Université Joseph Fourier
Grenoble I – Sciences, Technologie, Santé

THÈSE

Présentée par

Nabil DENDANE

Pour l'obtention du titre de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Spécialité : Chimie-Biologie

Mise au point d'une méthode de fonctionnalisation de microcomposants par voie photochimique

---

Soutenance prévue le vendredi 14 décembre 2007

Mme. Carole CHAIX Rapporteur
Mr. Oleg MELNYK Rapporteur
Mr. Gérard LANNEAU Examinateur
Mr. Eric PEYRIN Examinateur
Mme. Françoise VINET Examinateur
Mr. Pascal DUMY Examinateur
Mr. Eric DEFRANCQ Directeur de thèse
Thèse préparée au sein du

Département de Chimie Moléculaire, DCM – UJF / CNRS
Et du
Laboratoire d'Electronique et de Technologies de l'Information – LETI – CEA Grenoble

SOMMAIRE

SOMMAIRE **1**

ABREVIATIONS **9**

INTRODUCTION **11**

I. HISTORIQUE **12**

II. CONCEPTION D'UNE BIOPUCE **14**

II. 1. CHOIX DU SUPPORT 14

II. 2. AGENT DE COUPLAGE 15

III. LES SONDES ET LEUR ACCROCHAGE **15**

III. 1. PREPARATION DE PUCES A ADN 15

III. 1. 1. Immobilisation des sondes pré-synthétisée *18*

III. 1. 1. 1. Adressage Mécanique 18

III. 1. 1. 1. 1. Greffage non covalent 19

III. 1. 1. 1. 2. Greffage covalent 21

III. 1. 1. 2. Adressage électrochimique 24

III. 1. 2. Synthèse in situ *27*

III. 1. 2. 1.Lumière ou photolithographie 27

III. 1. 2. 2. Electrochimie 29

III. 1. 2. 3.Impression (Ink-jet) 30

III. 2. PREPARATION DE PUCES A PEPTIDES 31

III. 2. 1. Immobilisation des sondes pré-synthétisées *32*

III. 2. 1. 1. Greffage non covalent 32

III. 2. 1. 1. Greffage covalent 32

III. 2. 2. Synthèse in situ *35*

III. 2. 2. 1. Synthèse en SPOT ou « SPOT synthesis » 35

III. 2. 2. 2. Photolithographie 36

III. 3. PREPARATION DE PUCES A SUCRES 37
III. 3. 1. Greffage non covalent *38*
III. 3. 2. Greffage covalent *38*

IV. TECHNIQUE DE DETECTION ET D'ANALYSE SUR PUCES 41

IV. 1. METHODES DE DETECTION AVEC TRACEUR 41
IV. 1. 1. Détection par fluorescence *41*
IV. 1. 2. Détection par radioactivité *42*
IV. 1. 3. Détection par les enzymes *42*
IV. 1. 3. Détection par les nanoparticules "quantum dot" *43*
IV. 2. METHODES DE DETECTION SANS TRACEUR 43
IV. 2. 1. La microbalance à quartz *43*
IV. 2. 2. La résonance plasmonique de surface *43*
IV. 2. 3. La technique Sarfus *44*
IV. 2. 4. La microscopie à force atomique *44*

V. OBJECTIF 45

V. 1. TRAVAUX ANTERIEURS 48
V. 2. TRAVAUX ANTERIEURS DU LABORATOIRE 49
V. 3. NOTRE APPROCHE D'ADRESSAGE PHOTOCHIMIQUE 53
V. 3. 1. Choix du groupe photoactivable *54*
V. 3. 2. Stratégies envisagées *57*
V. 3. 3. Plan de travail *59*

BIBLIOGRAPHIE 60

CHAPITRE I : SYNTHESE DES "SYNTHONS OXYAMINE PHOTOACTIVABLES" ET OLIGONUCLEOTIDES 76

I. SYNTHESE DES SYNTHONS OXYAMINE PHOTOACTIVABLES 77

I. 1. SYNTHESE DES DERIVES ESTERS ACTIVES 77
I. 1. 1. Protection de la fonction oxyamine *78*
I. 1. 2. Activation de la fonction acide carboxylique *78*
I. 2. SYNTHESE DU DERIVE PHOSPHORAMIDITE 79
I. 2. 1. Introduction de l'oxyamine *80*
I. 2. 2. Tritylation *80*
I. 2. 3. Hydrazinolyse *80*
I. 2. 4. Protection de l'oxyamine *81*
I. 2. 5. Détritylation *81*
I. 2. 6. Phosphitylation *81*
I. 3. SYNTHESE DES ORGANOSILANES 82
I. 3. 1. Synthèse du synthon à chaîne courte (C_3) *82*
I. 3. 1. 1. Protection de l'oxyamine 82
I. 3. 1. 2. Hydrosilylation 83
I. 3. 2. Synthèse du synthon silane à chaîne longue (C_{11}) *83*
I. 3. 2. 1. Introduction de l'oxyamine 83
I. 3. 2. 2. Hydrazinolyse 84
I. 3. 2. 3. Protection de l'oxyamine 84
I. 3. 2. 4. Hydrosilylation 84

II. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES 85

II. 1. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES PORTEURS DE LA FONCTION ALDEHYDIQUE EN 5' . 85
II. 1. 1. Synthèse automatisée *86*
II. 1. 2. Déprotection de l'extrémité 5' *87*
II. 1. 3. Oxydation de la fonction 1,2-diol *87*
II. 2. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES PORTEURS DE LA FONCTION ALDEHYDIQUE EN 3' . 88
II. 2. 1. Synthèse automatisée *89*
II. 2. 2. Déprotection de l'extrémité 5' *89*
II. 2. 3. Oxydation de la fonction diol *90*

PARTIE EXPÉRIMENTALE 91

BIBLIOGRAPHIE 106

CHAPITRE II : PREPARATION DES SURFACES OXYAMINE PHOTOACTIVABLES 108

I. LA SURFACE DE SILICE : GENERALITES 109

I. 1. NATURE PHYSIQUE DE LA SURFACE 109
I. 2. DENSITE DES GROUPEMENTS HYDROXYLES 110
I. 3. MODIFICATION CHIMIQUE DE LA SURFACE 110
I. 3. 1. Réaction de silanisation *111*
I. 3. 2. Les groupements hydrolysables *112*
I. 3. 3. Longueur de la chaîne carbonée *112*
I. 3. 4. Nature du solvant *112*
I. 3. 5. Température de greffage *113*
I. 3. 6. Temps de greffage *113*

II. FONCTIONNALISATION DE SURFACE 113

II. 1. APPROCHE VIA LES ESTERS ACTIVES 114
II. 1. 1. Format plan *114*
II. 1. 1. 1. Réhydratation de la surface 115
II. 1. 1. 2. Silanisation 115
II. 1. 1. 3. Couplage 116
II. 1. 1. 4. Photodéprotection 117
II. 1. 1. 5. Immobilisation des oligonucléotides 118
II. 1. 1. 6. Hybridation 118
II. 1. 1. 7. Résultats 119
II. 1. 2. Format capillaire *120*
II. 1. 2. 1. Résultats 121
II. 1. 3. Conclusion sur l'approche "ester activé" *122*
II. 2. APPROCHE VIA LE PHOSPHORAMIDITE 122
II. 3. APPROCHE VIA LES ORGANOSILANES 124

II. 3. 1. Choix des organosilanes *124*
II. 3. 2. Format plan *124*
II. 3. 2. 1. Optimisation de la silanisation 125
II. 3. 2. 2. Optimisation de la photodéprotection..... 132
II. 3. 2. 3. Optimisation de l'immobilisation 135
Figure 27 : Immobilisation de l'oligonucléotide aldéhyde séquence 1..... 135
II. 3. 2. 4. Etudes de la sensibilité 139
II. 3. 3. Format capillaire *140*
II. 3. 4. Caractérisation de la surface oxyamine photoactivable *151*
II. 3. 4. 1. Angle de contact 151
II. 3. 4. 2. La Spectroscopie Infrarouge en Réflexion Interne Multiple (MIR-FTIR) 152
II. 3. 4. 3. Microscopie à Force Atomique (AFM) 153
II. 3. 4. 4. Ellipsométrie spectroscopique 154

III. APPLICATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR L'ADRESSAGE DE TROIS OLIGONUCLEOTIDES 155

III. 1. PRINCIPE DE L'ADRESSAGE DES OLIGONUCLEOTIDES 156
III. 2. RESULTATS EXPERIMENTAUX 156

PARTIE EXPÉRIMENTALE 158

BIBLIOGRAPHIE 162

CHAPITRE III : UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR D'AUTRES APPLICATIONS 167

I. UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR L'ADRESSAGE DE SUCRES 168

I. 1. STRATEGIES DU GREFFAGE DES SUCRES 168
I. 2. CHOIX DES SUCRES 168

I. 2. 1. Mannose *169*
I. 2. 2. Glycosaminoglycanes *170*
I. 3. RESULTATS 170

II. UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOACTIVABLE POUR L'ADRESSAGE DE PEPTIDES 174

II. 1. STRATEGIES DU GREFFAGE DES PEPTIDES 174
II.2. CHOIX DU PEPTIDE 174
II. 3. RESULTATS 175

III. UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR L'ADRESSAGE DE SURFACES HYDROPHOBE-HYDROPHILE 176

III. 1. STRATEGIES DU GREFFAGE 176
III. 2. CHOIX DES MOLECULES 177
III. 3. RESULTATS 177
III. 3. 1. Immobilisation du tridécanal ou du pentafluorobenzaldéhyde *177*
III. 3. 2 Immobilisation du polyéthylène glycol (PEG) *178*
III. 3. 3. Intégration de la surface hydrophile dans le protocole d'immobilisation *179*
III. 3. 4. Utilisation de la surface hydrophile pour l'élimination des interactions non spécifiques *180*

IV. CONCLUSION 181

PARTIE EXPÉRIMENTALE 182

BIBLIOGRAPHIE 188

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 191

ANNEXES 196

ANGLE DE CONTACT 197
LA SPECTROSCOPIE INFRAROUGE EN REFLEXION INTERNE MULTIPLE (MIR-FTIR) 199
MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE (AFM) 200
ELLIPSOMETRIE 202

ARTICLE 205

ABREVIATIONS

ADN : **A**cide **D**ésoxyribo**N**ucléotide

AFM : **M**icroscopie à **F**orce **A**tomique (ou **A**tomic **F**orce **M**icroscopy)

BSA : **B**ovin **s**erum **a**lbumin

Cy3 : **Cy**anine 3

Cy5 : **Cy**anine 5

CLHP : **C**hromatographie **L**iquide **H**aute **P**erformance

DCC : **D**i**C**ylohexyl**C**arbodiimide

DCI : **D**esorption **C**hemical **I**onisation

DCM : **Di**chloro**m**éthane

DIEA : **Di**isopropyl**é**thyl**a**mine

ESI : **E**lectro**S**pray **I**onisation

Fmoc : 9-**F**luorényl**m**éthyl**o**xy**c**arbonyl

FITC : Fluorosceine

MIR-FTIR : **S**pectroscopie **I**nfra**R**ouge en **R**éflexion **I**nterne **M**ultiple (ou : **M**ultiple **I**nternal **R**eflexion **F**ourier **T**ransformed **I**nfra**R**ed **S**pectroscopy)

NHS : *N*-Hydroxysuccinimide

NPPOC : 2-(2-**n**itrophényl)**p**ro**p**yloxy**c**arbonyl

ODN : **O**ligo**d**ésoxy**n**ucléotide

OTS : **O**ctadécyl**t**richloro**s**ilane

PBS : **P**hosphate **B**uffered **S**aline

PEG : **P**oly**é**thylène **g**lycol

PFP : **P**enta**f**luoro**p**hénol

PyBOP : (**B**enzotriazol-1-yl**o**xy)tris(**py**rrolidino)**p**hosphonium hexafluorophosphate

SAMs : **S**elf-**A**ssembled-**M**onolayer**s**

SDS : **S**odium **D**odecyl **S**ulfate

SPPS : **S**ynthèse **pep**tidique sur support **s**olide

SSC : **S**aline **S**odium **C**itrate

Rdt : **R**en**d**emen**t**

RMN : **R**ésonance **M**agnétique **N**ucléaire

tBu : **T**ertio**bu**tyle

TFA : **A**cide **Tri**fluoroacétique

UV : **U**ltra-**V**iolet

INTRODUCTION

I. HISTORIQUE

En 1953, l'américain James Watson et l'anglais Francis Crick, font l'une des découvertes scientifiques les plus célèbres de l'histoire : l'élucidation de la structure spatiale de la molécule d'ADN[1]. Grâce aux résultats cristallographiques obtenus, les deux chercheurs établissent que l'ADN est formé de deux brins complémentaires antiparallèles qui s'enroulent en une double hélice. Par ailleurs, la complémentarité des deux brins fonde une propriété fascinante de l'ADN. Lorsqu'on chauffe une solution d'ADN au delà d'une certaine température (qui dépend de la proportion en paires de bases G-C), les deux brins se dissocient : on parle de dénaturation de l'ADN. Si l'on refroidit ensuite progressivement la solution, les deux brins peuvent se réassocier, "s'hybrider" par le retour en vis-à-vis des séquences complémentaires.

En 1975, Edwin M. Southern[2] met au point une technique basée sur le phénomène d'hybridation appelée Southern Blot. Le Southern Blot est une technique permettant de transférer sur un support solide (membrane de nylon), des fragments d'ADN digérés par une enzyme de restriction et séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Le "blot" ainsi obtenu peut être hybridé à l'aide d'une sonde marquée (par un radio-isotope) qui permettra de repérer les fragments complémentaires.

Dans les années 1970, les progrès des techniques du génie génétique tels que : les enzymes bactériennes capables de copier l'ADN, d'autres capables de le couper en des sites précis, d'autres enzymes encore capables de recoller les segments obtenus, la PCR (pour Polymerase Chain Reaction) et d'autre, ont permit le développement des techniques de séquençages de génome par les méthodes de Sanger et de Maxam-Gilbert. Ces méthodes impliquent un grand nombre de manipulations lourdes et demandent un temps considérable.

Au cours des années 1980, les premiers génomes séquencés sont ceux, modestes, de virus qui comporte 5386 bases. Face à la demande de séquençage de génome de plus en plus grand, d'autres techniques ont vus le jour.

En 1989, Mirzabekov et *al*[3] propose une méthode de séquençage de l'ADN basée sur l'hybridation d'un fragment d'ADN en présence de milliers d'autres brins d'ADN de séquence connue (SbH pour Sequencing by Hybridation) qui seraient immobilisés individuellement sur matrice 2-D (couche de poly-acrylamide activé). En même temps, Dramnac et *al*[4] proposent une autre méthode de séquençage par hybridation dans laquelle le fragment d'ADN à déterminer est immobilisé.

En 1991, Fodor et *al*[5] de la société Affimetrix parviennent à développer une technique permettant de synthétiser *in situ* des séquences peptidiques sur support solide. La méthode gouvernait les réactions par des irradiations successives de différentes régions de la lame assurant ainsi l'activation de réactifs photosensibles. Cela autorisait l'application de cette méthode pour la synthèse de nombreux oligonucléotides différents sur la même lame grâce à l'emploi de masques aux dimensions définies[6]. Cette méthode, proche de celles employées pour la fabrication des microprocesseurs, bénéficia pleinement des connaissances accumulées et de l'infrastructure mise en place par l'industrie de la microélectronique. Elle déboucha rapidement sur des « puces à oligonucléotides » comportant, sur une surface de l'ordre du centimètre carré, plusieurs dizaines de milliers de plots portant chacun quelques millions d'exemplaires d'un oligonucléotide de séquence définie à l'avance. Ces puces étaient au départ conçues pour effectuer un « quasi-séquençage », en fait une détection de mutation sur des gènes déjà connus. Le procédé sera un peu plus tard adapté à la mesure d'expression.

Durant la même période, grâce aux avancées des techniques de séquençage, la communauté scientifique démarre le projet ambitieux de séquencer la totalité du génome humain (HGP : Human Genom Project) lequel sera fini en avril 2003 avec deux ans d'avance.

L'avènement des puces à ADN a incité les chercheurs à développer d'autres puces telles que les puces à peptides, sucres, protéines et cellules. Ces types de biopuces, en permettant la détection et/ou l'analyse rapide et multiparamétriques ont de nombreuses applications :

- Puce à peptides : impliqué dans l'identification des zones d'interaction protéine-protéine ou anticorps-antigènes[7].
- Puce à sucres : détection et caractérisation des spécificités d'interaction entre protéines et sucres en prenant pour exemple des molécules d'intérêt médicale[8].
- Puce à protéines : interaction protéines-protéines[9], protéines-peptides[10], protéines-phospholipides[11], protéines-cellules[12].
- Puce à cellules : Le plus souvent, les études portent sur un seul type cellulaire dédiées à une analyse fonctionnelle[13].

Plus récemment, les recherches se sont orientées vers la conception de laboratoires sur puces "Lab on a Chip" intégrant les différentes étapes successives d'analyse d'un échantillon. Ceux sont des laboratoires miniaturisés à la réalisation d'analyse automatisée, sur de petits volumes, et dans certains cas à très haut débit. Ils permettront d'abaisser le coût de l'analyse. Ils incorporent des transports de fluides ainsi que des étapes de réactions enzymatiques. Une des premières applications des laboratoires sur puces est l'électrophorèse microcapillaire

permettant la séparation d'oligonucléotides, ou de fragments d'ADN[14]. Plus récemment, des micro-dispositifs ont été utilisés pour le génotypage dans des expériences de criblage de maladies héréditaires[15], ou dans des analyses en médecine légale[16].

II. CONCEPTION D'UNE BIOPUCE

La conception d'une biopuce est une étape très délicate. En effet, les biopuces peuvent être divisées en trois grandes parties : le support ou substrat, la sonde sur laquelle va venir s'associer la cible, et l'agent de couplage qui va permettre de relier les deux premières parties entre elles. La conception passe par la parfaite maîtrise de ces trois paramètres (Figure 1).

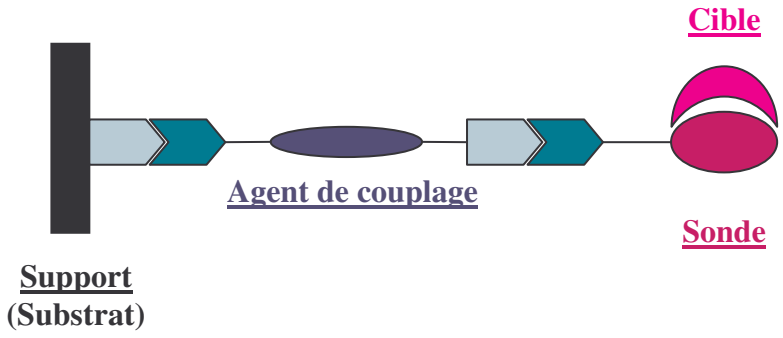


Figure 1 : Schéma d'une biopuce

II. 1. Choix du support

De nombreux substrats existent et sont utilisés pour la préparation de biopuces. On trouve :

- **Le mica** constitue, après clivage, un substrat parfaitement plan[17, 18]. Cependant, le mica présente en surface une distribution de charge K^+ qui rend la surface très sensible à la pollution par tous les contaminants présents dans l'atmosphère proche du substrat.
- **Les polymères** sont à la base des techniques développées par les société CIS Bio-international et bioMérieux qui utilisent le dépôt du polypyrrole, et par les équipes de Mirzabekov et *al*[3] et de Matson et *al*[19] qui utilisent respectivement un polymère acrylique et le polypropylène.
- **Les métaux** tel qu'une surface d'or[20-22], elle présente un mouillage très difficile.
- **Les substrats de type silice** sont très appréciés car d'une part, de nombreuses surfaces siliciées[23-26] ou analogues sont utilisables (verres, oxyde métalliques, etc…), et d'autre

part des matériaux de très faible rugosité à l'échelle atomique peuvent être obtenus à partir de surfaces planes de silicium monocristallin appelés "wafers". De plus, la silice présente de grandes possibilités de fonctionnalisation avec des agents de couplage de type silane.

II. 2. Agent de couplage

L'immobilisation de biomolécules sur support est certainement l'une des voies qui a suscité le plus grand nombre de travaux de recherche. En effet, la réalisation d'une fixation, stable en milieu aqueux, et présentant une bonne tenue en température et dans le temps, confère aux puces une grande résistance de leur structure aux rinçages. Les puces ainsi élaborées sont donc réutilisables, ce qui constitue un avantage certain du point de vue commercial.

L'immobilisation entre la sonde et le support inorganique est renforcée par l'utilisation de réactifs bifonctionnels appelés aussi agents de couplage qui vont rendre compatibles les deux phases interagissantes, malgré leurs différences physiques et chimiques, en formant une liaison covalente ou pas entre elles. Deux liaisons stables doivent donc être établies : la première entre l'agent de couplage et le substrat (fonction thiol pour les substrats en or, fonctions silylées pour les substrats de silice : lame de verre, wafer de silicium ou par simple revêtement), la seconde entre les groupements terminaux des molécules du substrat et la biomolécule (modifié ou non par une fonction complémentaire aux groupements terminaux).

III. LES SONDES ET LEUR ACCROCHAGE

III. 1. Préparation de puces à ADN

L'acide désoxyribonucléique (ADN), dont la structure a été proposé par Watson et Crick[1] en 1953, est le support de l'information génétique. Il est constitué de deux chaînes polynucléotidiques qui s'apparient l'une à l'autre de façon antiparallèle, pour former une double hélice. Chaque chaîne est constituée de quatre nucléosides différents (2'-désoxyadénosine, 2'-désoxyguanosine, 2'-désoxycytidine et thymidine) liés entre eux par des liaisons phosphodiesters. Les interactions hydrophobes dues à l'empilement des bases nucléiques et les liaisons hydrogènes entre les bases complémentaires (adénine-thymine et guanine-cytosine) stabilisent la structure secondaire de l'ADN (Figure 2). L'ordre dans lequel se succèdent les bases nucléiques constitue le code génétique qui détermine la structure des protéines, essentielles au bon fonctionnement cellulaire.

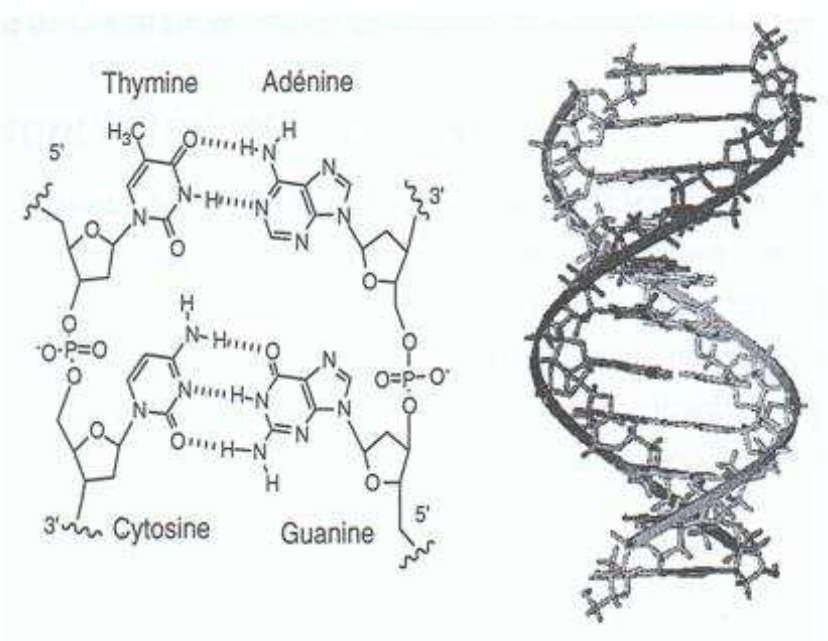


Figure 2 : Structure de l'ADN B.

Le principe de puce ADN est basé sur le processus d'hybridation entre la séquence cible que l'on veut détecter et sa séquence complémentaire synthétisée par voie chimique ou enzymatique (Figure 3). Cette séquence complémentaire de l'acide nucléique à détecter est appelée sonde nucléique. Grâce aux programmes de séquençage du génome des organismes vivants, il est possible de caractériser les fragments d'ADN spécifiques d'un organisme, et donc de développer un test basé sur cette séquence unique. L'analyse des banques de données d'ADN permet de cibler la séquence à détecter et de choisir la sonde nucléique capable de reconnaître spécifiquement sa cible. Ainsi, des sondes oligonucléotidiques immobilisées sur un support solide, peuvent s'hybrider avec des cibles préparées à partir d'ARNm extraits d'un tissu ou d'un type cellulaire que l'on cherche à étudier. Par exemple, ce principe a été appliqué chez la levure pour réaliser des analyses phénotypiques systématiques sur la collection de mutants de délétion construite en 1999 par un consortium international[27].

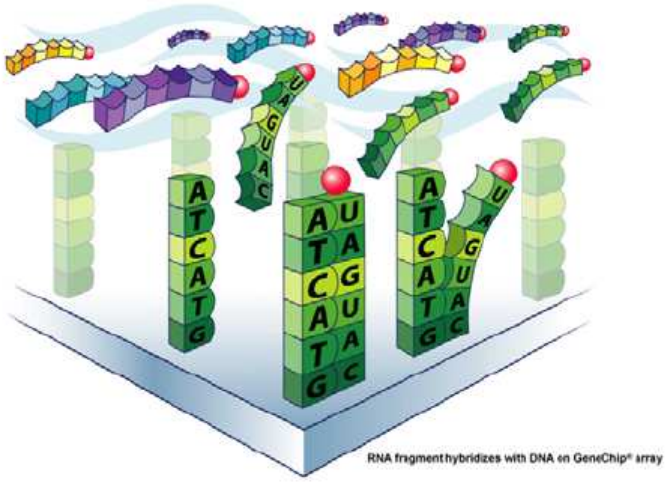


Figure 3 : Principe de puce ADN (image Affimetrix).

La puce à ADN est constituée par une multitude de sondes oligonucléotidiques, précisément organisées sur un support solide miniaturisé (Figure 4). La puce contient l'ensemble des séquences des cibles à détecter. La taille des sondes est généralement comprise entre 17 et 20 bases.

Cette technologie est devenu durant la dernière décennie un outil très important dans l'analyse de l'expression des gènes[28], diagnostic des maladies (détection de mutation)[29] et le séquençage de l'ADN[30] etc.

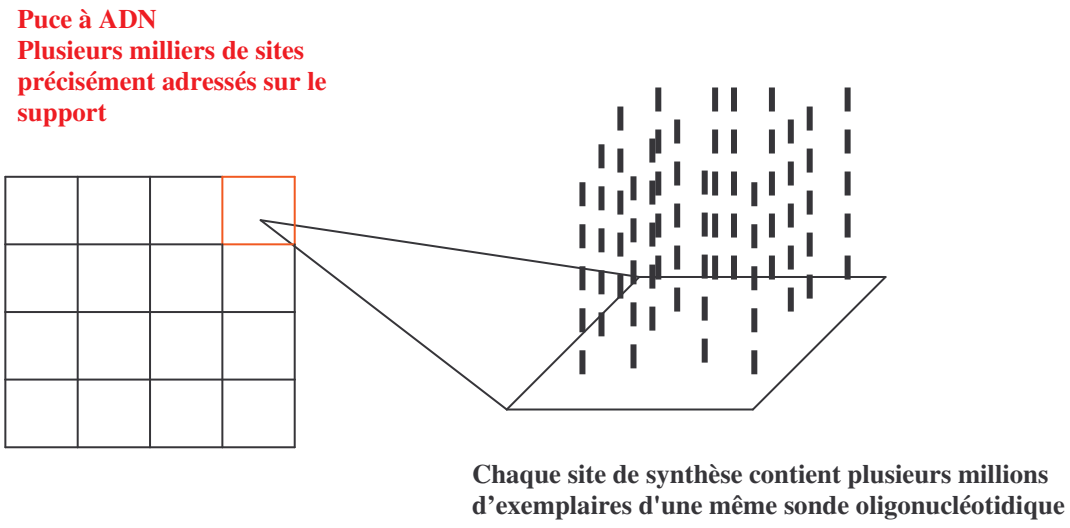


Figure 4 : Schéma d'une puce à ADN.

L'objectif dans la fabrication d'une puce est d'obtenir le nombre le plus élevé de sondes différentes sur une surface la plus petite possible. Par abus de langage, on désigne souvent par « densité » le nombre de sondes de nature différente immobilisées[31]. Le terme « complexité » convient mieux. En effet, une biopuce de faible complexité d'une centaine de plots d'hybridation peut être de forte densité (surfacique) si ces plots sont de taille micrométrique et répartis avec des espacements micrométriques. La « complexité » est un critère qui détermine les applications visées (tableau 1).

Degré de complexité	Nombre de plot d'hybridation	Application visée
Basse	10-1000	Diagnostic
Moyenne	1000-10000	Etude de mutation, génotypage
Haute	10000-100000	Séquençage des gènes

Tableau 1 : Relation entre la complexité et l'application visée.

On distingue deux grandes méthodes de préparation de puce ADN :

- La technologie « off chip » où les sondes sont pré-synthétisées, contrôlées puis déposées sur le substrat par des moyens mécaniques ou électrochimiques.
- La technologie « on chip » où les sondes ODN sont synthétisées chimiquement *in situ* sur le support structuré.

III. 1. 1. Immobilisation des sondes pré-synthétisée

L'immobilisation de séquences pré-synthétisées consiste à faire la synthèse des séquences éventuellement modifiées par un groupement réactif puis à les fixer sur un support fonctionnalisé par une chimie compatible. L'adressage est réalisé principalement par voie :

- Mécanique.
- Electrochimique

III. 1. 1. 1. Adressage Mécanique

L'adressage mécanique est largement utilisé dans la littérature. Cette technique a été développée par Shalon et Brown[32] et reprise par de nombreuses entreprises tels que Synteni ou encore Biorobotics. Deux techniques sont utilisées pour déposer et adresser des séquences oligonucléotidiques. Soit les aiguilles apportent la solution d'immobilisation puis la dépose sur la surface par contact, soit la solution est projetée sous forme de gouttelettes par jets

(technique piézo-électrique, « *Ink-jet* »). Ces appareillages sont devenus totalement automatisés et permet la fabrication de puces à ADN de faible à moyenne complexité. Mais, elles rencontrent des contraintes tels que :

- Limitation de la taille des spots (entre 150 µm et 500 µm) et donc une faible à moyenne complexité des puces préparées.
- L'évaporation des gouttes de solution d'oligonucléotides à immobiliser entraîne des spots mal définis.
- La synthèse, la purification et le stockage de chaque échantillon d'oligonucléotides.

On trouve dans la littérature un nombre important de méthodes d'immobilisation de brin d'ADN[33, 34]. La préparation par déposition consiste à préparer par la méthode la plus appropriée l'oligonucléotide et à le fixer ensuite sur le support de manière covalente ou non. Dans la partie suivante, nous allons décrire quelques unes de ces méthodes parmi les plus utilisées.

III. 1. 1. 1. 1. Greffage non covalent

Le dépôt est effectué sur des lames en verre traitées par un revêtement chimique qui permet de fixer les brins d'ADN grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives du brin d'ADN et les charges positives de la surface. Différentes types de lames sont disponibles aujourd'hui (Figure 5).

• Des lame recouvertes de polylysine sont couramment utilisées, car elles sont simples et peu coûteuses à produire au laboratoire à partir de lames de microscope, par une série de trempages et de lavages successifs dans une solution de PBS-polylysine[35, 36]. Cependant, ces lames sont mal conservées et souvent d'une qualité inégale d'une série à l'autre selon le traitement effectué.

• On trouve des lame commercialisées par Corning (lames CMT-GAPS II, à surface de gamma amino-propyl silane). Comme la polylysine, les charges positives des groupements amines permettent de fixer l'ADN. Ces lames sont coûteuses mais permettent d'obtenir en général des bons résultats avec une durée de vie de 2 ans selon Corning[37].

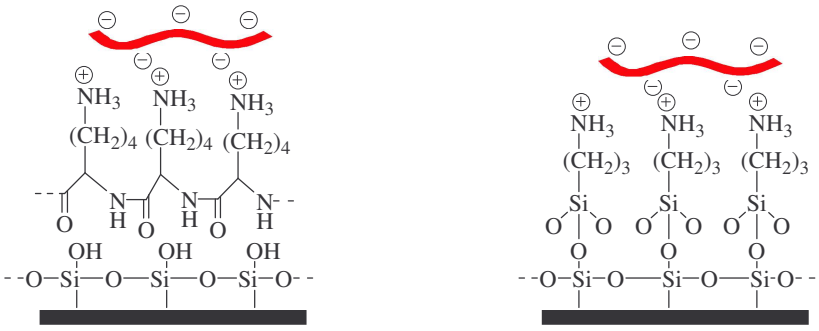


Figure 5 : Greffage par interactions électrostatiques. Lames de type polylysine (à gauche) et gamma amino-propyl silane (à droite).

Les interactions non covalentes peuvent être des interactions de type ligand/récepteur, par exemple : la biotine est reconnue avec une haute spécificité par l'avidine (Ka = 10^{15}). Un oligonucléotide sur lequel la biotine a été greffée peut être ainsi spécifiquement accroché sur un support imprégné avec l'avidine[38] (Figure 6).

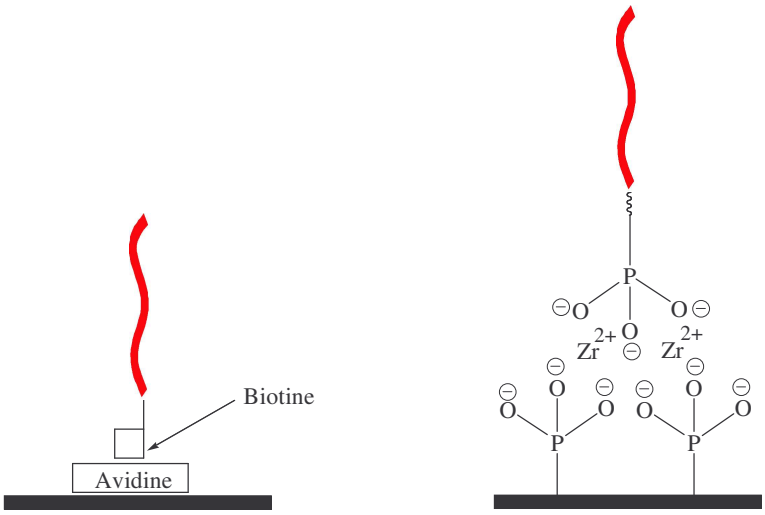


Figure 6 : Greffage non covalent : par interactions ioniques (à droite) et par interactions ligand /récepteur (à gauche).

On trouve également des interactions ioniques par exemple entre le phosphate en 5' d'un oligonucléotide et un support fonctionnalisé par un complexe du zirconium. Dans ce dernier cas, il y a formation d'une liaison ionique spécifique entre la fonction phosphate en 5' et le Zirconium[39] (Figure 6).

Le greffage non covalent a plusieurs inconvénients limitant ce genre de stratégie :

- Interactions non spécifiques des cibles ce qui peut augmenter le bruit de fond.

- Stabilité relativement faible des substrats.

III. 1. 1. 1. 2. Greffage covalent

L'immobilisation par voie chimique implique la formation d'une couche dite agent de couplage qui établit le lien entre le substrat et l'oligonucléotide à fixer. On peut souligner que les oligonucléotides utilisés actuellement sont quasiment toujours modifiés. Ils possèdent en particulier un espaceur (composé généralement d'une chaîne carbonée) qui a pour objectif d'augmenter l'accessibilité de la sonde immobilisée dans la phase d'hybridation[21, 39-41].

Plusieurs méthodes ont été décrites dans la littérature pour le greffage covalent de l'oligonucléotide sur le support solide. Les méthodes chimiosélectives[42] ou plus récemment la "Click Chemistry"[43] apportent une solution pour la conception de nouvelles méthodes d'immobilisation de biomolécules. Il suffit d'intégrer aux deux partenaires des fonctions chimiques présentant une réactivité réciproque, unique et spécifique. En général, l'un des deux synthons porte une fonction nucléophile et l'autre une fonction électrophile complémentaire. Ainsi, on peut fonctionnaliser une surface par l'une des deux fonctions et l'immobilisation se fait avec la biomolécule modifiée par la fonction complémentaire. L'intérêt d'utiliser ce type de réaction réside dans plusieurs points :

- La réaction est chimiosélective et donc il suffit de mélanger les deux partenaires pour l'amorcer sans avoir recours à des stratégies de groupes protecteurs.
- La réaction est rapide et est souvent réalisée dans des conditions douces (l'eau par exemple) et sans réactif de couplage ou catalyseur.
- Le haut rendement de la réaction.
- Les sous produits "inoffensifs".
- La stabilité dans les conditions physiologiques du lien qui résulte.

La diversité des réactions possibles entraîne différents types de liaisons chimiosélectives. On trouve les réaction dites "Click Chemistry" : premièrement, la cycloaddition des espèces insaturées tels que la réaction de Diels-Alder ou 1,3 cycloaddition dipolaire. Deuxièmement, la substitution nucléophile par ouverture des hétérocycles tels que l'époxyde, l'aziridine et l'aziridinium. Troisièmement, l'addition carbone-carbone qui met en jeu des doubles liaisons tel que l'addition de Michael. Enfin, les réactions qui mettent en jeu des carbonyles telles que les liaisons thioesters, thioethers, hydrazones, thiazolidines, oxazolidines, amides et éthers d'oxime. Les différentes méthodes de greffage covalent d'oligonucléotides sur support solide sont décrites succinctement ci-après.

- L'amination réductrice : c'est le résultat d'une réaction entre un oligonucléotide modifié par un aldéhyde et un support porteur d'une fonction amine formant une liaison imine, puis la réduction de cette imine en amine (Figure 7)[44]. On peut également trouver la stratégie inverse (support fonctionnalisé par un aldéhyde et l'oligonucléotide modifié par une fonction amine)[45]. L'utilisation d'un réactif de réduction est nécessaire car l'imine n'est pas stable dans les conditions aqueuses utilisées.

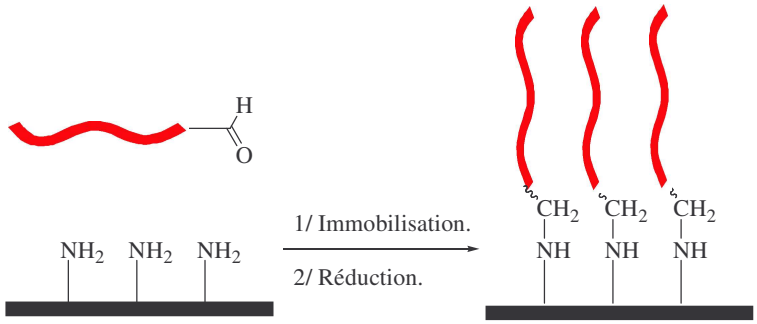


Figure 7 : Greffage covalent : amination réductrice

- Formation d'hydrazone : c'est le résultat d'une réaction entre un oligonucléotide modifié par une α-oxo aldéhyde et un support porteur d'une fonction semicarbazide formant une α-oxo semicarbazone[46] (Figure 8). On peut également trouver la stratégie inverse[47]. La réaction est chimiosélective et donc elle ne demande pas de groupe protecteur et le seul produit issu de la réaction est de l'eau. De plus, à l'inverse de l'imine, l'hydrazone est stable et ne demande pas d'étape supplémentaire de réduction.

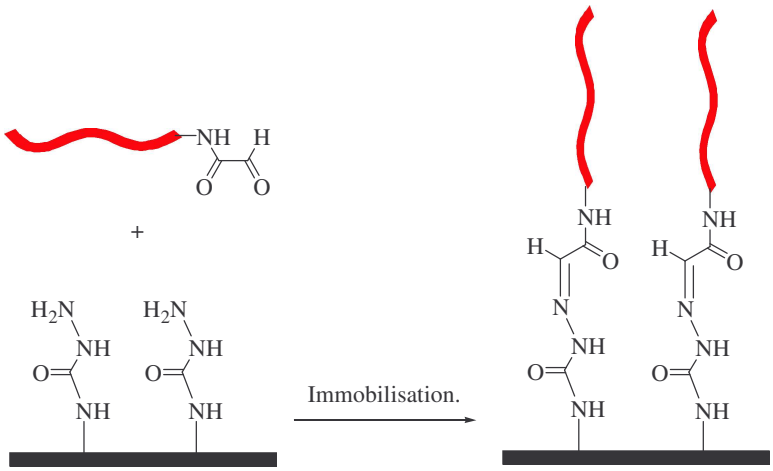


Figure 8 : Greffage covalent : formation d'hydrazone.

- Couplage de type peptidique : c'est le résultat d'une réaction entre un oligonucléotide modifié par une amine et un support solide porteur d'une fonction ester activé (*N*-hydroxysuccinimide) formant une liaison amide[48] (Figure 9). On peut également trouver la stratégie inverse[49]. Cette réaction se fait dans l'eau ce qui limite cette stratégie car dans ces conditions la dégradation de l'ester activé est facile.

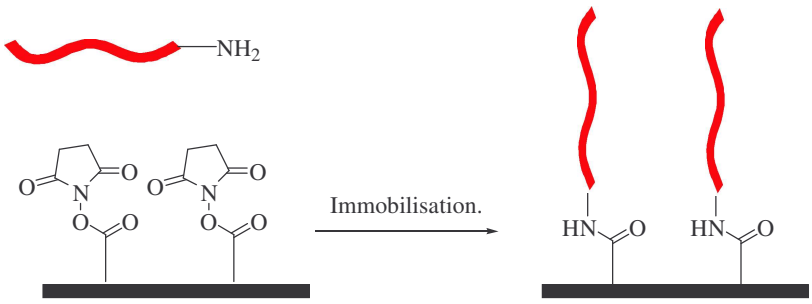


Figure 9 : Greffage covalent : couplage peptidique.

- Formation de disulfure : c'est le résultat d'une réaction d'oxydation entre un oligonucléotide modifié par un thiol et un support solide porteur d'une fonction thiol formant une liaison disulfure[50] (Figure 10). La réaction secondaire : l'oxydation entre deux oligonucléotides formant un dimère lié avec un pont disulfure ou encore l'oxydation au niveau de la surface limite cette stratégie.

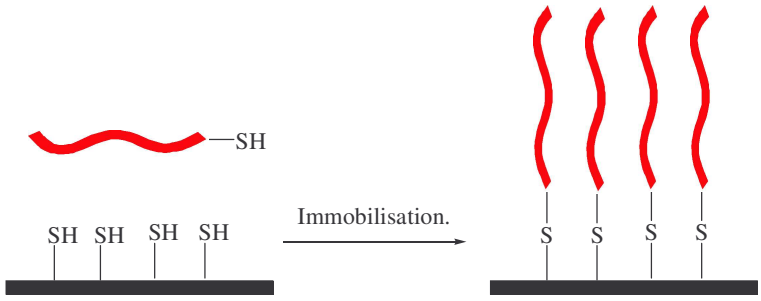


Figure 10 : Greffage covalent : formation de disulfure.

- 1,3 cycloaddition dipolaire : les oligonucléotides sont couplés par une réaction de cycloaddition [3+2] catalysée par du cuivre entre le groupement azide de la surface et le groupement alcyne en bout de la séquence oligonucléotidique[51] (Figure 11). L'un des invonvénients c'est l'utilisation du cuivre comme catalyseur de la réaction.

