. Figures extraites de IBA : www.iba-go.com.

F.4 Matrices d'analyse

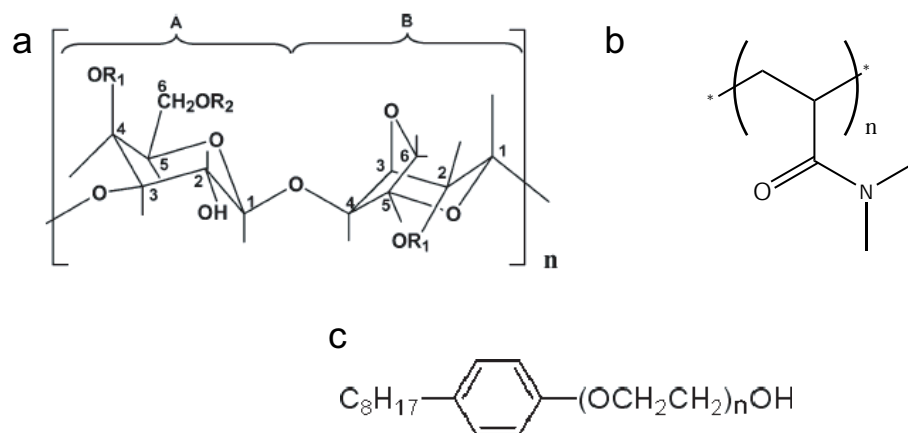


FIG. F.4 – (a) Unité idéalisée de répétition dans l'agarose, extraite de [134]. (b) Monomère du poly(diméthylacrylamide), PDMA. (c) Triton-X100, *n* vaut entre 8 et 10, d'après Sigma-Aldrich.

F.5 Tampons

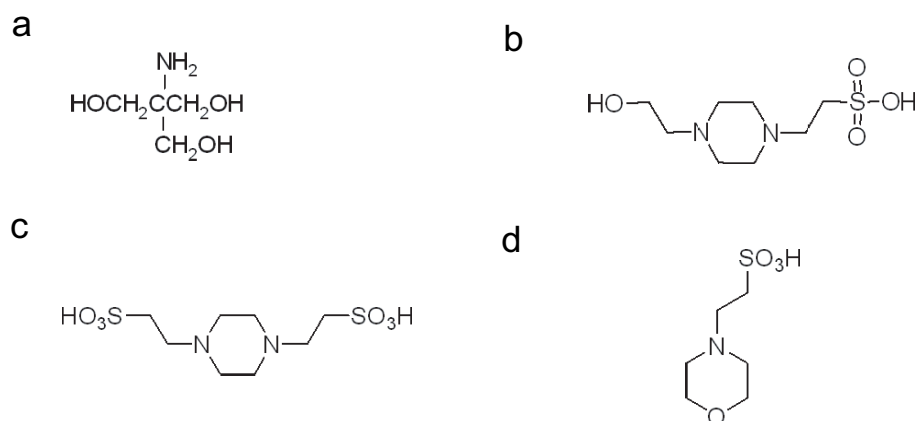


FIG. F.5 – (a) Tris, (b) Hepes, (c) Pipes, (d) Mes. Figures d'après Sigma-Aldrich.

Annexe G

Séquences des oligonucléotides utilisés

Nom	Séquence (5' → 3')
ACA9	CAA ACA AAG
TGT9	CTT TGT TTG
TTT9	CTT TTT TTG
rhgTGT9bio	rhodamine-green-CTT TGT TTG-biotine
rhgTGT9	rhodamine-green-CTT TGT TTG
texTGT9	texas-red-CTT TGT TTG
rhgACA9	rhodamine-green-CAA ACA AAG
rhgTGT11	rhodamine-green-C CTT TGT TTG T
rhgTTT11	rhodamine-green-C CTT TTT TTG T
rhgTGT13	rhodamine-green-TC CTT TGT TTG TG
rhgTTT13	rhodamine-green-TC CTT TTT TTG TG
ACA13	CA CAA ACA AAG GA
TGT13	TC CTT TGT TTG TG
TTT13	TC CTT TTT TTG TG
ACA17	T ACA CAA ACA AAG GAG A
rhgTGT19ch	rhodamine-green-TC CTT TGT TTG TGC GGA GA-cholestéryl
chACA19	cholestéryl-AG AGG C CA CAA ACA AAG GA
chACA _m 19	cholestéryl-AG AGG C CA TAA ACA AAG GA
chACA _M 19	cholestéryl-AG AGG C CA CAA ACC AAG GA
ACA19	AG AGG C CA CAA ACA AAG GA
ACA _m 19	AG AGG C CA TAA ACA AAG GA
ACA _M 19	AG AGG C CA CAA ACC AAG GA
ACA27	TAG TAT TAT CTT ACA CAA ACA AAG GAG
rhgACA27	rhodamine-green-TAG TAT TAT CTT ACA CAA ACA AAG GAG
rhgACA105	TAG TAT TAT CTT ACA CAA ACA AAG GAG AAT AAA ATG AAA ACG ATT AAT CTG AAC GCT GCA GTT AAA ACT AAA TGC TTC AAT GGT AAA TAT GAT GAA ACT ATG TGG

Nom	Séquence (5' → 3')
ACA100	TAG TAT TAT CTT ACA CAA ACA AAG GAG AAT AAA ATG AAA ACG ATT AAT CTG AAC GCT GCA GTT AAA ACT AAA TGC TTC AAT GGT AAA TAT GAT GAA ACT A

Bibliographie

- [1] X. Zhong, P. Garg, C. M. Stith, S. A. N. McElhinny, G. E. Kissling, P. M. J. Burgers, and T. A. Kunkel. The fidelity of DNA synthesis by yeast DNA polymerase zeta alone and with accessory proteins. *Nucl. Acids Res.*, 34 :4731–4742, 2006.
- [2] J. J. Hopfield. Kinetic proofreading : A new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 :4135–4139, 1974.
- [3] J. Ninio. Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie*, 57 :587–595, 1975.
- [4] R. Mallik and S. P. Gross. Molecular motors : Strategies to get along. *Curr. Biol.*, 14 :R971–R982, 2004.
- [5] J. P. Caviston and E. L. F. Holzbaur. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends Cell Biol.*, 16 :530–537, 2006.
- [6] R. D. Astumian. Thermodynamics and kinetics of a brownian motor. *Science*, 276 :917–922, 1997.
- [7] F. Jülicher, A. Ajdari, and J. Prost. Modeling molecular motors. *Rev. Mod. Phys.*, 69 :1269–1281, 1997.
- [8] L. Jullien and A. Lemarchand. Evaluation of the separation efficiency of some processes based on interaction of reactive species with a static, spatially periodic potential. *J. Phys. Chem. B*, 105 :4415–4423, 2001.
- [9] S.K.W. Dertinger, D.T. Chiu, N.L. Jeon, and G.M. Whitesides. Generation of gradients having complex shapes using microfluidic networks. *Anal. Chem.*, 73 :1240–1246, 2001.
- [10] H. Wu, B. Huang, and R.N. Zare. Generation of complex, static solution gradients in microfluidic channels. *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :4194–4195, 2006.
- [11] M. Eigen and L. de Maeyer. Relaxation methods. In S.L. Friess and E.S. Lewis, editors, *Techniques of Organic Chemistry*, volume VIII. John Wiley and Sons, 1963.
- [12] J. E. Leffler and E. Grunwald. *Rates and Equilibria of Organic Reactions as Treated by Statistical, Thermodynamic, and Extrathermodynamic Methods*. Dover, New York, 1989.
- [13] H. Berthoumieux, L. Jullien, and A. Lemarchand. Temporal modulation of a spatially periodic potential for kinetically governed oriented motion. *J. Phys. Chem. B*, 111 :2045–2051, 2007.
- [14] L. Jullien, A. Lemarchand, and H. Lemarchand. Diffusion of reactive species tuned by modulated external fields : Application to high performance chromatography. *J. Chem. Phys.*, 112 :8293–8301, 2000.