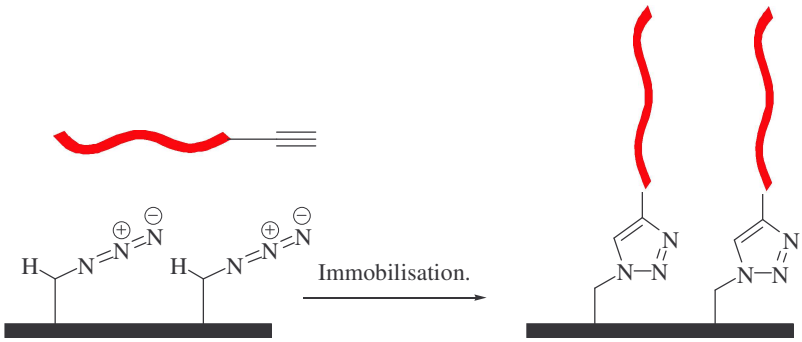


Figure 11 : Greffage covalent : 1,3 cycloadition dipolaire.

- Formation d'une liaison thioether : c'est le résultat d'une réaction entre un oligonucléotide modifié par un groupe thiol et un support solide porteur d'une fonction maléimide[52] (Figure 12). L'invonvénient de cette stratégie est le risque de dimérisation des brins d'ADN par oxydation.

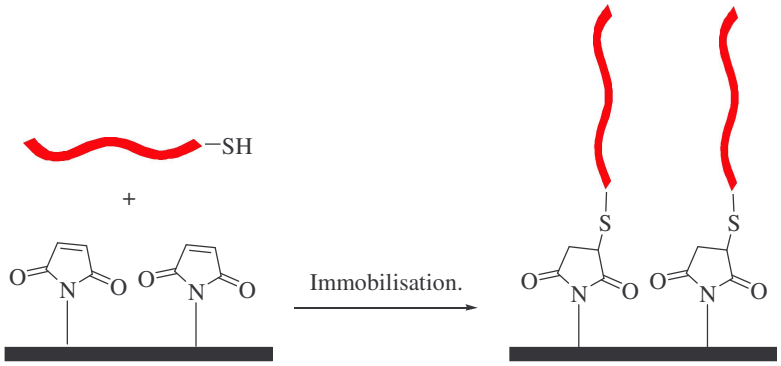


Figure 12 : Greffage covalent : formation de liaison thioéther.

III. 1. 1. 2. Adressage électrochimique

L'adressage électrique de l'immobilisation est une alternative. Ainsi, Nanogen utilise un concept proche de l'électrophorèse, si ce n'est que les molécules d'ODN sont libres en solution[53-55]. Dans ce concept, on applique un potentiel positif à une électrode pour guider la sonde à greffer et pour produire un champ électrique qui améliore la dynamique et la

spécificité de l'hybridation (Figure 13). Cette approche repose sur l'interaction électrostatique avec les charges négatives (phosphates) portées par l'ADN avec l'électrode positive. Une matrice d'électrodes de platine (jusqu'à 10 000) recouvertes de streptavidine immobilise des sondes de 12 à 26-mèr greffées par une biotine.

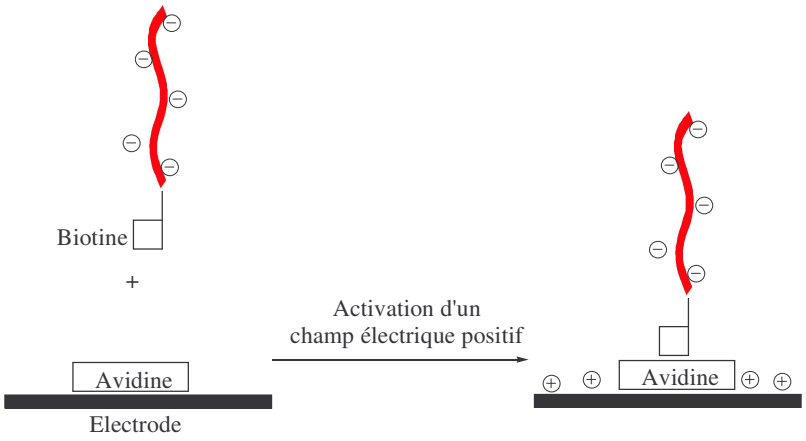


Figure 13 : Principe de l'adressage par électrochimique.

D'autres groupes ont exploité les propriétés des polymères conducteurs électroniques, l'électropolymérisation (Figure 14) et leur fonctionnalisation aisée. Du fait de sa biocompatibilité et d'une électropolymérisation qui peut être menée en milieu aqueux et à des pH physiologiques, le polypyrrole (PPy) est de loin le polymère conjugué le plus utilisé. Ainsi, l'électropolymérisation du monomère pyrrole ou de ses dérivés en solution aboutit au dépôt à la surface d'une électrode d'un film mince de PPy [56-60] (Figure 15).

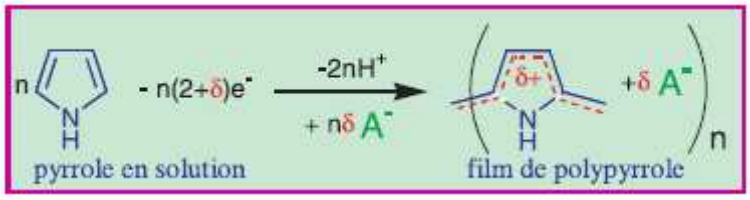


Figure 14 : A. Réaction d'électropolymérisation du polypyrrole.

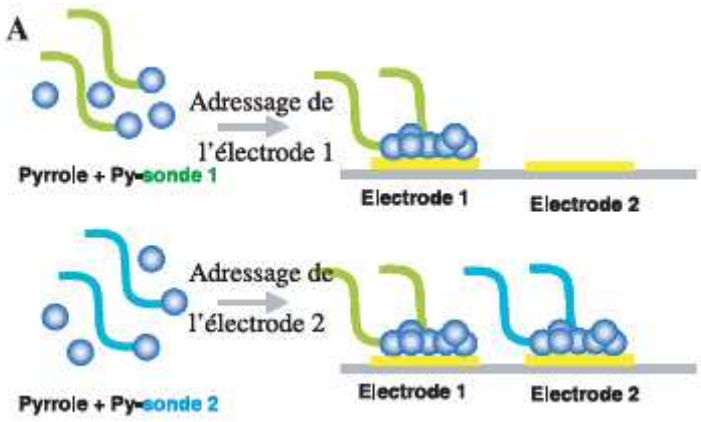


Figure 15 : Principe de l'adressage par électropolymérisation (technologie MICAM^{TM}).

Trois approches mettent en oeuvre une réaction d'électropolymérisation du PPy pour déposer un film polymère incluant en volume et/ou en surface les séquences ADN sondes :

• Le procédé MICAM^{TM} permet, en une étape, l'adressage et l'immobilisation simultanés des sondes ODN par copolymérisation électrochimique de sondes ODN portant un pyrrole avec du pyrrole libre[61] (Figure 15). Cette simultanéité apporte un avantage considérable en gain de temps, puisque le dépôt peut être mené en 0,5 s, tandis qu'un couplage chimique nécessite un temps plus important (dépend du type du couplage). Ce greffage covalent assure la stabilité et l'accessibilité pour l'hybridation des sondes ADN à la surface des puces MICAM^{TM}.

• Le dopage électrochimique du polypyrrole par des sondes ODN : celles-ci sont emprisonnées dans la matrice polymère durant l'électrosynthèse, elles se comportent comme un dopant anionique multichargé[62]. La perte du dopant ODN par échange avec d'autres anions de l'électrolyte contribue à la dérive du signal.

• Un procédé en deux étapes, introduit par Korri-Youssoufi *et al*[63] et nommé « post-fonctionnalisation », comprend une première étape « d'activation de la surface » par dépôt électrochimique d'un PPy fonctionnalisé par un groupement ester activé. Ce groupement est capable de se coupler à une séquence d'ODN fonctionnalisé par une fonction amine. L'étape de couplage/adressage peut être effectuée par jet d'encre.

III. 1. 2. Synthèse in situ

Tandis qu'il est concevable de manipuler des centaines, voire des milliers de sondes oligonucléotidiques pré-synthétisées, répertoriées et stockées, au-delà il a été imaginé un autre procédé d'élaboration avec la croissance des sondes sur leur plot d'hybridation « on chip ».

Le principe est basé sur le remplacement de l'étape classique de détritylation en milieu acide dans le cycle conventionnel de la synthèse phosphoramidite (méthode au β-cyanoéthyl phosphoramidite[64, 65]) par une autre étape de déprotection. Ainsi, on trouve la déprotection dirigée par :

- La lumière ou la photolithographie.
- L'électrochimie.
- Impression (*Ink-jet*).

III. 1. 2. 1.Lumière ou photolithographie

En 1991, Fodor et *al*[66] démontrent pour la première fois la synthèse *in situ* de séquences peptidiques sur support en utilisant des masques et des acides aminés protégés par un groupe photoactivable. Cette découverte a permit l'utilisation de cette méthodologie pour la synthèse *in situ* d'oligonucléotides sur support[6] (puce à oligonucléotides). Ainsi, on trouve dans la littérature plusieurs groupes photoactivables pour les amines et les alcools (Figure 16).

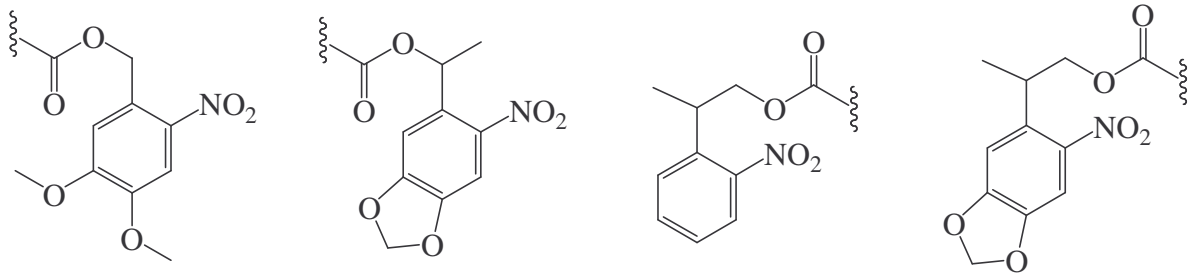


Figure 16 : Groupes protecteurs photoactivables.

Lors de la première étape de construction des sondes, une surface activée portant les groupements hydroxyles protégés par un groupement méthyl-2-nitropipéronyloxycarbonate (MeNPOC), est en partie couverte par un masque de forme définie, qui laisse accessible à la lumière certains sites. L'illumination conduit à une déprotection des groupes hydroxyles exposés qui sont alors prêts pour le couplage avec le premier nucléoside activés en position 3' (β-cyanoéthyl phosphoramidite) et protégés en position 5' par MeNPPOC (Figure 17). L'utilisation de masques de formes différentes permet la construction d'oligonucléotides de tailles et séquences souhaitées en des sites parfaitement définis[67]. L'enchaînement de plusieurs étapes de protection et de synthèse chimique aboutit à un accroissement exponentiel du nombre d'oligonucléotides à la surface du support, et ce, pour un nombre d'étapes relativement faible.

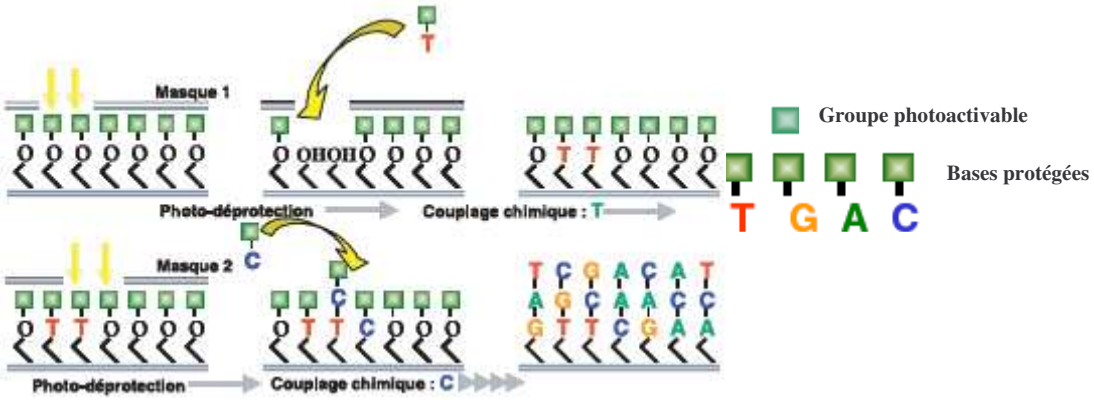


Figure 17 : Synthèse *in situ* d'ODN par photodéprotection.

Affymetrix en collaboration avec IBM propose une alternative pour la photolithographie. La puce est recouverte avant chaque étape de synthèse par un polymère photodégradable. L'hydroxyle en position 5' des nucléosides est protégé par le diméthoxytrityle (DMTr). L'exposition à travers des masques, permet de détruire sélectivement le film aux endroits où la synthèse d'oligonucléotides doit avoir lieu. La puce est alors placée dans une solution acide permettant la déprotection des groupements trityles[64, 65]. Dans un autre format, le film polymère contient un précurseur capable de génèrer sous illumination l'acide pentafluorobenzoique qui hydrolyse le groupe trityle (Figure 18) [68].

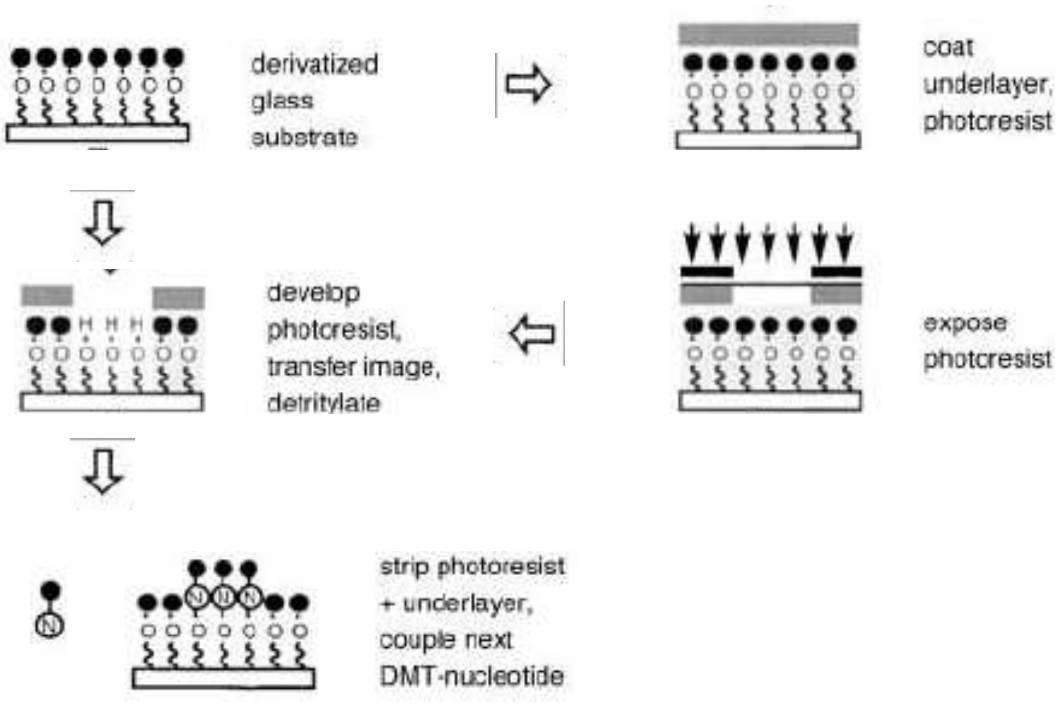


Figure 18 : Synthèse *in situ* d'ODN par photogénération d'acide.

Toutefois, cette méthode reste relativement chère puisqu'elle nécessite un nombre important de masques. Ainsi pour synthétiser une puce avec des oligonucléotides de 25-mers, 100 masques différents sont requis. De plus, ces masques perdent leur efficacité au cours du temps. Pour pallier à ces inconvénients, de nouveaux dispositifs avec des micro-miroirs digitaux ont été développés pour remplacer les masques[69]. La technique est appelée MAS (pour Maskless Array Synthesizer) commercialisée par la société NimbleGen.

III. 1. 2. 2. Electrochimie

Une approche électrochimique de la synthèse « on chip » basée sur la déprotection électrochimique du groupe protecteur en 5' électrolabile *p*-nitrobenzoyle[70] a été développée. Cette électroréduction à - 1,4 V vs Ag/Ag^+ est compatible avec l'ensemble du cycle conventionnel de synthèse qui est inchangé, à part l'étape de déprotection. Il faut cependant souligner que le rendement de coupure de 90 %, excellent en électrochimie, est insuffisant en synthèse oligonucléotidique et devra être optimisé afin d'améliorer le rendement global.

III. 1. 2. 3.Impression (Ink-jet)

La fabrication par microprojection est inspirée des techniques d'impression des imprimantes jet d'encre. Un système de microprojection par injecteurs piézo-électriques, permet de déposer les quatre bases en très petites quantités (de l'ordre de la centaine de picolitres) à la surface d'un support. Les réactions de couplage ont lieu par confinement par l'élaboration d'un substrat micro-structuré chimiquement (Figure 19). La société Protogène[71] définit des zones hydrophiles et hydrophobes en utilisant une grille de téflon posée sur une lame de verre. Les réactions sont réalisées par dépôts séquentiels de gouttes à l'intérieur des puits (hydrophile) amenant les différents réactifs jusqu'à la réaction suivante. La difficulté de cette méthode réside dans l'injection successive sur un même plot.

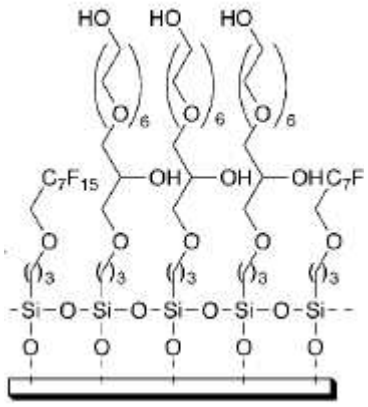


Figure 19 : Surface hydrophile (puit) entouré d'une surface hydrophobe (Figure issue de la publication[71]).

La fabrication d'une puce de haute complexité est l'avantage majeur de la synthèse *in situ* par rapport au dépôt d'ODN pré-synthétisés. Néanmoins, la technique rencontre des inconvénients[72, 73] tels que :

- Une faible quantité de produit sur la surface (environ 10 pmol/ mm^2).
- Une faible qualité des séquences synthétisées (environ 35% des séquences sont parfaites).
- Une difficulté d'incorporer des bases modifiées.
- Une longueur limitée de séquence.

III. 2. Préparation de puces à peptides

Les méthodes moléculaires appliquées au diagnostic des maladies infectieuses présentent non seulement une sensibilité de détection élevée, mais permettent également d'identifier rapidement les agents pathogènes incriminés ainsi que les micro-organismes échappant aux méthodes conventionnelles. Le séquençage de centaines de génomes microbiens traduit l'enjeu actuel de la microbiologie qui est d'élucider la complexité des nombreuses interactions moléculaires à l'échelle d'un organisme entier et d'intégrer les informations acquises pour déterminer les fonctions des protéines et identifier de nouvelles cibles diagnostiques et thérapeutiques. En effet, la fonctionnalité des protéines se caractérise par des interactions avec d'autres molécules, telles que des protéines, des anticorps, des acides nucléiques, des carbohydrates, des lipides et des petits ligands. Dans ce contexte, la technologie des puces à protéines est parfaitement positionnée pour étudier les interactions moléculaires à haut débit et répondre à plusieurs questions, d'ordre postgénomique et d'intérêt fondamental et appliqué[9-11].

Les premières tentatives pour fabriquer des puces à protéines cherchaient le plus souvent à extrapoler la méthode employée dans la conception des puces à ADN en utilisant la même technologie et la même démarche expérimentale. Or, il s'est avéré qu'une adaptation ne permet pas, dans la majorité des cas, de réaliser des puces à protéines. En effet, l'adaptation se heurte à plusieurs difficultés[74] :

- La complexité structurale : la protéine peut interagir avec différents partenaires en raison de multiples sites actifs ce qui n'est pas le cas pour l'ADN.
- La nature physique : les protéines peuvent être hydrophiles ou hydrophobes, acides ou basiques et par conséquent interagir avec leur environnement par force électrostatique, liaison hydrogène, liaison hydrophobe ou interactions de Van der Waals.
- La production en grande quantité pour une éventuelle commercialisation.
- La modification fastidieuse et coûteuse des protéines qui peut entraîner une perte de l'activité des protéines immobilisées.

Cependant, l'immobilisation de peptides sur support pour mimer les protéines est considérée comme une alternative des puces à protéines. En effet, l'immobilisation de peptides semble être moins compliquée que celle des protéines et ils sont beaucoup plus stables.

Deux grands types de méthodes sont utilisés pour la conception des puces à peptides :

- L'immobilisation de séquences peptidiques pré-synthétisées.
- La synthèse *in situ* directement sur support.

III. 2. 1. Immobilisation des sondes pré-synthétisées

L'immobilisation de peptides pré-synthétisés consiste à faire la synthèse des séquences peptidiques et éventuellement les modifier par un groupement réactif puis à les fixer sur un support fonctionnalisé par une chimie compatible. La synthèse peptidique en phase solide est réalisée pour produire une quantité importante de peptides et faire les modifications nécessaires, pour l'immobilisation[75, 76].

L'adressage des séquences peptidiques est réalisé mécaniquement (le principe est décrit en page 8)

III. 2. 1. 1. Greffage non covalent

L'adsorption met en jeu des interactions de type ionique, hydrophobe ou encore des liaisons hydrogènes entre le peptide et la surface par l'intermédiaire d'un matériau actif tels que les surface recouvertes d'une couche de polylysines[77] ou de silane amine[78]. Le greffage non covalent de peptides n'est pas performant du fait de la faible stabilité. De plus, les interactions non spécifiques des cibles augmentent le bruit de fond ce qui limite ce genre de stratégie.

III. 2. 1. 1. Greffage covalent

L'immobilisation par voie chimique comme on l'a vu pour l'immobilisation d'oligonucléotides implique la formation d'une couche dite agent de couplage qui établit le lien entre le substrat et le peptide à fixer. Les méthodes d'immobilisations de peptides sont largement décrites dans la littérature. Ces méthodes mettent en jeu des réactions chimiosélectives[42] ou encore des réaction dites de la "Click Chemistry"[43].

Les peptides modifiés par un thiol (résidu cystéine) sont impliqués dans plusieurs types de réactions qui vont permettre l'immobilisation. Les différentes méthodes de greffage covalent de peptides sur support solide sont décrits succinctement ci après.

- La réaction avec un support solide porteur d'une fonction α-halocarbonyl formant une liaison thioether[79] (Figure 20a).

- La réaction avec un support solide porteur d'une fonction maléimide formant une liaison thioether[80] (Figure 20b).
- La réaction avec un support solide porteur d'une fonction thiol formant par oxydation une liaison disulfure[81] (Figure 20c).

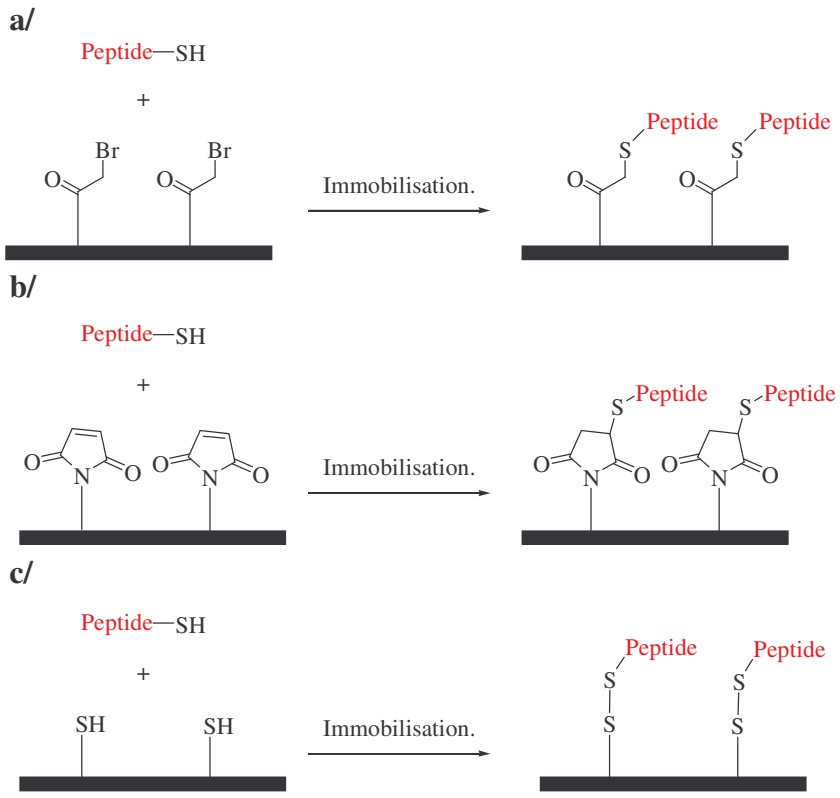


Figure 20 : Immobilisation covalente via un peptide porteur d'une cystéine. a/ liaison thioether, b/ liaison thioether, c/ liaison disulfure.

L'avantage majeur de cette méthode est le fait d'utiliser un peptide modifié par simple incorporation de la cystéine dans la séquence au cours de la synthèse peptidique. Par contre, l'inconvénient, est la réaction secondaire d'oxydation entre deux peptides formant un dimère.

D'autres groupes utilisent une surface fonctionnalisée par une fonction α-oxo aldéhyde pour immobiliser la séquence peptidique portant une cystéine en N-terminale par formation d'une thiazolidine[82] (Figure 21).

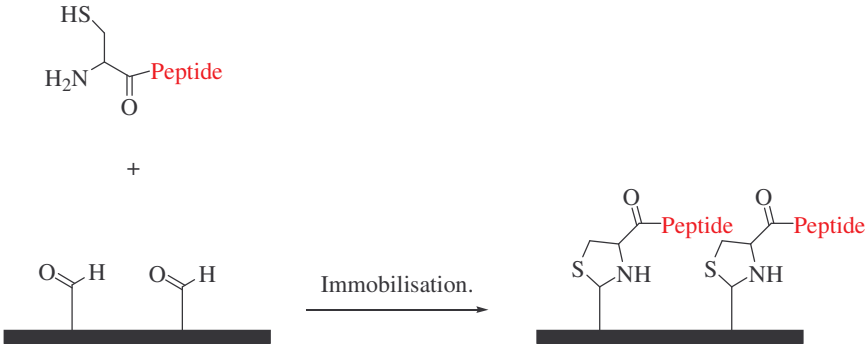


Figure 21 : Immobilisation sur support fonctionnalisé par une fonction α-oxo aldéhyde.

Melnyk et *al*[46, 83-85], développent depuis plusieurs années l'utilisation de biomolécules modifiées par la fonction aldéhyde, réactif vis-à-vis des nucléophile tel que les hydrazines. Ils utilisent des peptides modifiés par une fonction α-oxo aldéhyde qui va réagir avec une fonction semicarbazide présente sur la surface. La fonction α-oxo aldéhyde est introduite par simple oxydation de la sérine présente en position N-terminale de la séquence. Pour l'introduction des fonctions semicarbazides sur la surface, deux méthodes sont exploitées :

- Par silanisation d'une surface en silice (Figure 22).
- Par dépôt de nanoparticules préalablement fonctionnalisées par la fonction semicarbazide sur une surface polycarbonate[86] (Figure 23).

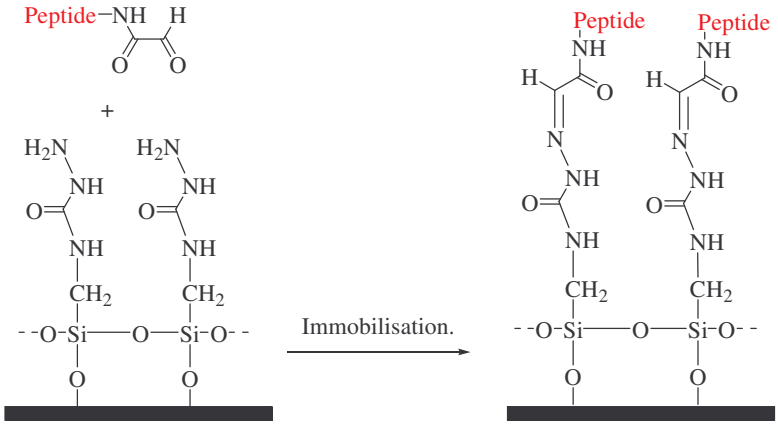


Figure 22 : Immobilisation de type semicarbazone.

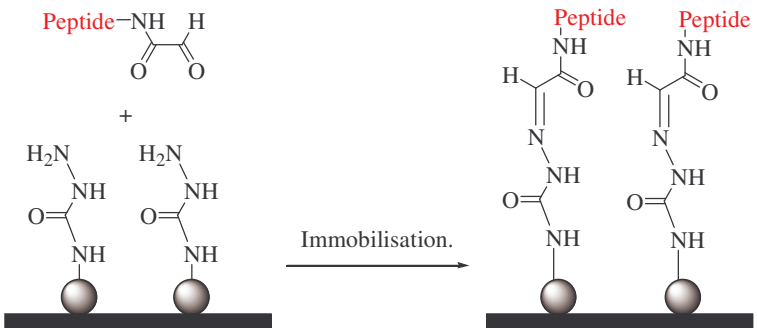


Figure 23 : Immobilisation de type semicarbazone par l'utilisation de nanoparticules préalablement fonctionnalisées par une fonction semicarbazide.

La réaction est chimiosélective et donc elle ne demande pas de groupes protecteurs et le seul produit issu de la réaction est de l'eau. De plus, à l'inverse de l'imine, l'hydrazone est stable et ne demande pas d'étape supplémentaire de réduction.

Un point critique dans la conception des puces à peptides est l'accessibilité du peptide pour la cible. En effet, les séquences peptidiques sont généralemet utilisées pour déterminer des sites spécifiques, et les séquences sont généralement courtes. Dans ce cas, il peut être nécessaire d'incorporer un bras espaceur entre le peptide et le support, ce qui permet de bien présenter le substrat à son enzyme ou l'épitope à son anticorps. Différents types d'espaceurs ont été employées : l'acide 11-mercaptoundécanoique[81], une chaîne hydrophilique de polyéthylène glycol[82] ou encore le dextran[87].

III. 2. 2. Synthèse in situ

L'immobilisation *in situ* consiste à faire la synthèse des peptides directement sur le support. Il existe deux stratégie de synthèse des peptides : la stratégie de synthèse en SPOT ou « SPOT synthesis » et la synthèse par photolithographie.

III. 2. 2. 1. Synthèse en SPOT ou « SPOT synthesis »

Dans cette stratégie[88, 89], la synthèse est réalisée par la méthode de synthèse standard des peptides[74, 75] directement sur support solide fonctionnalisé tels que les membranes de cellulose, le polypropylène ou encore le verre. Chaque spot est considéré comme un microréacteur indépendant formé d'une goutte (Figure 24). Par dépôts séquentiels des réactifs

nécessaires on réalise la synthèse peptidique. Un point très important dans cette approche est que les solvants nécessaires pour la synthèse doivent être non volatiles.

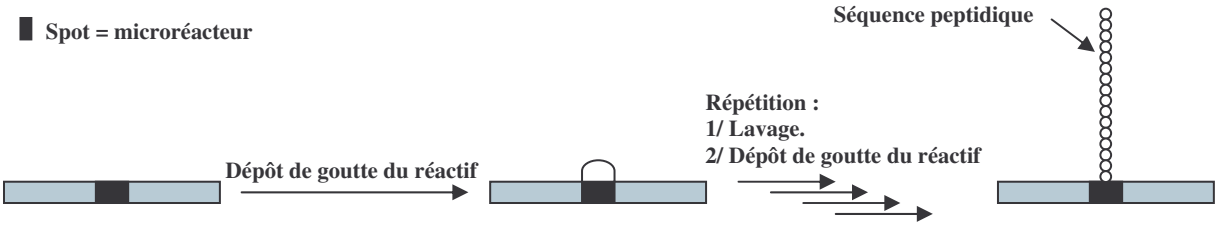


Figure 24 : Synthèse *in situ* des peptides par la synthèse en *SPOT*.

III. 2. 2. 2. Photolithographie

La synthèse *in situ* des peptides par photolithographie est la méthode la plus adaptée pour construire des puces à haute densité. La synthèse est réalisée avec des monomères d'acides aminés protégés du côté N-terminal par un groupement photoactivable (Figure 25)[5]. (le principe est décrit en page 16).

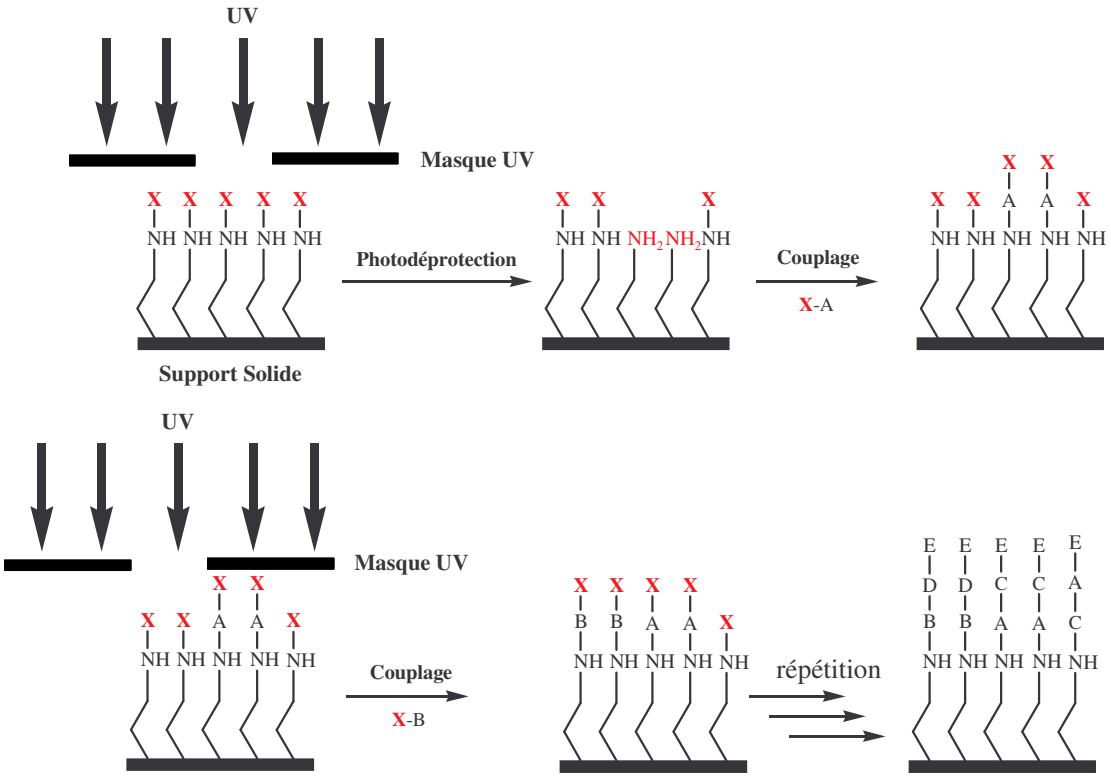


Figure 25 : Synthèse *in situ* des peptides par photodéprotection (X = groupe photoactivable ; A, B, C et E = acides aminés.

III. 3. Préparation de puces à sucres

Depuis les deux dernières décennies, les progrès enregistrés dans le domaine de la génomique ou la protéomique, ont permit d'introduire un nouveau terme : la glycomique. La glycomique est l'étude de la structure et la fonction des sucres[90], c'est-à-dire l'étude des interactions sucres / protéines. Outre l'implication des sucres dans des phénomènes structuraux (cellulose…) ou énergétiques (amidon…), ils sont impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que la reconnaissance, l'adhésion ou le transfert d'informations entre les cellules[91]. Ils sont impliqués dans la réponse inflammatoire ou dans l'entrée de certains virus dans la cellule (HIV…).

Les sucres également appelés hydrates de carbone sont composés d'atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, et sont nommés monosaccharides, disaccharides, etc., selon le nombre d'unités de sucre qu'ils contiennent. Les oligosaccharides sont constitués de chaînes plus longues, les molécules les plus longues étant des polysaccharides.

La recherche dans ce domaine s'est heurtée à l'absence d'outils performants permettant de déchiffrer la structure des molécules complexes et de synthétiser les sucres de façon reproductible et en quantité suffisante. Les sucres ont des structures plus compliquées que celles des chaînes d'ADN et des protéines. Les 4 nucléotides qui constituent l'ADN et les 20 acides aminés que contiennent les protéines sont associés les uns aux autres, telles des perles sur un fil. En outre, ils sont toujours reliés par la même liaison chimique. Les sucres se différencient des protéines (peptides) ou des acides nucléiques par leurs complexités structurales : anomère, épimère, énantiomère, diastéréoisomère, forme furanose, pyranose, types de liaisons (α1-3, β1-4..) et branchements. En particulier, les deux dernières caractéristiques des sucres augmentent drastiquement la complexité des sucres. Les quelques dix sucres simples que l'on retrouve dans les hydrates de carbone des mammifères se lient les uns aux autres en des points différents et constituent des structures aux ramifications complexes. Les 4 nucléotides de l'alphabet de l'ADN peuvent être combinés et former 256 structures différentes de tétranucléotides, et les 20 acides aminés des protéines mènent à environ 16000 tétrapeptides. En revanche, les sucres les plus simples de l'organisme peuvent s'assembler sous plus de 15 millions de tétrasaccharides. Même si toutes ces combinaisons n'existent pas dans la nature, le nombre de possibilités est considérable.

Parallèlement aux développements des technologies liées aux puces à ADN et à peptides, le champs d'étude de la glycomique s'est largement développé et un nouveau

système de détection et reconnaissance multiparamétrique sucre /protéine a vu le jour : les puces à sucres.

Chimiquement, ces sucres (ou poly / oligo saccharides) sont des polymères très complexes qui peuvent être :

- d'origine naturelle[92-94] (et éventuellement fractionnés).
- d'origine synthétique lorsqu'ils sont suffisamment simples et courts. La synthèse peut être réalisée par voie chimique[95-97] ou enzymatique[98].

Ces produits possédant une terminaison réductrice se révèlent être bien adaptés à une modification ou à une fixation sur support. On trouve dans la littérature un nombre important de méthodes d'immobilisation de sucres. La méthode la plus répandu est celle par déposition par opposition à la synthèse *in situ* faiblement développée. La préparation par déposition consiste à préparer par la méthode la plus appropriée le sucre par voie naturel ou synthétique et à le fixer ensuite sur le support de manière covalente ou non.

III. 3. 1. Greffage non covalent

L'adsorption met en jeu des interactions de type hydrophobe ou encore des liaisons hydrogènes avec la surface par l'intermédiaire d'un matériau actif tels que les surfaces recouvertes d'une couche d'avidine[99], membrane de nitrocellulose[100], ou encore le polystyrène[101]. Le greffage non covalent comme vu pour l'immobilisation des oligonucléotides et les peptides n'est pas performant.

III. 3. 2. Greffage covalent

L'immobilisation covalente implique la réaction entre la fonction introduite sur la surface et le sucre que soit :

• Modifié par une fonction complémentaire de celle présente sur la surface.

• Non modifié, et dans ce cas l'immobilisation se fait par sa terminaison réductrice.

Les différentes méthodes de greffage covalent de sucres sur support solide sont décrites succinctement ci-après.

- Formation d'une liaison thioether : c'est le résultat d'une réaction entre un sucre modifié par un groupe maléimide et un support solide porteur d'une fonction thiol[102, 103] (Figure 26a). Dans cette méthode, le sucre a été couplé par sa terminaison réductrice à un maléimide. On trouve également la stratégie inverse, où le sucre est

modifié par une fonction thiol et la surface est fonctionnalisée par une fonction maléimide[79, 104, 105] (Figure 26b). L'invonvénient de cette stratégie est le risque de dimérisation.

- Formation d'une liaison disulfure : Dans ce cas le sucre a été modifié sur sa terminaison réductrice par un thiol et le support solide porte d'une fonction thiol[106] (Figure 26c). La réaction secondaire : l'oxydation entre deux sucres formant un dimère lié avec un pont disulfure ou encore l'oxydation au niveau de la surface limite cette stratégie.

- Ligation de Staudinger : c'est le résultat d'une réaction entre un sucre modifié sur sa terminaison réductrice par un azide et un support solide porteur d'une fonction phosphonate[107] (Figure 26d).

- Formation d'une liaison de Diels-Alder : c'est le résultat d'une réaction entre un sucre modifié sur sa terminaison réductrice par un cyclopentadiène et un support solide porteur d'une benzoquinone[108] (Figure 26e).

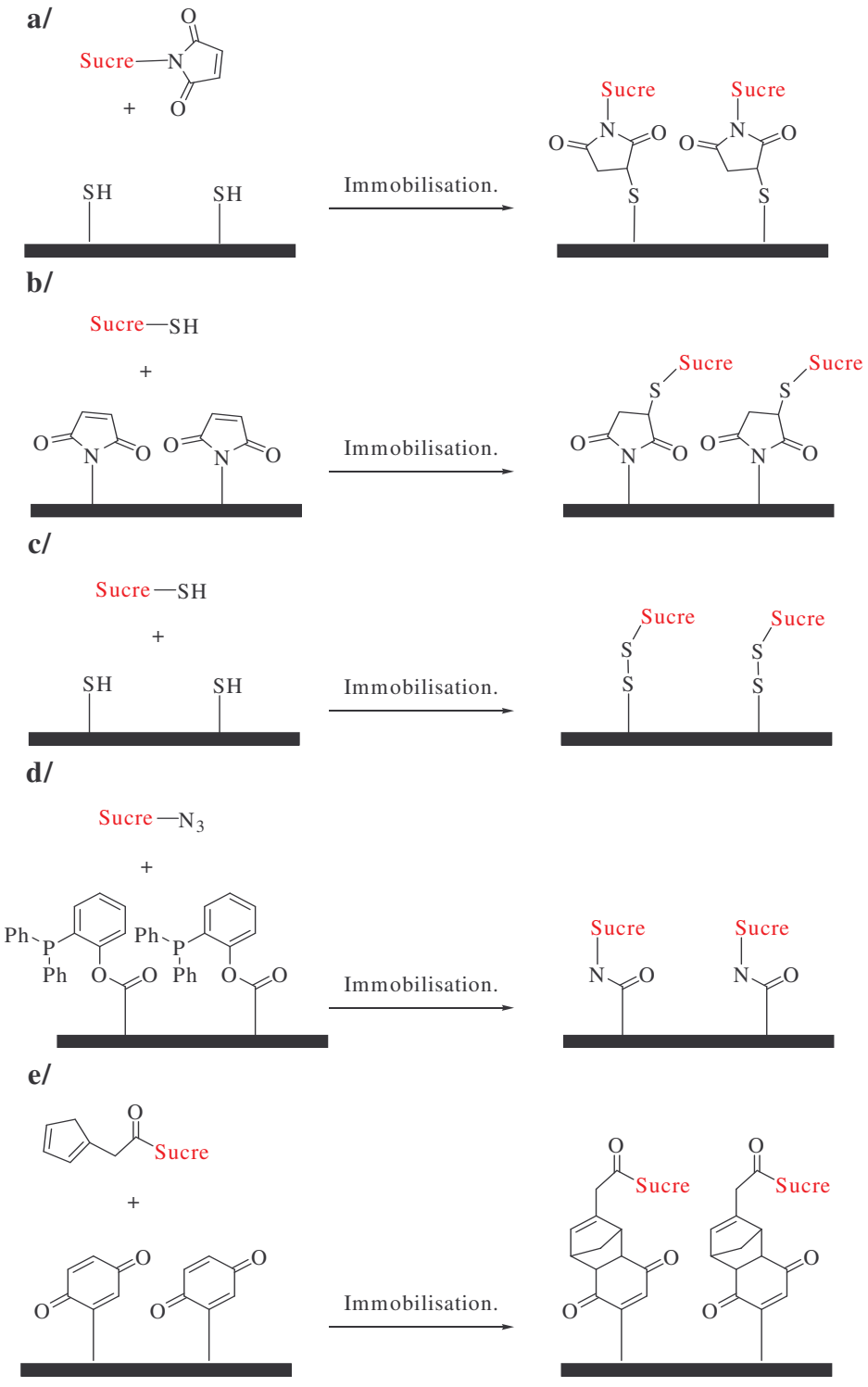


Figure 26 : Stratégies d'immobilisation covalente. **a/** thioether (sucre-maleimide, surface-thiol), **b/** thioether (sucre- thiol, surface-maleimide), **c/** disulfure, **d/** ligation de Staudinger, **e/** Diels-Alder.