- [15] D. Alcor, V. Croquette, L. Jullien, and A. Lemarchand. Molecular sorting by stochastic resonance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 :8276–8280, 2004.
- [16] D. Alcor, J.-F. Allemand, E. Cogné-Laage, V. Croquette, F. Ferrage, L. Jullien, A. Kononov, and A. Lemarchand. Stochastic resonance to control diffusive motion in chemistry. *J. Phys. Chem. B*, 109 :1318–1328, 2005.
- [17] A. Lemarchand and L. Jullien. Symmetry-broken reactant motion upon phase-related symmetrically modulated excitations : application to highly selective molecular sorting. *J. Phys. Chem. A*, 109 :5770–5776, 2005.
- [18] J. D. Watson and F. H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids – a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 :737–738, 1953.
- [19] B. H. Zimm. Theory of "melting" of the helical form in double chains of the DNA type. *J. Phys. Chem.*, 33 :1349–1356, 1960.
- [20] J. Applequist and V. Damle. Thermodynamics of the helix-coil equilibrium in oligoadenylic acid from hypochromicity studies. *J. Am. Chem. Soc.*, 87 :1450–1458, 1965.
- [21] J. Marmur and P. Doty. Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 3 :585–594, 1961.
- [22] C. R. Cantor and P. R. Schimmel. *Biophysical Chemistry*, volume II. Freeman, New York, 1980.
- [23] K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blocker, and L. A. Marky. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83 :3746–3750, 1986.
- [24] J. SantaLucia Jr. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 :1460–1465, 1998.
- [25] P.D. Ross and J. M. Sturtevant. The kinetics of double helix formation from polyriboadenylic acid and polyribouridylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46 :1360–1365, 1960.
- [26] P. D. Ross and J. M. Sturtevant. On the kinetics and mechanism of helix formation : The two stranded poly (A + U) complex from polyriboadenylic acid and polyribouridylic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 84 :4503–4507, 1962.
- [27] N. R. Kallenbach, D. M. Crothers, and R. G. Mortimer. Interpretation of the kinetics of helix formation. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 11 :213–216, 1963.
- [28] D. Pörschke and M. Eigen. Co-operative non-enzymatic base recognition III. kinetics of the helix–coil transition of the oligoribouridylic-oligoriboadenylic acid system and of oligoriboadenylic acid alone at acidic pH. *J. Mol. Biol.*, 62 :361–364, 1971.
- [29] M. E. Craig, D. M. Crothers, and P. Doty. Relaxation kinetics of dimer formation by self complementary oligonucleotides. *J. Mol. Biol.*, 62 :383–392, 1971.
- [30] D. Pörschke, O. C. Uhlenbeck, and F. H. Martin. Thermodynamics and kinetics of the helix-coil transition of oligomers containing GC base pairs. *Biopolymers*, 12 :1313–1335, 1973.
- [31] T. G. Dewey and D. H. Turner. Laser temperature-jump study of stacking in adenylic acid polymers. *Biochemistry*, 18 :5757–5762, 1979.