IV. TECHNIQUE DE DETECTION ET D'ANALYSE SUR PUCES

Dans un système d'analyse biologique, la détection est un procédé qui consiste à transformer un signal physico-chimique (la présence d'une molécule d'intérêt réagissant spécifiquement avec une molécule connue) en un signal physique qui peut être de nature variée : optique, mécanique, électrique, etc. Ce signal physique est toujours lui-même affiché et enregistré par l'intermédiaire d'un signal électrique numérisé par un système électronique. La détection est un élément essentiel de tout système d'analyse biologique. Elle en conditionne fortement les performances, en particulier en terme de sensibilité (on aurait même parfois tendance, à tort, à considérer que la sensibilité n'est qu'un problème de détection).

Les techniques de détection des biomolécules sur puces les plus couramment utilisées peuvent être classées en deux grands groupes selon qu'elles utilisent ou non un traceur. L'objectif de ce paragraphe est de décrire succinctement les principales techniques utilisées dans le domaine des biopuces.

IV. 1. Méthodes de détection avec traceur

Les traceurs, comme leur nom l'indique, permettent de suivre une interaction (sonde/cible). Ainsi, une des deux biomolécules impliquées doit subir une première étape de marquage. Un marqueur doit répondre aux exigences suivantes :

- Sensibilité par des instruments analytiques de faible coût.
- Stable et permettre à la molécule marquée de rester soluble dans le milieu.
- Marquage simple, efficace, peu coûteux et conduire à un produit ayant une réactivité proche de la molécule non marquée.
- Durée de vie élevée et être sans risque pour la santé du manipulateur.
- Conduire à un bruit de fond minimal.

On trouve de nombreux marqueurs performants et commercialisés comme les radio-isotopes, les molécules fluorescentes, les systèmes chimioluminescents ou encore les enzymes.

IV. 1. 1. Détection par fluorescence

La détection par fluorescence est le mode le plus utilisé dans les systèmes miniaturisés[74, 108, 109]. Son principe est basé sur le marquage de la cible par un fluorophore.

Les fluorophores sont des molécules qui absorbent de l'énergie lumineuse à une longueur d'onde donnée (excitation) et la restituent en partie sous forme de lumière fluorescente (émission). L'excitation et l'émission est une propriété intrinsèque du fluorophore. Actuellement, plusieurs fluorophores sont disponibles sur le marché avec une gamme assez large de longueur d'onde. La mesure de l'émission du fluorophore est réalisée par un scanner qui permet de balayer la surface de la puce.

Cependant, l'inconvénient majeur de la technique est le "quenching" et le photoblanchiment qui correspondent respectivement à l'adsorption d'une partie de l'énergie émis par les autres molécules présentes dans le milieu, et la perte des propriétés d'émission des fluorophores sous l'effet d'une excitation prolongée par une forte intensité lumineuse.

IV. 1. 2. Détection par radioactivité

Le marquage des cibles peut être réalisé par des isotopes radioactifs tels que ^{125}I, ^{32}P, ^{3}H. Ainsi, par un compteur de radioactivité on peut quantifier la radioactivité de la cible marquée qui interagit avec la sonde[11, 109]. Cependant, la méthode rencontre plusieurs inconvénients :

- La faible résolution (de l'ordre de 100 µm).
- L'adaptation du comptage pour des systèmes de plus en plus miniaturisés.
- La manipulation d'entités radioactives par le manipulateur.
- Le processus d'élimination des déchets et leur coût.

IV. 1. 3. Détection par les enzymes

L'utilisation des enzymes est l'une des méthodes les plus utilisées afin d'amplifier le signal. Dans ce cas, ce n'est pas le marqueur lui-même qui est détecté mais le produit fabriqué en grande quantité à partir d'un substrat de l'enzyme. Le principe consiste à utiliser la stréptavidine ou des anticorps secondaires conjuguées à une peroxydase ou à une phosphatase alcaline pour catalyser une réaction dont le produit final est détecté par chimioluminescence ou fluorescence[110, 111]. La lumière générée au niveau des spots est enregistrée par une caméra CCD. Cependant, la méthode rencontre plusieurs inconvénients :

- La nécessité de compartimenter les spots de façon à empêcher la diffusion du produit issu de la révélation enzymatique.
- Durée de vie limitée.
- Certaines substances présentes dans l'échantillon peuvent être inhibitrices.

- L'adsorption non spécifique qui peut engendrer un bruit de fond important.

IV. 1. 3. Détection par les nanoparticules "quantum dot"

Ce sont des cristaux de taille nanométrique semi-conducteurs purs ou composé qui, sous éclairage ultraviolet, réémettent une lumière fluorescente dont la longueur d'onde dépend de la taille du nanocristal, une conséquence d'un phénomène appelé "confinement quantique" lié à leur petite taille. De plus, ils présentent un coefficient d'extinction 10 à 100 fois supérieur aux molécules fluorescentes classiques. Cette caractéristique permet de les détecter avec une grande efficacité[112]. Ils apportent également une solution à des limitations de "quenching" et le photoblanchiment connue pour les fluorophore classiques.

Plus récemment, les propriétés des nanopaticules sont exploitées pour marquer les cibles[113]. La détection se fait par un scanner de fluorescence.

IV. 2. Méthodes de détection sans traceur

Les méthodes de détection sans traceur permettent d'analyser en temps réel de nombreuses interactions en évitant les étapes de marquage pouvant dénaturer la protéine ou du moins modifier l'interaction. On peut distinguer des techniques optique ou mécaniques.

IV. 2. 1. La microbalance à quartz

La microbalance à quartz (QCM pour Quartz Cristal Microbalance) utilise une transduction mécanique. Le dispositif est constitué d'un solide piézoélectrique dont la résonance est excitée par l'application d'une tension alternative. Celle-ci est transmise par l'intermédiaire d'électrodes métalliques déposées en couche mince sur le matériau. Cette couche peut être fonctionnalisée avec des molécules sondes[114]. La fixation des molécules cibles entraîne une variation de la fréquence de résonance due à la modification de la masse présente en surface. Malgré sa grande sensibilité (de l'ordre du ng/cm^2), cette technique nécessite encore des développements pour l'adapter au format biopuce.

IV. 2. 2. La résonance plasmonique de surface

La résonance plasmonique de surface (SPR pour Surface Plasmon Resonance) permet de mesurer en temps réel et sans marquage spécifique, les interactions entre deux molécules sur une surface[21, 41, 80, 106]. Pour cela, une des molécules (le ligand) est immobilisée sur la

surface et l'autre (l'analyte) est injecté. Le principe de détection par SPR quantifie les changements de l'indice de réfraction près de la surface, reliés à la variation de masse à la surface du biocapteur, due à la formation et à la dissociation des complexes moléculaires.

IV. 2. 3. La technique Sarfus

Sarfus est une nouvelle technique de contraste photonique compatible avec l'usage d'un microscope optique et particulièrement adaptée à l'observation fine des surfaces. Le principe de la technique est basé sur l'augmentation du contraste du motif observé en se débarrassant du fond de l'image dont l'éclat ne dépend que de la réflectivité de la surface. Ainsi, en utilisant des surfaces anti-réfléchissantes appelés Surfs on peut amplifier le contraste. Les systèmes étudiés sont des films très minces d'une épaisseur de 2 à 50 nm ou des objets individuels d'un diamètre de 2 à 100 nm. Sarfus permet l'observation en temps réel d'une cinétique rapide à une échelle nanométrique[86]. Grâce à une analyse colorimétrique des images, la technologie Sarfus permet une représentation 3D. Il est ainsi possible d'accéder à l'épaisseur et à la rugosité d'une surface. De plus, Sarfus peut être utilisée en complément de techniques comme la microscopie AFM en tant qu'outil de localisation des structures (gain de temps).

IV. 2. 4. La microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy) permet d'observer les atomes à la surface d'échantillons sous vide, à l'air ou encore en milieu liquide, propriété qui a permis le transfert de cette technologie à la biologie. Le principe de l'AFM consiste à amener, soit au contact de la surface, soit à une distance de quelques Å, une pointe dont l'extrémité a un rayon de quelques nm, et à lui faire balayer ligne par ligne la topographie de cette surface. Cette pointe se situe à l'extrémité d'un levier flexible, le "cantiliver". Un faisceau laser dirigé sur l'extrémité de "cantiliver" est réfléchi vers une photodiode qui va permettre de reconstituer la topographie. Cette technique a permis d'étudier des interactions de type biotine-avidine[115], ADN-ADN[116] ou encore ligand-récepteur[117].

V. OBJECTIF

Le laboratoire sur puce, né au cours des années 1990, a pour but d'intégrer sur un système de quelques centimètres carrés toutes les fonctions d'un laboratoire d'analyse à taille humaine, comme le transfert d'échantillons, le prélèvement d'un volume précis de produit chimique, le mélange avec des réactifs, le chauffage, le titrage, la manipulation de petites quantités de fluides, liquides ou gaz. Un laboratoire sur puce est non seulement un réseau de microcanalisations, mais aussi d'autres fonctions, selon les applications : pompes, valves, diodes laser, capteurs, électronique,… C'est donc avant tout un microsystème comprenant des fonctions mécaniques, électroniques et fluidiques.

Les différentes technologies de fabrication d'un réseau microfluidique sont décrits succinctement ci après.

• La première technologie est basée sur la gravure humide, sèche ou encore ionique sur du verre ou du silicium[118, 119, 120], profitant ainsi de la large expérience en micro ingénierie acquise en microélectronique (Figure 27). Ils permettent de réaliser des structures rigides avec une géométrie contrôlée compatible avec une large gamme de solvant organique. Cependant, ces procédés permettent de réaliser des structures suspendues mais pas directement des structures réellement fermées. La fermeture des structures requiert généralement une étape d'assemblage entre deux substrats usinés.

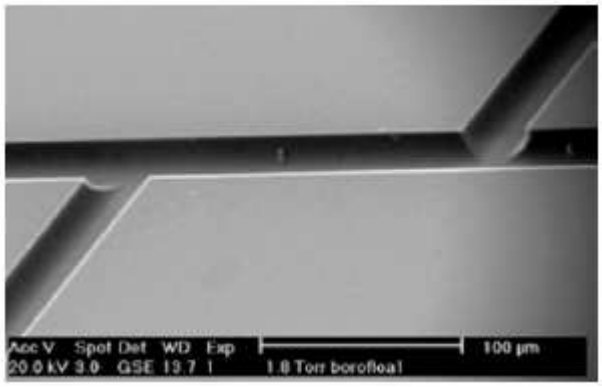


Figure 27 : Gravure sur silicium.

Différents types de soudure entre substrats ont été développés (Figure 28) :

- La soudure thermique nécessite une haute température (600-1000°c).
- La soudure adhésive est un procédé basse température (150°C) et nécessite d'introduire un autre matériau dans la structure.

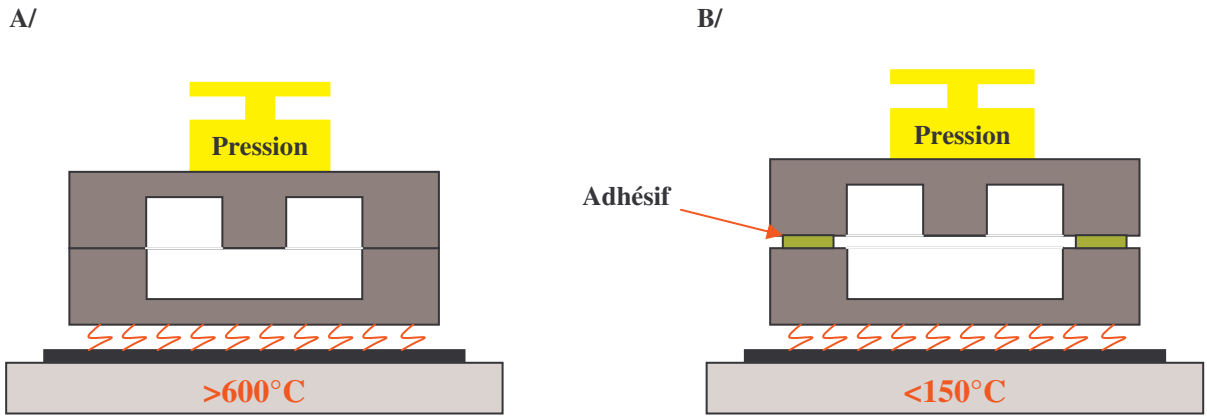


Figure 27 : Types de soudure. **A/** thermique ; **B/** adhésive.

Cependant, cette technologie montre de nombreux inconvénients :

- L'utilisation des spoteurs est inadaptée pour la fonctionnalisation des microcanaux par des biomolécules.
- L'utilisation d'une haute température de soudure peut entraîner une dégradation des biomolécules fonctionnalisés dans les microcanaux.
- L'utilisation d'un adhésif ce qui peut être indésirable.
- Des erreurs d'alignement lors de la soudure entre deux substrats.

• La deuxième technologie consiste en l'utilisation de résines photosensibles tels que le PDMS (polydiméthylsiloxane)[121], PMMA (polyméthylméthacrylate)[122] ou encore le PEG (polyéthylène glycol)[123], qui évitent l'étape de gravure, coûteuse et/ou utilisant des produits chimiques agressifs. Le procédé commence par la fabrication du moule, souvent par usinage de volume du silicium. Puis le précurseur est coulé dans le moule et irradier (UV) à travers des masques pour le réticuler et éventuellement immobiliser des biomolécules. Ensuite, le premier moule est enlevé pour introduire un deuxième plus grand pour définir le canal (Figure 28)[123]. Les avantages de cette technologie sont : sa simplicité de mise en oeuvre puisqu'il n'y a pas besoin d'outillage, le faible coût et la biocompatibilité.

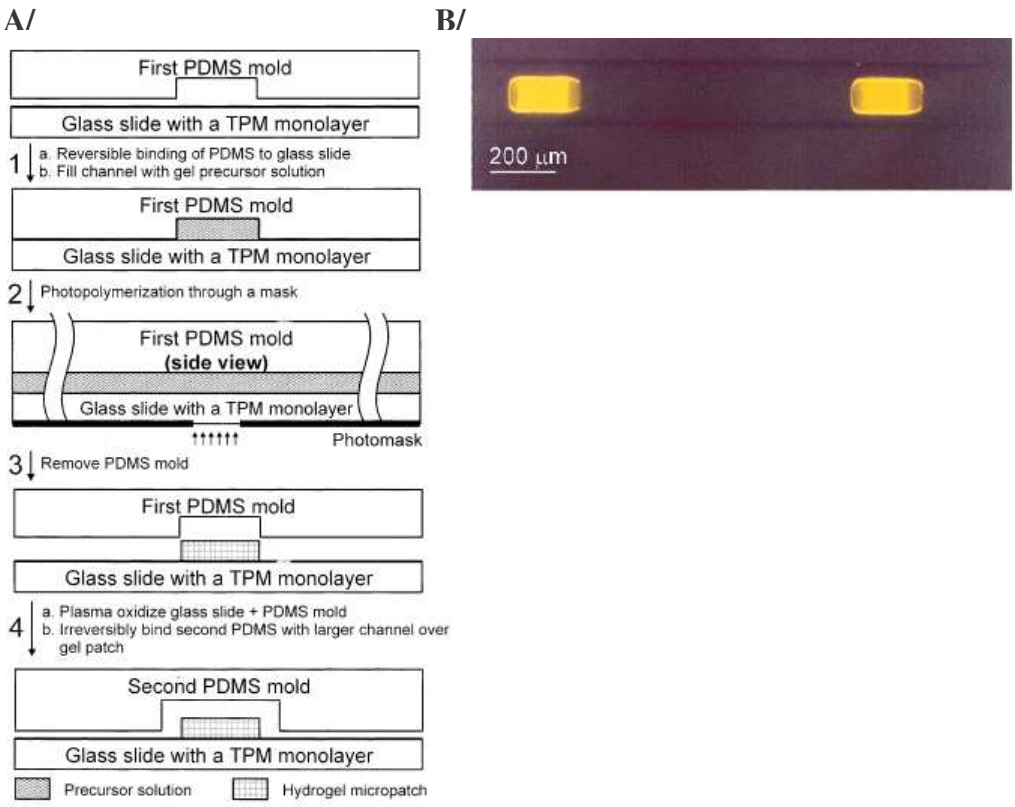


Figure 28 : A/ Principe de fabrication par résine photosensible ; **B/** exemple d'immobilisation d'un fluorophore au court de la fabrication. (Figures issues de la publication[123]).

Cependant, cette technologie à de nombreux inconvénient comme :

- La diffusion à travers le polymère (cible : protéine, ligands, réactifs de détection…).
- La courte durée de vie.
- L'absorption du solvant organique (gonflement de la résine).

L'un des challenges à relever est le greffage localisé en un site prédéterminé dans un système fermé pour éviter les différents invonvénients rencontrés au cours de la fabrication des microcanaux. Ainsi, le travail ici exposé a pour finalité le développement d'une méthode efficace de fonctionnalisation et d'adressage de biomolécules sur support solide fermé tel que des microcanaux ou capillaires.

Quelques méthodes permettent un greffage covalent localisé de molécules chimiques ou biologiques sur un support fermé donné, principalement par voie photochimique.

V. 1. Travaux antérieurs

L'adressage photochimique dans un système fermé tel que des microcanaux ou capillaires est peu étudié dans la littérature. Deux principales méthodes ont été décrites :

Chatelain et *al*[124] ont développé une voie d'adressage photochimique de biomolécules dans des capillaires en silice (transparent aux UV). La méthode consiste à modifier la surface interne du capillaire par un dérivé de benzophénone. L'irradiation à 365 nm du capillaire remplie par une solution de la biomolécule, permet l'immobilisation covalente de cette dernière par réaction avec la benzophénone mettant en jeu un mécanisme radicalaire (Figure 29). Ils ont pu montrer que cette stratégie est efficace pour l'immobilisation d'oligonucléotides ou de protéines.

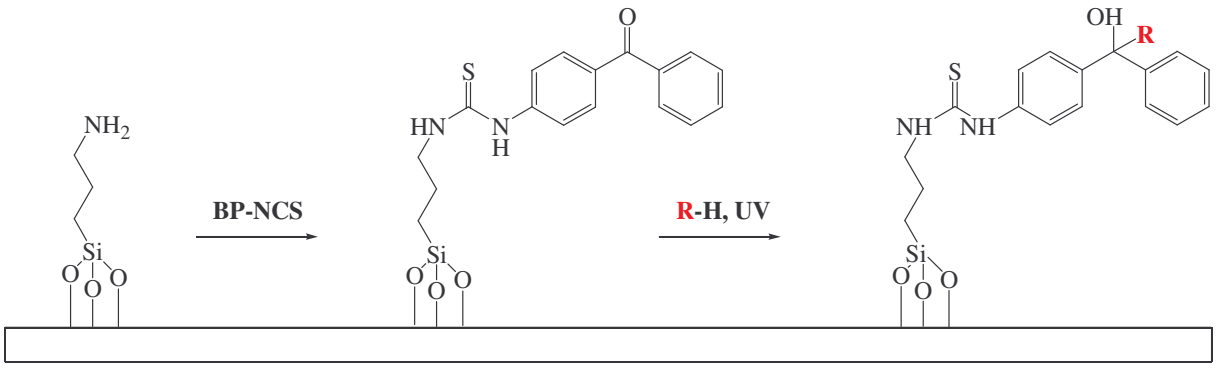


Figure 29 : modification chimique du capillaire et immobilisation covalente par photochimie de la biomolécule R (avec BP-NCS = benzophénone 4-isothiocyanate) selon la méthode de Chatelain et *al*[124].

L'avantage de cette stratégie réside dans l'utilisation de la biomolécule dans son état natif pour l'immobilisation covalente (aucune modification de la biomolécule n'est nécessaire). Par contre, le désavantage de cette stratégie est l'immobilisation aléatoire due à la réaction radicalaire. Cette immobilisation aléatoire peut entraîner d'un part, dans le cas des protéines un masquage du site d'interaction par exemple et dans le cas des oligonucléotides une réduction de la séquence hybridable si l'immobilisation se fait au milieu de la séquence par exemple. D'autre part, des dommages sur la sonde causés par une sur irradiation à l'UV peut entraîner une diminution de la sensibilité de la méthode.

Plus récemment, Blair et *al*[125] ont adapté la synthèse *in situ* des oligonucléotides (le principe est décrit en page 27) dans le format capillaire. Ces synthèses ont été réalisées selon la chimie du 3-nitrophénylpropyloxycarbonyl (NPPOC) et irradiation UV (UV-LEDs pour

ultravioletlight emitting diodes). Après la fonctionnalisation du capillaire par le monohydroxyl silane, ce dernier est placé dans le système d'irradiation (UV-LEDs) (Figure 30a), ainsi le cycle de photodéprotection / couplage avec la base correspondante est amorcé (Figure 30b).

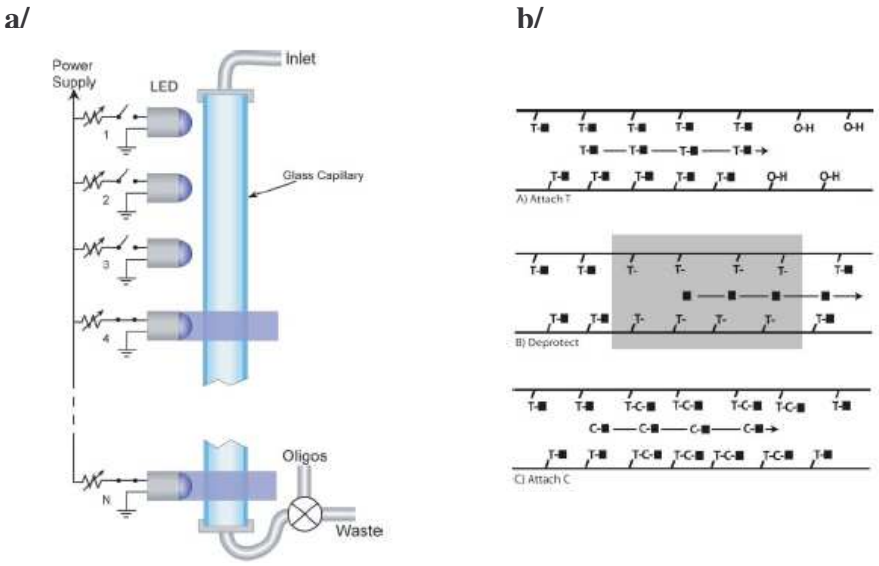


Figure 30 : (Figures issues de la publication[125]) **a/** Système LEDs de synthèse *in situ*. Le capillaire est irradié par une série indépendante de LEDs contrôlé par ordinateur. **b/** Cycle de synthèse *in situ* d'oligonucléotide dans le capillaire. A) Etape 1 : le couplage de la première base sous forme de phosphoramidite protégé par le NPPOC avec l'hydroxyl libre de la surface. B) Etape 2 : Irradiation du capillaire par le LED et ainsi on obtient la photodéprotection du NPPOC. C) Etape 3 : Le couplage avec la seconde base phosphoramidite NPPOC.

Plusieurs oligonucléotides ont été fabriqués par cette méthode et ont été analysés par hybridation et séquençage. Ainsi par hybridation, ils ont montré pour la première fois la possibilité de la synthèse *in situ* d'oligonucléotides dans le format capillaire. Cette méthode permet la préparation d'oligonucléotide d'une qualité supérieure ou égale à la qualité du produit sur format planaire commercial[72, 73]. Néanmoins, la faible qualité des séquences synthétisées (44% des séquences sont parfaites) reste un désavantage de la technique.

V. 2. Travaux antérieurs du laboratoire

Le laboratoire travaille depuis plusieurs années sur l'utilisation du lien éther d'oxime pour la préparation des bioconjugués. La réaction de formation d'éther d'oxime met en jeu une

fonction électrophile carbonyle (aldéhyde ou cétone) qui réagit avec le groupe nucléophile oxyamine. Le mécanisme de formation d'une liaison éther d'oxime à partir d'un dérivé carbonylé et d'une oxyamine fait intervenir deux étapes[126] (Figure 31). L'addition du composé nucléophile sur le carbonyle conduit à la formation d'un intermédiaire carbinolamine qui se déshydrate pour donner l'éther d'oxime. Cette seconde étape est favorisée à pH acide. De manière générale, des études ont montré que le pH optimum de la formation de l'éther d'oxime est voisin de 4.

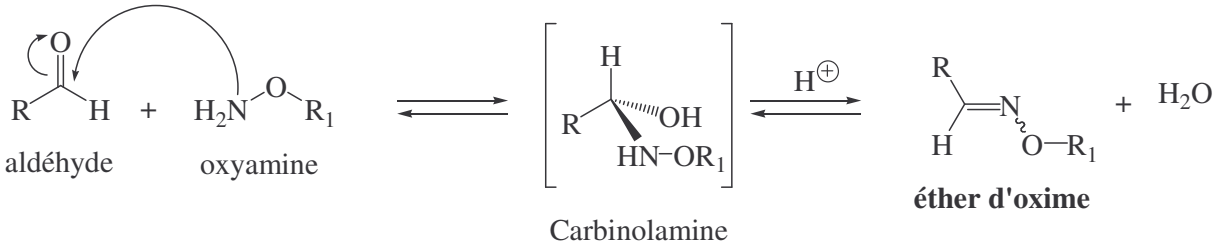


Figure 31 : Mécanisme de formation de la liaison éther d'oxime.

La réaction présente de nombreux avantages :

- Réaction rapide, efficace et formation de composés stables.
- Bon rendement
- Réaction chimiosélective (pas de groupes protecteurs ou de réactifs supplémentaires).
- Absence de réactions secondaires.

Ce procédé de ligation chimiosélectif a déjà été utilisé efficacement au laboratoire pour préparer des conjugués peptide-sucre[127], peptide-oligonucléotide[128] et sucre-oligonucléotide[129].

Dans des travaux antérieurs du laboratoire, cette méthode a été étudiée pour le greffage covalent d'oligonucléotides sur support[130]. La stratégie impliquait la réaction d'oligonucléotides porteurs de la fonction oxyamine en 5' avec le support porteur de l'aldéhyde (Figure 32A). L'efficacité de cette stratégie a été comparée à celle de la stratégie impliquant l'amination réductrice (Figure 32B).

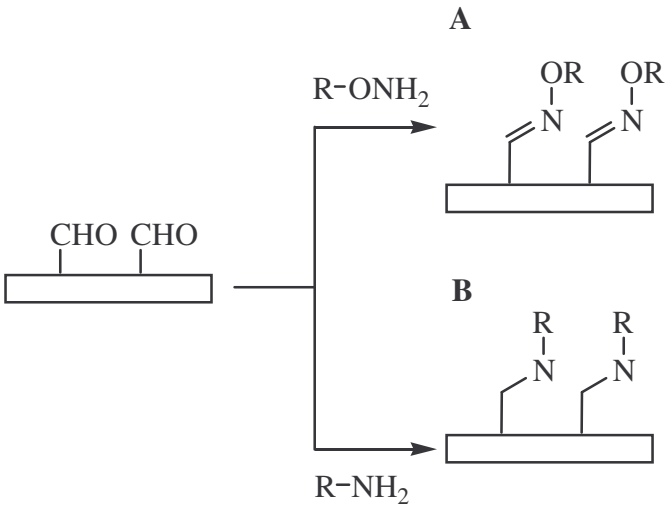


Figure 32 : Stratégies d'attachement covalent sur support solide aldéhyde utilisant **A.** formation d'oxime ; **B.** l'amination réductrice (avec R = oligonucléotide).

L'efficacité de l'attachement des oligonucléotides selon les deux stratégies a été estimée par hybridation avec un oligonucléotide complémentaire marqué avec Cy3. Après hybridation et des étapes de lavage, le support solide est scanné avec un scanner de fluorescence. La différence d'intensité du signal reflète la différence d'efficacité entre les deux stratégies (Figure 33).

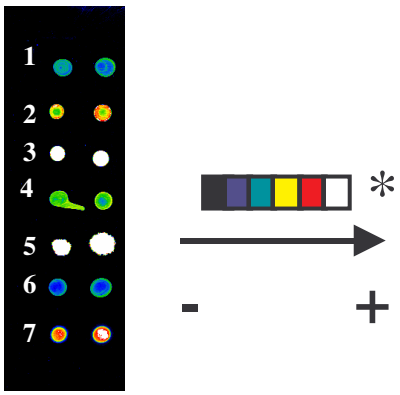


Figure 33 : (Figure issue de la publication[130]) Image scanné de l'hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire marqué par Cy3. Ligne 1 : déposition d'oligonucléotides non modifiés (10 µM), lignes 2, 4 et 6 : attachement covalent avec le 5'-amino oligonucléotide (concentration 10, 5, 1 µM, respectivement), lignes 3, 5 et 7 : attachement covalent avec le 5'-oxyamine oligonucléotide (concentration 10, 5, 1 µM, respectivement). (* intensité de la fluorescence).

L'ancrage par formation d'une liaison oxime s'avère être plus efficace que l'ancrage par alkylation réductrice. En effet, même à de faibles concentrations en oligonucléotides modifiés par une fonction oxyamine (1 µM), on observe toujours une intensité de fluorescence importante alors que dans le cas de faibles concentrations en oligonucléotides modifiés par une fonction amine (1 µM) on observe que le bruit de fond.

La même différence est observée lors de la fonctionnalisation d'une surface intérieure d'un tube capillaire (Figure 34).

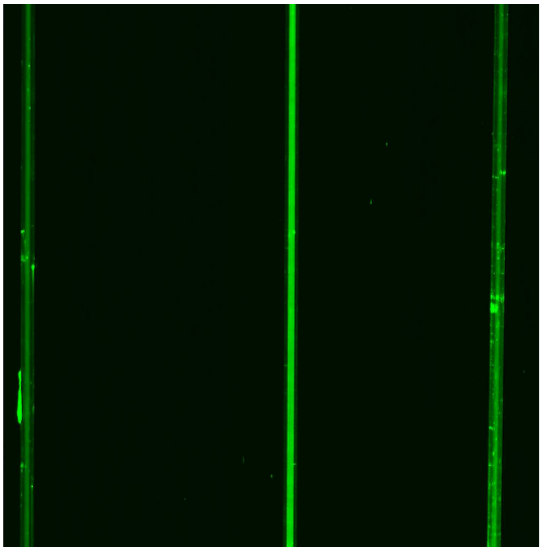


Figure 34 : (Figure issue de la publication[130]) Image scanné des capillaires après déposition du 5'-amino oligonucléotide (a) ou du 5'-oxyamine oligonucléotide (b) hybridé avec un oligonucléotide complémentaire marqué avec Cy3. (c) contrôle : déposition du 5'-oxyamine oligonucléotide hybridé avec un oligonucléotide non complémentaire marqué par Cy3.

L'intérêt majeur de cette méthode est qu'elle nécessite ni l'ajout d'un réactif de couplage, ni l'ajout d'un stabilisant (un réducteur comme dans le cas de l'amination réductive) et permet l'immobilisation efficace d'oligonucléotides.

Avec cette stratégie, nous avons développé une méthode efficace d'immobilisation d'oligonucléotides à la fois sur substrat plan (format ouvert) et dans le capillaire (format fermé). L'inconvénient est qu'il est impossible de faire un adressage de plusieurs oligonucléotides dans un format fermé (l'immobilisation d'un seule oligonucléotide dans le capillaire). Le chalenge à relever c'est de transformer un système monoparamétrique en un système multiparamétrique. Le seul moyen est d'intégrer la photochimie avec le couple, oxyamine / aldéhyde.

V. 3. Notre approche d'adressage photochimique

Dans ce contexte, ce travail a pour finalité le développement d'une méthode d'adressage d'oligonucléotides sur support solide. Nous souhaitons développer l'utilisation d'un support solide fonctionnalisé par une fonction oxyamine protégée par un groupe photoactivable pour immobiliser les molécules d'intérêt (biomolécules, molécules hydrophobes, hydrophiles…) fonctionnalisées par une fonction aldéhyde (Figure 35). Ce choix de stratégie, support solide fonctionnalisé par une fonction oxyamine protégée par un groupe photoactivable / biomolécules fonctionnalisée par une fonction aldéhyde a été fait parce que :

- On connaît des groupes protecteurs photoactivables pour les amines[5, 6, 131-141], et donc ils peuvent être de bons candidats comme groupes protecteurs pour les oxyamines.
- Il n'existe pas de stratégie de régénération d'aldéhyde par voie photochimique qui puisse nous intéresser[142].
- On peut immobiliser des oligonucléotides modifiés par une fonction aldéhyde des deux côté 3' et 5'[128, 143], alors qu'il est difficile de synthétiser des oligonucléotides modifiés par une fonction oxyamine du coté 3' pour la stratégie inverse.
- L'accès aux diverses molécules porteurs de la fonction aldéhyde semble plus aisé.

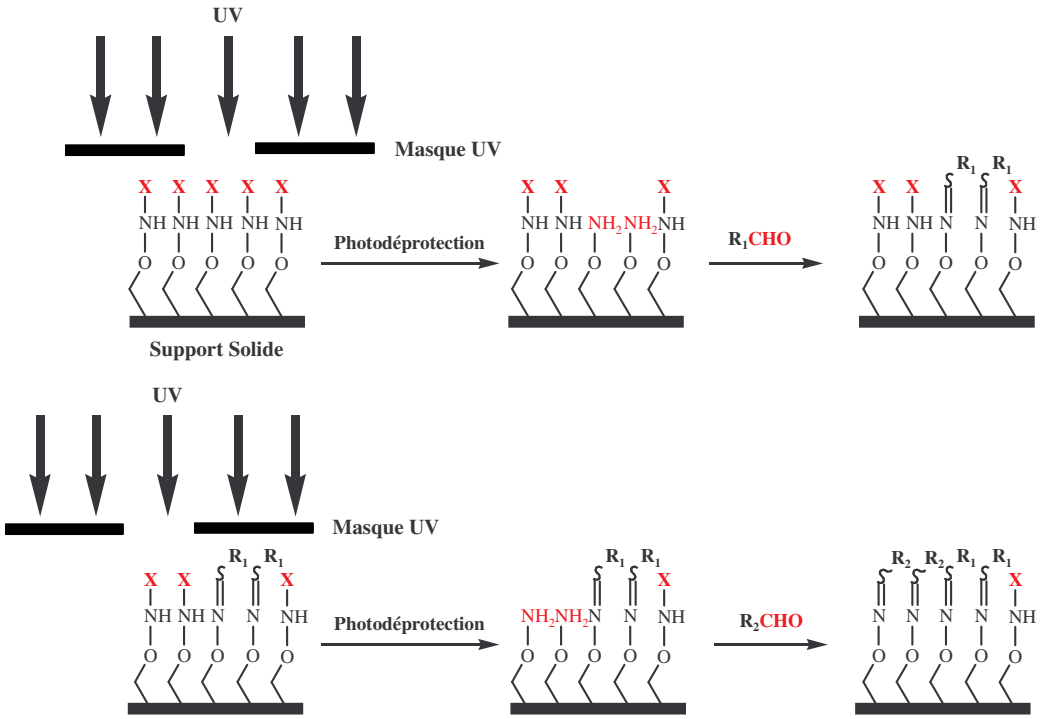


Figure 35 : Adressage par voie photochimique (avec **X** = groupe photoactivable ; $\mathbf{R_1}$, $\mathbf{R_2}$ = molécule tel qu'une biomolécule ou molécule hydrophobe, hydrophile et autres).

V. 3. 1. Choix du groupe photoactivable

L'adressage des biomolécules est réalisé par l'utilisation de la fonction oxyamine protégé par un groupe photoactivable. La photodéprotection doit permettre de générer la fonction oxyamine réactive à une position prédéfinie sur la surface pour réagir avec la biomolécule qui comporte la fonction complémentaire aldéhyde. Compte-tenu de la grande importance du groupe photoactivable, ce dernier doit répondre à des caractéristiques spécifiques :

- Le temps de la photodéprotection doit être très rapide.
- Le rendement de la photodéprotection doit être quantitatif.
- Les sous-produits de la photodéprotection doivent être inertes vis-à-vis de la fonction oxyamine libérée.

Fodor et *al*[62, 132,133] ont utilisé un groupe photoactivable de type α-nitrobenzyl carbonate d'ester pour protéger les acides aminés dans la synthèse *in situ* (Figure 36). Ainsi, ils ont utilisé le *o*-nitrovératryloxycarbonyl (NVOC), introduit par Patchornik et *al*[134]. Ils ont également utilisé le [(méthylnitropipéronyl)oxy]carbonyl[6, 135] (MeNPOC) comme groupe photoactivable.

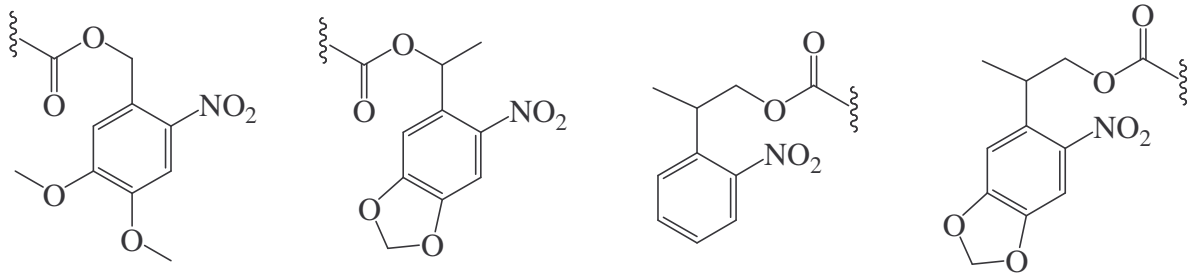


Figure 36 : Groupes protecteurs photoactivables.

Depuis 1990, Pfleiderer et *al*[136-138] développe des dérivés du β-nitrobenzyl carbonate d'ester comme groupe photoactivable, tel que le 2-(2-nitrophényl)propyloxycarbonyl (NPPOC). Ils ont étudié la photodéprotection de plusieurs groupes photoactivables y compris le NVOC, MeNPOC, NPPOC et autres. Ils ont montré d'une part, l'intérêt de l'utilisation du β-nitrobenzyl carbonate d'ester qui réside dans l'absence du sous-produit de type nitroso lors de la photoactivation observé dans le cas des groupes α-nitrobenzyl carbonate d'ester. D'autre part, ils ont montré que le groupe NPPOC est le plus efficace avec un $t_{1/2}$ à 40 secondes, le MeNPOC à 2.5 minutes et le NVOC à 7.3 minutes lors de la photodéprotection des alcools.

Finalement, ils ont proposé un mécanisme de photodéprotection par un processus de β-élimination photoinduite (Figure 37).

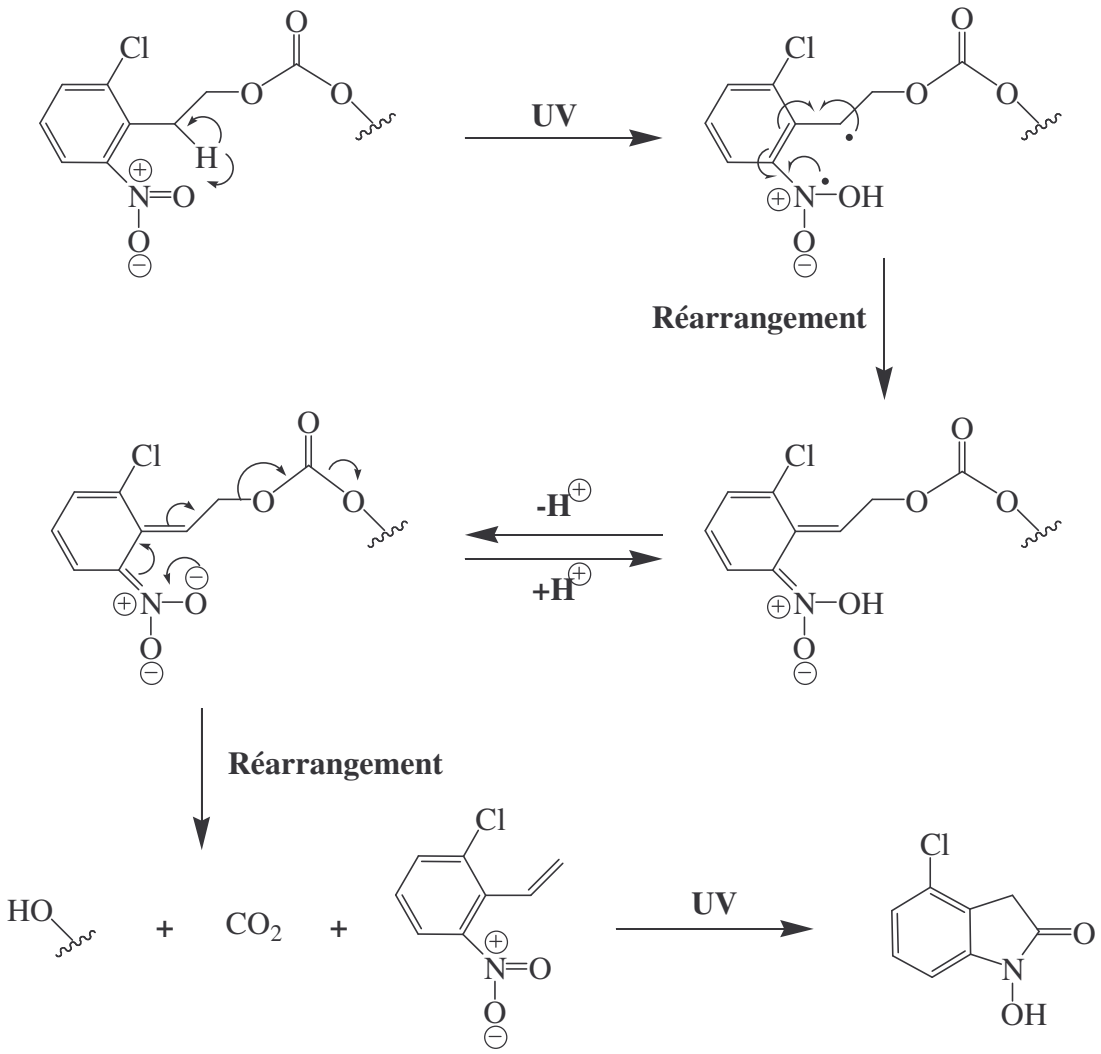


Figure 37 : Mécanisme de la photodéprotection de groupe protecteur de type β-nitrobenzyl carbonate d'ester : 2-(6-chloro-2-nitrophényl)éthoxycarbonulthymidine, selon Giegrich et *al*[137].

La première étape de la photo-élimination est l'abstraction de l'hydrogène de la position β par un processus radicalaire après irradiation à une longueur d'onde de 365 nm. Ensuite, la β-élimination permet la déprotection de l'alcool correspondant et formation du CO_2 et du 6-chloro-2-nitrostyrène. Ils ont montré également que la photodéprotection des groupes α-nitrobenzyl carbonate d'ester génère un sous produit aldéhyde (Figure 38).

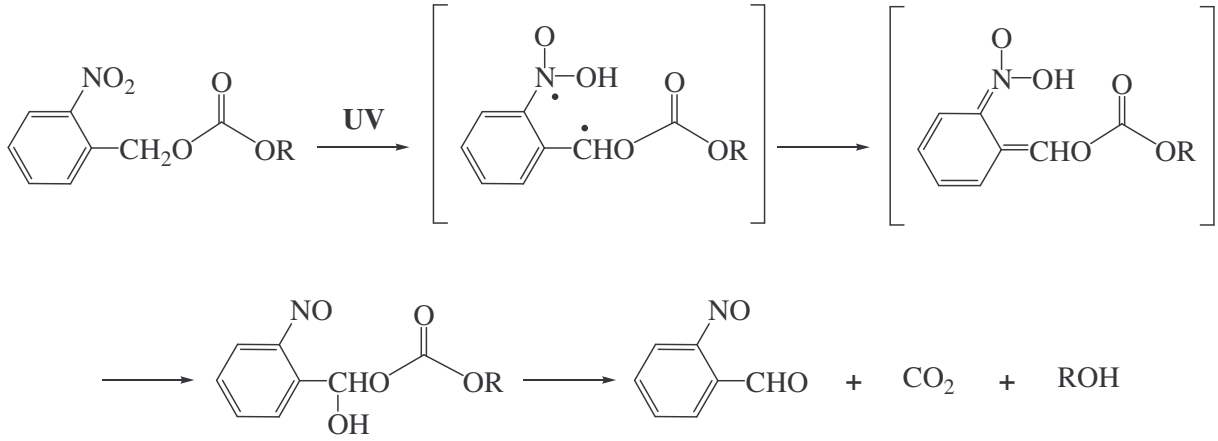


Figure 38 : Mécanisme de la photodéprotection de groupe protecteur de type α-nitrobenzyl carbonate d'ester : 2-nitrobenzyl ester carbonate, selon Hasan et *al*[136].

Bhushan et *al*[139] ont également utilisé le 2-(2-nitrophényl)propyloxycarbonyl (NPPOC) pour protéger les acides aminés. Ainsi, ils ont fait une étude comparative de photodéprotection dans les mêmes conditions entre des acides aminés protégé par le NPPOC ou le NVOC. Ils ont montré, que la photodéprotection du NPPOC est 2 fois plus rapide que celle du groupe NVOC.

Beier et Hoheisel[67, 140] ont montré qu'un nucléotide protégé par le 2-(2-nitrophényl)propyloxycarbonyl (NPPOC) est plus efficacement photodéprotegé qu'un nucléotide protégé par MeNPOC. Ils ont montré que le groupe NPPOC permet des synthèses photochimiques sur support avec des rendements pratiquement quantitatifs.

Plus récemment, Bhushan[141] a utilisé le 2-(3,4-méthylenedioxy-6-nitrophényl)-propyloxycarbonyl (MNPPOC) comme groupe photoactivable de type β-nitrobenzyl carbonate d'ester (Figure 36). Il a fait une étude comparative de la photodéprotection du MNPPOC et NPPOC dans les mêmes conditions. Cette étude a montré que le groupe MNPPOC est plus efficace que le NPPOC.

Nous avons finalement choisie, le 2-(2-nitrophényl)propyloxycarbonyl (NPPOC), comme groupe photoactivable pour la fonction oxyamine pour plusieurs raisons :

- Un temps relativement rapide de la photodéprotection (entre 40 secondes et 2 minutes selon les auteurs et les conditions de déprotection).
- Rendement quantitatif.
- Disponibilité commerciale (sous forme de chloroformiate) alors que le MNPPOC ne l'est pas.

V. 3. 2. Stratégies envisagées

Pour préparer des supports solides fonctionnalisés par une fonction oxyamine protégée par un groupe photoactivable, nous avons envisagé trois approches :

- La première, consiste à coupler un support solide fonctionnalisé par une fonction aminée avec un synthon ester activé oxyamine protégé par le groupe photoactivable (Figure 39A).
- La deuxième, est le couplage d'un support fonctionnalisé par une fonction alcool avec un synthon phosphoramidite oxyamine protégé par le groupe photoactivable (Figure 39B).
- La troisième, consiste à coupler un support activé (silanol) avec un synthon silane oxyamine protégé par le groupe photoactivable (Figure 39C).

Les différentes structures des synthons sont présentées dans la Figure 39. Les fonctions oxyamines sont protégées par le groupe photoactivable NPPOC. Les surfaces fonctionnalisées par la fonction oxyamine protégée par le groupe photoactivable seront appelées surface oxyamine photoactivable.

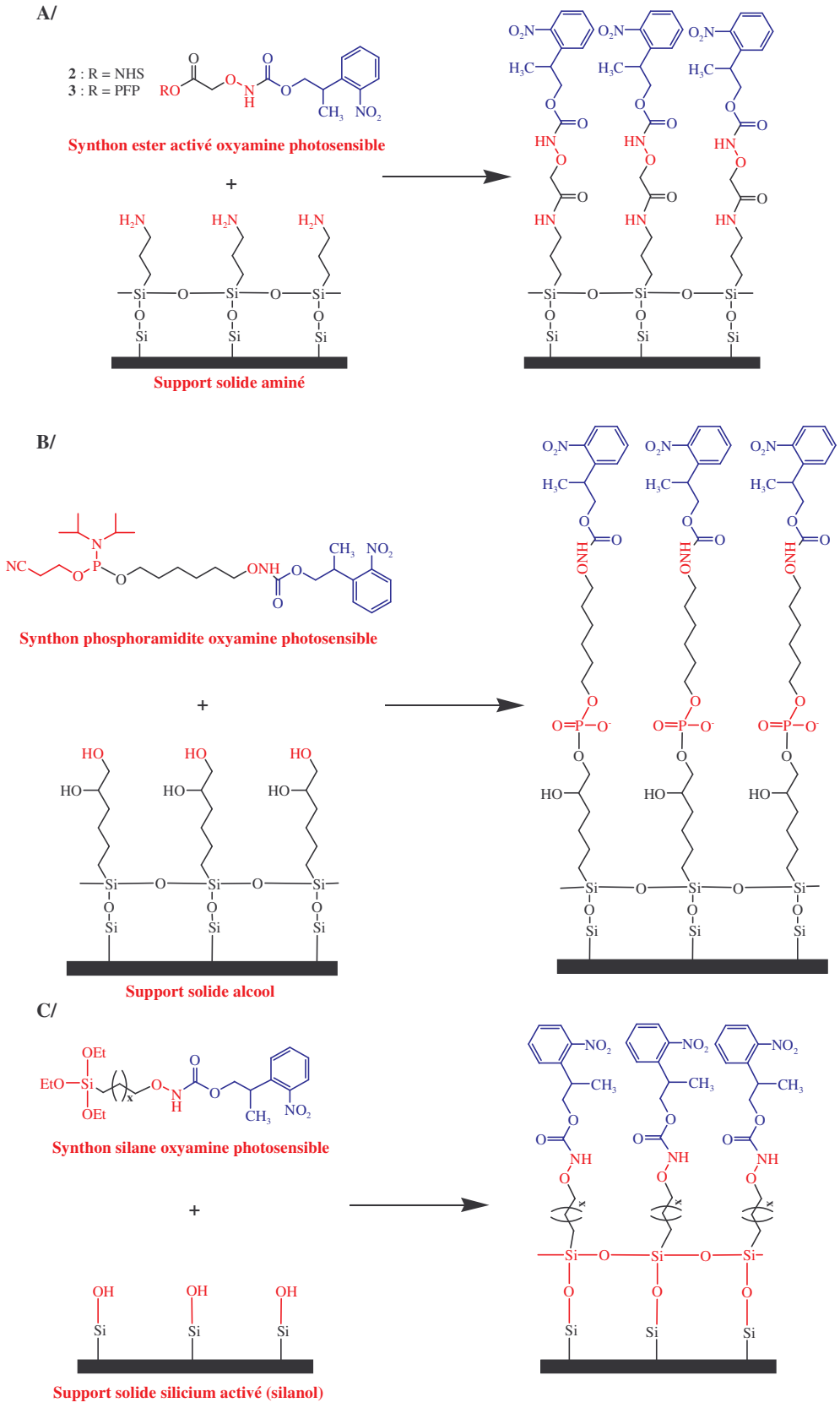


Figure 39 : Préparation de surfaces oxyamine photoactivables. **A/** via un synthon ester activé, **B/** via un synthon phosphoramidite, **C/** via un synthon silane.

V. 3. 3. Plan de travail

Dans une première partie, la synthèse des différents synthons oxyamine photoactivables sera décrite ainsi que la préparation des oligonucléotides porteurs de la fonction réactive aldéhyde en 3' et 5'. La partie synthèse a été réalisée au Département de Chimie Moléculaire (DCM) dans l'équipe d'Ingénierie et Interactions BioMoléculaires (I2BM).

Dans une seconde partie, la fonctionnalisation de surfaces par des oligonucléotides sera présentée. Cette fonctionnalisation a dans un premier temps été étudiée sur support plan afin de pouvoir caractériser l'état de surface. Dans un second temps, elle a été appliquée dans un tube capillaire pour l'adressage de trois oligonucléotides différents.

Enfin, la stratégie a été étendue à l'immobilisation d'autres molécules tel que les sucres, peptides, molécules hydrophobes ou hydrophiles. Les résultats préliminaires sont présentés dans la troisième partie. La partie fonctionnalisation de surfaces a été réalisée au Laboratoire d'Electronique et Technologie de l'Information (LETI) dans le Laboratoire de Fonctionnalisation et Chimie des Microsystèmes (LFCM).

BIBLIOGRAPHIE

1. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Desoxyribose Nucleic Acid. *Nature*, **1953**, *171*, 737-738.

2. Southern, E.M.. Detection of Specific Sequence Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis. *J. Mol. Biol*. **1975**, *98*, 503-517.

3. Khrapko, K. R.; Lysov, Y. P.; Khorlyn, A. A.; Shick, V. V.; Florentiev, V. L.; Mirzabekov, A. D. An Oligonucleotide Hybridization Approach to DNA Sequencing. *J. Mol. Biol.* **1989**, *256*, 118-122.

4. Drmanac, R.; Labat, I.; CrKvenjakov, R. Sequencing of Megabase plus DNA by Hybridization : Theory of the Method. *Genomics*, **1989**, *4*, 114-128.

5. Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; and Solas, D. Light-Directed Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*, **1991**, *251*, 767-773.

6. Pease, A. C.; Solas, D.; Sullivan, E. J.; Cronin, M. T.; Holmens, C. P.; Fodor, S. P. A. Light-Generated Oligonucleotide Arrays for Rapid DNA Sequence Analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **1994**, *91*, 5022-5026.

7. Kato, R.; Kunimatsu, M.; Fujimoto, S.; Kobayashi, T.; Honda, H. Angiotensin II Inhibitory Peptide Found in the Receptor Sequence using Peptide Array. *Biochem Biophys. Res. Commun*. **2004**, *315*, 22-29.

8. Fukui, S.; Feizi, T.; Galustian, C.; Lawson, A. M.; Chai, W. Oligosaccharide Microarrays for High-throughput Detection and Specificity Assignment of Carbohydrate-Protein Interaction. *Nat. Biotechnol*. **2002**, *20*, 1011-1017.

9. Snapyan, M.; Lecocq, M.; Guevel, L.; Arnaud, M. C.; Ghochikyan, A.; Sakanyan, V. Dissecting DNA-protein and Protein-protein Interactions Involved in Bacterial Transcriptional Regulation by a Sensitive Protein Array Method Combining a Near-Infrared. *Proteomics*, **2003**, *3*, 647-657.

10. Larkin, J. E.; Frank, B. C.; Gaspard, R. M.; Duka, I.; Gavras, H.; Quackenbush, J. Cardiac Transcriptional Response to Acute and Chronic Angiotensin II Tretments. *Physiol. Genomics*, **2004**, *18*, 152-166.

11. Zhu, H.; Bilgin, M.; Bangham, R.; Hall, D.; Casamayor, A.; Bertone, P.; Lau, N.; Jansen, R.; Bidlingmaier, S.; Houfek, T. Global Analysis of Protein Activities using Proteome Chips. *Science*, **2001**, *293*, 2101-2105.

12. Belov, L.; de la Vega, O.; dos Remedios, C. G.; Mulligan, S. P.; Chritopherson, R. I. Immunophenotyping of Leukemias using a Cluster of Differentiation Antibody Microarray. *Cancer Res*. **2001**, *61*, 4483-4489.

13. Castel, D.; Pitaval, A.; Debily, M. A.; Gidrol, X., Cell Microarrays in Drug Discovery. *Drug Discovery Today,* **2006**, *11*, 616-622.

14. Woolley, A. T.; Mathies, R. A. Ultra-High-Speed DNA Fragment Separations using Microfabricated Capillary Array Electrophoresis Chips. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **1994**, *91*, 11348-11352.

15. Landers, J. P. Molecular Diagnostics on Electrophoretic Microchips. *Anal. Chem*. **2003**, *75*, 2919-2927.

16. Verpoorte, E. Microfluidic Chips for Clinical and Forensic Analysis. *Electrophoresis*, **2002**, *23*, 677-712.

17. Bustamante, C.; Vesenka, J.; Tang, C. L.; Rees, W.; Guthold, M.; Keller, R. Circular DNA Molecules Imaged in Air by Scanning Force Microscopy. *Biochemistry*, **1992**, *31*, 22-26.

18. Lyubchenko, Y. L.; Oden, P. I.; Lampner, D.; Lindsay, S. M.; Dunker, K. A. Atomic Force Microscopy of DNA and Bacteriophage in Air, Water and Propanol: the Role of Adhesion Forces. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 1117-1123.

19. Matson, R.S.; Rampal, J.; Pentoney Jr, S.L.; Anderson, P.D.; Coassin, P. Biopolymer Synthesis on Polypropylene Supports: Oligonucleotide Arrays. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 110-116.

20. Frutos, A. G.; Smith, L. M.; Corn, R. N. Enzymatic Ligation Reactions of DNA "Words" on Surfaces for DNA Computing. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 10277-10282.

21. Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. A Multistep Chemical Modification Procedure to Create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 8044-8051.

22. Smith, E. A.; Wanat, M. J.; Cheng, Y.; Barreira, S. V. P.; Frutos, A. G; Corn, R. M. Formation, Spectroscopic Characterization, and Application of Sulfhydryl-Terminated Alkanethiol Monolayers for the Chemical Attachment of DNA onto Gold Surfaces. *Langmuir*, **2001**, *17*, 2502-2507.

23. Beattie, W. G.; Meng, L.; Turner, S. L.; Varma, R. S.; Dao, D. D.; Beattie, K. L. Hybridization of DNA Targets to Glass-Tethered Oligonucleotide Probes. *Mol. Biotechnol.* **1995**, *4*, 213-225.

24. Lamture, J. B.; Beattie, K. L.; Burke, B. E.; Eggers, M. D.; Ehrlich, D. J.; Fowler, R.; Hollis, M. A.; Hosicki, B. B.; Reich, R. K.; Smith, S. R.; Varma, R. S.; Hogan, M. E. Direct Detection of Nucleic Acid Hybridization on the Surface of a Charge Coupled Device. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2121-2125.

25. Strother, T.; Cai, W.; Zhao, X.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. Synthesis and Characterization of DNA-Modified Silicon (111) Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1205-1209.

26. Strother, T.; Hamers, R. J.; Smith, L. M. Covalent Attachment of Oligodeoxyribonucleotides to Amine-Modified Si (001) Surfaces. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3535-3541.

27. Winzeler, E. A.; *et al* Functional Characterization of the S. cerevisiae Genome by Gene Deletion and Parallel Analisis. *Science*, **1999**, *285*, 901-906.

28. Milosavljevic, A.; Savkovic, S.; Crkvenjakov, R.; Salbego, D.; Serrato, H.; Kreuzer, H.; Gemmell, A.; Batus, S.; Grujic, D.; Carnahan, S.; Paunesku, T.; Tepavcevic, J. DNA Sequence Recognition by Hybridization to Short Oligomers: Experimental Verification of the Method on the E. coli Genome. *Genomics*, **1996**, *27*, 77-86.

29. Dill, K.; Stanker, L. H.; Young, C. R. Detection of Plasmids Using DNA and RNA Probes and the Light-Addressable Potentiometric Sensor. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **1999**, *41*, 61-67.

30. Drmanac, S.; Kita, D.; Labat, I.; Hauser, B.; Schmidt, C.; Burczak, J. D.; Drmanac, R. Accurate Sequencing by Hybridization for DNA Diagnostics and Individual Genomics. *Nat. Biotechnol*. **1998**, *16*, 54-58.

31. Pirrung, M. C. How to Make a DNA Chips. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2002**, *41*, 1276-1289.

32. Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R. W.; Brown, P. O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*, **1995**, *270*, 467-470.

33. Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Turner, A. P. F.; Mascini, M. Carbon and Gold Electrodes as Electrochemical Transducers for DNA Hybridisation Sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **2004**, *19*, 515–530.

34. Beaucage, S. L.Strategies in the Preparation of DNA Oligonucleotide Arrays for Diagnostic Applications. *Curr. Med. Chem*. **2001**, *8,* 1213-1244.

35. DeRisi, J.; Plenland, L.; Brown, P. O.; Bittner, M. L.; Meltzer, P. S.; Ray, M.; Chen, Y.; Su, Y. A.; Trent, J. M. Use of a cDNA Microarray to Analyse Gene Expression Patterns in Human Cancer. *Nat Genet*. **1996**, *14*, 457-460.

36. Eisen, M. B.; Brown, P. O. DNA Arrays for Analysis of Gene Expression. *Methods Enzymol*. **1999**, *303*, 179-205.

37. www.corning.com

38. Riccelli, P. V.; Merante, F.; Leung, K. T.; Bortolin, S.; Zastawny, R. L.; Janeczko, R.; Benight, A. S. Hybridization of Single-Stranded DNA Targets to Immobilized Complementary DNA Probes: Comparison of Hairpin Versus Linear Capture Probes. *Nucleic Acids Res*. **2001**, *29*, 996-1004.

39. Nonglaton, G.; Benitez, I. O.; Guisle, I.; Pipelier, M.; Léger, J.; Dubreuil, D.; Tellier, C.; Talham, D. R.; Bujoli, B. New Approach to Oligonucleotide Microarrays Using Zirconium Phosphonate-Modified Surfaces. *J. Amer. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 1497-1502.

40. Shchepinov, M. S.; Casegreen, S. C.; Southern, E. M. Steric Factors Influencing Hybridisation of Nucleic Acids to Oligonucleotide Arrays. *Nucleic Acids Res*. **1997**, *25*, 1155-1161.

41. Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Anal. Chem*. **1997**, *69*, 4948-4956.

42. Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective Ligations Reactions with Proteins, Oligosaccharides and Cells. *Tibtech*. **1998**, *16*, 506-513.

43. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from Few Good Reaction. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2001**, *40*, 2004-2021.

44. O'Donnell, M. J.; Tang, K.; Koster, H.; Smith, C. L.; and Cantor, C. R. High-Density, Covalent Attachment of DNA to Silicon Wafers for Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. **1997**, *69*, 2438-2443.

45. Afanassiev, V.; Hanemann, V.; Wölfl, S. Preparation of DNA Protein Micro Arrays Glass Slides Coated with an Agarose Film. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, *e66*.

46. Olivier, C.; Hot, D.; Huot, L.; Ollivier, N.; El-Mahdi, O.; Gouyette, C.; Huynh-Dinh, T.; Gras-Masse, H.; Lemoine, Y.; Melnyk, O. α-oxo Semicarbazone Peptide or Oligodeoxynucleotide Microarrays. *Bioconjugate Chem*. **2003**, *14*, 430-439.

47. Raddatz, S.; Mueller-Ibeler, J.; Kluge, J.; WäB, L.; Burdinski, G.; Havens, J. R.; Onofrey, T. J.; Wang, D.; Schweitzer, M. Hydrazide Oligonucleotides: Modification for Chip Array Attachment and Conjugation. *Nucleic Acids Res*. **2002**, *30*, 4793-4802.

48. Benters, R.; Niemeyer, C. M.; Drutschmann, D.; Blohm, D.; Wöhrle, D. DNA Microarrays with PAMAM Dentritic Linker Systems. *Nucleic Acids Res*. **2002**, *30*, *e10*.

49. Joos, B.; Kuster, H.; Cone, R. Covalent Attachment of Hybridizable Oligonucleotides to Glass Supports. *Anal. Biochem*. **1997**, *247*, 96-101.

50. Kumar, A.; Larsson, O.; Parodi, D.; Liang, Z. Silanized Nuleic Acids: General Platform for DNA Immobilization. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, *e71*.

51. Devaraj, N. K.; Miller, G. P.; Ebina, W.; Kakaradov, B.; Collman, J. P.; Kool, E. T.; Chidsey, C. E. D. Chemoselective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**, *127*, 8600-8601

52. Chrisey, L. A.; O'Ferrall, C. E.; Spargo, B. J.; Dulcey, C. S.; Calvert, J. M. Fabrication of Patterned DNA Surfaces. *Nucl. Acids Res*. **1996**, *24*, 3040.

53. Gilles, P. N.; Wu, D. J.; Foster, C. B.; Dillon, P. J.; Chanock, S. J. Single Nucleotide Polymorphic Discrimination by an Electronic Dot Blot Assay on Semiconductor Microchips . *Nat. Biotechnol*. **1999**, *17*, 365-370.

54. Sosnowski, R. G.; Butler, W. F.; Nerenberg, M. I.; Heller, M. J.; Edman, C. F. WO9929711 patent, **1999**.

55. Heller, M. J.; Forster, A. H.; Tu, E. Active Microelectronic Chip Devices which utilize Controlled Electrophoretic Fields for Multiplex DNA Hybridization and other Genomic Applications. *Electrophoresis*, **2000**, *21*, 157-164.

56. Delabouglise, D.; Garnier, F. Chiral Metals: Amino-Acid-Substituted Conducting Polypyrroles. *Synth. Meth*. **1990**, *39*, 117-120.

57. Garnier, F.; Korri-Youssoufi, H.; Srivastava, P.; Yassar, A. Enzyme Recognition by Polypyrroles-Functinalized with Bioactive Peptides. *J. Am. Chem. Soc*. **1994**, *116*, 8813-8814.

58. Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R. Preparation of a DNA Matrix Via an Electochemically Directed Copolymerization of Pyrrole and Oligonucleotides Bearing a Pyrrole Group. *Nucleic Acids Res*. **1994**, *22*, 2915-2921.

59. Livache, T.; Fouque, B.; Roget, A.; Marchand, J.; Bidan, G.; Teoule, R.; Mathis, G. Polypirrole DNA Chip on a Silicon Device: Exemple of Hepatitis C Virus Genotyping. *Anal. Biochem*. **1998**, *255*, 188-194.

60. Marquette, C. A.; Lawrence, M. F.; Blum, L. J. DNA Covalent Immobilization onto Screen-Printed Electrode Networks for Direct Label-Free Hybridization Detection of p53 Sequences. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 959-964.

61. Bidan, G.; Billon, M.; Galasso, K.; Livache, T.; Mathis, G.; Roget, A.; Torres-Rodriguez, L. M.; Vieil, E. Electropolymerization as a Versatile Route for Immobilizing Biological Species onto Surfaces. *Appl. Biochem. Biotech.* **2000**, *89*, 183-194.

62. Wang, J.; Cai, X.; Rivas, G.; Shiraishi, H.; Farias, P.; Dontha, N. DNA Electrochemical Biosensor for the Detection of Short DNA Sequences Related to the Human Immunodeficiency Virus. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 2629-2629.

63. Korri-Youssoufi, H.; Garnier, F.; Srivastava, P.; Godillot, P.; Yassar, A. Toward Bioelectronics: Specific DNA Recognition Based on an Oligonucleotide-Functionalized Polypyrrole. *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, *119*, 7388-7389.

64. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 2223-2311.

65. Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fisher, E. F.; McBride L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. Y. Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method. *Methods Enzymol*. **1987**, *154*, 287-313.

66. Fodor, S. P. A.; Read, J. L.; Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Lu, A. T.; and Solas, D. Light-Directed Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*, **1991**, *251*, 767-773.

67. Beier, M.; Hoheisel, J. D. Production by Quantitative Photolithographic Synthesis of Individually Quality Checked DNA Microarrays. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, e11.

68. McGall, G.; Labadie, J.; Brock, P.; Wallraff, G.; Nguyen, T.; Hinsberg, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1996**, *93*, 13555-13560.

69. Singh-Gasson, S.; Green, R. D.; Yue, Y.; Nelson, C.; Blattner, F.; Sussman, M. R.; Cerrina, F. *Nat. Biotechnol*. **1999**, *17*, 974-978.

70. Roget, A.; Livache, T. In Situ Synthesis and Copolymerization of Oligonucleotides on Conducting Polymers. *Mikrochim. Acta*, **1999**, *131*, 3-8.

71. Blanchard, A. P.; Friend, S. H**.** Cheap DNA Arrays-it's not all Smoke and Mirrors. *Nat. Biotechnol*. **1999**, *17*, 953-953.

72. Cleary, M. A.; Kilian, K.; Wang, Y.; Bradshaw, J.; Cavet, G.; Ge, W.; Kulkarni, A.; Paddison, P.J.; Chang, K.; Sheth, N. Production of Complex Nucleic Acid Libraries Using Highly Parallel *In Situ* Oligonucleotide Synthesis. *Nat. Meth*. **2004**, *1*, 241.

73. Richmond, K. E.; Li, M.-H.; Rodesch, M. J.; Patel, M.; Lowe, A. M.; Kim, C.; Chu, L. L.; Venkataramaian, N.; Flickinger, S. F.; Kaysen, J.; Belshaw, P. J.; Sussman, M. R.; Cerrina, F. Amplification and Assembly of Chip-Eluted DNA (AACED): a Method for High-Throughput Gene Synthesis. *Nucleic Acids Res*. **2004**, *32*, 5011-5018.

74. Zhu, H.; Snyder, M. Protein Chip Technology. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **2003**, *7*, 55-63.

75. Merrifield, R. B. Solid Phase Synthesis. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc*. **1963**, *85*, 2049-2054.

76. Merrifield, R. B. Solid Phase Synthesis (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **1985**, *24*, 799-810.

77. Haab, B. B.; Dunham, M. J.; Browx, P. O. Protein Microarrays for Hignly Parallel Detection and Quantitation of Specific Proteins and Antibodies in Complex Slution. *Genome Biol*. **2001**, *2*, research0004.1-0004.13.

78. Templin, M. F.; Stoll, D.; Schrenk, M.; Traub, P. C.; Vohringer, C. F.; Joos, T. O. Protein Mirroarray Technology. *Drug Discovery Today*, **2002**, *7*, 815-822.

79. Takahashi, M.; Nokihara, K.; Mihara, H. Construction of a Protein-Detection System using a Loop Peptide Library with a Fluorescence Label. *Chem. Biology*. **2003**, *10*, 53-60.

80. Houseman, B. T.; Gawalt, E. S.; Mrksich, M. Maleimide-Functionalized Self-Assembled Monolayers for the Preparation of Peptide and Carbohydrate Biochips. *Langmuir*, **2003**, *19*, 1522-1531.

81. Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M. Characterization and Optimization of Peptide Arrays for the Study of Epitope-Antibody Interaction using Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem*. **2002**, *74*, 5161-5161.

82. Falsey, J. R.; Renil, M.; Park, S.; Li, S.; Lam, K. S. Peptide and Small Molecule Microarray for High Throughput Cell Adhesion and Functional Assays. *Bioconjugate Chem*. **2001**, *12*, 346-353.

83. Melnyk, O.; Duburcq, X,; Olivier, C.; Urbès, F.; Auriault, C.; Gras-Masse, H. Peptide Arrays for highly Sensitive and Specific Antibody-Binding Fluorescence Assays. *Bioconjugate Chem*. **2002**, *13*, 713-720.

84. Duburcq, X.; Olivier, C.; Malingue, F.; Desmet, R.; Bouzidi, A.; Zhou, F.; Auriault, C.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. Peptide-Protein Microarrays for Simultaneous Detection of Pathogen Infection. *Bioconjugate Chem*. **2004**, *15*, 307-316.

85. Coffinier, Y.; Olivier, C.; Perzyna, A.; Grandidier, B.; Wallart, X.; Durand, J. O.; Melnyk, O. Semicarbazide-Functionalized Si (111) Surface for the Site-Specific Immobilization of Peptide. *Langmuir*, **2005**, *21*, 1489-1496.

86. Carion, O.; Souplet, V.; Olivier, C.; Maillet, C.; Medard, N.; El-Mahdi, O.; Durand, J. O.; Melnyk, O. Chemical Micropatterning of Polycarbonate for Site-Specific Peptide Immobilization and Biomolecular Interactions. *ChemBioChem*. **2006**, *7*, 1-9.

87. Luo, K.; Zhou, P.; Lodish, H. F. The Specificity of the Transforming Growth Factor Beta Receptor Kinases Determined by a Spatially Addressable Peptide Library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, *92*, 11761-11765.

88. Frank, R. Spot-Synthesis : An Easy Technique for the Positionally Addressable, Parallel Chemical Synthesis on a Membrane Support. *Tetrahedron*, **1992**, 48, 9217-9232.

89. Frank, R. Overwin, H. SPOT Synthesis. Epitope Analysis with Arrays of Synthetic Peptides prepared on Cellulose Membranes. *Methods Mol. Biol*. **1996**, *66*, 149-169.

90. Feizi, T.; Mulloy, B. Carbohydrate and Glycoconjugates Glycomics: the New Area of Carbohydrate Biology. *Curr. Opin. Struct. Biol*. **2003**, *13*, 602-604.

91. Bertozzi, C. R.; Kiessling, L. L. Chemical Glycobiology. *Science*, **2001**, *291*, 2357-2364.

92. Chai, W.; Luo, J.; Lim, C. K.; Lawson, A. M. Characterization of Heparin Oligosaccharide Mixtures as Ammonium Salts using Electrospray Mass Spectroscopy. *Anal. Chem*. **1998**, *70*, 2060-2066.

93. Shively, J. E.; Conrad, H. E.; Formation of Anhydrosugars in the Chemical Depolymerization of Heparin. *Biochemistry*, **1976**, *15*, 3932-3942.

94. Chai, W.; Yuen, C. T.; Feizi, T.; Lawson, A. M. Core-Branching Pattern and Sequence Analysis of Mannitol-Terminating Oligosaccharides by Neoglycolipid Technology. *Anal. Biochem*. **1999**, *270*, 314-322.

95. Marcaurelle, L. A.; Seeberger, P. H. Combinatorial Carbohydrate Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol*. **2002**, *6*, 289-296.

96. Seeberger, P. H.; Haase, W. C. Solide-Phase Oligosaccharide Synthesis and Combinatorial Carbohydrate Libraries. *Chem. Rev*. **2000**, *100*, 4349-4393.

97. Zhang, Z. Y.; Ollmann, I. R.; Ye, X. S.; Wischnat, R.; Baasov, T.; Wong, C. H. Programmable Onepot Oligosaccharide Synthesis. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 734-753.

98. Koeller, K. M.; Wong, C. H. Enzymes for Chemical Synthesis. *Nature*, **2001**, *409*, 232-240.

99. Shao, M. C. The use of Streptavidin-Biotinylglycans as a Tool for Characterization of Oligosaccharide Binding Specificity of Lectin. *Anal. Biochem*. **1992**, *205*, 77-82.

100. Wang, D.; Liu, S.; Trummer, B. J.; Deng, C.; Wang, A. Carbohydrate Microarrays for the Recognition of Cross-Reactive Molecular Markers of Microbes and Host Cells. *Nat. Biotechnol*. **2002**, *20*, 275-281.

101. Willats, W. G. T.; Rasmussen, S. E.; Kristensen, T.; Mikkelsen, J. D.; Knox, J. P. Sugar-Coated Microarrays: a Novel Slide Surface for the High-Throughput Analysis of Glycans. *Proteomics*, **2002**, *2*, 1666-1671.

102. Park, S.; Shin, I. Fabrication of Carbohydrate Chips for Studying Protein-Carbohydrate Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2002**, *41*, 3180-3182.

103. Park, S.; Lee, M. R.; Pyo, S. J.; Shin, I. Carbohydrate Chips for Studying High-Throughput Carbohydrate-Protein Interactions. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 4812-4819.

104. Adams, E. W.; Ueberfeld, J.; Ratner, D. M.; O'Keefe, B. R.; Walt, D. R.; Seeberger, P. H. Encoded Fiberoptic Microsphere Arrays for Probing Protein-Carbohydrate Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, *42*, 5317-5320.

105. Ratner, D. M.; Adams, E. W.; Su, J.; O'Keefe, B. R.; Mrksich, M.; Seeberger, P. H. Probing Protein-Carbohydrate Interactions with Microarrays of Synthetic Oligosaccharides. *ChemBioChem*, **2004**, *5*, 379-383.

106. Smith, E. A.; Thomas, W. D.; Kiessling, L. L.; Corn, R. M. Surface Plasmon Imaging Studies of Protein-Carbohydrate Interactions. *J. Am. Chem. Soc*. **2003**, *125*, 6140-6148.

107. Kohn, M.; Wacker, R.; Peters, C.; Schroder, H.; Soulere, L.; Breinbauer, R.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H.; Staudinger Ligation: a New Immobilisation Strategy for the Preparation of Small Molecule Arrays. *Angew. Chem. Int. Ed*. **2003**, *42*, 5830-5834.

108. Houseman, B. T.; Mrksich, M. Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification. *Chem. Biol*. **2002**, *9*, 443-454.

109. MacBeath, G.; Schreiber, S. L. Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination. *Science*, **2000**, *289*, 1760-1763.

110. Moody, M. D.; Van Arsedell, S. W.; Murphy, K. P.; Oremcole, S. F.; Burns, C. Array-Based ELISAs for High-Throughput Analysis of Hulan Cytokines. *Biotech*. **2001**, *31*, 186-190.

111. Wiese, R.; Belosludtsev, Y.; Powdrill, T.; Thompson, P.; Hogan, M. Simultaneous Multianalyte ELISA Performed on a Microarray Platform. *Clin. Chem*. **2001**, *47*, 1451-1457.

112. Wu, X.; Liu, H.; Liu, J.; Haley, K. N.; Treadway, J. A.; Larson, J. P.; Ge, N.; Peale, F.; Bruchez, M. P. Immunofluorescencent Labeling of Cancer Marker Her2 and other Cellular Targets with Semiconductor Quantum Dots. *Nat. Biotechnol*. **2003**, *21*, 41-46.

113. Wang, L.; Lofton, C.; Popp, M.; Tan, W. Using Luminescent Nanoparticles as Staining Probes for Affymetrix GeneChips**.** *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 610-613.

114. Rawle, R. J.; Selassie, C. R. D.; Johal, M. S. Creation of Mammalian Single- and Double-Stranded DNA Surfaces: A Real-Time QCM-D Study. *Langmuir*, **2007**, *23*, 9563-9566.

115. Florin, S. P.; Moy, V. T.; Gaub, H. E. Adhesion Forces Between Indidual Ligand-Receptor Pairs. *Science*, **1991**, *264*, 415-417.

116. Rief, M.; Clausem-Schaumann, H.; Gaub, H. E. Sequence-Dependent Mechanics of Single DNA Molecules. *Nat Struct Biol*. **1999**, *6*, 346-349.

117. Willemsen, O. H.; Snel, M. M.; Cambi, A.; Greve, J.; De Grooth, B. G.; Figdor, C. G. Biomolecular Interaction Measured by Atomic Force Microscoy. *Biophys. J*. **2000**, *79*, 3267-3281.

118. Richter, K.; Orfert, M.; Howitz, S.; Thierbach, S. Deep Plasma Silicon etch for Microfluidic Applications. *Surf. Coat. Technol*. **1999**, *116–119*, 461-467.

119. Anduze, M.; Colin, S.; Caen, R.; Camon, H.; Conedera, V.; Do Conto T. Analysis and Testing of a Fluidic Vortex Microdiode. *J. Micromech. Microeng*. **2001**, *11*, 108-112.

120. Andersson, H.; van der Wijngaart, W.; Enoksson, P.; Stemme, G. Micromachined Flow-Through Filter-Chamber for Chemical Reactions on Beads. *Sens. Actuat. B*. **2000**, 67, 203-208.

121. B.H. Jo, L.M. Van Lerberghe, K.M. Motsegood, D.J. Beebe, Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomer. *J. Microelectromech. Syst*. **2000**, *9*, 76-81.

122. Muck, A.; Wang, J.; Jacobs, M.; Chen, G.; Chatrathi, M. P.; Jurka, V.; Vyborny, Z.; Spillman, S. D.; Sridharan, G.; Schöning M. J. Fabrication of Poly(methyl methacrylate) Microfluidic Chips by Atmospheric Molding. *Anal. Chem*. **2004**, *76*, 2290-2297.

123. Zhan, W.; Seong, G. H.; Crooks R. M.. Hydrogel-Based Microreactors as a Functional Component of Microfluidic Systems. *Anal. Chem*. **2002**, *74*, 4647-4652.

124. Balakirev, M. Y.; Porte, S.;Vernaz-Gris, M.; Berger, M.; Arié, J. P.; Fouqué, B.; Chatelain, F. Photochemical Patterning of Biological Molecules Inside a Glass Capillary. *Anal. Chem*. **2005**, 77, 5474-5479

125. Blair, S.; Richmond, K.; Rodesch, M.; Bassetti, M.; Cerrina, F. A Scalable Method for multiplex LED-Controlled Synthesis of DNA in Capillaries. *Nucleic Acids Res*. **2006**, *34*, e 110.

126. Jencks, W. P. "Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation." *J. Am. Chem. Soc.*, **1959**, *81*, 475-481.

127. Renaudet, O.; Dumy P. Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrate. *Org. Lett*. **2003** *5*, 243-246.

128. Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly Efficient Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates: Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. *Chem. Eur. J*. **2001**, *7*, 3976-3984.

129. Forget, D.; Renaudet, O.; Defrancq, D.; Dumy P. Efficient Preparation of Carbohydrate-Oligonucleotide Conjugates (COCs) using Oxime Bond Formation. *Tetrahedron Lett*. **2001**, *42*, 7829-7832.

130. Defrancq, E.; Hoang, A.; Vinet, F.; Dumy, P. Oxime Bond Formation for the Covalent Attachment of Oligonucleotides on Glass Support. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2683-2686.

131. Holmes, C. P.; Adams, C. L.; Kochersperger, L. M.;Mortensen, R. B.; Aldwin, L. A. The Use of Light-Directed Combinatorial Peptide Synthesis in Epitope Mapping. *Biopolymers*, **1995**, *37*,199.

132. Read, J. L.; Fodor, S. P. A.; Stryer, L.; Pirrung, M. C.; Hoeprich, P. D. US Patent. **2002**, 6,420,169

133. Pirrung, M. C.; Stryer, L.; Fodor, S. P. A.; Read, J. L. US Patent. **2002**, 6, 416, 952.

134. Patchornik, A.; Amit, B.; Woodward, R. B. Photosensitive Protecting Groups. *J. Am. Chem. Soc*. **1970**, 92, 6333-6335.

135. McGall, G. H.; Barone, A. D.; Diggelmann, M.; Fodor, S. P. A.; Gentalen, E.; Ngo, N. The Efficiency of Light-Directed Synthesis of DNA Arrays on Glass Substrates. *J. Am. Chem. Soc*. **1997**, *119*, 5081-5090.

136. Hasan, A.; Stengele, K.; Giegrich, H.; Cornwell, P.; Isham, K. R.; Sachleben, R. A.; Pfleiderer, W.; Foote, R. S. Photolabile Protecting Groups for Nucleosides: Synthesis and Photodeprotection Rates. *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 4247-4264.

137. Giegrichh, H.; Eisele-Bühler, S.; Hermann, C.; Kvasyuk, E.; Charubala, R. and Pfleiderer, W. New Photolabile Protecting Groups in Nucleotide and Nucleotide Chemistry-Synthesis, Cleavage Mechnisms and Applications. *Nucleosides & Nucleotides*. **1998**, *17*, 1987-1996.

138. Walbert, S., Pfleiderer, W., and Steiner, U. E., Photolabile Protecting Groups for Nucleosides : Mechanistic Studies of the 2-(2-nitrophenyl)ethyl Group, *Helv. Chim. Acta*. **2001**, *84*, 1601–1611.

139. Bhushan, K. R.; DeLisi, C. and Laursen, R. A. Synthesis of Photolabile 2-(2-nitrophenyl)propyloxycarbonyl Protected Amino acids. *Tetrahedron Lett*. **2004**, *44*, 8585-8588.

140. Beier, M.; and Hoheisel, J. D. Versatile Derivatisation of Solid Support Media for Covalent Bonding on DNA-Microchips. *Nucleic Acids Res*. **1999**, *27*, 1970-1977.

141. Bhushan, K. R. Light-Directed Maskless Synthesis of Peptide Arrays Using Photolabile Amino Acid Monomers. *Org. Biomol. Chem*. **2006**, *4*, 1857–1859.

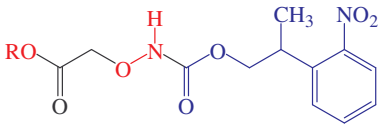
142. Nivens, D. A.; Conrad, D. W. Photoactive Poly(ethylene glycol) Organosilane Films for Site-Specific Protein Immobilization. *Langmuir*, **2002**, *18,* 499-504.

143. Edupuganti, O. P.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. The Oxime Bond Formation as an Efficient Chemical Tool for the Preparation of 3', 5'-Bifunctionalised Oligodeoxyribonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **2004**, *14*, 2839-2842.

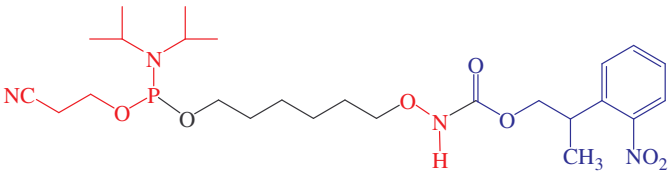
Chapitre I : SYNTHESE DES "SYNTHONS OXYAMINE PHOTOACTIVABLES" ET OLIGONUCLEOTIDES

Nous allons décrire dans cette partie, la synthèse des différents "synthons oxyamine photoactivables", ainsi que la préparation des oligonucléotides modifiés contenant respectivement la fonction aldéhydique en 5' et 3'(Figure 1).

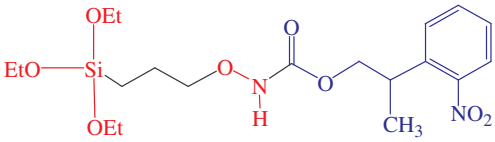
Ester activé 2, 3 (R = NHS, PFP)



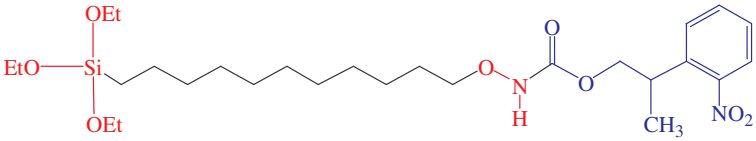
Phosphoramidite 9

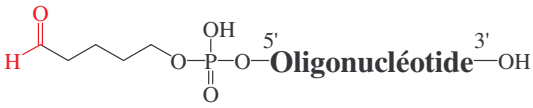


Silane à chaîne courte 11



Silane à chaîne longue 15





Oligonucléotide 5' aldéhyde



Oligonucléotide 3' aldéhyde

Figure 1 : "Synthons oxyamine photoactivables" et oligonucléotides modifiés par la fonction aldéhyde.

I. SYNTHESE DES SYNTHONS OXYAMINE PHOTOACTIVABLES

I. 1. Synthèse des dérivés esters activés

Nous avons envisagé la synthèse des dérivés esters activés à partir du chlorhydrate de carboxyméthoxylamine commercial (Figure 2). Le chlorhydrate de carboxyméthoxylamine est tout d'abord protégé par le chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle. Puis, la réaction d'activation de l'acide est réalisée soit, par le *N*-hydroxysuccinimide, soit par le pentafluorophénol.