- [32] S. M. Freier, K. O. Hill, T. G. Dewey, L. A. Marky, K. J. Breslauer, and D. H. Turner. Solvent effects on the kinetics and thermodynamics of stacking in poly(cytidylic acid). *Biochemistry*, 20 :1419–1426, 1981.
- [33] J. W. Nelson and I. Tinoco. Comparison of the kinetics of ribo-, deoxyribo- and hybrid oligonucleotide double-strand formation by temperature-jump kinetics. *Biochemistry*, 21 :5289–5295, 1982.
- [34] A. P. Williams, C. E. Longfellow, S. M. Freier, R. Kierzek, and D. H. Turner. Laser temperature-jump, spectroscopic, and thermodynamic study of salt effects on duplex formation by dGCATGC. *Biochemistry*, 28 :4283–4291, 1989.
- [35] W. H. Braunlin and V. A. Bloomfield. Proton NMR study of the base-pairing reactions of d(GGAATTCC) : salt effects on the equilibria and kinetics of strand association. *Biochemistry*, 30 :754–758, 1991.
- [36] N. Peyret, P. Saro, and J. SantaLucia Jr. Hyther server version 1.0. <http://ozone3.chem.wayne.edu/>. Wayne State University.
- [37] N. Peyret, P. A. Seneviratne, H. T. Allawi, and J. SantaLucia. Nearest-neighbor thermodynamics and NMR of DNA sequences with internal A.A, C.C, G.G, and T.T mismatches. *Biochemistry*, 38 :3468–3477, 1999.
- [38] J. SantaLucia Jr. and D. Hicks. The thermodynamics of DNA structural motifs. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 33 :415–440, 2004.
- [39] R. Owczarzy, Y. You, B.G. Moreira, J.A. Manthey, L. Huang, M.A. Behlke, and J.A. Walder. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers : Improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 43 :3537–3554, 2004.
- [40] C.A.M. Seidel, A. Schulz, and M.H.M. Sauer. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. Nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. *J. Phys. Chem.*, 100 :5541–5553, 1996.
- [41] G. Vamosi, C. Gohlke, and R. M. Clegg. Fluorescence characteristics of 5-carboxytetramethylrhodamine linked covalently to the 5' end of oligonucleotides : multiple conformers of single-stranded and double-stranded dye-dna complexes. *Biophys. J.*, 71(2) :972–994, 1996.
- [42] B. Valeur. *Molecular fluorescence principles and applications*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- [43] F. Aboul-ela, D. Koh, I. Tinoco Jr., and F. H. Martin. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA₃XA₃G + dCT₃YT₃G. *Nucl. Acids Res.*, 13 :4811–4825, 1985.
- [44] S. Ikuta, K. Takagi, R. Bruce Wallace, and K. Itakura. Dissociation kinetics of 19 base paired oligonucleotide-DNA duplexes containing different single mismatched base pairs. *Nucl. Acids Res.*, 15 :797–811, 1987.
- [45] S. Bommarito, N. Peyret, and J. SantaLucia Jr. Thermodynamic parameters for DNA sequences with dangling ends. *Nucl. Acids Res.*, 28 :1929–1934, 2000.
- [46] B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke, and R. Owczarzy. Effects of fluorescent dyes, quenchers, and dangling ends on DNA duplex stability. *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, 327 :473–484, 2005.

- [47] S. A. E. Marras, F. R. Kramer, and S. Tyagi. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes. *Nucl. Acids Res.*, 30 :e122, 2002.
- [48] J. R. Williamson. G-quartet structures in telomeric DNA. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 23 :703–730, 1994.
- [49] M. L. Bleam, C. F. Anderson, and M. T. Record. Relative binding affinities of monovalent cations for double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 :3085–3089, 1980.
- [50] P. Hazel, J. Huppert, S. Balasubramanian, and S. Neidle. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 :16405–16415, 2004.
- [51] G. Bonnet, S. Tyagi, A. Libchaber, and F. R. Kramer. Thermodynamics basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96 :6171–6176, 1999.
- [52] A. Tsourkas, M. A. Behlke, S. D. Rose, and G. Bao. Hybridization kinetics and thermodynamics of molecular beacons. *Nucl. Acids Res.*, 31 :1319–1330, 2003.
- [53] J.-L. Viovy. Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes : Physical mechanisms. *Rev. Mod. Phys.*, 72(3) :813–872, July 2000.
- [54] R. J. Meagher, J.-I. Won, L. C. McCormick, S. Nedelcu, M. M. Bertrand, J. L. Bertram, G. Drouin, A. E. Barron, and G. W. Slater. End-labeled free-solution electrophoresis of DNA. *Electrophoresis*, 26(2) :331–350, 2005.
- [55] B. H. Zimm. Dynamics of polymer molecules in dilute solution : Viscoelasticity, flow birefringence and dielectric loss. *J. Chem. Phys.*, 24 :269–278, 1956.
- [56] M. M. Tirado, C. López Martínez, and J. García de la Torre. Comparison of theories for translational and rotational diffusion coefficients of rod-like macromolecules. Application to short DNA fragments. *J. Chem. Phys.*, 81 :2047–2052, 1984.
- [57] G. S. Manning. Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions. 7. Electrophoretic mobility and conductance. *J. Phys. Chem.*, 85 :1506–1515, 1981.
- [58] C. Desruisseaux, D. Long, G. Drouin, and G.W. Slater. Electrophoresis of composite molecular objects. 1. Relation between friction, charge, and ionic strength in free solution. *Macromolecules*, 34 :44–52, 2001.
- [59] E. Stellwagen, Y.J. Lu, and N.C. Stellwagen. Unified description of electrophoresis and diffusion for DNA and other polyions. *Biochemistry*, 42 :11745–11750, 2003.
- [60] W. Eimer and R. Pecora. Rotational and translational diffusion of short rodlike molecules in solution : Oligonucleotides. *J. Chem. Phys.*, 94 :2324–2329, 1991.
- [61] D.E. Smith, T.T. Perkins, and S. Chu. Dynamical scaling of DNA diffusion coefficients. *Macromolecules*, 29 :1372–1373, 1996.
- [62] M. K. Liu and J. C. Giddings. Separation and measurement of diffusion coefficients of linear and circular DNAs by flow field-flow fractionation. *Macromolecules*, 26 :3576–3588, 1993.
- [63] A. E. Nkodo, J. M. Garnier, B. Tinland, H.i Ren, C. Desruisseaux, L. C. McCormick, G. Drouin, and G. W. Slater. Diffusion coefficient of DNA molecules during free solution electrophoresis. *Electrophoresis*, 22 :2424–2432, 2001.

- [64] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm, and G. Weill. Persistence length of single-stranded DNA. *Macromolecules*, 30 :5763–5765, 1997.
- [65] D.A. Hadden, R.L. Rill, L. McFaddan, and B.R. Locke. Oligonucleotide and water self-diffusion in systems of pluronic triblock copolymers and in buffer solutions by pulsed field gradient nuclear magnetic resonance. *Macromolecules*, 33 :4235–4248, 2000.
- [66] K. Pappaert, J. Biesemans, D. Clicq, S. Vankrunkelsven, and G. Desmet. Measurements of diffusion coefficients in 1-D micro- and nanochannels using shear-driven flows. *Lab Chip*, 5 :1104–1110, 2005.
- [67] N. C. Stellwagen, S. Magnusdottir, C. Gelfi, and P. G. Righetti. Measuring the translational diffusion coefficients of small DNA molecules by capillary electrophoresis. *Biopolymers*, 58 :390–397, 2001.
- [68] E. Stellwagen and N. C. Stellwagen. Determining the electrophoretic mobility and translational diffusion coefficients of DNA molecules in free solution. *Electrophoresis*, 23 :2794–2803, 2002.
- [69] T. Maniatis, A. Jeffrey, and H. Van deSande. Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*, 14 :3787–3794, 1975.
- [70] P. Mayer, G.W. Slater, and G. Drouin. Theory of DNA sequencing using free-solution electrophoresis of protein-DNA complexes. *Anal. Chem.*, 66 :1777, 1994.
- [71] P. Sandström and B. Åkerman. Electrophoretic properties of DNA-modified colloidal gold nanoparticles. *Langmuir*, 20 :4182–4186, 2004.
- [72] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, and K. Sato. Design of an open-tubular column liquid chromatograph using silicon chip technology. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 1 :249–255, 1990.
- [73] D. J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Luedi, and H. M. Widmer. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. *Anal. Chem.*, 64 :1926–1932, 1992.
- [74] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer. Miniaturized total chemical analysis systems : A novel concept for chemical sensing. *Sens. Actuators B*, 1 :244–248, 1990.
- [75] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Anal. Chem.*, 70 :4974–4984, 1998.
- [76] Y. Xia and G. M. Whitesides. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 :550–575, 1998.
- [77] J. C. McDonald and G. M. Whitesides. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Acc. Chem. Res.*, 35 :491–499, 2002.
- [78] C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey. Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices. *Talanta*, 56 :365–373, 2002.
- [79] L.-M. Fu, R.-J. Yang, and G.-B. Lee. Electrokinetic focusing injection methods on microfluidic devices. *Anal. Chem.*, 75 :1905–1910, 2003.