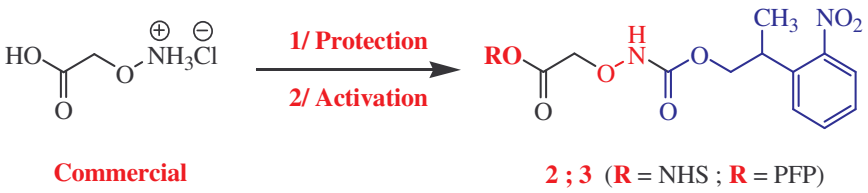


Figure 2 : synthèse de l'ester activé.

I. 1. 1. Protection de la fonction oxyamine

L'introduction du groupe protecteur photolabile est réalisé à l'aide du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle commercial. La réaction est réalisée dans un milieu biphasique (eau/dioxanne) à température ambiante pendant 3 heures. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le produit **1** avec un rendement de 90 % (Figure 3).

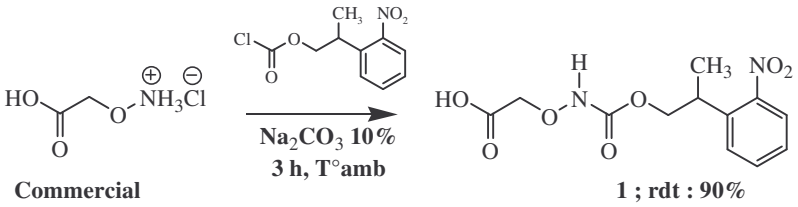


Figure 3 : synthèse du composé **1**.

I. 1. 2. Activation de la fonction acide carboxylique

- Activation avec *N*-hydroxysuccinimide (NHS)

L'acide est activé sous forme d'ester de *N*-hydroxysuccinimide. La réaction s'effectue en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) avec le *N*-hydroxysuccinimide dans du dichlorométhane à température ambiante pendant 1 nuit. Après purification par "flash" chromatographie sur gel de silice, on obtient le produit **2** avec un rendement de 67 % (Figure 4).

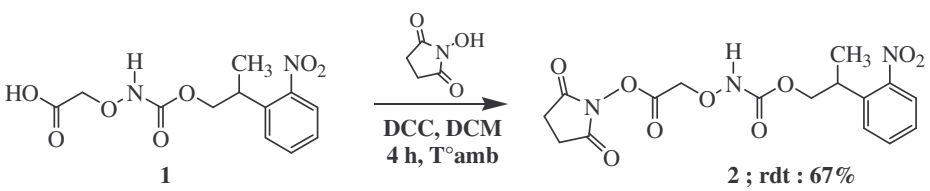


Figure 4 : synthèse de l'ester activé **2**.

- Activation avec pentafluorophénol (PFP)

L'acide est activé sous forme d'ester de pentafluorophénol. La réaction s'effectue en présence de dicyclohexylcarbodiimide avec le pentafluorophénol dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 4 heures. On obtient le produit **3** avec un taux de conversion de 100 % (Figure 5).

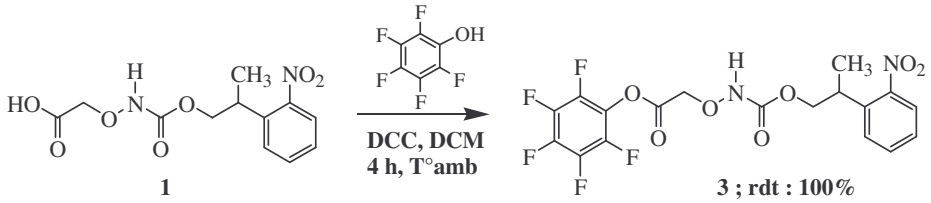


Figure 5 : synthèse de l'ester activé **3**.

I. 2. Synthèse du dérivé phosphoramidite

Nous avons envisagé la synthèse du dérivé phosphoramidite à partir du 6-bromohexanol commercial (Figure 6). L'introduction de l'oxyamine est réalisée en utilisant le *N*-hydroxyphthalimide, et l'alcool est ensuite protégé sous forme d'ether de trityle. Ensuite, la fonction oxyamine est déprotégée avec l'hydrazine, et le groupe photoactivable est introduit en utilisant le chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle. La déprotection de l'alcool s'effectue en milieu acide, et enfin la réaction de phosphitylation est réalisée.

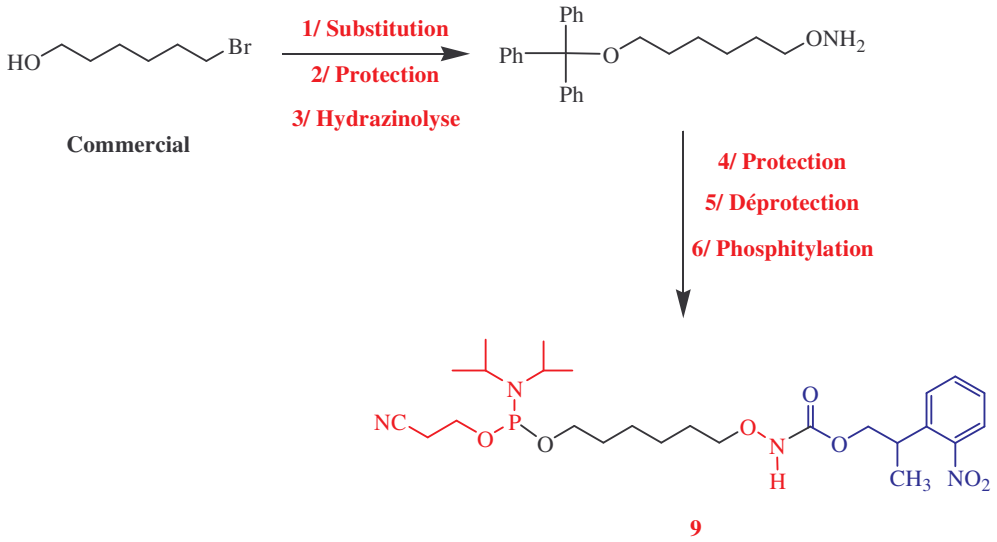


Figure 6 : synthèse du phosphoramidite **9**.

I. 2. 1. Introduction de l'oxyamine

La fonction oxyamine est introduite à l'aide du *N*-hydroxyphthalimide. La réaction est réalisée en milieu basique à 50°C et conduit après une nuit au composé **4** avec un rendement de 75 % (Figure 7).

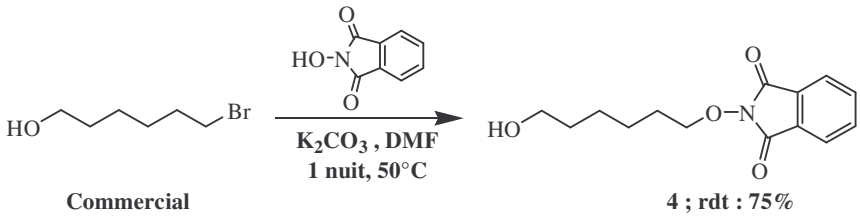


Figure 7 : synthèse du composé **4**.

I. 2. 2. Tritylation

L'alcool primaire est ensuite protégé sous forme d'éther de trityle. La réaction est effectuée à l'aide du chlorure de trityle dans la pyridine à température ambiante pendant une nuit. Le composé **5** est obtenu après purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 99 % (Figure 8).

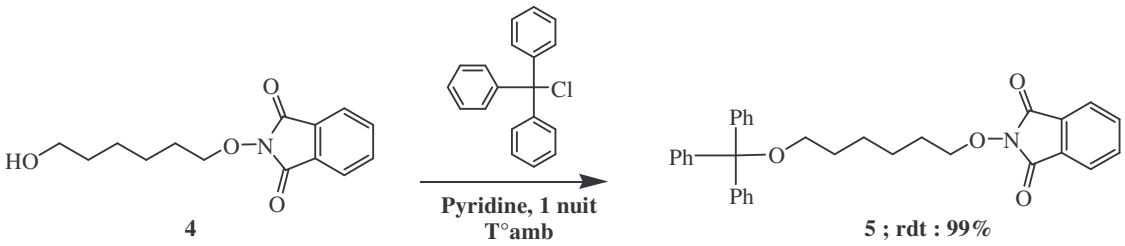


Figure 8 : synthèse du composé **5**.

I. 2. 3. Hydrazinolyse

La déprotection de l'oxyamine est réalisée par l'hydrazine dans le dichlorométhane à reflux pendant 1 h 30. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le composé **6** avec un rendement de 90 % (Figure 9).

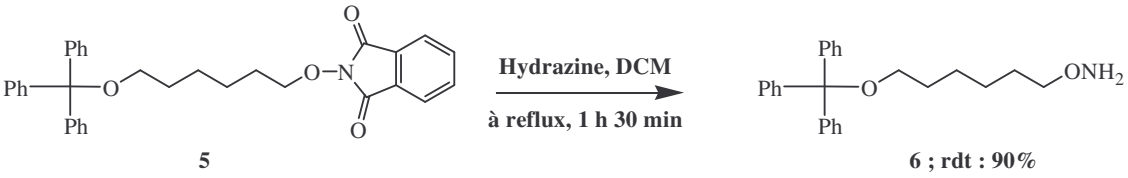
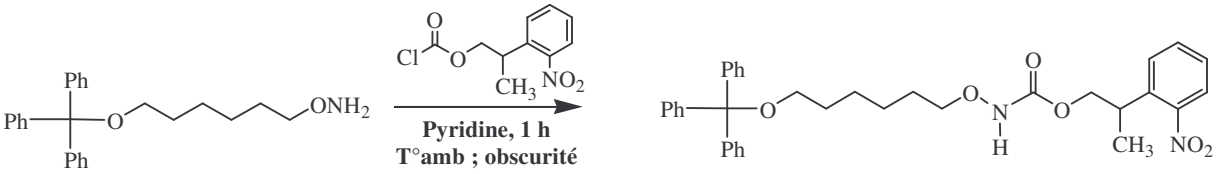


Figure 9 : synthèse du composé **6**.

Le produit **6** contenant une fonction oxyamine réactive, des précautions d'utilisations doivent être prise notamment proscrire toutes traces de dérivés carbonylés dans la verrerie (acétone de lavage).

I. 2. 4. Protection de l'oxyamine

L'introduction du groupe protecteur photolabile est réalisée à l'aide du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle dans la pyridine à température ambiante à l'obscurité. La réaction est très rapide, et on obtient après purification par chromatographie sur gel de silice, le produit **7** avec un rendement de 89 % (Figure 10).

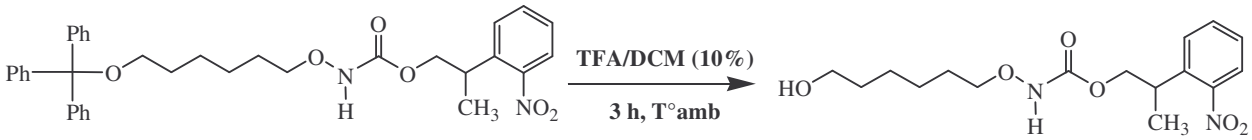


6 **7 ; rdt : 89%**

Figure 10 : synthèse du composé **7**.

I. 2. 5. Détritylation

La déprotection de l'alcool primaire est réalisée en milieu acide à température ambiante pendant 3 heures. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le composé **8** avec un rendement de 90 % (Figure 11). Nous n'avons pas observé de dégradation du groupe protecteur NPPOC dans ces conditions.

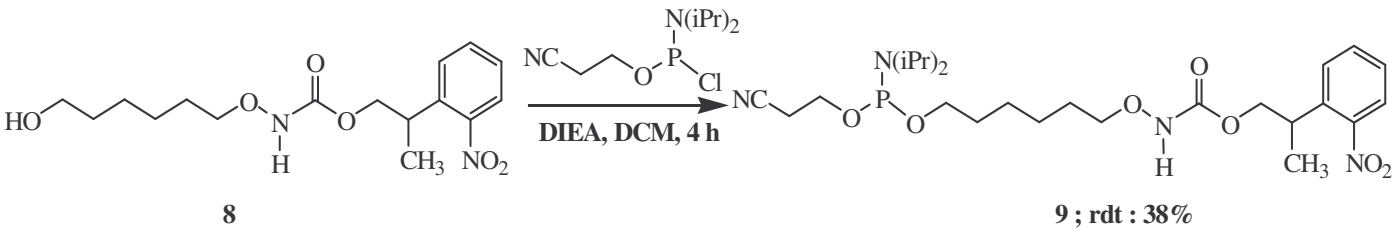


7 **8 ; rdt : 90%**

Figure 11 : synthèse du composé **8**.

I. 2. 6. Phosphitylation

Le dérivé phosphoramidite est obtenu par phosphitylation de l'alcool. La réaction avec le chlorophosphoramidite est réalisée en conditions anhydres en présence d'une base (DIEA) à température ambiante sous argon pendant 4 heures. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le composé **9** avec un rendement de 38 % (Figure 12). Nous n'avons pas optimisé la réaction, ce qui explique le faible rendement.



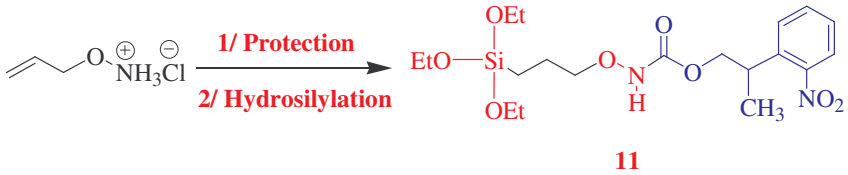
8 **9 ; rdt : 38%**

Figure 12 : synthèse du phosphoramidite **9**.

I. 3. Synthèse des organosilanes

I. 3. 1. Synthèse du synthon à chaîne courte (C_3)

La synthèse de l'organosilane a été réalisée à partir du chlorhydrate de 3-hydroxylamine propène commercial (Figure 13). Le chlorhydrate de 3-hydroxylamine propène est tout d'abord protégé, en utilisant le chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle, suivie de l'hydrosilylation de l'alcène.

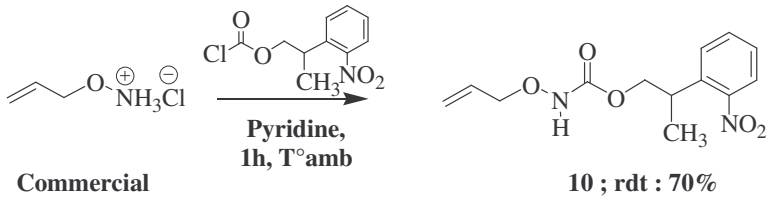


11

Figure 13 : synthèse du silane **11**.

I. 3. 1. 1. Protection de l'oxyamine

L'introduction du groupe protecteur photolabile est réalisée à l'aide du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle dans la pyridine à température ambiante. La réaction est très rapide, et on obtient après purification par chromatographie sur gel de silice le produit **10** avec un rendement de 70 % (Figure 14).



Commercial **10 ; rdt : 70%**

Figure 14 : synthèse du composé **10**.

I. 3. 1. 2. Hydrosilylation

L'incorporation du groupement triéthoxysilyle s'effectue par une réaction d'hydrosilylation de la double liaison (C=C) en présence du catalyseur de Karstedt (platine(0)-1,3-divinyl-1,1,3,3-tétraméthyldisiloxane dissous dans le poly-(diméthylsiloxane))[1-4]. Le triéthoxysilane, joue à la fois le rôle de réactif et de solvant, et on obtient après 2h d'agitation à 60°C le produit **11** avec un rendement de 78 % après purification par "flash" chromatographie sur gel de silice (Figure 15).

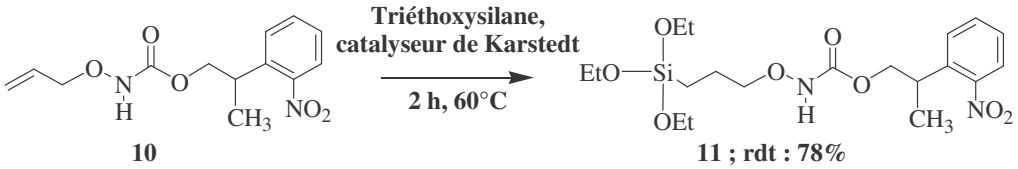


Figure 15 : synthèse du silane **11**.

I. 3. 2. Synthèse du synthon silane à chaîne longue (C_{11})

La synthèse de l'organosilane **15** a été réalisée à partir du 11-bromoundecène commercial (Figure 16). L'introduction de l'oxyamine est réalisée en utilisant le *N*-hydroxyphthalimide suivie d'une déprotection avec l'hydrazine. Le groupe photoactivable est ensuite introduit en utilisant le chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle, suivie de l'étape d'hydrosilylation de l'alcène.

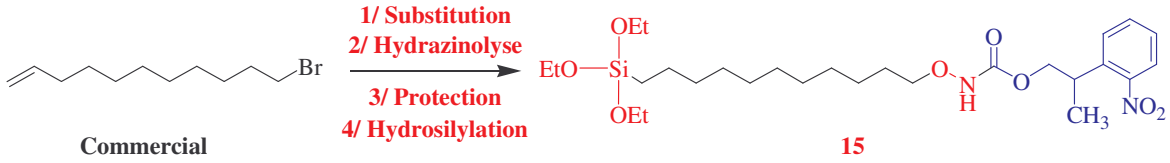


Figure 16 : synthèse du silane **15**.

I. 3. 2. 1. Introduction de l'oxyamine

La fonction oxyamine est introduite à l'aide du *N*-hydroxyphtalimide. La réaction est réalisée en milieu basique à 50°C et conduit après 3 heures au composé **12** avec un rendement de 97% (Figure 17).

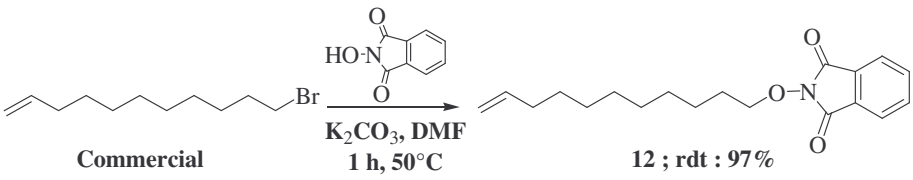


Figure 17 : synthèse du composé **12**.

I. 3. 2. 2. Hydrazinolyse

La déprotection de l'oxyamine est réalisée par l'hydrazine dans le dichlorométhane à reflux pendant 1 h 30. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le composé **13** avec un rendement de 94% (Figure 18).

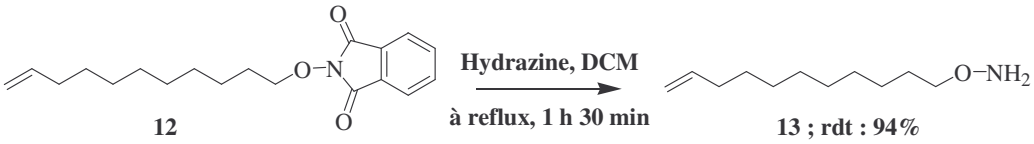


Figure 18 : synthèse du composé **13**.

I. 3. 2. 3. Protection de l'oxyamine

L'introduction du groupe protecteur photolabile est réalisée à l'aide du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle dans une solution pyridine/dichlorométhane à température ambiante. La réaction est très rapide, et on obtient après purification par chromatographie sur gel de silice le produit **14** avec un rendement de 88 % (Figure 19).

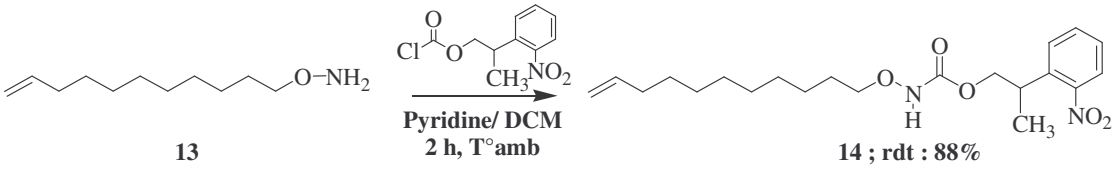


Figure 19 : synthèse du composé **14**.

I. 3. 2. 4. Hydrosilylation

L'hydrosilylation est réalisée dans les mêmes conditions que pour le produit à chaîne courte. Après purification par chromatographie sur gel de silice, on obtient le produit **15** avec un rendement de 80 % (Figure 20).

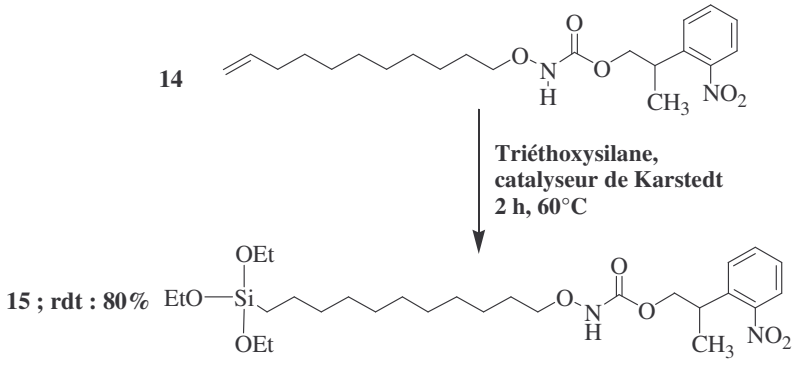
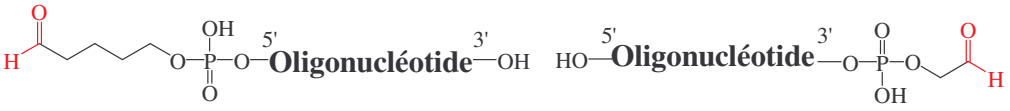


Figure 20 : synthèse du silane **15**.

L'hydrosilylation des oléfines terminales catalysées par des dérivés du platine conduit le plus souvent à une orientation de type anti-Markovnikov[4]. Cependant, pour confirmer cette orientation nous avons analysé le produit par son spectre de RMN du silicium (^{29}Si) et du proton (^{1}H). Sur le spectre de RMN ^{29}Si, nous observons un seul pic à -21.7 ppm confirmant l'obtention d'un seul isomère. Dans le spectre de RMN ^{1}H, la présence de 2 protons blindés (Si-C<u>H</u>$_2$-) par l'atome du silicium prouve la formation du silane en position terminale.

II. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES

Nous décrirons la préparation des oligonucléotides modifiés contenant respectivement la fonction aldéhydique en 5' et 3'.



II. 1. Synthèse des oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhydique en 5'

La synthèse automatisée d'oligonucléotides, par voie aux phosphoramidites, fournie une méthode simple et efficace pour introduire des groupes réactifs à l'extrémité 5' en ajoutant des phosphoramidites modifiés lors de la dernière étape de la synthèse automatisée[5, 6].

Dans des travaux antérieurs, le laboratoire a développé une méthode de modification des oligonucléotides par un aldéhyde[7]. Celle-ci consiste à incorporer un phosphoramidite porteur de la fonction 1,2-diol protégée par un groupe protecteur acidolabile lors de la dernière étape de la synthèse de l'oligonucléotide. Après déprotection du diol, l'oxydation génère ensuite l'aldéhyde correspondant.

Les séquences oligonucléotidiques choisies, présentent à l'extrémité 5', un pentamère de composition d(TTTTT), servant d'espaceur entre la séquence hybridable et la surface, et permettant une meilleure accessibilité de cette dernière vis-à-vis de sa cible[8-12].

Nous avons choisie trois séquences oligonucléotidiques pour tester nos surfaces photoactivables (Figure 21).

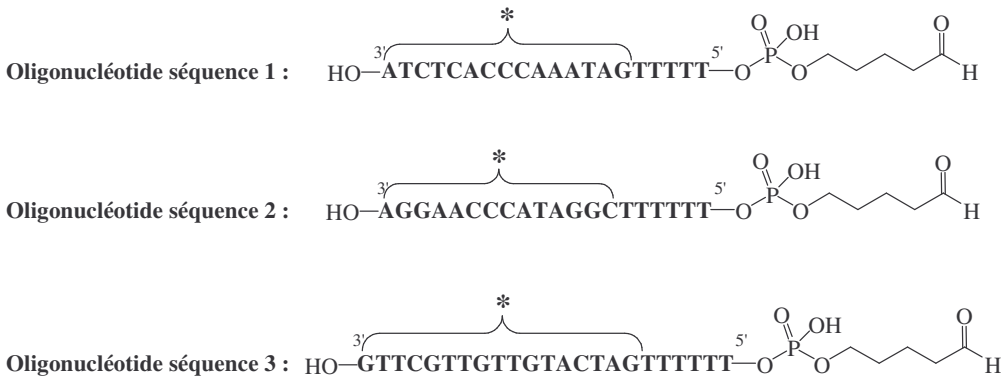
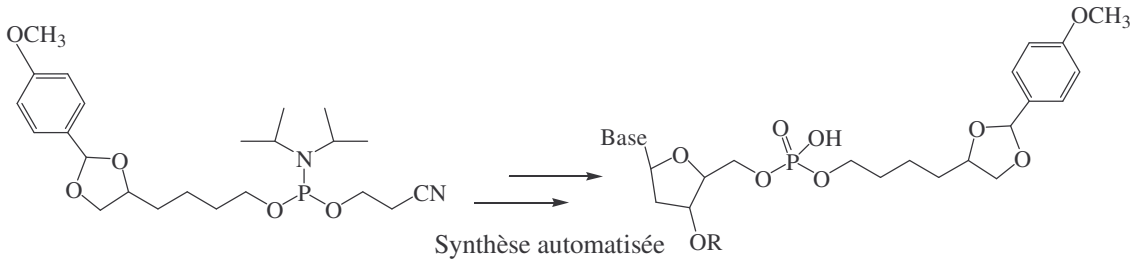


Figure 21 : Oligonucléotides aldéhydiques, séquences **1**, **2** et **3** (***** séquence hybridable).

II. 1. 1. Synthèse automatisée

L'introduction du phosphoramidite modifié disponible au laboratoire) s'effectue en doublant le temps de couplage préconisé par le constructeur, lors de la dernière étape de la synthèse automatisée d'oligonucléotide (Figure 22). Après déprotection dans les conditions usuelles (NH_4OH 28%, 55°C pendant 24 h), les oligonucléotides porteurs du diol protégé à l'extrémité 5' sont purifiés par CLHP en phase de polarité inversée. Le groupe protecteur du diol facilite la purification des oligonucléotides à ce niveau grâce aux propriétés hydrophobes du groupe benzylidène.

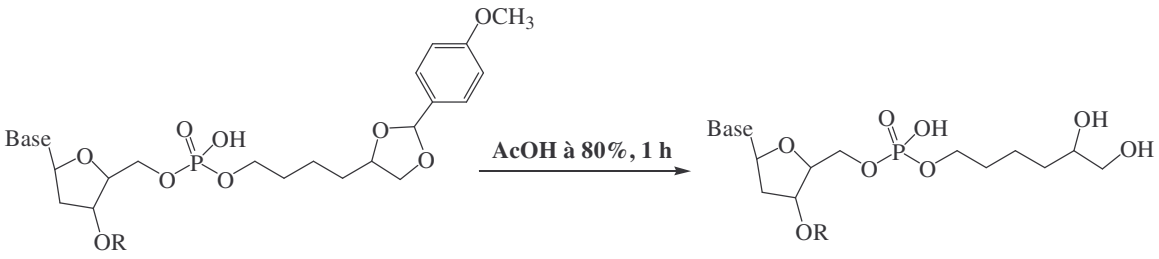


Base = T, R = TTTTGATAAACCCACTCTA — **Oligonucléotide séquence 1**
R = TTTTTCGGATACCCAAGGA — **Oligonucléotide séquence 2**
R = TTTTTGATCATGTTGTTGCTTG — **Oligonucléotide séquence 3**

Figure 22 : synthèse des oligonucléotides porteurs du diol protégé : séquences **1**, **2** et **3**.

II. 1. 2. Déprotection de l'extrémité 5'

Les oligonucléotides protégés en 5' sont traités avec une solution aqueuse d'acide acétique à 80% pendant 1 h, conduisant aux oligonucléotides déprotégés correspondant (Figure 23). Les résidus, après lyophilisation, sont lavés avec de l'éther afin d'éliminer le dérivé du benzylidène libéré lors de la déprotection. Les oligonucléotides ont été caractérisés par spectrométrie de masse par électrospray en mode négatif.

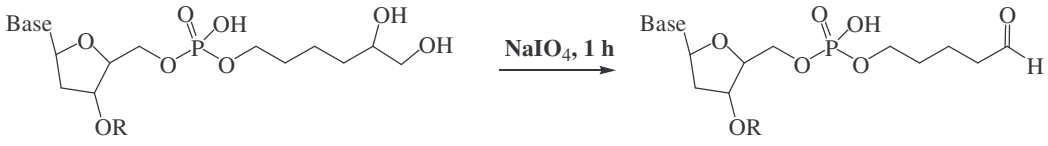


Base = T, R = TTTTGATAAACCCACTCTA — **Oligonucléotide séquence 1**
R = TTTTTCGGATACCCAAGGA — **Oligonucléotide séquence 2**
R = TTTTTGATCATGTTGTTGCTTG — **Oligonucléotide séquence 3**

Figure 23 : synthèse des oligonucléotides porteurs du diol : séquences **1**, **2** et **3**.

II. 1. 3. Oxydation de la fonction 1,2-diol

La coupure oxydative du diol est effectuée en utilisant un excès de périodate de sodium (50 éq) à température ambiante pendant 1 h (Figure 24). Ceci conduit à la formation sélective des oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhydique. L'excès de $NaIO_4$ est éliminé par filtration sur colonne de phase inverse C18.



Base = T, R = TTTTGATAAACCCACTCTA — **Oligonucléotide séq 1**
R = TTTTTCGGATACCCAAGGA — **Oligonucléotide séq 2**
R = TTTTTGATCATGTTGTTGCTTG — **Oligonucléotide séq 3**

Figure 24 : synthèse des oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhyde en 5'.

Après lyophilisation, les "oligonucléotides aldéhydiques" sont conservés au congélateur à -18°C. Ils sont utilisés rapidement (moins d'une semaine) pour l'immobilisation sur surface pour éviter toutes dégradations. Cette limitation de stabilité des aldéhydes nous a

poussé à utiliser le brut réactionnel de l'oxydation pour l'immobilisation sur surface. Les études de la fonctionnalisation de surfaces (chapitre II) ont montré que l'utilisation du brut réactionnel n'a aucun impact, ni dans l'efficacité de l'immobilisation, ni dans la stabilité de la surface.

II. 2. Synthèse des oligonucléotides porteurs de la fonction aldéhydique en 3'

Nous avons choisi d'utiliser de nouveau le groupe 1,2-diol comme précurseur de la fonction aldéhyde en utilisant une méthode mise au point au laboratoire[13]. L'aldéhyde est facilement démasqué par coupure oxydative du groupe 1,2-diol. Cette fonctionnalisation est avantageuse de par la disponibilité commerciale du support solide contenant le 1,2-diol (Figure 25). La fonction alcool, protégée sous forme acétate, est déprotégée lors du traitement basique.

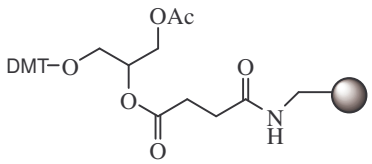


Figure 25 : Support solide contenant le 1,2-diol.

L'utilisation d'un oligonucléotide 3' aldéhyde, nous permettra d'étudier sa réactivité part rapport à celle de l'aldéhyde en 5'. Ainsi, nous avons choisi la même séquence hybridable que l'oligonucléotide séquence **1** pour préparer l'oligonucléotide séquence **4**, alors que la séquence T_5 a été introduite du côté 3' (Figure 26).

Oligonucléotide séq 4 : 

Figure 26 : Séquence de l'oligonucléotide séquence **4** (* séquence hybridable).

II. 2. 1. Synthèse automatisée

Le support solide est incorporé dans une "colonne d'oligonucléotide" et permet l'assemblage et la préparation de l'oligonucléotide aldéhyde séquence **4** par synthèse automatisée (Figure 27). Un traitement NH_4OH 28% à 55°C pendant 24 heures est utilisé pour couper l'oligonucléotide du support et supprimer les groupes protecteurs des bases, incluant le groupement acétyle labile en milieu basique. L'oligonucléotide porteur du groupe diméthoxytrityle à l'extrémité 5' et le diol à l'extrémité 3' est purifié par CLHP en phase de polarité inversée.

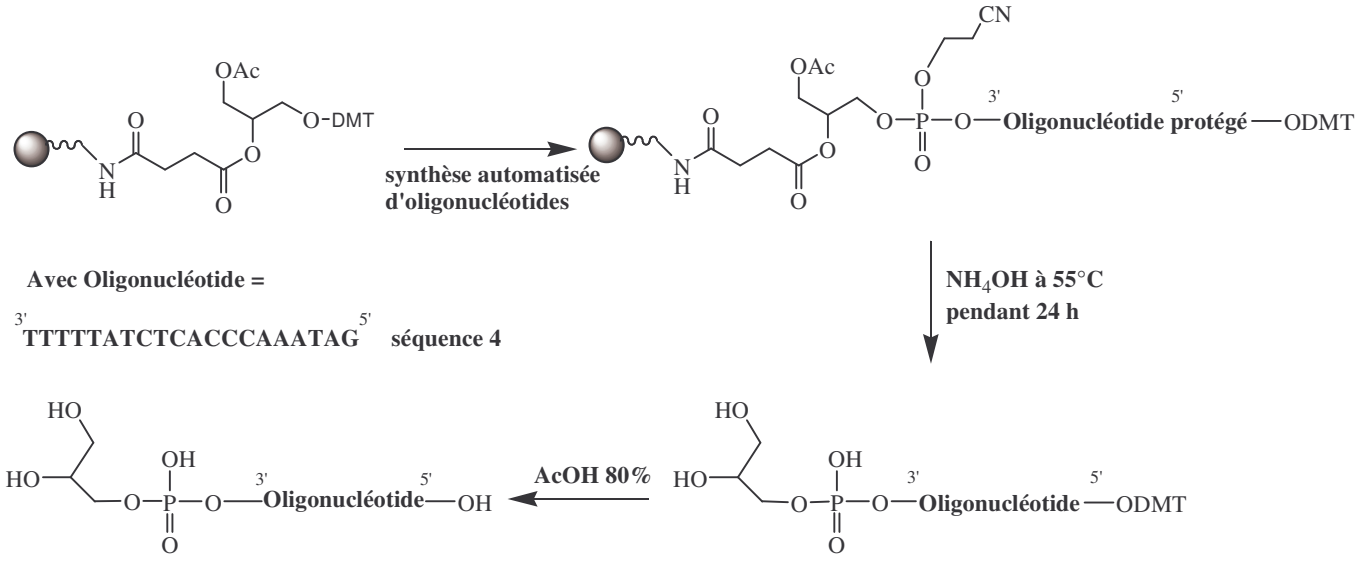


Figure 27: synthèse de l'oligonucléotide de séquence **4** portant le diol en 3'.

II. 2. 2. Déprotection de l'extrémité 5'

Le traitement de l'oligonucléotide protégé séquence **4** avec de l'acide acétique à 80% conduit à l'oligonucléotide déprotégé de séquence **4** porteur du diol en 3'. Les résidus, après lyophilisation, sont lavés avec de l'éther afin d'éliminer le dérivé trityle libéré lors de la déprotection. Le composé a été caractérisé en spectrométrie de masse par électrospray en mode négatif.

II. 2. 3. Oxydation de la fonction diol

La coupure oxydative du diol est effectuée en utilisant un excès de périodate de sodium (50 éq) à température ambiante pendant 1 h (Figure 28). Nous utilisons le brut réactionnel de l'oxydation pour l'immobilisation sur surface pour les mêmes raisons qu'auparavant.

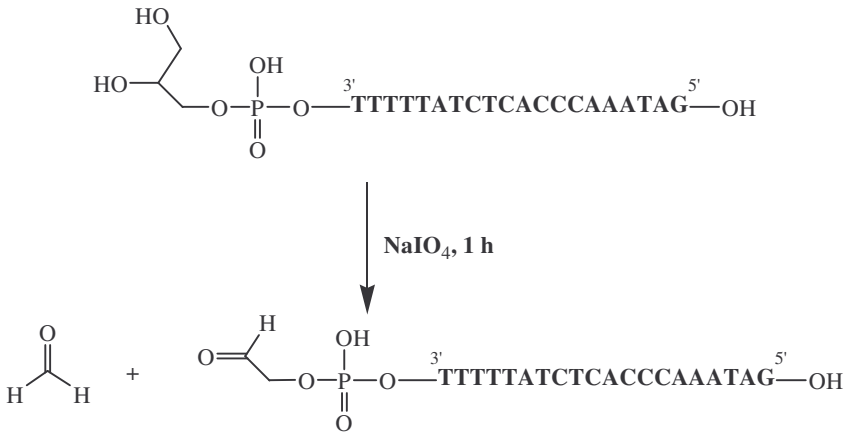


Figure 28 : Oxydation de la fonction diol en 3' (oligonucléotide séquence **4**).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. INDICATIONS GENERALES

Tous les composés chimiques et les solvants (Fournisseurs : Fluka, Sigma-Aldrich, Merck) sont de qualité analytique et ont été utilisés directement sans purification.

- La purification des produits par chromatographie sur colonne a été réalisée avec un gel de silice Kieselgel 60 (0.063-0.200 mm) Merck.

- Les analyses par chromatographie sur couche mince **(CCM)** ont été réalisées sur des plaques de silice 60 F254 Merck de 0.25 mm d'épaisseur, avec une détection UV à 254 et 365 nm (ou avec une révélation à l'iode si les produits n'absorbent pas en UV).

- Les oligonucléotides ont été synthétisés sur un appareil Expedite 8909 (Perkin-Elmer, PerSeptive Biosystems) et ABI 3400 (Applied Biosystems) à l'échelle de 1 µmole. Les réactifs utilisés proviennent de chez Cruachem et Eurogentec.

- Les analyses des oligonucléotides ont été effectuées par Chromatographie Liquide Haute Performance **(CLHP)** sur un appareil Waters constitué d'un injecteur universel Rhéodyne, d'un détecteur UV Waters 2487 à double longueur d'onde, d'un programmeur de gradient 600E. Les purifications des oligonucléotides ont été effectuées sur un appareil Waters équipé de deux pompes M510, d'un injecteur universel Rhéodyne, d'un programmateur de gradient M680 et d'un détecteur UV M490E à longueur d'onde variable.

- Les spectres de Résonance Magnétique Nucléaire **(RMN)** ont été enregistrés sur les spectromètre Bruker AC200 et Avance 300. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en ppm par rapport au pic du solvant pris comme référence ($CDCl_3$: 7.24 ppm à 25°C). Les spectres sont décrits avec les abréviations suivantes : s = singulet, d : doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet, quat = carbone quaternaire. Les constantes de couplage (*J*) sont données en Hertz (Hz).

- Les spectres de masse **(SM)** ont été obtenus avec des spectromètres POLARISQ Thermo Finnigan à trappe à ions (logiciel X Calibur) pour l'ionisation par désorption chimique, et Esquire 3000 (Bruker) pour l'ionisation par électrospray (ESI). L'analyse par ESI a été faite en mode négatif pour les oligonucléotides, et en mode négatif et/ou positif pour les composés intermédiaire des synthon oxyamine photoactivable. L'éluant est constitué de 50% d'acétonitrile aqueux et le débit est de 8 µl /min. Pour la mesure en mode négatif, on ajout 2% de Et_3N. Pour la mesure en mode positif, on ajout 0.1 % de TFA.

- Les spectres d'adsorption électronique **(UV)** ont été obtenus sur un spectrophotomètre Varian Cary 400 scan UV/Visible.

- Les analyses élémentaires ont été réalisées dans le service de Microanalyse du DCM.

- Les analyses en Infrarouge **(IR)** ont été réalisées sur un spectromètre Magna-IR 550 en utilisant un disque en NaBr.

II. CONDITION DE CLHP

II. 1. Analyse des oligonucléotides

Colonne : Macherey-Nagel Nucleosil µ-Bondapack ; 4.6 x 250 mm^2 ;
Phase de polarité inverse C_{18}, 5 µm de porosité.

Éluant : **A** : Acétate d'ammonium 20 mM / CH_3CN, 95/5, v/v, pH 6
B : CH_3CN/H_2O, 95/5, v/v

Gradient : de 0 à 30% de B en 20 minutes

Débit : 1 mL/min (Système **1**).

II. 2. Purification des oligonucléotides

Colonne : Macherey-Nagel Nucleosil µ-Bondapack ; 10 x 250 mm^2 ;
Phase de polarité inverse C_{18}, 7 µm de porosité.

Éluant : **A** : Acétate d'ammonium 20 mM / CH_3CN, 95/5, v/v, pH 6
B : CH_3CN/H_2O, 95/5, v/v

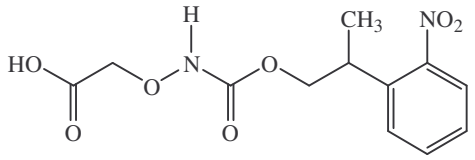
Gradient : de 0 à 30% de B en 20 minutes

Débit : 4 mL/min (Système **2**).

III. SYNTHESE DES SYNTHONS OXYAMINE PHOTOACTIVABLES

III. 1. Synthèse des dérivés esters activés

♦ Acide acétique, [[[[2-(2-nitrophényl)propoxy]carbonyl]amino]oxy] 1 :



Le chlorhydrate de carboxyméthoxylamine (1 g, 4.57 mmol) est dissous dans une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10 % (25 mL). La solution est refroidie à 0°C et l'on ajoute, goutte à goutte une solution de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC) (2.20 g, 9.1 mmol) dans du dioxane (20 mL). L'agitation est maintenue pendant 2-3 heures à température ambiante. On évapore à sec le milieu réactionnel. Au résidu obtenu, on additionne de l'eau (250 mL) et on lave la phase aqueuse avec de l'éther diéthylique (200 mL). On acidifie alors la phase aqueuse avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 1N jusqu'à pH 3 et l'on extrait avec du dichlorométhane (3 x 250 mL). Les phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de sodium anhydre, et évaporées. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane puis dichlorométhane/ méthanol, 97/3, v/v). Le produit **1** est obtenu sous forme d'une poudre blanche (1.20 g, 4.0 mmol, 90%).

Point de fusion : 88-92°C.

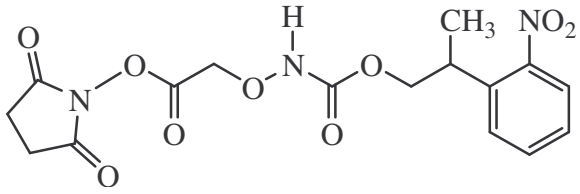
RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.40 (3 H, d, *J* = 16 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 3.70 (1 H, m, C$\underline{H}$) ; 4.30 (2 H, m, C$\underline{H}_2$O) ; 4.40 (s, 2 H, COC$\underline{H}_2$O) ; 7.30-7.60 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 18.0 (CH_2) ; 33.0 (CH_2) ; 75.0 (CH_3) ; 123.0 (Cquat) ; 137.0 (Cquat) ; 138.0 (Cquat) ; 133.0 (Cquat) ; 136.0 (CH) ; 151.0 (CH) ; 159.0 (CH) ; 172.0 (CH) ; 173.0 (CH).

SM (ESI mode positif) : M_{calc} = 298 ($C_{12}H_{14}N_2O_7$) ; m/z = 321$[M+Na]^+$; m/z = 337 $[M+K]^+$.

SM (ESI mode négatif) : m/z = 297 $[M-H]^-$; m/z = 595 $[2M-H]^-$.