- [80] C.-X. Zhang and A. Manz. High-speed free-flow electrophoresis on chip. *Anal. Chem.*, 75 :5759–5766, 2003.
- [81] B.R. Fonslow and M.T. Bowser. Free-flow electrophoresis on an anodic bonded glass microchip. *Anal. Chem.*, 77(17) :5706–5710, 2005.
- [82] H. Song and R. F. Ismagilov. Millisecond kinetics on a microfluidic chip using nanoliters of reagents. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 :14613–14619, 2003.
- [83] L.R. Huang, J.O. Tegenfeldt, J.J. Kraeft, J.C. Sturm, R.H. Austin, and E.C. Cox. Generation of large-area tunable uniform electric fields in microfluidic arrays for rapid DNA separation. *Int. Elect. Dev. Meet. Tech. Digest*, pages 363–366, 2001.
- [84] David C. Schwartz and Charles R. Cantor. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 37(1) :67–75, May 1984.
- [85] L. R. Huang, J. O. Tegenfeldt, J. J. Kraeft, J. C. Sturm, R. H. Austin, and E. C. Cox. A DNA prism for high-speed continuous fractionation of large DNA molecules. *Nat. Biotechnol.*, 20 :1048–1051, 2002.
- [86] A. Manz and J. C. T. Eijkel. Miniaturization and chip technology. what can we expect? *Pure Appl. Chem.*, 73 :1555–1561, 2001.
- [87] C.Y. Hui, A. Jagota, Y.Y. Lin, and E.J. Kramer. Constraints on microcontact printing imposed by stamp deformation. *Langmuir*, 18 :1394–1407, 2002.
- [88] T. Gervais, J. El-Ali, A. Güntherb, and K. F. Jensen. Flow-induced deformation of shallow microfluidic channels. *Lab Chip*, 6 :500–507, 2006.
- [89] T. Ito, A. Inoue, K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda. Autonomous polymer loading and sample injection for microchip electrophoresis. *Anal. Chem.*, 77 :4759–4764, 2005.
- [90] J. Goulpeau (ESPCI). Communication personnelle. Octobre 2005.
- [91] J. Horvath and V. Dolník. Polymer wall coatings for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 22 :644–655, 2001.
- [92] S. Hjerten. High-performance electrophoresis : Elimination of electroendosmosis and solute adsorption. *J. Chrom. A*, 347 :191–198, 1985.
- [93] H. Makamba, J. H. Kim, K. Lim, N. Park, and J. H. Hahn. Surface modification of poly(dimethylsiloxane) microchannels. *Electrophoresis*, 24 :3607–3619, 2003.
- [94] V. Barbier, B. A. Buchholz, A. E. Barron, and J.-L. Viovy. Comb-like copolymers as self-coating, low-viscosity and high-resolution matrices for DNA sequencing. *Electrophoresis*, 23 :1441–1449, 2002.
- [95] V. Barbier and J.-L. Viovy. Advanced polymers for DNA separation. *Curr. Op. Biotechnol.*, 14 :51–57, 2003.
- [96] G. Ocirk, M. Munroe, T. Tang, R. Oleschuk, K. Westra, and D. J. Harrison. Electrokinetic control of fluid flow in native poly(dimethylsiloxane) capillary electrophoresis devices. *Electrophoresis*, 21 :107–115, 2000.
- [97] Y. Luo, B. Huang, H. Wu, and R.N. Zare. Controlling electroosmotic flow in poly(dimethylsiloxane) separation channels by means of prepolymer additives. *Anal. Chem.*, 78 :4588–4592, 2006.