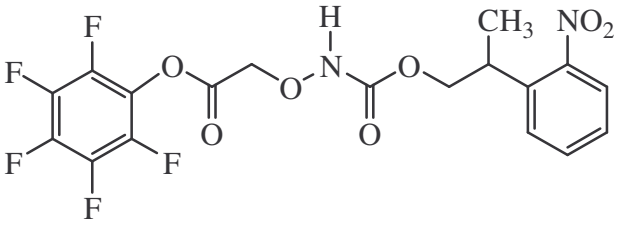
♦ Acide carbamique, [2-[(2,5-dioxo-1-pyrrolidinyl)oxy]-2-oxoéthoxy]-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 2 :



L'acide **1** (1.20 g, 4.0 mmol) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (15 mL), et l'on ajoute du DCC (0.82 g, 4.4 mmol), puis du *N*-hydroxysuccinimide (0.457 g, 4.4 mmol). On agite pendant 1 nuit. Après filtration pour éliminer la DCU, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle). Le produit **2** est obtenu sous forme d'une poudre jaune (1.0 g, 2.68 mmol, 67 %).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.39 (3 H, d, *J* = 16 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 2.89 (4 H, s, 2 C$\underline{H}_2$) ; 3.68 (1 H, m, C$\underline{H}$) ; 4.31 (2 H, m, C$\underline{H}_2$O) ; 4.39 (s, 2 H, COC$\underline{H}_2$O) ; 7.30-7.60 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

♦ Acide acétique, [[[[2-(2-ntrophényl)propoxy]carbonyl]amino]oxy]-, pentafluorophényl ester 3 :



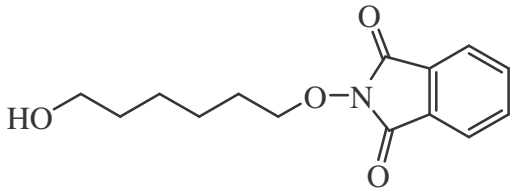
L'acide **1** (500 mg, 1.6 mmol) est dissous dans le dichlorométhane anhydre (5 mL) et l'on ajoute du pentafluorophénol (372 mg, 1.9 mmol), puis goutte-à-goutte une solution de DCC (360 mg, 1.9 mmol) dans le dichlorométhane. On agite pendant 4 heures et on filtre. Après évaporation, le produit **3** est obtenu sous forme de huile jaune (740 mg, 1.9 mmol, 100 % de conversion).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30 (3 H, d, *J* = 16 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 3.70 (1 H, m, C$\underline{H}$) ; 4.30 (2 H, m, C$\underline{H}_2$O) ; 4.70 (2 H, s, COC$\underline{H}_2$O) ; 7.70-7.30 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

RMN-^{19}F (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : -166.0 (1 F, t) ; -164.0 (1 F, d) ; -162.0 (1 F, t) ; -157.0 (1 F, t) ; -152.50 (1 F, d).

III. 2. Synthèse du dérivé phosphoramidite

♦ 1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-[(6-hydroxyhexyl)oxy] 4 :



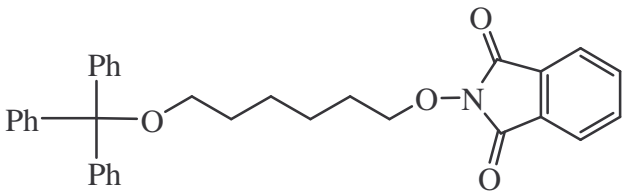
Une solution de *N*-hydroxyphtalimide (2.70 g, 16.6 mmol) et de carbonate de potassium (4.60 g, 23.6 mmol) dans le diméthylformamide (150 mL) est chauffée à 50°C sous argon pendant une heure. Le 6-bromohexanol (3.0 g, 16.6 mmol) est ensuite ajouté et le mélange réactionnel est à nouveau agité pendant 1 nuit à 50°C. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. On ajoute alors de l'acétate d'éthyle (50 mL) au résidu obtenu et la phase organique est lavée avec de la soude 0.1N, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, et évaporée. Le produit **4** est obtenu sous forme de poudre blanche (3.28 g, 12.5 mmol, 75%).

Point de fusion : 85-88°C.

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30-1.90 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 3.60 (2 H, t, *J* = 13 Hz, C$\underline{H}_2$O) ; 4.20 (2 H, t, J = 13 Hz, C$\underline{H}_2$ON) ; 7.70-7.90 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

SM (DCI, mode positif) : M_{calc} = 263 ($C_{14}H_{17}NO_4$) ; m/z = 281 $[M+NH_4]^+$.

♦ 1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-[[6-[bis(4-mèthoxyphényl)phénylméthoxy]hexy]oxy] 5 :



A une solution du composé **4** (3.28 g, 12.5 mmol) dans la pyridine anhydre (75 mL), on ajoute du chlorure de trityle (4.2 g, 15 mmol). La solution est agitée à température ambiante sous argon pendant 1 nuit. On ajoute alors lentement du méthanol (5 mL), et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans de l'acétate

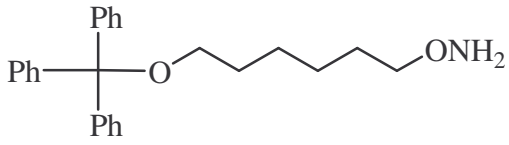
d'éthyle et la phase organique est lavée avec de l'eau, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane/cyclohexane, 75/25, v/v). Le produit **5** est obtenu sous forme de poudre blanche (6.27 g, 12.4 mmol, 99 %).

Point de fusion : 106-107°C.

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30-1.90 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 3.20 (2 H, t, *J* = 13 Hz, C$\underline{H}_2$O) ; 4.20 (2 H, t, J = 13 Hz, C$\underline{H}_2$ON) ; 7.20-7.40 (15 $\underline{H}_{Ar}$, m, trityle) ; 7.70-7.90 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m, phtalimide).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 505 ($C_{33}H_{31}NO_4$) ; m/z = 528 $[M+Na]^+$; m/z = 544 $[M+K]^+$.

♦ Hydroxylamine, *O*-[6-[bis(4-méthoxyphényl)phénylméthoxy]hexy] 6 :

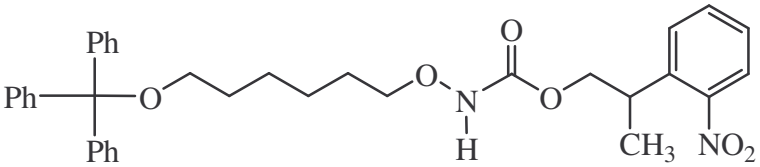


Le composé **5** (6.27 g, 12.4 mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane (50 mL) et l'on ajoute de l'hydrazine (780 mg, 24.8 mmol). La solution est portée à reflux pendant 1 h 30, puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane puis dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v). On obtient le composé **6** sous forme d'huile translucide (4.20 g, 11.2 mmol, 90 %).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30-1.80 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 3.10 (2 H, t, *J* = 13 Hz, C$\underline{H}_2$O) ; 3.60 (2 H, t, J = 13 Hz, C$\underline{H}_2$ON) ; 7.70-7.90 (15 $\underline{H}_{Ar}$, m).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 375 ($C_{25}H_{29}NO_2$), m/z = 376 $[M+H]^+$; m/z = 398 $[M+Na]^+$; m/z = 414 $[M+K]^+$.

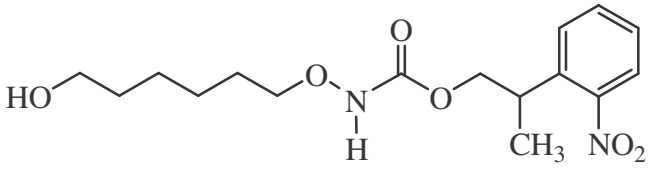
♦ Acide carbamique, [[6-[bis(4-méthoxyphényl)phénylméthoxy]hexy]oxy]-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 7 :



Le composé **6** (4.20 g, 11.2 mmol) est dissous dans la pyridine anhydre (100 mL). On ajoute, goutte à goutte, une solution du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC) (5.40 g, 22.4 mmol) dans le dichlorométhane (50 mL). On agite pendant une heure à l'obscurité et on évapore sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans le dichlorométhane et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane). Le produit **7** est obtenu sous forme d'une huile orange (5.80 g, 9.9 mmol, 89 %).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30 (3 H, d, *J* = 16 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 1.50-1.80 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 3.0 (2 H, t, J = 13 Hz, C$\underline{H}_2$OTrt) ; 3.70 (2 H, m, C$\underline{H}_2$ON, 1 H, m, C$\underline{H}$) ; 4.20 (2 H, t, J = 13 Hz, C$\underline{H}_2$OCO) ; 7.10-7.50 (15 $\underline{H}_{Ar}$, m, trityle) ; 7.50-7.80 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m, NPPOC).
SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 582 ($C_{35}H_{38}N_2O_6$) ; m/z = 605 $[M+Na]^+$; m/z = 621 $[M+K]^+$.
SM (ESI, mode négatif) : m/z = 581 $[M-H]^-$.

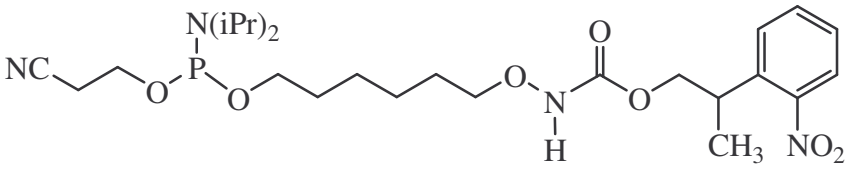
♦ **Acide carbamique, [(6-hydroxyhexyl)oxy]-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 8 :**



Le composé **7** (5.80 g, 9.9 mmol) est dissous dans une solution d'acide trifluoroacétique à 20 % dans le dichlorométhane. On agite pendant 3 heures à l'obscurité et à température ambiante, puis on évapore le solvant sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans le dichlorométhane et la phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane puis dichlorométhane/méthanol, 95/5, v/v). Le produit **8** est obtenu sous forme d'huile orange (3.0 g, 8.9 mmol, 90 %).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.30 (3 H, d, *J* = 16 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 1.50-1.80 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 3.70 (2 H, m, C$\underline{H}_2$ON ; 1H, m, C$\underline{H}$) ; 4.3 (2 H, t, C$\underline{H}_2$OCO ; 2 H, t, C$\underline{H}_2$OH) ; 7.50-7.80 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).
SM (DCI, mode positif) : M_{calc} = 340 ($C_{16}H_{24}N_2O_6$) ; m/z = 454 $[M+TFA]^+$.

♦ 3,10,12, Trioxa-2-aza-11-acide Phosphotetradécanoique, 11-[bis(1-méthyléthyl)amino]-14-cyano-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 9 :



Le produit **5** (0.90 g, 2.7 mmol) est solubilisé sous courant argon dans le dichlorométhane anhydre (15 mL) et l'on ajoute le DIEA (0.56 mL, 3.2 mmol), puis le 2-cyanoéthyle diisopropylchlorophosphoramidite (0.72 mL, 3.2 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 4 heures jusqu'à disparition du produit de départ. On ajoute alors du dichlorométhane (40 mL) et on lave la phase organique avec une solution d'hydrogénocarbonate de sodium saturée, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (dichlorométhane puis dichlorométhane/méthanol, 97/3, v/v). Le produit **6** est obtenu sous forme d'huile jaune (0.50 g, 1.0 mmol, 38 %).

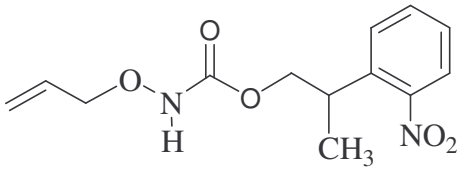
RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.20-1.50 (15 H, m, 4 C$\underline{H}_3$) ; 1.50-1.85 (8 H, m, 4 C$\underline{H}_2$) ; 2.65 (2H, t, C$\underline{H}_2$CN) ; 3.80 (2 H, m, C$\underline{H}_2$ON, 1H, m, C$\underline{H}$, 4 H, m, 2 C$\underline{H}_2$OP) ; 4.30 (2 H, m, C$\underline{H}_2$OCO ; 2 H, m, 2 C$\underline{H}$N) ; 7.10-7.70 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

RMN-^{31}P (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 120 (2 diastéréoisomères).

III. 3. Synthèse des organosilanes

III. 3. 1. Synthèse du synthon silane chaîne courte

♦ Acide carbamique, (2-propènyloxy)-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 10 :



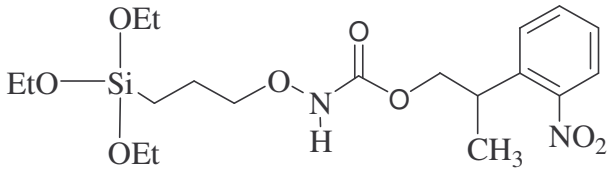
Le chlorhydrate de 3-hydroxylamine propène (1.8 g, 16.4 mmol) est dissous dans la pyridine anhydre (15 mL). La solution est refroidie à 0°C et l'on ajoute, goutte à goutte une solution de chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC) (4.36 g, 18 mmol) dans

le dichlorométhane (15 mL). L'agitation est maintenue pendant 30 min à température ambiante jusqu'à la formation d'un précipité. On ajoute du méthanol (3 mL) pour solubiliser le précipité. On évapore à sec le milieu réactionnel, puis on co-évapore avec le toluène (4-5 fois). Au résidu obtenu, on additionne de l'acétate d'éthyle (100 mL) et on lave la phase organique avec l'eau (200 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle / hexane, 1/4, v/v). Le produit **10** est obtenu sous forme d'une huile jaune (2.66 g, 9.5 mmol, 70 %).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.11 (3 H, d, *J* = 7 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 3.50 (2 H, m, C$\underline{H}_2$O) ; 3.8 (1H, m, C$\underline{H}$) ; 4.00-4.20 (2H, m, C$\underline{H}_2$OCO) ; 5.00-5.20 (1 H, m, CH_2=C$\underline{H}$) ; 5.50-5.78 (2 H, m, C$\underline{H}_2$=CH); 7.20-7.80 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 280 ($C_{13}H_{16}N_2O_5$) ; m/z = 303 $[M+Na]^+$; m/z = 319 $[M+K]^+$.

♦ 3,8-dioxa-2-aza-7-acide siladécanoique,7,7-diéthoxy-,2-(2-nitrophényl)propyl ester 11 :



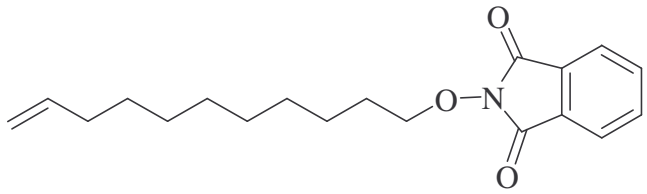
Le composé **10** (1 g, 3.6 mmol) est dissous dans le triéthoxysilane (5 ml). On ajoute 15 µl de catalyseur de Karstedt (platine(0)-1,3-divinyl-1,1,3,3-tétraméthyldisiloxane dissous dans le poly-(diméthylsiloxane)), et le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures à 60°C sous argon. On évapore à sec le milieu réactionnel, puis on co-évapore avec du toluène (5-6 fois). Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle). Le produit **11** est obtenu sous forme d'une huile jaune (1.25 g, 2.81 mmol, 78 %).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 0.6 (2 H, m, C$\underline{H}_2$Si) ; 1.20-1.30 (12 H, m, 4C$\underline{H}_3$) ; 1.34 (2 H, m, C$\underline{H}_2$) ; 3.60-3.90 (9 H, m, CH + 4CH_2O) ; 4.28 (2 H, m, C$\underline{H}_2$OCO) ; 7.20-7.80 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 444 ($C_{19}H_{32}N_2O_8Si$) ; m/z = 467 $[M+Na]^+$; m/z = 483 $[M+K]^+$.

III. 3. 2. Synthèse du synthon silane chaîne longue

♦ 1H-Isoindole-1,3(2H)-dione, 2-(10-undécèn-1-yloxy)- 12 :



Une solution de *N*-hydroxyphtalimide (3.50 g, 21 mmol) et de carbonate de potassium (8 g, 41 mmol) dans le diméthylformamide (250 mL) est chauffée à 50°C sous argon pendant une heure. Le 11-bromoundécène (5.0 g, 21 mmol) est ensuite ajouté et le mélange réactionnel est à nouveau agité pendant 3 heures à 50°C. Après filtration, le solvant est évaporé sous pression réduite. On ajoute alors de dichlorométhane (100 mL) au résidu obtenu et la phase organique est lavée avec de la soude 0.1N, puis avec une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit **12** est obtenu sous forme de poudre blanche (6.45 g, 20,4 mmol, 97 %).

Point de fusion : 38-40°C.

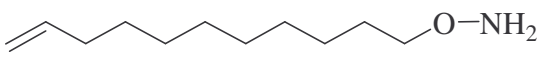
RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.20-1.50 (12 H, m, 6 C$\underline{H}_2$) ; 1.78 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH$_2$O) ; 2.02 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH=CH$_3$) ; 4.18 (2 H, t, *J* = 6 Hz, C$\underline{H}_2$ON) ; 4.95 (2 H, m, C$\underline{H}_2$=CH) ; 5.79 (1 H, m, CH$_2$=C$\underline{H}$) ; 7.70-7.85 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).

RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 25.6 (CH_2) ; 28.2 (CH_2) ; 29.0 (CH_2) ; 29.2 (CH_2) ; 29.3 (CH_2) ; 29.4 (CH_2) ; 29.5 (CH_2) ; 33.9 (CH_2) ; 78.7 (CH_2) ; 114.2 (CH_2) ; 123.5 (CH) ; 129.1 (Cquat) ; 134.5 (CH) ; 139.3 (Cquat) ; 163.7 (Cquat).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 315 ($C_{19}H_{25}NO_3$) ; m/z = 338 $[M+Na]^+$.

Analyse Elémentaire : Calculé = C 72.36 %, H 7.99 %, N 4.45 % ; Obtenu = C 72.21 %, H 8.13 %, N 4.40 %.

♦ Hydroxylamine, *O*-10-undécèn-1-yl- 13 :

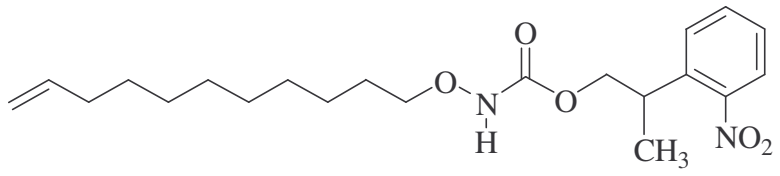


Le composé **12** (3 g, 9.64 mmol) est solubilisé dans dichlorométhane (30 mL) et l'on ajoute de l'hydrazine (966 mg, 19.3 mmol). La solution est portée à reflux pendant 3 h, puis filtrée et évaporée sous pression réduite. Le produit brut est purifié par chromatographie sur

gel de silice (acétate d'éthyle/cyclohéxane, 1/2, v/v). On obtient le composé **13** sous forme d'huile translucide (1.65 g, 8.94 mmol, 93 %).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.20-1.40 (12 H, m, 6 C$\underline{H}_2$) ; 1.56 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH$_2$O) ; 2.03 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH=CH$_2$) ; 3.65 (2 H, t, *J* = 6 Hz, C$\underline{H}_2$ON) ; 4.9-5.02 (2 H, m, C$\underline{H}_2$=CH) ; 5.74-5.87 (1 H, m, CH$_2$=C$\underline{H}$).
RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 26.1 (CH_2) ; 28.5 (CH_2) ; 29.0 (CH_2) ; 29.2 (CH_2) ; 29.5 (CH_2) ; 29.5 (CH_2) ; 29.6 (CH_2) ; 33.8 (CH_2) ; 76.2 (CH_2) ; 114.2 (CH_2) ; 139.2 (CH).
SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 185 ($C_{11}H_{23}NO$), m/z = 186 $[M+H]^+$.

♦ **Acide carbamique, *N*-(10-undécèn-1-yloxy)-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 14 :**

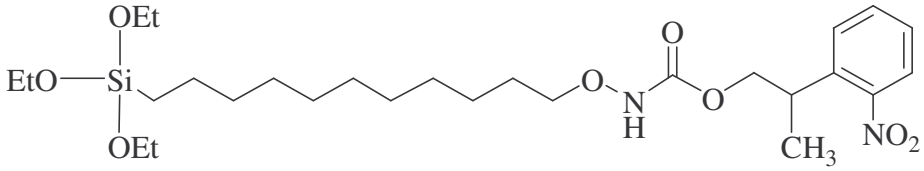


Le composé **13** (470 mg, 2.54 mmol) est dissous dans la pyridine anhydre (2 mL). On ajoute, goutte à goutte, une solution du chloroformiate de 2-(2-nitrophényl)-propyle (Cl-NPPOC) (740 mg, 3 mmol) dans le dichlorométhane (3 mL). On agite pendant 2 heures à l'obscurité, on filtre et on évapore sous pression réduite. Le produit est ensuite repris dans le toluène et on filtre puis on évapore sous pression réduite. Le résidu obtenu est solubilisé dans le dichlorométhane et la phase organique est lavée successivement avec une solution aqueuse de carbonate de sodium à 10%, une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1 N) et une solution aqueuse saturée en chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et évaporée. Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle/cyclohexane, 1/4, v/v). Le produit **14** est obtenu sous forme d'une huile orange (873 mg, 2.22 mmol, 88 %).

RMN-^{1}H (200 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 1.20-1.40 (12 H, m, 6 C$\underline{H}_2$) ; 1.35 (3 H, d, *J* = 7 Hz, C$\underline{H}_3$) ; 1.56 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH$_2$O) ; 2.03 (2 H, m, C$\underline{H}_2$CH=CH$_2$) ; 3.69-3.78 (3 H, m, C$\underline{H}$ + C$\underline{H}_2$ON) ; 4.21-4.35 (2H, m, C$\underline{H}_2$OCO) ; 4.90-5.01 (2 H, m, C$\underline{H}_2$=CH) ; 5.74-5.87 (1 H, m, CH$_2$=C$\underline{H}$).; 7.20-7.80 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).
RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 17.6 (CH_3) ; 25.8 (CH_2) ; 27.9 (CH_2) ; 29.0 (CH_2) ; 29.1 (CH_2) ; 29.4 (CH_2) ; 33.3 (CH) ; 33.8 (CH_2) ; 69.3 (CH_2) ; 77.1 (CH_2) ; 114.2 (CH_2) ; 124.2 (CH) ; 127.5 (CH) ; 128.2 (CH) ; 132.7 (CH) ; 137.1 (Cquat) ; 139.2 (CH) ; 150.6 (Cquat) ; 157.2 (Cquat).

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 392 ($C_{21}H_{32}N_2O_5$) ; m/z = 415 $[M+Na]^+$; m/z = 410 $[M+NH_4]^+$.
Analyse Elementaire : Calcule = C 64.27 %, H 8.22 %, N 7.14 % ; **Obtenu** = C 64.16 %, H 8.48 %, N 6.88 %.

♦ 3,16-dioxa-2-aza-15-acide silaoctadécanoique, 15,15-diéthoxy-, 2-(2-nitrophényl)propyl ester 15 :



Le composé **14** (663 mg, 1.69 mmol) est dissous dans le triéthoxysilane (1.5 ml). On ajoute 7 µl de catalyseur de Karstedt (platine(0)-1,3-divinyl-1,1,3,3-tétraméthyldisiloxane dissous dans le poly-(diméthylsiloxane)) et le mélange réactionnel est agité pendant 2 heures à 60°C sous argon. On évapore à sec le milieu réactionnel, puis on co-évapore avec du toluène (5-6 fois). Le produit brut est purifié par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle). Le produit **15** est obtenu sous forme d'une huile jaune (704 mg, 1.26 mmol, 75 %).

RMN-^{1}H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm 0.6 (2 H, m, $C\underline{H}_2Si$) ; 1.10-1.30 (25 H, m, $3C\underline{H}_3$+ $8CH_2$) ; 1.35 (3 H, m, $C\underline{H}_3$) ; 1.56 (2 H, m, $C\underline{H}_2CH_2O$) ; 3.65-3.90 (9 H, m, CH + $4CH_2O$) ; 4.28 (2 H, m, $C\underline{H}_2OCO$) ; 7.35-7.75 (4 $\underline{H}_{Ar}$, m).
RMN-^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : 10.9 (CH_2) ; 18.0 (CH_3) ; 18.8 (CH_3) ; 23.2 (CH_2) ; 23.3 (CH_2) ; 26.3 (CH_2) ; 28.4 (CH_2) ; 29.8 (CH_2) ; 29.9 (CH_2) ; 30.0 (CH_2) ; 30.1 (CH_2) ; 33.8 (CH) ; 58.8 (CH_2O) ; 69.8 (CH_2O) ; 77.6 (CH_2) ; 124.6 (CH) ; 128.0 (CH) ; 128.6 (CH) ; 132.2 (CH) ; 137.0 (Cquat) ; 150.1 (Cquat) ; 157.1 (Cquat).
RMN-^{29}Si (59 MHz, $CDCl_3$) : δ ppm : -21.7.
IR (NaCl) : 3279 (br) ; 2975 (CH_2) ; 2926 (CH_2) ; 2855 ; 1752 (CH_{Ar}) ; 1728 (CO) ; 1528 (NO_2) ; 1082 (SiO) cm^{-1}.

SM (ESI, mode positif) : M_{calc} = 556 ($C_{27}H_{48}N_2O_8Si$) ; m/z = 579 $[M+Na]^+$; m/z = 595 $[M+K]^+$.
Analyse Elémentaire : Calculé = C 58.25 %, H 8.69 %, N 5.03 % ; Obtenu = C 58.62 %, H 8.57 %, N 5.05 %.

IV. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES

IV. 1. Synthèse des "oligonucléotides-5'- aldéhyde"

La synthèse automatisée d'oligonucléotides est réalisée en utilisant le protocole standard préconisé par le constructeur, sur une échelle de 1 µmole (voir Annexe). Les solutions de phosphoramidites sont préparées en dissolvant le composé dans l'acétonitrile anhydre sous argon à raison de 50 mg/mL.

Le phosphoramidite porteur de la fonction 1,2-diol protégée par un groupe protecteur acidolabile est incorporé dans l'étape finale de la synthèse automatisée en tant que base X. Pour X, le temps de couplage est multiplié par 2.

Après coupure du support solide et déprotection par traitement ammoniaque aqueux (28%) pendant 24 heures à 55°C, les oligonucléotides sont lyophilisés.

Les oligonucléotides bruts porteurs du groupe méthoxybenzylidène à l'extrémité 5' sont purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en phase de polarité inversée en tampon acétate d'ammonium (Système **2**).

Les oligonucléotides, ainsi purifiés, protégés à l'extrémité 5' par le groupe méthoxybenzylidène sont traités avec une solution aqueuse d'acide acétique à 80% (500 µL) pendant une heure, puis le solvant est évaporé par lyophilisation. Le résidu obtenu après lyophilisation est solubilisé dans l'eau (500 µL), et la phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec l'éther. Après lyophilisation, chaque oligonucléotide est "dispatché" à 0.002 µmole par tube et stocké au congélateur.

Oligonucléotides	**λ max (nm)**	**Rendement total**	**CLHP temps de rétention. (Système 1)**	**SM (*ESI*)**
Séquence 1	263	45 %	12.9 min	$M_{calc.}$ = 6222.0 $M_{obt.}$ = 6219.3
Séquence 2	262	43 %	11.7 min	$M_{calc.}$ = 6303.2 $M_{obt.}$ = 6302.2
Séquence 3	258	40 %	12 min	$M_{calc.}$ = 7243.8 $M_{obt.}$ = 7242.7

L'oxydation de l'oligonucléotide est effectuée dans les tubes préalablement préparés. On solubilise l'oligonucléotide (0.002 µmol) dans l'eau ou dans le tampon d'acétate

d'ammonium (0.4 M, pH 4.6, 98 µL). On ajoute 50 équivalents de périodate de sodium (2 µL d'une solution mère à 100 mM) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Après oxydation, la solution d'oligonucléotide aldéhyde est utilisée sans aucune purification pour l'immobilisation sur la surface.

IV. 2. Synthèse des "oligonucléotides-3'-Aldéhyde"

Le support 3-[(4,4'-diméthoxytrityoxy)glycéryl-1-succinoyl]-long chain alkylamine CPG (Eurogentec) (Figure 29) utilisé, contenant la fonction 1,2 diol, est disponible commercialement.

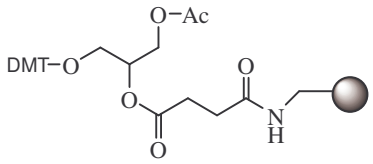


Figure 29 : support commercial.

La synthèse automatisée d'oligonucléotides est réalisée en utilisant le protocole standard préconisé par le constructeur, sur une échelle de 1 µmole. Après coupure du support solide et déprotection par traitement ammoniaque aqueux (28%) pendant 24 heures à 55°C, l'oligonucléotide est lyophilisé et purifié par (CLHP) en phase de polarité inversée en tampon acétate d'ammonium (Système **2**). Après lyophilisation, l'oligonucléotide est stocké au congélateur.

L'oligonucléotide protégé à l'extrémité 5' par le groupe diméthoxytrityle est traité avec une solution aqueuse d'acide acétique à 80% (500 µL) pendant 1 heure. Le résidu obtenu après lyophilisation est solubilisé dans l'eau (500 µL) et la phase aqueuse est lavée plusieurs fois avec l'éther. Après lyophilisation, l'oligonucléotide est "dispatché" à 0.002 µmole par tube et stocké au congélateur.

Oligonucléotide	**λ max (nm)**	**Rendement total**	**CLHP Temps de rétention (Système 1)**	**SM (*ESI*)**
Séquence 4	263	45 %	11.8 min	$M_{calc.}$ = 6180,2 $M_{obt.}$ = 6178.1

L'oxydation de l'oligonucléotide est effectuée dans les tubes préalablement préparés. On solubilise l'oligonucléotide (0.002 µmol) dans l'eau ou dans le tampon d'acétate d'ammonium (0.4 M, pH 5.5, 98 µL). On ajoute 50 équivalents de périodate de sodium (2 µL d'une solution mère à 100 mM) et la solution est agitée à température ambiante pendant 1 heure. Après oxydation, la solution d'oligonucléotide aldéhyde est utilisée pour l'immobilisation sur la surface.

IV. 3. Quantification UV-visible des oligonucléotides

La quantité de produit est déterminée par spectrophotométrie UV-visible à 25°C, dans l'eau en utilisant la loi de Beer-Lambert :

$$A = \varepsilon.l.C$$

- A : absorbance
- ε : coefficient d'extinction molaire en $Mol^{-1}. cm^{-1}$
- l : longueur de trajet optique qui traverse la cuve d'analyse en cm
- C : concentration en $mol .L^{-1}$.

D'après la valeur de l'absorbance expérimentale A, à la longueur d'onde spécifique du coefficient d'extinction de la molécule ε, on obtient la quantité de produit présent dans l'échantillon analysé.

BIBLIOGRAPHIE

1. Karstedt, B . D. (General Electric), US Patent **1973**, 3 715 334.

2. Lewis, L. N.; Lewis, N. Platinum-Catalyzed Hydrosilylation - Colloid Formation as the Essential Step. *J. Am. Chem. Soc*. **1986**, *108*, 7228-7231.

3. Lewis, L.N. On the Mechanism of Metal Colloid Catalyzed Hydrosilylation : Proposed Explanations for Electronic Effects and Oxygen Cocatalysis. *J. Am. Chem. Soc*. **1990**, *112*, 5998-6004.

4. Stein, J.; Lewis, L.N.; Gao, Y.; Scott, R. A. In Situ Determination of the Active Catalyst in Hydrosilylation Reactions Using Highly Reactive Pt(0) Catalyst Precursors. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 3693.

5. Beaucage, S. L.; Iyer, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. **1992**, *48*, 2223-2311.

6. Caruthers, M. H.; Barone, A. D.; Beaucage, S. L.; Dodds, D. R.; Fisher, E. F.; McBride L. J.; Matteucci, M.; Stabinsky, Z.; Tang, J. Y. Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method. *Methods Enzymol*. **1987**, *154*, 287-313.

7. Forget, D.; Boturyn, D.; Defrancq, E.; Lhomme, J.; Dumy, P. Highly Efficient Synthesis of Peptide-Oligonucleotide Conjugates : Chemoselective Oxime and Thiazolidine Formation. *Chem. Eur. J*. **2001**, *7*, 3976-3984.

8. Nonglaton, G.; Benitez, I.O.; Guisle, I.; Pipelier, M.; Léger, J.; Dubreuil, D.; Tellier, C.; Talham, D.R.; Bujoli, B. New Approach to Oligonucleotide Microarrays Using Zirconium Phosphonate-Modified Surfaces. *J. Am. Chem. Soc*. **2004**, *126*, 1497-1502.

9. Georgiadis, R. M.; Peterlinz, K. P.; Peterson, A. W. Quantitative Measurements and Modeling of Kinetics in Nucleic Acid Monolayer Films Using SPR Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc*. **2000**, *122*, 3166-3173.

10. Shchepinov, M. S.; Casegreen, S. C.; Southern, E. M. Steric Factors Influencing Hybridisation of Nucleic Acids to Oligonucleotide Arrays. *Nucleic Acids Res*. **1997**, *25*, 1155-1161.

11. Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. In Situ Surface Plasmon Resonance Imaging Detection of DNA Hybridization to Oligonucleotide Arrays on Gold Surfaces. *Anal. Chem*. **1997**, *69*, 4948-4956.

12. Brockman, J. M.; Frutos, A. G.; Corn, R. M. A Multistep Chemical Modification Procedure To Create DNA Arrays on Gold Surfaces for the Study of Protein-DNA Interactions with Surface Plasmon Resonance Imaging. *J. Am. Chem. Soc*. **1999**, *121*, 8044-8051.

13. Edupuganti, O. P.; Renaudet, O.; Defrancq, E.; Dumy, P. The Oxime Bond Formation as an Efficient Chemical Tool for the Preparation of 3', 5'-Bifunctionalised Oligodeoxyribonucleotides. *Bioorg. & Med. Chem. Lett*. **2004**, *14*, 2839-2842.

Chapitre II : PREPARATION DES SURFACES OXYAMINE PHOTOACTIVABLES

La conception d'une surface oxyamine photoactivable passe par la parfaite maîtrise des différentes étapes de préparation. Dans un premier temps, nous allons tester différentes stratégies de préparation. Les études de préparation de la surface nous permettront de choisir la meilleure stratégie qui fera ensuite l'objet d'une étude d'optimisation des différentes étapes de préparation de la biopuce sur le format plan, aboutissant à un protocole standard. Ce protocole sera ensuite appliqué pour la fonctionnalisation dans le format capillaire. Les tests menés au cours de ce travail mettent en jeu la complémentarité entre des séquences oligonucléotidiques **cibles** marquées par un fluorophore et les séquences immobilisées sur la surface appelé **sondes**.

Dans un deuxième temps, la surface oxyamine photoactivable préparée dans les conditions optimales, sera l'objet d'une caractérisation physique. Ainsi, plusieurs techniques seront exploitées tels que, l'angle de goutte, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la microscopie à force atomique et l'ellipsométrie.

Finalement, nous allons tester notre méthodologie de préparation pour l'adressage de trois séquences oligonucléotidiques différentes dans le même capillaire.

I. LA SURFACE DE SILICE : GENERALITES

I. 1. Nature physique de la surface

- Format plan

Les surfaces que nous utiliserons tout au long de nos travaux sont des tranches de silicium (100) dopé (dopage P), recouvertes d'une couche d'oxyde de silicium d'une épaisseur de 500 µm. Ces tranches seront découpées en carrés de 5 mm x 5 mm que nous appellerons **substrat**.

- Format capillaire

Les capillaires que nous utiliserons, sont fournis par la société Polymicro Technologie. Le capillaire est constitué en silice de 129 µm d'épaisseur et de 100 µm de diamètre, enrobé par une gaine de 12 µm d'épaisseur (Figure 1). La gaine est utilisée pour éviter la casse du capillaire. Le capillaire a la particularité d'être transparent aux UV, une particularité importante pour l'irradiation à l'intérieur du capillaire.

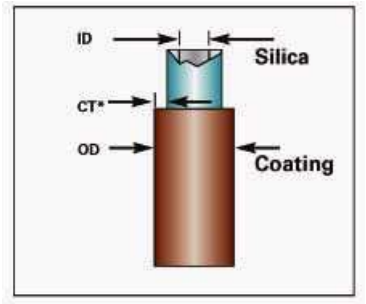


Figure 1 : capillaire en verre, transparent aux UV (image Polymicro Technologies).

I. 2. Densité des groupements hydroxyles

La silice est l'une des surfaces oxydées les plus couramment utilisées. Sa surface est surtout composée de siloxanes non réactifs, ainsi que des fonctions silanols. A la surface de la silice, on peut distinguer trois types de groupements silanols[1,2] (Figure 2).

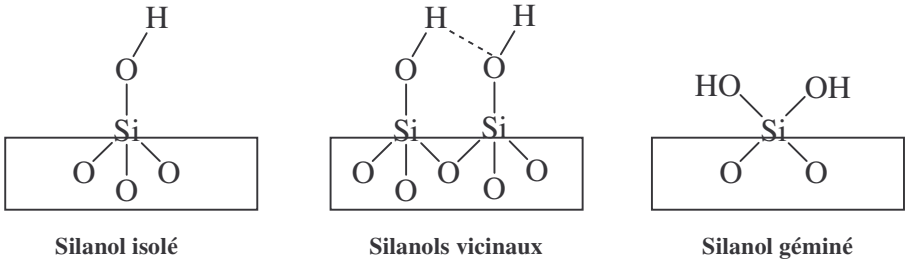


Figure 2 : représentation des trois types de groupements silanols de surface.

Les silanols présents à la surface de la silice lui confèrent des propriétés d'adsorption tout à fait particulières, notamment avec des composés pouvant créer des liaisons hydrogènes. Le taux de silanols présents dépend du prétraitement que la silice a reçu. Pour une silice non traitée, on estime la densité de groupements hydroxyles à 5 OH/nm^2. On peut atteindre la dizaine de OH/nm^2 suivant le type de silice étudiée et les traitements thermiques ou chimiques réalisés[3].

I. 3. Modification chimique de la surface

Le greffage d'une biomolécule sur un tel support inorganique est rendu possible par l'utilisation d'agent de couplage bifonctionnel. En effet, l'agent de couplage est fixé sur le support inorganique par réaction d'une des deux fonctions avec la surface (fonction thiol pour les substrats en or et fonctions silylées pour les substrats de silice tel que lame de verre,

"wafer" de silicium) avec formation d'une liaison covalente stable, l'autre fonction réagissant avec la biomolécule par simple physisorption ou en formant une liaison covalente.

L'utilisation d'agent de couplage de type organosilane est largement répandue pour la fonctionnalisation de la silice. La parfaite maîtrise de cette étape permet d'obtenir une meilleure reproductibilité des résultats expérimentaux. Cependant, il est impératif de contrôler rigoureusement les conditions expérimentales du dépôt qui dépendent de certains paramètres difficiles à maîtriser.

I. 3. 1. Réaction de silanisation

La formule générale des organosilanes utilisés est la suivante : $Z\text{-}R_y\text{-}Si\text{-}(CH_3)_{3\text{-}n}X_n$ avec n = 1, 2 ou 3, Z un groupement fonctionnel terminal, R est une chaîne alkyle à y carbones et X une fonction hydrolysable comme un atome de chlore, une fonction méthoxy (OMe), éthoxy (OEt) ou récemment un atome d'hydrogène[4].

Le greffage de composés organiques sur la silice passe obligatoirement par la présence de groupements hydrolysables notés X, autour de l'atome de silicium de l'agent de couplage . Ce processus a été décrit par Sagiv en 1980[5].

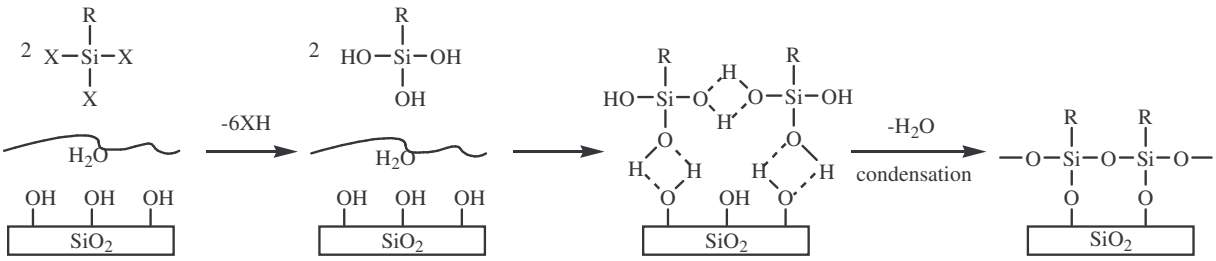


Figure 3 : Réaction de silanisation selon Sagiv.

Dans une première étape, les silanes sont adsorbés sur la surface hydratée. Les groupements X (halogénes, alcoxy) sont alors hydrolysés. Ensuite, les différentes fonctions hydroxyles se lient entre elles par liaisons hydrogènes, pour donner après condensation, un réseau tridimensionnel lié à la surface de silice par l'intermédiaire de fonctions siloxanes (Figure 3).

La teneur en eau apparaît donc comme un paramètre essentiel dans la réaction de greffage[6]. En effet, l'eau physisorbée permet d'hydrolyser les silanes dans le cas d'utilisation de solvants anhydres[7]. Ainsi, il est important de conserver une certaine quantité d'eau à la

surface de la silice. Par contre, au court de la silanisation, les liaisons siloxanes peuvent être formées entre les silanols du silane et ceux de la surface, et/ou entre les silanols de deux groupes voisins. Dans ce dernier cas, la condensation conduit à la formation d'une couche hétérogène d'épaisseur non contrôlée[8]. Ce type de réaction est peu reproductible et dépend du silane utilisé. Afin de résoudre ce problème, Hair et Tripp[9] ont mis en évidence la possibilité de faire la réaction de silanisation en milieu anhydre en présence d'une base comme catalyseur. La triéthylamine est souvent utilisée.

I. 3. 2. Les groupements hydrolysables

On trouve deux grandes familles de groupements hydrolysables : les halogènes et les alcoxyles. La principale différence est une réactivité beaucoup plus importante pour les groupements halogénures que pour les groupements alcoxyles[10].

I. 3. 3. Longueur de la chaîne carbonée

Wasserman *et al*[11] ont étudié par ellipsométrie, XPS et mesures d'angles de contact un grand nombre d'alkyltrichlorosilanes CH_3-$(CH_2)_n$-$SiCl_3$, avec n = 0, 1, 2, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15 et 17. A l'exception des organosilanes à très courtes chaînes (n = 0, 1, 2), les autres systèmes forment des couches auto-assemblées (SAMs, pour Self-Assembled-Monolayers) bien ordonnées et stables dans les solvants organiques usuels, l'eau et les acides. Ces SAMs sont toutefois dégradées par séjour prolongé dans une solution basique.

De même, Duchet *et al*[12] ont montré que les couches deviennent plus désordonnées et dans un état proche de l'état liquide quand la longueur des chaînes diminue. Contrairement, le silane en C_{17} forme un film ordonné et de structure proche de l'état cristallin dans lequel les chaînes sont alignées. Ils ont expliqué la formation des "SAMs" en surface par l'augmentation des interactions de Van der Waals entre les chaînes qui sont alors moins mobiles et moins réparties.

I. 3. 4. Nature du solvant

Gun et Sagiv[13] ont été parmi les premiers à montrer que la densité de greffage de l'octadécyltrichlorosilane CH_3-$(CH_2)_{17}$-$SiCl_3$ (OTS) sur des substrats siliciés était fonction du solvant choisi. En effet, ils ont observé que cette densité était plus grande dans le toluène ou le bicyclohexyle que dans l'hexadécane.

De même, McGovern et *al*[14] ont étudié le greffage de l'OTS sur du verre en présence de onze solvants différents, huit hydrocarbonés (six aliphatiques et deux aromatiques), le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et le 1,4-dioxane. Ils ont montré que le 1,4-dioxane possède une trop grande capacité à dissoudre l'eau et entraîne une forte polymérisation des silanes loin de la surface. D'autres solvants, comme le n-pentane, au contraire, ne solubilisent pas assez d'eau pour permettre la formation des silanols. Enfin, ils ont montré que l'utilisation du toluène et du benzène aboutie à la formation de monocouches de plus haute structuration, en solubilisant une quantité optimale d'eau.

I. 3. 5. Température de greffage

Brzoska *et al*[15], et plus récemment Rye[16] et Kato *et al*[17] ont montré l'existence d'une température critique T_c qui contrôle la qualité des "SAMs" de différents alkyltrichlorosilanes. Cette température serait une propriété intrinsèque de la molécule greffée. En dessous de cette température, les molécules sont organisées et quasi perpendiculaires à la surface. Dans le cas de l'OTS par exemple, elle est de 25°C. Parikh et *al*[18] confirment cette valeur en trouvant 28±5°C. Ainsi, pour des températures élevées, la réaction en solution est favorisée alors que pour des températures basses, les réactions de surface, en compétition avec les réactions de polymérisation en solution, sont quant à elles favorisées.

I. 3. 6. Temps de greffage

Le temps de silanisation est un paramètre souvent mal défini pour un composé donné. On trouve, par exemple différents temps pour la formation de "SAMs" de OTS : Silberzan et *al*[19] rapportent que seulement 3 minutes sont suffisantes, alors que Wasserman et *al*[11] suggèrent 24 heures et Banga et coll[20] 90 minutes. Cette différence de cinétique peut induire un changement au niveau de la structuration du film greffé.

II. FONCTIONNALISATION DE SURFACE

Dans cette partie, nous allons tester les différentes stratégies de préparation de surface fonctionnalisée par une fonction oxyamine protégée par le groupe photoactivable NPPOC.

Nous avons testé deux stratégies de fonctionnalisation :

- Une stratégie en deux étapes via les esters activés.
- Une stratégie en une seule étape utilisant l'organosilane.

II. 1. Approche via les esters activés

La molécule synthétisée **2** ou **3**, correspond à un ester activé dont la fonction oxyamine est protégée par le groupe photoactivable et est réactive vis-à-vis des nucléophiles comme les amines. Par conséquent, un support solide portant la fonction amine tel qu'une surface silanisée Amino Propyl Triéthoxy Silane[21-26] (APTS), pourra réagir avec cette molécule pour donner une surface fonctionnalisée par une oxyamine protégée par le groupe photoactivable (Figure 4).

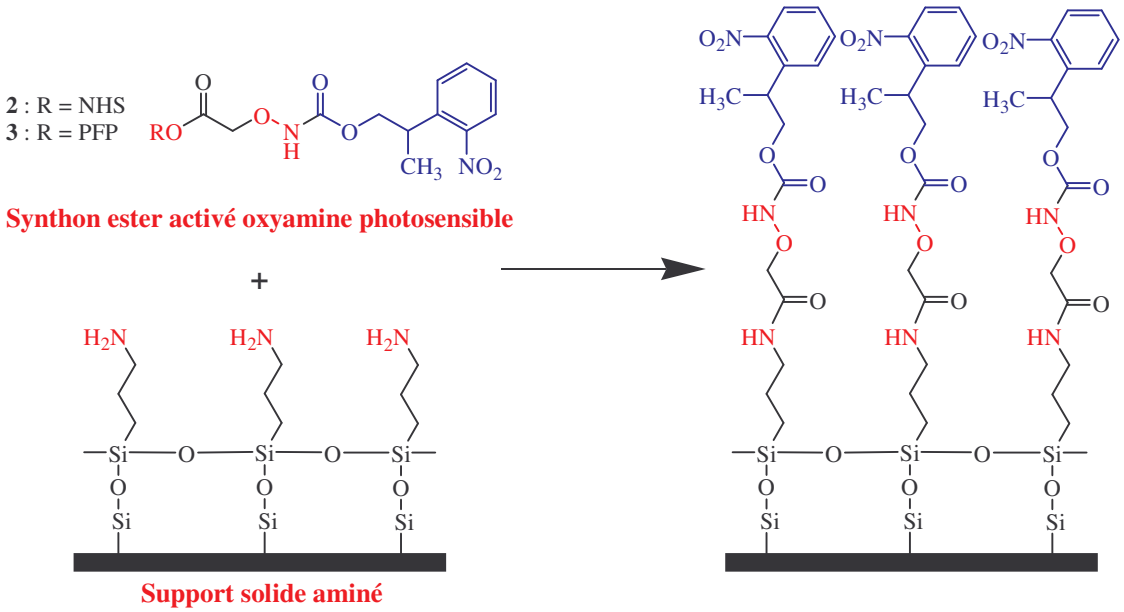


Figure 4 : Approche de préparation du support solide fonctionnalisé par une fonction oxyamine protégée par le NPPOC via un ester activé.

II. 1. 1. Format plan

Dans un premier temps, nous avons réalisé la fonctionnalisation de surfaces sur des substrats plans en utilisant l'ester activé **2**. On teste ensuite la photodéprotection du groupe photoactivable et l'immobilisation de l'oligonucléotide fonctionnalisé par une fonction aldéhyde (Figure 5).

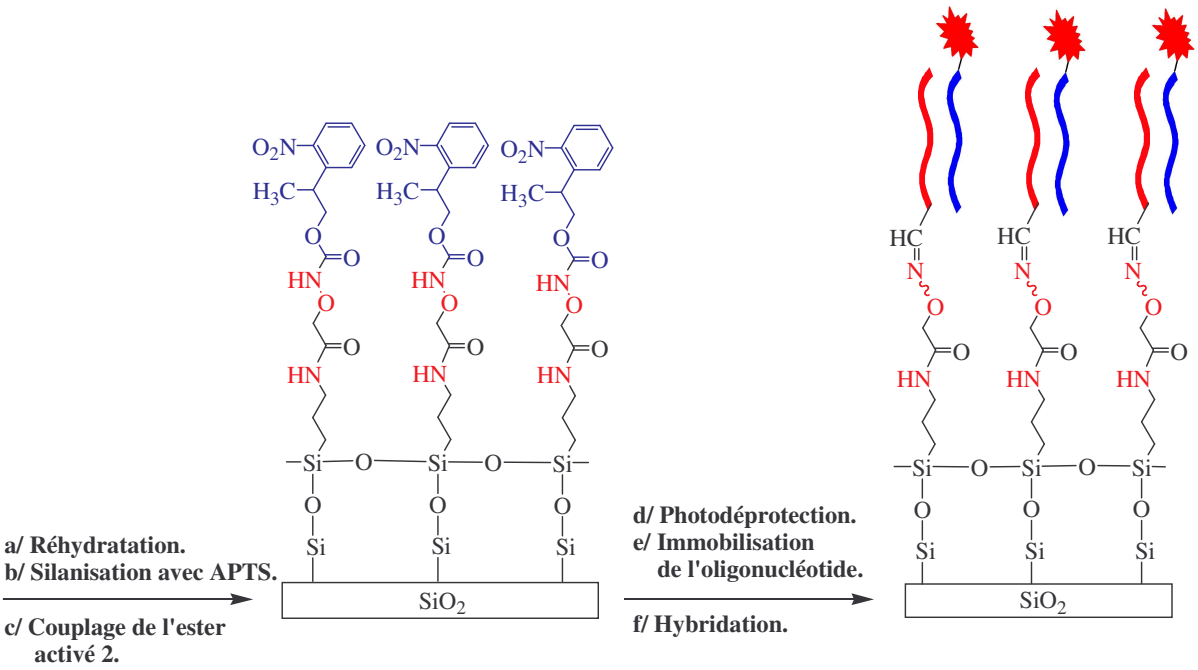


Figure 5 : Protocole de fabrication de la biopuce via l'ester activé **2**.

II. 1. 1. 1. Réhydratation de la surface

Le siloxane présent sur la surface est sous forme inactif (SiO_2). L'activation se fait à l'aide d'une solution de soude à 3.5 M dans un mélange eau/éthanol (3/4, v/v). Après l'activation, on fait une série de lavages à l'eau, puis avec une solution de HCl (0.1N) et de nouveau à l'eau et enfin on sèche à l'argon. Ainsi, on obtient une surface active sous forme de silanol[22] (Figure 6).

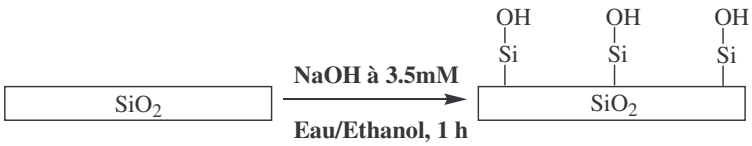


Figure 6 : Réhydratation de la surface.

Ce protocole de réhydratation sera utilisé pour l'ensemble des études réalisées sur support plan quelque soit la stratégie utilisée.

II. 1. 1. 2. Silanisation

La fonction amine est introduite par silanisation à l'aide d'une solution d'aminopropyltriéthoxysilane (APTS) à 5mM dans le toluène[26]. Après 1 nuit, on obtient une

surface fonctionnalisée par une amine. Après silanisation, on fait une série de lavage au toluène et à l'éthanol et on sèche à l'argon. La surface est stabilisée par une réticulation à 110°C pendant 3 heures (Figure 7). La réticulation permet la condensation des groupements éthoxys du silane entre eux pour une meilleure stabilité de la surface**.**

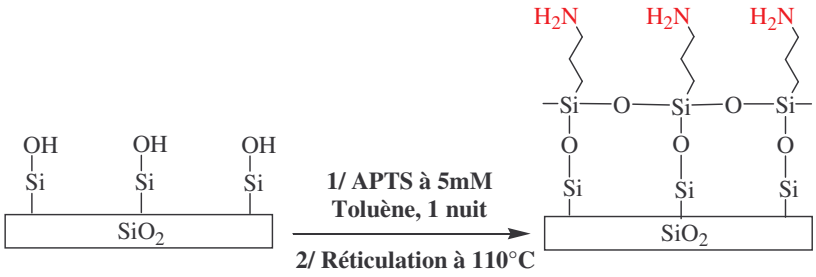


Figure 7 : Silanisation avec l'APTS.

II. 1. 1. 3. Couplage

Le couplage est effectué entre l'ester activé **2** et la fonction amine de la surface[24, 27, 28]. La réaction est réalisée avec une solution d'ester activé **2** à 5mM dans le diméthylformamide pendant 1 nuit et conduit à une surface fonctionnalisée par une fonction oxyamine protégée par le groupe photoactivable. Après couplage, on fait une série de lavage au diméthylformamide et à l'éthanol puis on sèche à l'argon (Figure 8).

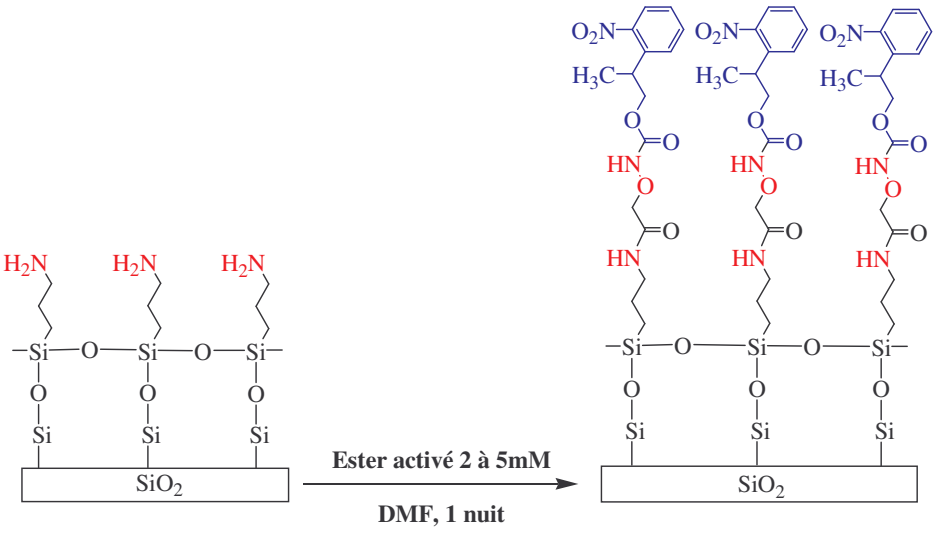


Figure 8 : Couplage de l'ester activé **2**.

II. 1. 1. 4. Photodéprotection

La photodéprotection se fait à travers un masque contenant des trous de 100 µm de diamètre à une longueur d'onde de 365 nm (Figure 9). Une irradiation dans une solution de pyridine/eau à 20% avec un temps variable (10, 15 et 20 secondes) permet la déprotection des zones ciblées de la surface. Après photodéprotection, on fait un lavage à l'eau et on sèche. Ainsi on obtient sur la surface, des zones comportant l'oxyamine libre (Figure 10). Les substrats sont rapidement utilisés pour l'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1**.

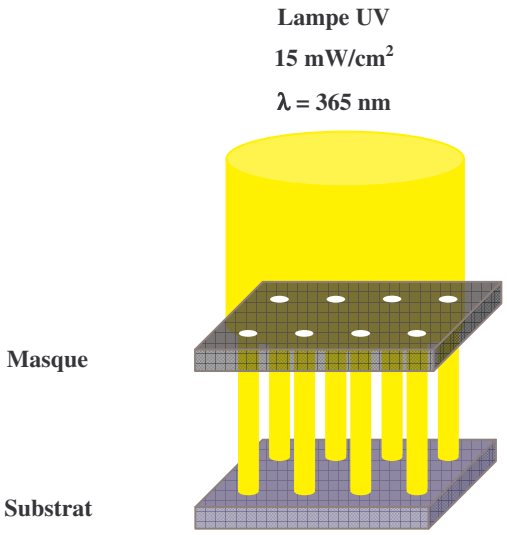


Figure 9 : Irradiation d'un substrat plan à travers un masque contenant des trous de 100 µm de diamètre à une longueur d'onde de 365 nm.

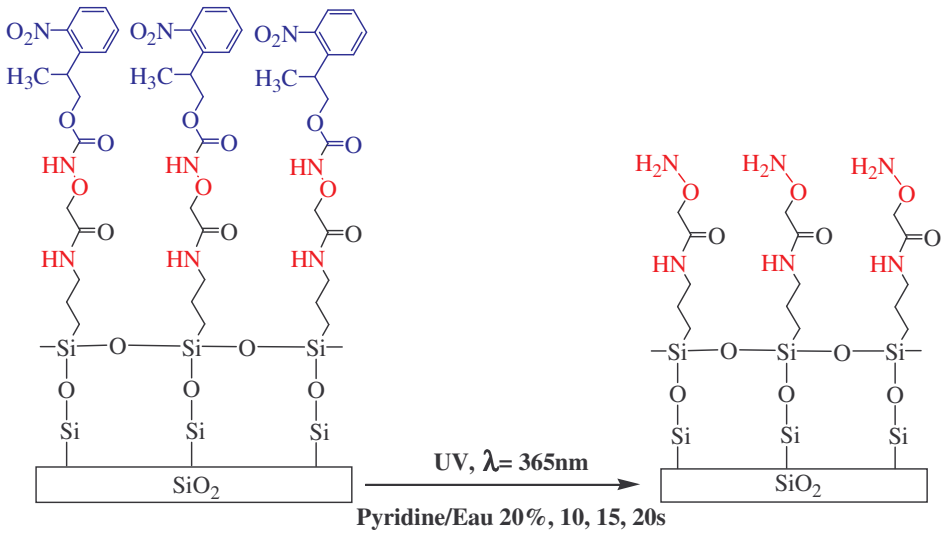


Figure 10 : Photodéprotection de la surface.

II. 1. 1. 5. Immobilisation des oligonucléotides

L'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1** est effectuée par liaison covalente d'éther d'oxime[29-32]. La réaction entre la fonction oxyamine libre et la fonction aldéhyde de l'oligonucléotide séquence **1** est réalisée pendant 2 minutes dans une solution à 20µM dans l'acétate d'ammonium (0.4M). Après l'immobilisation, on fait une série de lavage à l'eau et SDS 1% et de nouveau l'eau et ensuite on sèche à l'argon (Figure 11).

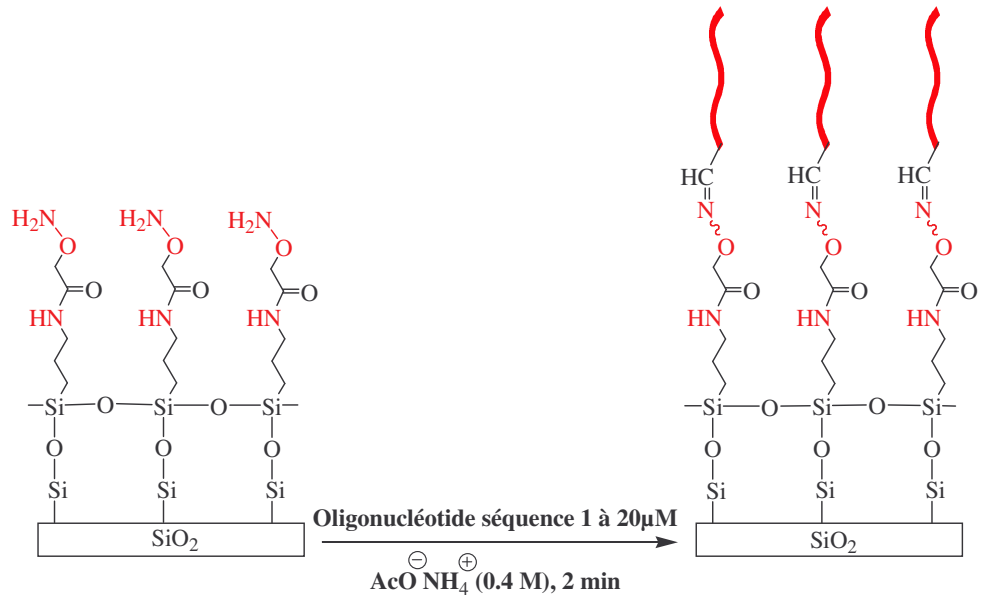


Figure 11 : Immobilisation de l'oligonucléotide aldéhyde séquence **1**.

II. 1. 1. 6. Hybridation

La détection de l'oligonucléotide séquence **1** immobilisé sur la surface se fait à l'aide d'une séquence complémentaire marqué au Cy3^{TM} par hybridation. L'hybridation est réalisée pendant 1 heure à 39°C (Figure 12). Après hybridation, on fait un lavage au SSC2X et on sèche à l'argon. Enfin, un scanner permet la lecture de la fluorescence.

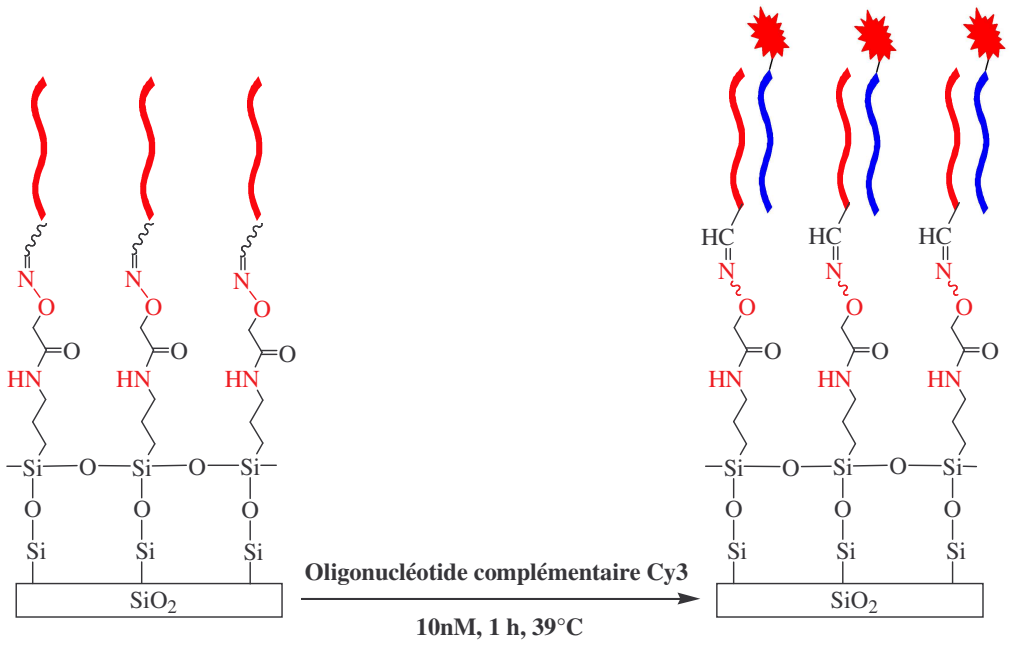


Figure 12 : Hybridation avec la cible marquée au Cy3.

II. 1. 1. 7. Résultats

Après hybridation, un scanner permet l'excitation et la détection de l'émission du fluorophore Cy3. On obtient ainsi une image de la fluorescence du substrat. Les résultats sont présentés dans la Figure 13. On observe de la fluorescence sur les plots (correspondant aux trous du masque) ce qui démontre l'efficacité de notre stratégie sur le format plan. On constate un certain niveau de fluorescence au niveau des interplots. Ceci peut provenir de :

- L'adsorption non covalente des oligonucléotides (interactions électrostatiques par exemple).
- L'immobilisation covalente des oligonucléotides, par liaison imine entre l'aldéhyde et les amines qui n'ont pas réagit au moment du couplage avec l'ester activé **2**.

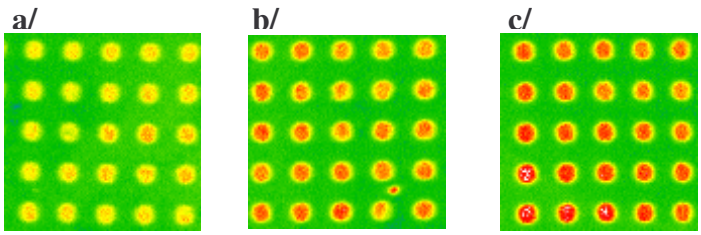


Figure 13 : Image du substrat après hybridation avec 10 nM de l'oligonucléotide complémentaire marqué au Cy3. Les trois substrats ont été insolés à travers un masque présentant des fentes de 100 µm de diamètre, dans la pyridine à 20 %, avec un temps variable : **a/** 10s, **b/** 15s et **c/** 20 secondes. L'immobilisation de l'oligonucléotide aldéhyde séquence **1** a été réalisée à 20 µM dans $AcO^-NH^+_4$ (0.4 M) pendant 2 min (Gain 45).

II. 1. 2. Format capillaire

Nous avons également réalisé la fonctionnalisation de surface dans des capillaires en utilisant l'ester activé **2**. Les étapes du protocole sont les mêmes qu'avec le support plan à quelques nuances près :

- Le couplage de l'ester activé **2** et la fonction amine est réalisée dans le trichloroéthylène car l'utilisation du diméthylformamide s'est avéré incompatible avec la gaine du capillaire (dégradation).
- La photodéprotection est quant à elle réalisée au travers d'une fente de 150 µm dans une solution pyridine / eau à 50% à des temps variables de 5 à 30 secondes (Figure 14).
- L'immobilisation par formation d'éther d'oxime est réalisée dans l'eau au lieu du tampon.
- L'hybridation est effectuée à 42°C au lieu de 39°C avec une concentration de 100 nM en oligonucléotide complémentaire marqué Cy3.

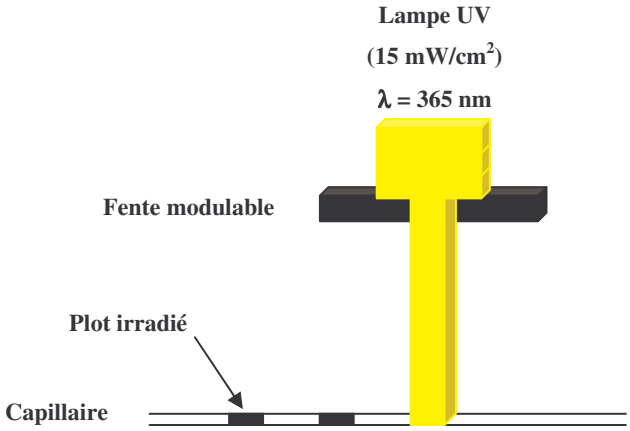


Figure 14 : Mode d'irradiation sur substrat plan.

II. 1. 2. 1. Résultats

Après hybridation, un scanner permet l'excitation et la détection de l'émission du fluorophore. On obtient ainsi une image de la fluorescence dans le capillaire. Les résultats sont présentés dans la Figure 15. On observe de la fluorescence sur les plots ce qui démontre l'efficacité de notre stratégie dans le format capillaire. Toutefois, de nouveau, on observe un certain niveau de fluorescence dans les zones non irradiées (interplots).

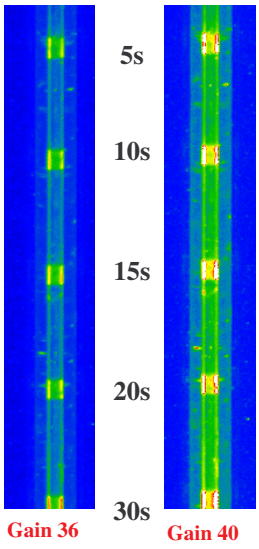


Figure 15 : Image du capillaire après hybridation avec 100 nM de l'oligonucléotide complémentaire marqué au Cy3. Le capillaire a été insolé au travers d'une fente de 150 µm, avec des temps variables (5, 10, 15, 20 et 30 secondes) dans la pyridine à 50 %. L'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1** a été réalisée à 20 µM dans l'eau pendant 30 min.

II. 1. 3. Conclusion sur l'approche "ester activé"

Nous avons montré en format plan et capillaire que la surface oxyamine photoactivable est efficace pour l'immobilisation d'oligonucléotides de façon localisée. En effet, en fluorescence, une intensité est enregistrée au niveau des régions de la surface irradiée et où a été immobilisé l'oligonucléotide séquence **1**.

Toutefois, l'inconvénient de cette stratégie c'est qu'une intensité de fluorescence non négligeable est observée au niveau des interplots (bruit de fond). Cette fluorescence parasite provient probablement de l'adsorption, et/ou l'immobilisation covalente (liaison imine) de la sonde. Le deuxième inconvénient est le temps long de préparation de la surface via la stratégie de l'ester activé **2**. En effet, la stratégie requiert deux étapes de préparation. Une étape de silanisation qui dure 24 heures et la deuxième étape de couplage qui est probablement le point critique de cette stratégie dure aussi 24 heures. Suite à cette dernière limitation, nous avons réalisé le couplage avec l'ester activé **2** durant 1 heure. Les résultats ont montrés une très faible intensité de fluorescence et donc une faible densité d'immobilisation expliquée par le faible rendement de la réaction de couplage (résultats non présenté dans le manuscrit).

Néanmoins, nous avons pu démontrer la possibilité de préparer une surface oxyamine protégée par le NPPOC et faire l'adressage d'oligonucléotides sur celle-ci.

II. 2. Approche via le phosphoramidite

L'intérêt de l'utilisation de la fonction phosphoramidite réside dans l'obtention d'un haut rendement de couplage avec une fonction hydroxyle, cette réaction étant bien connue dans la synthèse automatisée des oligonucléotides[33, 34] (rendement > 99 % à chaque cycle de couplage). Ainsi, nous pourrons coupler le synthon sur une surface silanisée OH en vue de l'obtention d'une grande densité de fonctions oxyamines protégés par un groupe photosensible sur la surface du support solide (Figure 16).

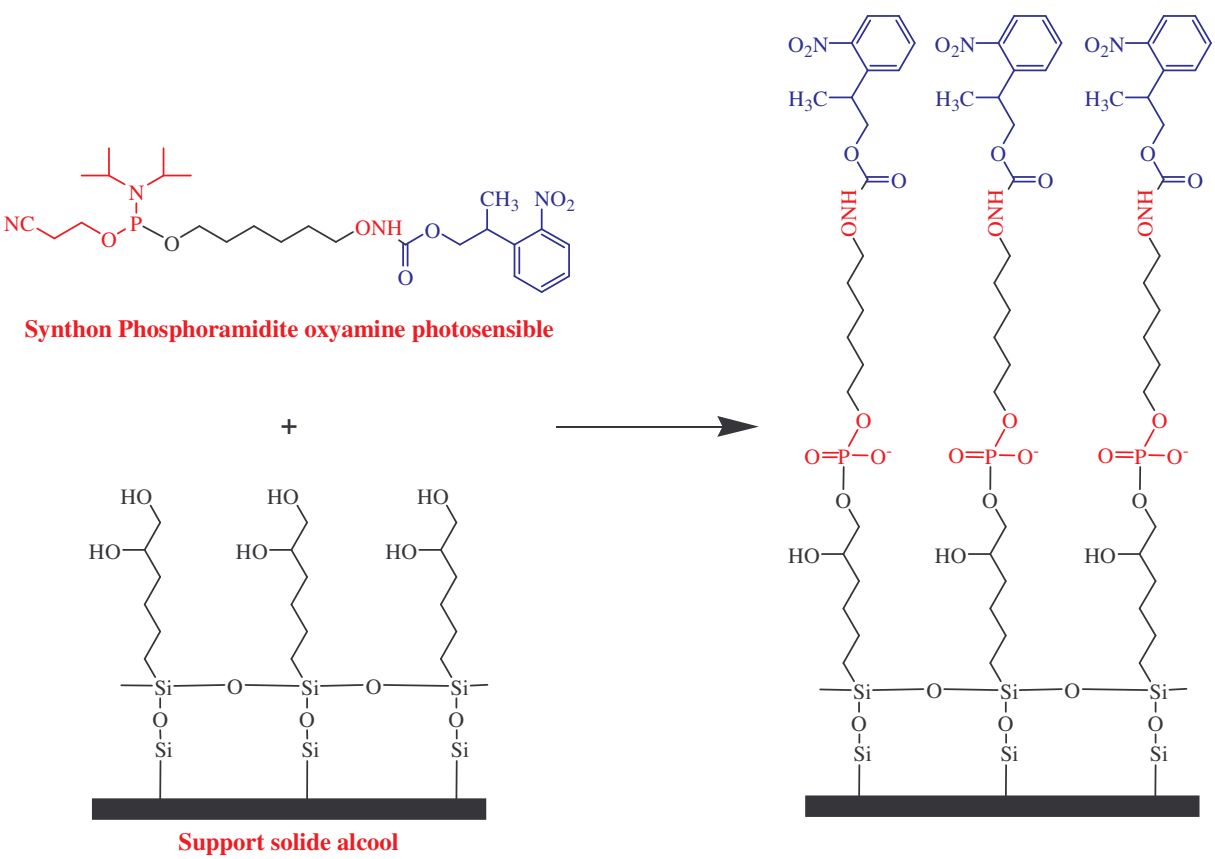


Figure 16 : Approche de préparation de surfaces fonctionnalisées par une fonction oxyamine protégée par le NPPOC via le phosphoramidite.

Néanmoins nous n'avons pas pu tester cette stratégie pour deux raisons :

- Les dérivés phosphoramidites sont peu stables (très réactif) et donc difficile à manipuler (stockage, couplage).
- Il s'agit d'une stratégie à 2 étapes et donc elle demande un temps considérable pour leur optimisation.

Sachant que la surface oxyamine photoactivable est efficace pour l'immobilisation localisée d'oligonucléotide et que les résultats obtenus par la stratégie de l'ester activé **2** est peu convaincante, nous nous sommes orientés vers la stratégie via les organosilanes pour préparer la surface, d'autant plus que cette stratégie ne demande qu'une seule étape de préparation.

II. 3. Approche via les Organosilanes

L'utilisation d'un organosilane bifonctionnel, permet l'obtention en une seule étape d'une surface fonctionnalisée par une oxyamine protégée par le groupe photoactivable. La réaction a lieu entre la surface présentant des silanols et l'organosilane choisi.

II. 3. 1. Choix des organosilanes

L'organosilane bifonctionnel présente trois parties :

- La fonction oxyamine protégée par le groupe photoactivable NPPOC[28-30].
- La partie silylée de la molécule. Nous avons choisie le triéthoxysilane[10] (-$Si(OEt)_3$) comme groupement hydrolysable qui permet le greffage du silane sur la surface.
- L'espaceur entre la fonction oxyamine protégée et le triéthoxysilane. Nous avons choisie deux espaceurs de longueur différente, trois ou onze carbones pour une comparaison du greffage sur la surface.

II. 3. 2. Format plan

Dans un premier temps, nous avons réalisé la fonctionnalisation de surface sur une surface plane. Nous avons choisi un protocole de départ (Figure 17), à partir duquel les étapes les plus importantes ont été optimisées :

- La silanisation avec le silane **11** ou **15**.
- La photodéprotection du groupe NPPOC.
- L'immobilisation des oligonucléotides fonctionnalisés par une fonction aldéhyde.

Ces optimisations nous permettront d'améliorer la sensibilité de notre système. Alors que le protocole de la réhydratation sera inchangé (protocole définie auparavant) et l'hybridation sera réalisée à 39° pendant 1 heure avec une concentration variable d'oligonucléotides marqués au Cy3.

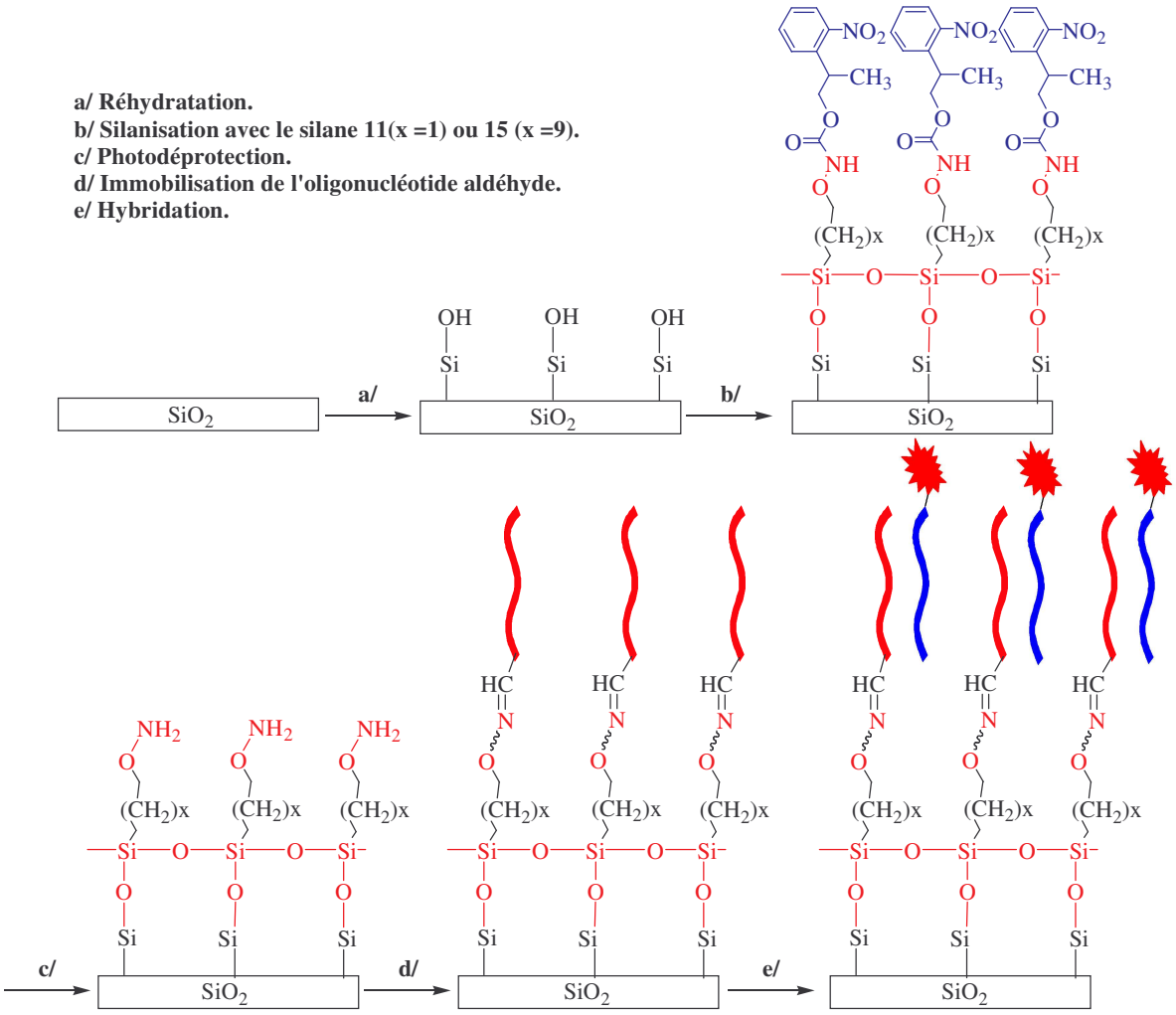


Figure 17 : protocole de fabrication de la biopuce via l'organosilane.

Au cours de l'étude d'optimisation de chaque paramètre, seul le paramètre étudié sera variable alors que tous les autres resteront inchangés.

II. 3. 2. 1. Optimisation de la silanisation

La silanisation est effectuée en trempant le substrat dans une solution du silane **11** ou **15**. Les paramètres suivants ont été étudiés :

- Longueur de la chaîne carbonée (l'espaceur).
- Concentration en silane.
- Solvant de silanisation.
- Température de silanisation.

L'étape de silanisation est terminée par une série de lavage au toluène et à l'éthanol et on sèche à l'argon. Enfin, un chauffage à 110°C pendant 3 heures est réalisé pour réticuler la surface. La réticulation permet la condensation des éthoxys du silane entre eux pour une meilleure stabilité.

- Influence de la longueur du silane (**11** et **15**)

Après réhydratation, on trempe les substrats dans une solution de triéthoxysilane **11** ou **15** à 5 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97/3, v/v) pendant 1 nuit à 80°C (Figure 18).

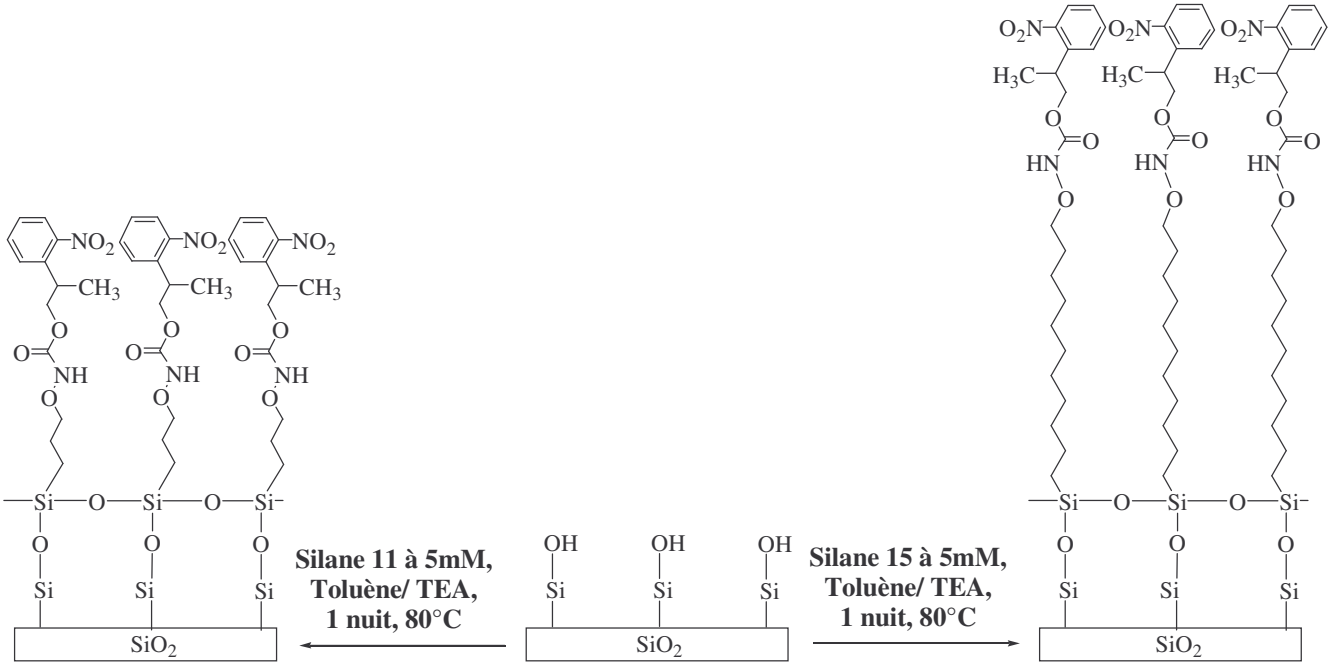


Figure 18 : Comparaison de la silanisation des composés **11** et **15**.

L'influence de la longueur de l'espaceur (chaîne longue et chaîne courte) a été étudiée par hybridation à deux concentrations (100 nM et 10 nM) en cibles. Les résultats sont présentés dans la Figure 19. On observe une meilleure intensité de fluorescence dans le cas du silane **15** quelque soit la concentration en cibles. Ce résultat permet de montrer la plus grande efficacité du silane long **15**, par rapport au silane court **11**. Ce résultat peut être expliqué par la formation d'une couche de silane long plus ordonnée par rapport à celle formée par le silane coure[11, 12]. Ainsi cette couche ordonnée permettra une meilleure reproductibilité des résultats[11, 12].

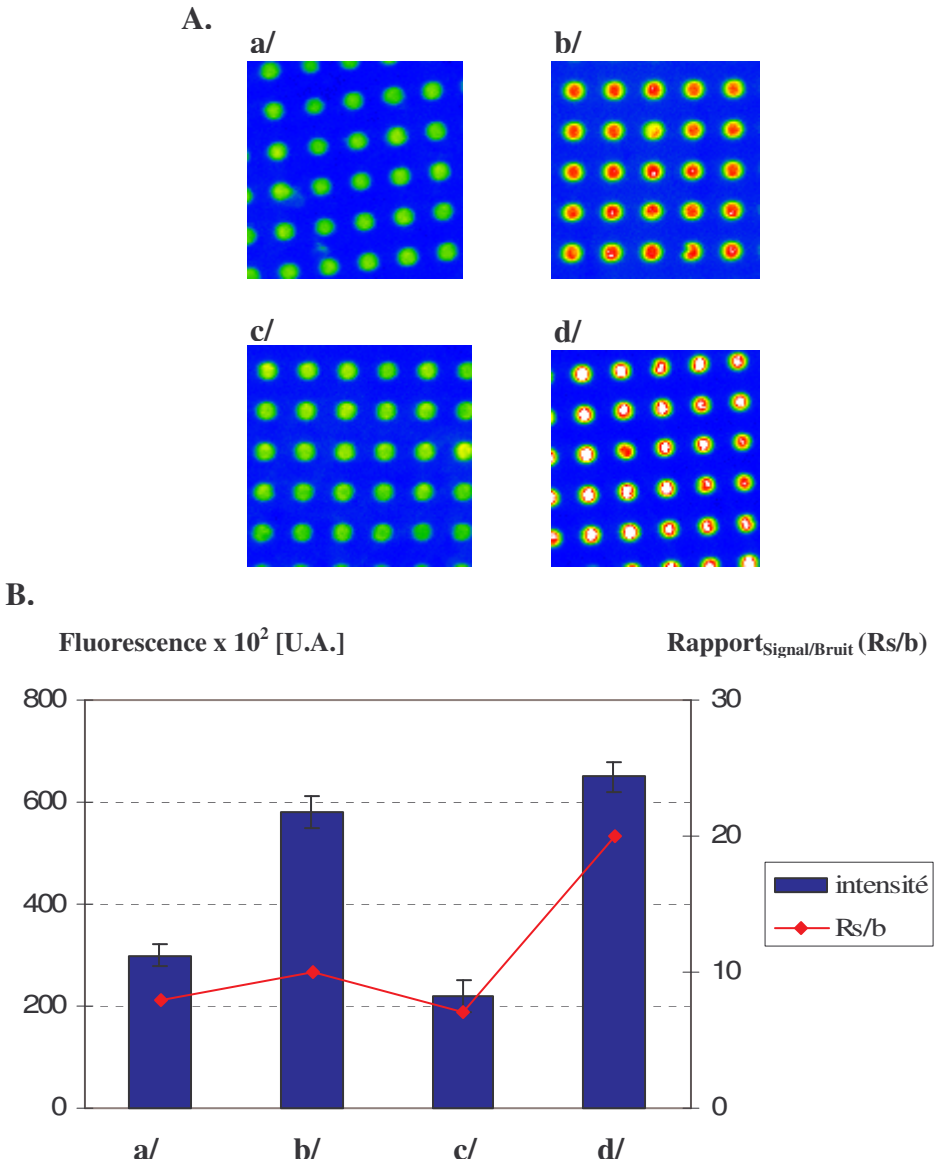


Figure 19 : Comparaison de la silanisation du silane **11** et **15**. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$) : **a/** silane **11** : 100 nM oligonucléotide complémentaire ; **b/** silane **15** : 100 nM oligonucléotide complémentaire ; **c/** silane **11** : 10 nM oligonucléotide complémentaire ; **d/** silane **15** : 10 nM oligonucléotide complémentaire (gain 37).