- [98] M. Kurata and Y. Tsunashima. Polymer handbook. pages VII/1–VII/46. John Wiley and Sons, New York, 1989.
- [99] C. Heller. Separation of double-stranded and single-stranded DNA in polymer solutions : I. mobility and separation mechanism. *Electrophoresis*, 20 :1962–1976, 1999.
- [100] C. S. Johnson Jr. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy : principles and applications. *Prog. NMR Spectros.*, 34 :203–256, 1999.
- [101] O. Krichevsky and G. Bonnet. Fluorescence correlation spectroscopy : the technique and its applications. *Rep. Prog. Phys.*, 65 :251–297, 2002.
- [102] D. Axelrod, D. E. Koppel, J. Schlessinger, E. Elson, and W. W. Webb. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys. J.*, 16 :1055–1069, 1976.
- [103] J. Davoust, P. F. Devaux, and L. Leger. Fringe pattern photobleaching, a new method for the measurement of transport coefficients of biological macromolecules. *EMBO J.*, 1 :1233–1238, 1982.
- [104] G. I. Taylor. Dispersion of soluble matter in solvent flowing slowly through a tube. *Proc. R. Soc. A*, 219 :186, 1953.
- [105] G.I. Taylor. Conditions under which dispersion of a solute in a stream of solvent can be used to measure molecular diffusion. *Proc. R. Soc. A*, 225 :473, 1954.
- [106] R. Aris. On the dispersion of a solute in a fluid flowing through a tube. *Proc. R. Soc. A*, 235 :67, 1956.
- [107] M.S. Bello, R. Rezzonico, and P.G. Righetti. Use of Taylor-Aris dispersion for measurement of a solute diffusion-coefficient in thin capillaries. *Science*, 266 :773–776, 1994.
- [108] A. Ajdari, N. Bontoux, and H.A. Stone. Hydrodynamic dispersion in shallow microchannels : the effect of cross-sectional shape. *Anal. Chem.*, 78(2) :387–392, 2006.
- [109] D. Clicq, K. Pappaert, S. Vankrunkelsven, N. Vervoort, G. V. Baron, and G. Desmet. Shear-driven flow approaches to LC and macromolecular separations. *Anal. Chem.*, 76 :430A–438A, 2004.
- [110] A. E. Kamholz, E. A. Schilling, and P. Yager. Optical measurement of transverse molecular diffusion in a microchannel. *Biophys. J.*, 80 :1967–1972, 2001.
- [111] A. E. Kamholz, B. H. Weigl, B. A. Finlayson, and P. Yager. Quantitative analysis of molecular interaction in a microfluidic channel : the T-sensor. *Anal. Chem.*, 71 :5340–5347, 1999.
- [112] A. Hatch, A. E. Kamholz, K. R. Hawkins, M. S. Munson, E. A. Schilling, B. H. Weigl, and P. Yager. A rapid diffusion immunoassay in a T-sensor. *Nat. Biotechnol.*, 19 :461–465, 2001.
- [113] J.-B. Salmon, C. Dubrocq, P. Tabeling, S. Charier, D. Alcor, L. Jullien, and F. Ferrage. An approach to extract rate constants from reaction–diffusion dynamics in a microchannel. *Anal. Chem.*, 77 :3417–3424, 2005.
- [114] É. Guyon, J.-P. Hulin, and L. Petit. *Hydrodynamique physique*. EDP Sciences, Paris, 2001.
- [115] J. Crank. *The mathematics of diffusion*. Clarendon Press, Oxford, 1957.

- [116] D. A. Beard. Taylor dispersion of a solute in a microfluidic channel. *J. Appl. Phys.*, 89 :4667–4669, 2001.
- [117] R. F. Ismagilov, A. D. Stroock, P. J. A. Kenis, G. Whitesides, and H. A. Stone. Experimental and theoretical scaling laws for transverse diffusive broadening in two-phase laminar flows in microchannels. *Appl. Phys. Lett.*, 76 :2376–2378, 2000.
- [118] A. E. Kamholz and P. Yager. Theoretical analysis of molecular diffusion in pressure-driven laminar flow in microfluidic channels. *Biophys. J.*, 80 :155–160, 2001.
- [119] J. Perrin. *Les atomes*. Flammarion, Paris, 1991.
- [120] K. J. Mysels. Electrodiffusion : A fluctuation method for measuring reaction rates. *J. Chem. Phys.*, 24 :371–375, 1956.
- [121] J. C. Giddings. Kinetic model for chromatographic dispersion and electrodiffusion. *J. Phys. Chem.*, 26 :1755–1756, 1957.
- [122] T. A. Bak and W. G. Kauman. Contribution to the theory of electrodiffusion. *J. Chem. Phys.*, 28 :509–510, 1958.
- [123] T.A. Bak and W.G. Kauman. Theory of electrodiffusion. *Trans. Faraday Soc.*, 55 :1109–1121, 1959.
- [124] P. C. Scholten and Karol J. Mysels. Random walk theory of electrodiffusion. *Trans. Faraday Soc.*, 56 :994–1000, 1960.
- [125] P. C. Scholten and Karol J. Mysels. Macrosopic theory of electrodiffusion. *Trans. Faraday Soc.*, 57 :764–772, 1961.
- [126] M. M. Breuer. Method for studying chemical interactions of electrolytes by evaluation of the electrophoretic boundary patterns obtained with alternating electric fields. *Trans. Faraday Soc.*, 58 :1008–1018, 1962.
- [127] M.M. Breuer. Isotope separation by electrodiffusion. *Nature*, 194 :281–282, 1962.
- [128] P. C. Scholten and Karol J. Mysels. Measurement of electrodiffusion. effect of electrosmosis on diffusion. *J. Chem. Phys.*, 35 :1845–1848, 1961.
- [129] K. F. Bowden. Horizontal mixing in the sea due to a shearing current. *J. Fluid Mech.*, 21 :83–95, 1965.
- [130] P. C. Chatwin. On the longitudinal dispersion of passive contaminant in oscillatory flows in tubes. *J. Fluid Mech.*, 71 :513–527, 1975.
- [131] C. Van den Broeck. Taylor dispersion revisited. *Physica A : Statistical and Theoretical Physics*, 168 :677–696, 1990.
- [132] I. Claes and C. Van den Broeck. Stochastic resonance for dispersion in oscillatory flows. *Phys. Rev. A*, 44 :4970–4977, 1991.
- [133] Philippe Belmont, Jean Francois Constant, and Martine Demeunynck. Nucleic acid conformation diversity : from structure to function and regulation . *Chemical Society Reviews*, 30(1) :70–81, 2001.
- [134] J.-Y. Xiong, J. Narayanan, X.-Y. Liu, T.K. Chong, S.B. Chen, and T.-S. Chung. Topology evolution and gelation mechanism of agarose gel. *J. Phys. Chem. B*, 109(12) :5638–5643, 2005.

Un microlaboratoire électrophorétique pour l'étude du couplage entre transport et cinétique chimique

Nous avons développé un microlaboratoire pour étudier la diffusion et son couplage avec la réaction chimique. Il est constitué d'une chambre d'analyse dans laquelle on peut appliquer des champs électriques en deux dimensions pour obtenir des profils de concentration stationnaires ou non-stationnaires. La simplicité spatiale du flux électrophorétique utilisé permet d'appliquer systématiquement une analyse dans l'espace de Fourier. Ce traitement fournit le coefficient de diffusion d'un analyte pur ainsi que la constante thermodynamique et les constantes cinétiques d'un mélange réactif. Dans le but de développer des techniques de séparation reposant sur la cinétique, nous avons étudié la réaction d'hybridation entre deux brins d'ADN et constitué une banque d'oligonucléotides avec des constantes cinétiques variées. Ces études nous ont mené à développer, en collaboration avec le Museum National d'Histoire Naturelle, une sonde oligonucléotidique fluorescente à motif quadruplex permettant une discrimination cinétique lorsqu'elle s'hybride avec une séquence parfaitement complémentaire ou mésappariée.

Mots clés : oligonucléotide, microfluidique, PDMS, hybridation, diffusion, cinétique

An electrophoretic microlaboratory to study the coupling between transport and chemical kinetics

We have fabricated a microlaboratory to study diffusion and its coupling with a chemical reaction. It is composed by an analysis chamber in which electric fields in two dimensions can be applied to yield stationary and non-stationary concentration profiles. The spatial simplicity of the electrophoretic flux used allows to systematically analyze data in the Fourier space. This treatment yields diffusion coefficients of a pure analyte and thermodynamic and kinetic constants of a reacting mixture. In the scope of developing separation techniques based on kinetics, we have studied the hybridization reaction between DNA oligonucleotides with a wide range of kinetic constants. These studies made us to develop, in collaboration with the Museum National d'Histoire Naturelle, a quadruplex-based molecular beacon that allows a kinetic discrimination when it hybridizes to a matched or a mismatched sequence.

Key words : oligonucleotide, microfluidics, PDMS, hybridization, diffusion, kinetics