- Concentration en silane

Après réhydratation, on trempe les substrats dans une solution de triéthoxysilane **15** à 5 ou 10 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97/3, v/v) pendant 1 nuit à T° ambiante.

L'influence de la concentration du silane **15** sur la silanisation a été étudiée par hybridation à 10 nM en cibles. Les résultats sont présentés dans la Figure 20. Aucune influence de la concentration n'est observée. Ce résultat peut être expliqué par deux raisons :

- Un large excès de silane **15** (5 et 10 mM) par rapport au nombre de site de condensations sur la surface (phénomène de saturation).
- La durée longue du temps de silanisation (24 heures) qui ne permet pas de voir la différence (le paramètre du temps n'a pas été étudié).

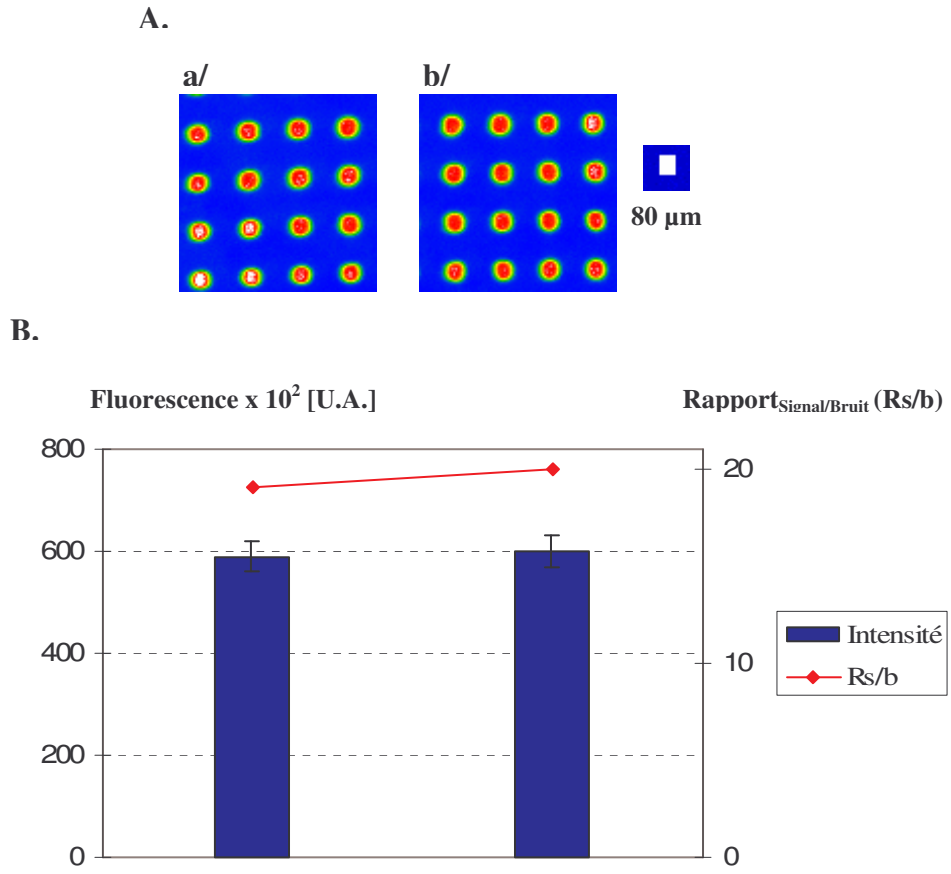


Figure 20 : Influence de la concentration du silane sur la silanisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$) : **a/** silanisation à 5 mM ; **b/** silanisation à 10 mM (Gain 34).

- Température

Après réhydratation, on trempe les substrats dans une solution de triéthoxysilane **15** à 5 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97/3, v/v) pendant 1 nuit à 2°C, T° ambiante, ou 80°C.

L'influence de la température sur la silanisation a été étudiée par hybridation à 10 nM en cible. Les résultats sont présentés dans la Figure 21. On observe une meilleure intensité de fluorescence dans le cas de la silanisation à T° ambiante. On observe que la silanisation à température ambiante est la condition optimale pour la fonctionnalisation du silane **15**. Ces

résultats donne une approximation de la température critique *Tc* de la silanisation du silane **15**. Cette température serait une propriété intrinsèque de la molécule greffée, tel que des auteur ont trouvé pour d'autres molécules[15-18].

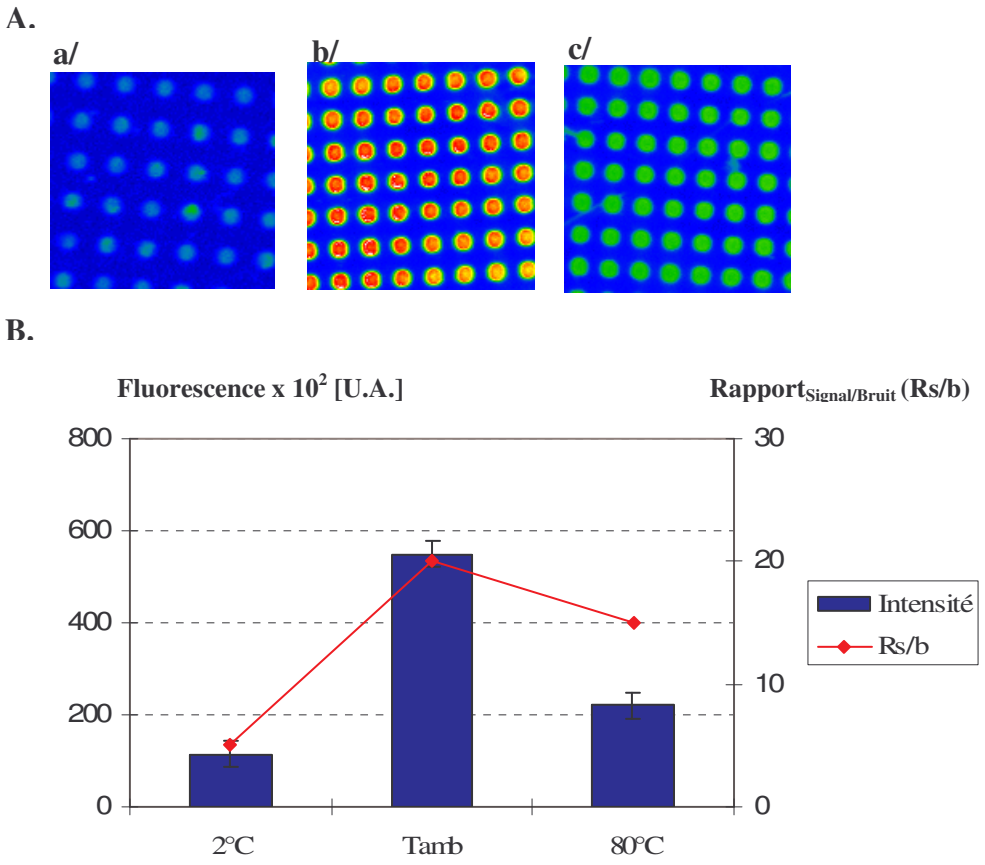


Figure 21 : Influence de la température sur la silanisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond **($R_{Signal/bruit}$)** : **a/** silanisation à 2°C ; **b/** silanisation T° ambiante ; **c/** silanisation à 80°C (Gain 34).

Ces résultats peuvent être expliqués par :

- Une faible condensation du silane **15** à cause de la silanisation à faible température (2°C) (Figure 22 A.).
- Une densité optimal du silane **15** par formation d'une monocouche ordonnée et peut être une formation d'une couche autoassemblée (SAMs)[15-18](Figure 22 B.).
- La silanisation à haute température (80°C) génère une condensation non contrôlée et donc un dépôt en multicouche non maîtrisé qui peut entraîner un masquage partiel des fonctions terminales en surface (Figure 22 C.).

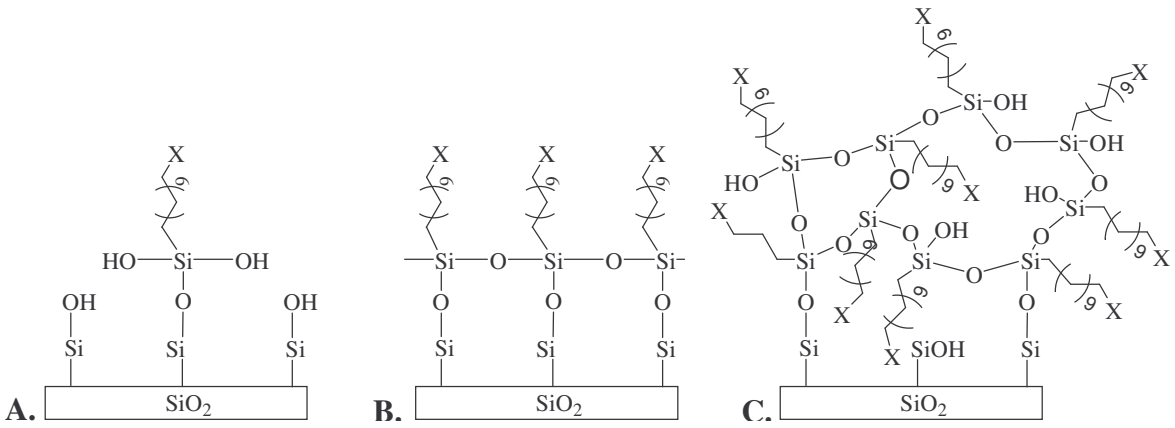


Figure 22 : Monocouche (**A.** faible densité ; **B.** densité optimal) et multicouche (**C.** haute densité) de silane **15** (avec X = oxyamine NPPOC).

- Solvant

Après réhydratation, on trempe les substrats dans une solution de triéthoxysilane **15** à 10 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97/3, v/v), ou dans le trichloroéthylène pendant 1 nuit à T° ambiante.

L'influence du solvant pour la silanisation avec l'organosilane **15**, a été étudiée par hybridation à 10 nM en cible. Les résultats sont présentés dans la Figure 23. On n'observe aucune différence d'intensité de fluorescence, et donc aucune influence du solvant sur la silanisation. Ces résultats peuvent être expliqués par deux raisons :

- Les deux solvants ont la même capacité à dissoudre l'eau de façon optimale au cours de la silanisation, et donc une bonne condensation du silane **15**. [13, 14].
- La durée élevée de la silanisation (24 heures) ne permet pas de voir la différence.

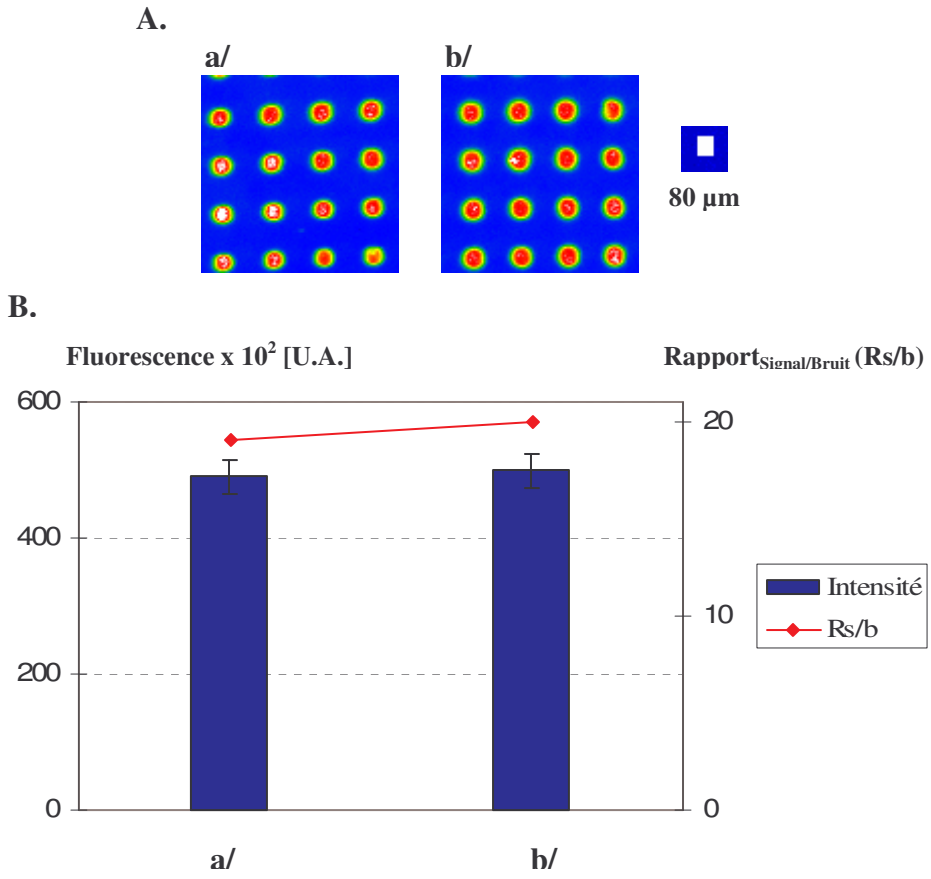


Figure 23 : Influence du solvant de silanisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$) : **a/** silanisation dans le trichloroéthylène ; **b/** silanisation dans toluène/triéthylamine (Gain 34).

- Conclusion :

Au cours de cette étude de la silanisation nous avons montré d'une part, que l'efficacité de la méthode est améliorée lorsqu'on utilise une longue chaîne de 11 carbones comme espaceur entre la fonction oxyamine protégée et la surface. D'autre part, ni la concentration du silane, ni le solvant de la silanisation ne semble avoir d'influence sur l'efficacité de la fonctionnalisation de surface. Enfin, la température est un paramètre important dans le processus de la silanisation. En effet, nous avons observé que la silanisation à basse (2°C) ou haute température (80°C) entraînaient une diminution de l'intensité de fluorescence. Une silanisation à température critique (*Tc* = T° ambiante) paraît optimale pour la fonctionnalisation de surface par le silane **15**.

II. 3. 2. 2. Optimisation de la photodéprotection

La photodéprotection du groupe photoactivable se fait par irradiation de la surface à une longueur d'onde de 365 nm. L'optimisation de la photodéprotection passe par l'étude du solvant de photodéprotection et du temps d'irradiation. Après photodéprotection on fait un lavage à l'eau et on sèche. Ainsi on obtient sur la surface, des zones d'oxyamines libres (Figure 24). Les substrats sont ensuite rapidement utilisés pour l'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1**.

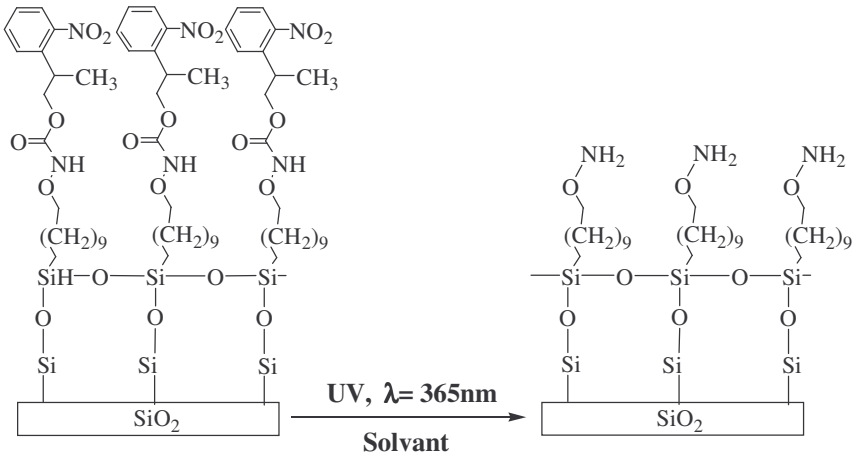


Figure 24 : Photodéprotection de la surface.

- Temps d'irradiation

L'influence du temps d'irradiation a été étudiée par hybridation à 10 nM en cibles. Les résultats sont présentés dans la Figure 25. On observe d'une part, à faible temps d'irradiation (<5 secondes) une faible intensité due au faible rendement de photodéprotection. D'autre part, à un temps d'irradiation plus élevé (>15 secondes) on remarque une augmentation du diamètre des plots due à l'agrandissement de la zone irradié par diffusion de la lumière. De plus une diminution de l'intensité de fluorescence est observée qui peut être expliqué par une immobilisation à haute densité d'oligonucléotide à tel point qu'il devient moins accessible à la cible, ou par une dégradation de la surface due à la forte exposition du faisceaux d'irradiation (énergie élevée).

Enfin la meilleure intensité de fluorescence est celle observée à 10 secondes d'irradiation.

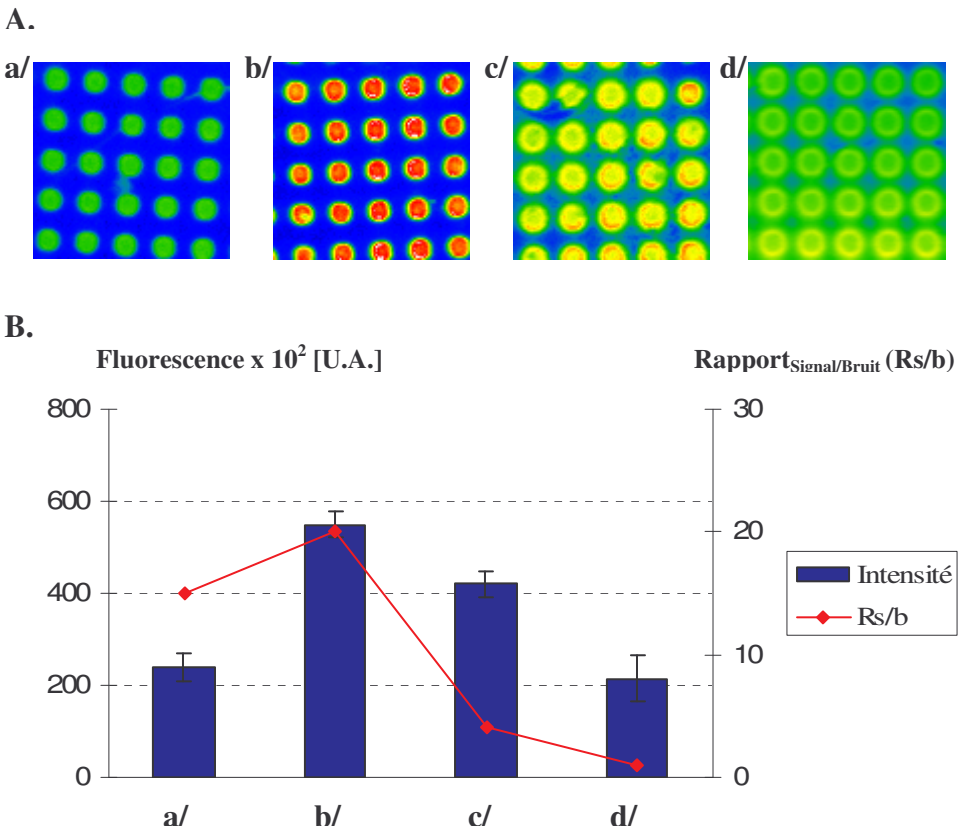


Figure 25 : Influence du temps d'irradiation sur l'immobilisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$) : **a/** 5 secondes d'irradiation ; **b/** 10 secondes d'irradiation ; **c/** 15 secondes d'irradiation ; et **d/** 20 secondes d'irradiation (gain34).

- Solvant de déprotection

Nous avons utilisé l'eau comme solvant de photodéprotection et on a augmenté la concentration de pyridine de 0 à 50 %.

L'influence de la présence, et/ ou la concentration de la pyridine sur la photodéprotection, a été étudiée par hybridation à 10 nM en cible. Les résultats sont présentés dans la Figure 26. On observe que la photodéprotection est efficace en milieux aqueux, mais on remarque une nette augmentation de la fluorescence lorsqu'on rajoute la pyridine en favorisant la β-élimination du groupe NPPOC (voir introduction p. 44). Enfin, la concentration de la pyridine n'a aucun impact sur le rendement de la photodéprotection.

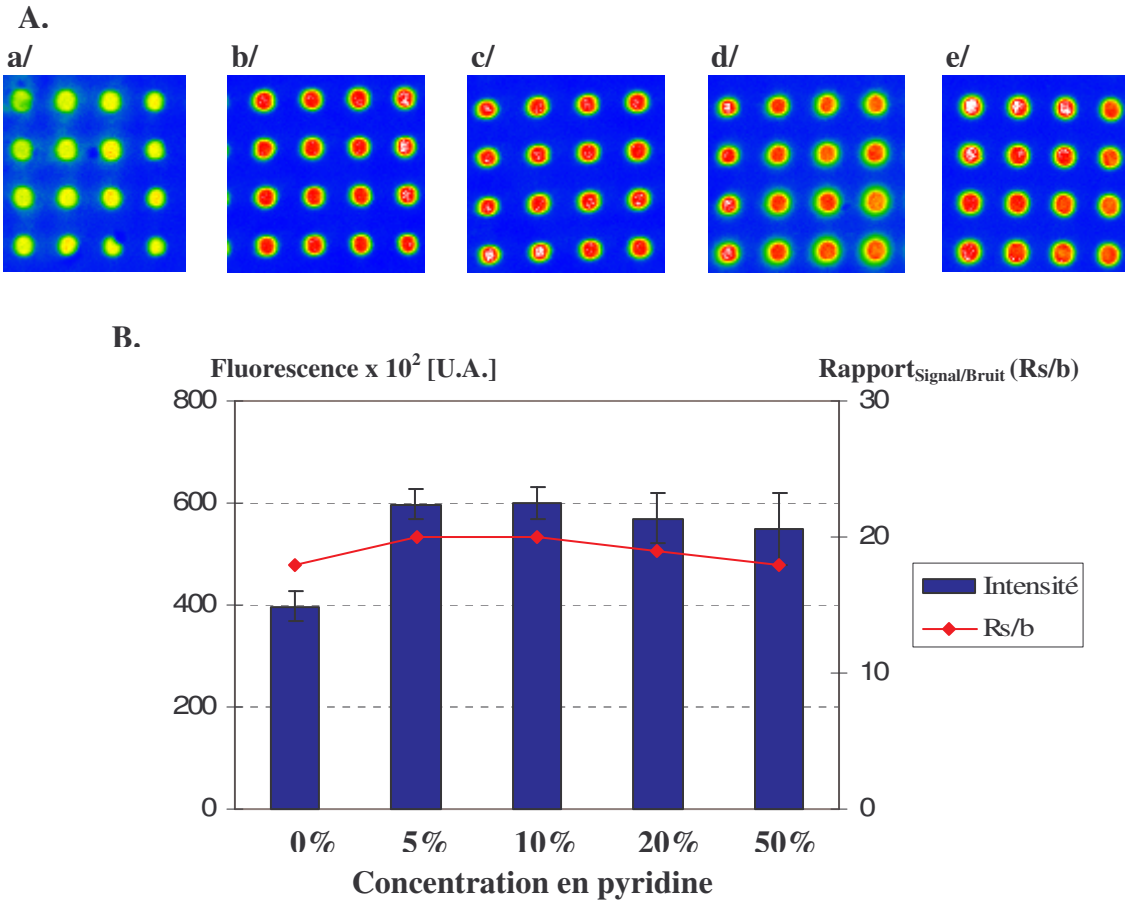


Figure 26 : Influence du solvant d'irradiation sur l'immobilisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond **($R_{Signal/bruit}$)** : **a/** eau, **b/** 5% pyridine, **c/** 10% pyridine, **d/** 20% pyridine, **e/** 50% pyridine (gain 37).

- Conclusion

Nous avons montré que la photodéprotection est un processus très rapide. Une irradiation à une longueur d'onde de 365 nm pendant 10 secondes semble optimale. Cette photodéprotection est améliorée par l'ajout d'une faible concentration de base. Une concentration à 5 % de pyridine paraît suffisante pour optimiser le rendement.

II. 3. 2. 3. Optimisation de l'immobilisation

L'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1** est effectuée par liaison covalente d'éther d'oxime[29-32]. La réaction se fait, entre la fonction oxyamine libre et la fonction aldéhyde de l'oligonucléotide séquence **1**. Les études sont réalisées sur :

- Le temps d'immobilisation (de 0 à 30 minutes).
- La concentration de la sonde (de 10 à 100µM).
- le solvant d'immobilisation (eau, acétate d'ammonium à 0.4M).

Après l'immobilisation, on fait une série de lavage à l'eau et à SDS 1% et de nouveau à l'eau et ensuite on sèche à l'argon (Figure 27).

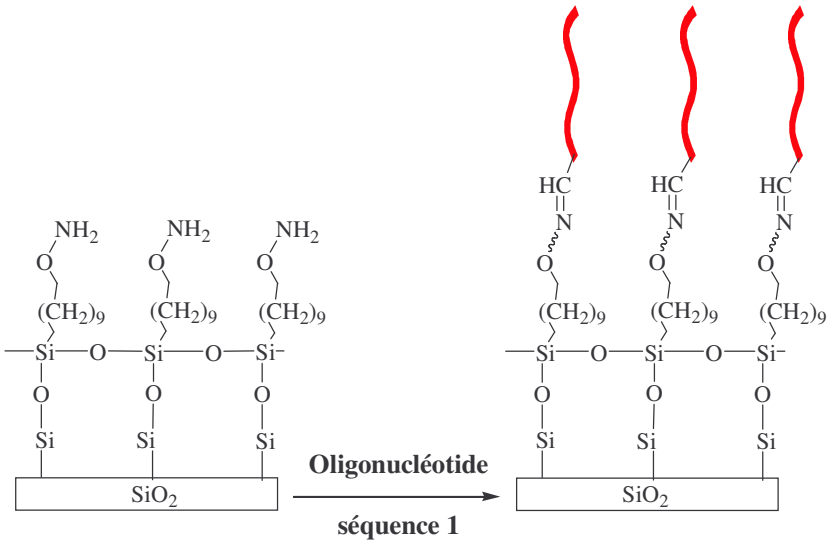


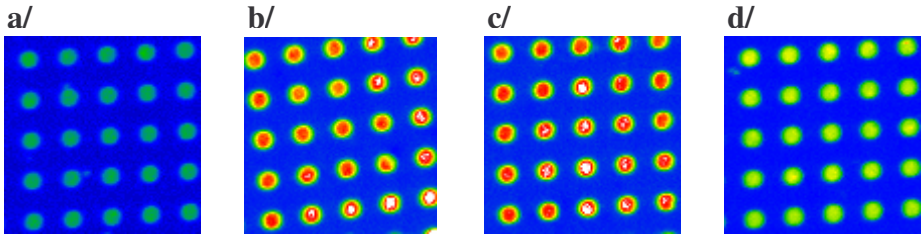
Figure 27 : ***Immobilisation de l'oligonucléotide aldéhyde séquence 1.***

- Concentration en sonde oligonucléotidique aldéhyde

L'influence de la concentration d'oligonucléotide séquence **1** sur l'immobilisation a été étudiée par hybridation à 100 nM en cible. On a testé une concentration variable d'oligonucléotide séquence **1** comprise entre 2 et 100 µM, ainsi quatre conditions ont été utilisées : 2 µM, 10 µM, 20 µM et 100 µM. Les résultats sont présentés dans la Figure 28. La meilleure intensité de fluorescence est celle observée à une concentration comprise entre 10 et 20 µM. On observe également, que l'intensité de la fluorescence diminue lorsqu'on augmente la concentration à 100 µM, ou lorsqu'on diminue la concentration à 2 µM. Ces résultats peuvent être expliqués par :

- A faible concentration, on obtient une faible densité d'oligonucléotide immobilisé.
- A concentration comprise entre 10 et 20µM, la densité est optimale.
- A forte concentration (100 µM), on génère une haute densité d'oligonucléotide et donc une accessibilité relativement faible ce qui explique la faible intensité de fluorescence.

A.



B.

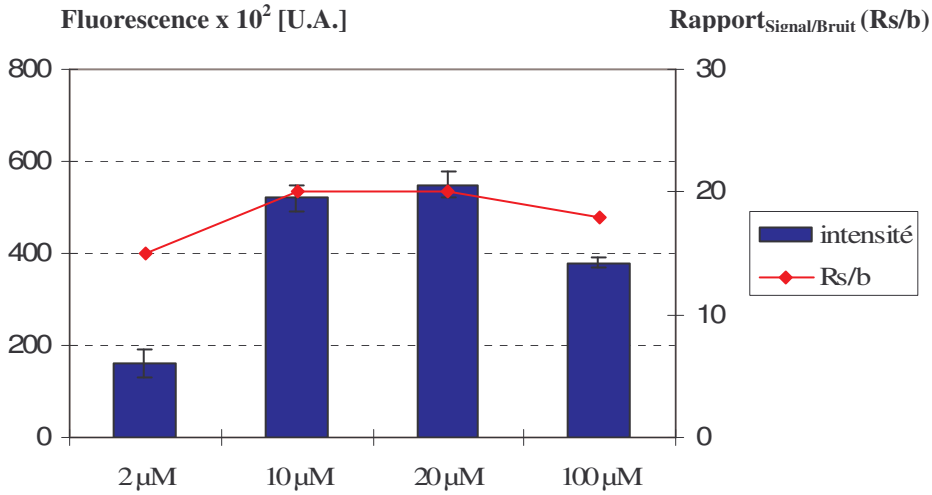


Figure 28 : Influence de la concentration de l'oligonucléotide séquence **1** sur l'immobilisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$) : **a/** Immobilisation à 2 µM, **b/** Immobilisation à 10 µM, **c/** Immobilisation à 20 µM, **d/** Immobilisation à 100 µM.

- Tampons de dépôt

L'influence du solvant d'immobilisation a été étudiée par hybridation à 100 nM en cibles et les substrats ont été insolés pendant 5, 10, 15, et 20 secondes à travers une fente de forme rectangulaire (de 2 mm/150 µm) dans une solution de pyridine à 5%. Les résultats sont présentés dans la Figure 29. L'intensité de fluorescence augmente nettement lorsque l'eau est remplacée par le tampon $ACONH_4$ à 0.4 M pH 4.6. L'ajout de tampon et donc le contrôle de pH permet une meilleure immobilisation des oligonucléotides.

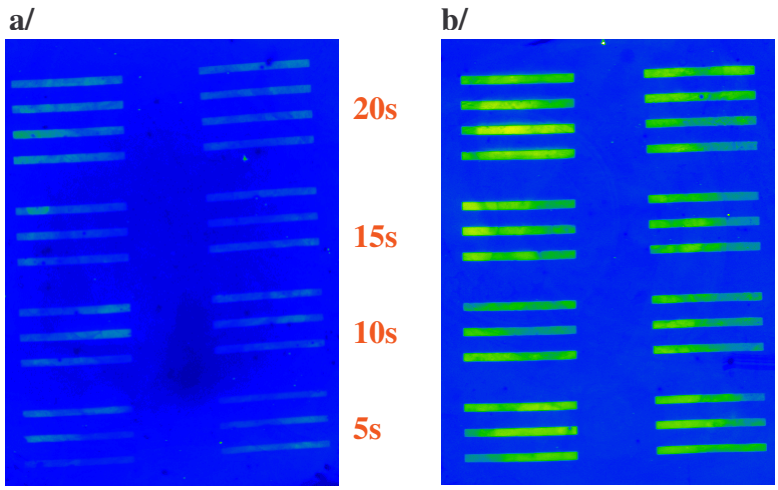


Figure 29 : Influence du solvant d'immobilisation, Images des substrats après hybridation et l'irradiation a été réalisée pendant 5, 10, 15 et 20 secondes : **a/** Immobilisation dans l'eau, **b/** Immobilisation dans $AcO^-NH^+_4$ à 0.4 M.

- Temps d'immobilisation

L'influence du temps d'immobilisation a été étudiée par hybridation à 100 nM en cible. On a testé un temps d'immobilisation compris entre 30 secondes et 30 minutes, ainsi quatre conditions on été utilisées : 30 secondes, 2, 10, et 30 minutes. Les résultats sont présentés dans la Figure 30. Les meilleures intensités sont observées à 30 secondes et 2 minutes, donc la réaction d'immobilisation est achevée au bout de 2 minutes. Les faibles intensités observées à 10 et 30 minutes peuvent être expliqués, par le fait que la densité d'oligonucléotide séquence **1** immobilisé est très importante et l'accessibilité de la cible devient plus faible.

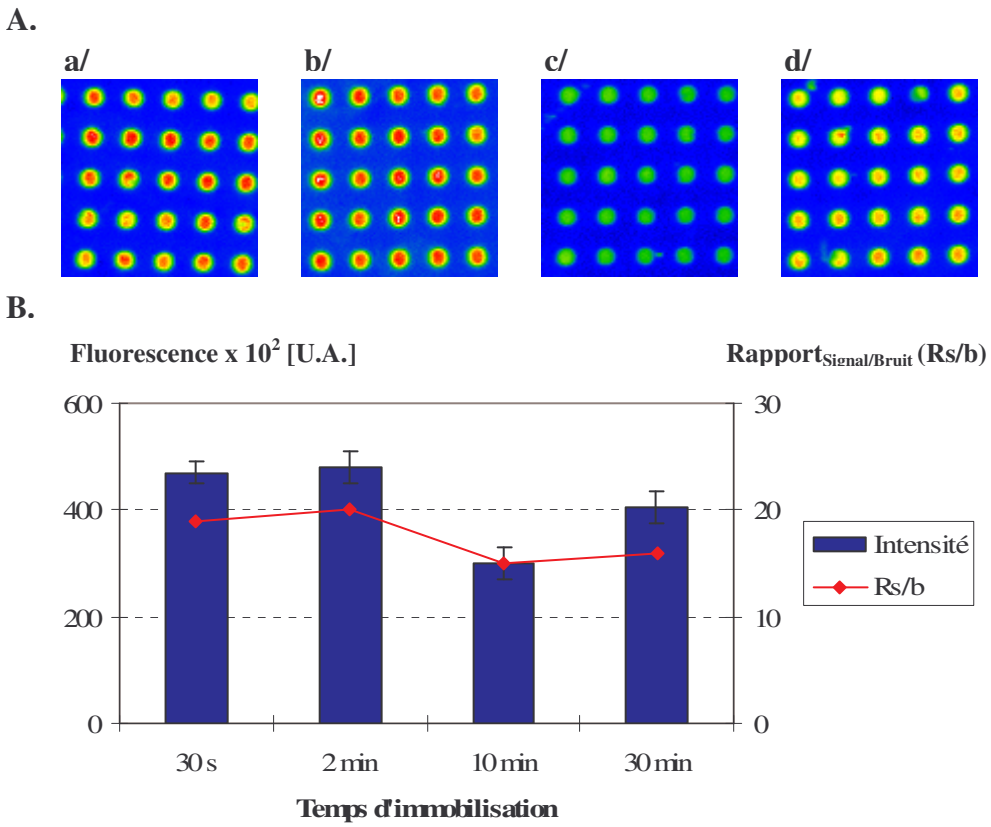


Figure 30 : Influence du temps d'immobilisation. **A.** Images des substrats après hybridation. **B.** Mesures d'intensités de fluorescence et rapport signal / bruit de fond ($\mathbf{R_{Signal/bruit}}$). Immobilisation pendant : **a/** 30 secondes, **b/** 2 minutes, **c/** 10 minutes, **d/** 20 minutes.

- Conclusion

La quantité d'oligonucléotides immobilisés est un point critique dans la méthodologie de préparation. En effet, nous avons observé que des concentrations trop faibles ou trop importantes entraînaient une diminution de l'intensité de fluorescence. Une concentration à 20 µM paraît optimale pour notre méthode.

Nous avons montré également que le choix du solvant d'immobilisation est très important. En effet, l'utilisation du tampon d'acétate d'ammonium à 0.4 M pH 4.6 améliore nettement le rendement d'immobilisation.

Enfin, nous avons montré que la réaction d'immobilisation est très rapide. Une réaction pendant 2 minutes dans l'acétate d'ammonium semble optimale.

II. 3. 2. 4. Etudes de la sensibilité

Nous avons montré, que notre méthode de préparation de biopuces est efficace. Nous souhaitons maintenant étudier la sensibilité de la méthode. Pour cette raison, nous avons défini un protocole standard **1**, à partir de la mise au point des différentes étapes réalisées auparavant.

Protocole Standard 1

Après réhydratation, la silanisation de la surface est réalisée avec une solution de triéthoxysilane **15** à 5 mM dans un mélange toluène/triéthylamine (97/3, v/v) pendant 1 nuit à température ambiante. On lave au toluène puis à l'éthanol puis on sèche à l'argon. Les substrats sont ensuite mis à l'étuve à 110°C pendant 3 heures.

La photodéprotection du groupe NPPOC est réalisée par irradiation de la surface pendant un temps très court (10 secondes). L'irradiation est réalisée à une longueur d'onde de 365 nm, dans une solution aqueuse de pyridine à 5%. On lave à l'eau puis on sèche à l'argon et le substrat est rapidement utilisé.

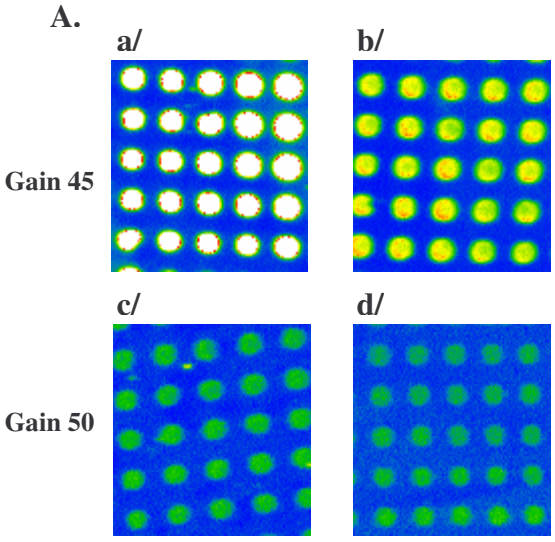
L'immobilisation de l'oligonucléotide 5'-aldéhyde est réalisée à une concentration de 20 µM dans l'acétate d'ammonium à 0.4 M pH 4.6. La réaction est très rapide et dure 2 minutes. On lave à l'eau et SDS 1% et de nouveau à l'eau puis on sèche à l'argon. La solution d'oligonucléotide séquence **1** fonctionnalisé par un aldéhyde est fraîchement préparée par oxydation à $NaIO_4$. L'oxydation est réalisée avec 50 éq de $NaIO_4$ dans le tampon (voir partie synthèse p. 65).

Enfin, l'hybridation est réalisée à différentes concentrations en cible pendant 1 heure à 39°C. Après hybridation de la cible marquée au Cy3, les substrats sont lus au scanner de fluorescence.

Résultats

Plusieurs substrats on été préparés pour l'étude de la sensibilité. Ainsi, différentes concentrations en cible sont testées : 10 à 10000 pM puis les substrats sont lus au scanner à la fluorescence du Cy3. Les résultats sont présentés dans la Figure 31.

A.



B.

Concentration d'hybride	10 nM	1 nM	100 pM	10 pM
Rapport signal / bruit de fond	21	15	9	4

Figure 31 : A. Images des substrats après hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire marqué au Cy3 à des concentrations variables : **a/** 10 nM, **b/** 1 nM, **c/** 100 pM, **d/** 10 pM. Les substrats sont préparés selon le protocole standard **1** ; **B.** Mesures du rapport signal / bruit de fond **($R_{Signal/bruit}$)**.

Lorsque la concentration en cible marquée diminue, une baisse des intensités de fluorescence est observée sur les plots. La détection est sensible à la concentration de la cible présente dans le milieu. A faible concentration (10 pM), on observe une différence encore significative entre la fluorescence des plots par rapport à celle du bruit de fond (Rs/b = 4). Le seuil de détection de notre méthode est de l'ordre de 10 pM en cible.

Nous allons maintenant nous tourner vers l'application du protocole standard **1** pour l'immobilisation localisée d'oligonucléotides dans le format capillaire.

II. 3. 3. Format capillaire

Possédant maintenant la méthodologie validée de fonctionnalisation d'une surface plane, nous souhaitons l'adapter au format capillaire. Pour cela, nous utilisons le protocole standard **1** définie pour la préparation sur format plan. Néanmoins, ce protocole a été modifié pour étudier la photodéprotection dans le capillaire. Ainsi, on a fait une cinétique du temps d'irradiation (2-15 secondes). Les résultats sont présentés dans la Figure 32.

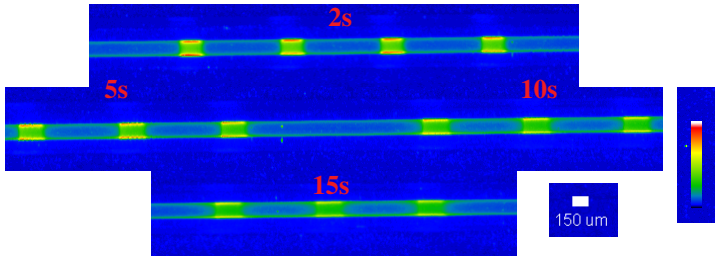


Figure 32 : Image du capillaire après hybridation à 10 nM de l'oligonucléotide complémentaire marqué au Cy3. Le capillaire est fonctionnalisé par l'organosilane **15** selon le protocole standard **1**. Le capillaire a été insolé à travers une fente de 150 µm, avec un temps variable (2, 5, 10 et 15 secondes) dans une solution aqueuse de pyridine à 5 %. L'immobilisation de l'oligonucléotide séquence **1** a été réalisée à 20 µM dans le tampon d'AcO^- NH^+_4 (0.4M) pH 4.6, pendant 2 minutes (gain 34).

D'une part, on observe de la fluorescence sur les plots ce qui prouve l'efficacité de notre stratégie dans le format capillaire. D'autre part, on remarque que la taille des plots augmente lorsqu'on augmente le temps d'irradiation. Cette observation est due à la propagation (diffusion) de la lumière dans le capillaire. Une irradiation à une longueur d'onde de 365 nm pendant 2 secondes semble optimale. Dans la suite des études, nous utiliserons ce temps d'irradiation de 2 secondes.

Par ailleurs, nous avons observé que l'utilisation du solvant de silanisation (toluène / triéthyle amine) fragilise la gaine protectrice du capillaire. Cette observation, nous a poussé à remplacer le solvant de silanisation par le trichloroéthylène. Pour cela, nous avons fait une comparaison de silanisation dans le format capillaire à 10 mM d'organosilane entre le mélange toluène / triéthylamine et le trichloroéthylène. Le protocole utilisé est celui défini pour le format plan avec la modification apportée par l'étude de la photodéprotection dans le capillaire (temps d'irradiation optimal = 2 secondes). L'hybridation a été réalisée par un oligonucléotide complémentaire marqué à la fluorescéine. Les résultats sont présentés dans la Figure 33.

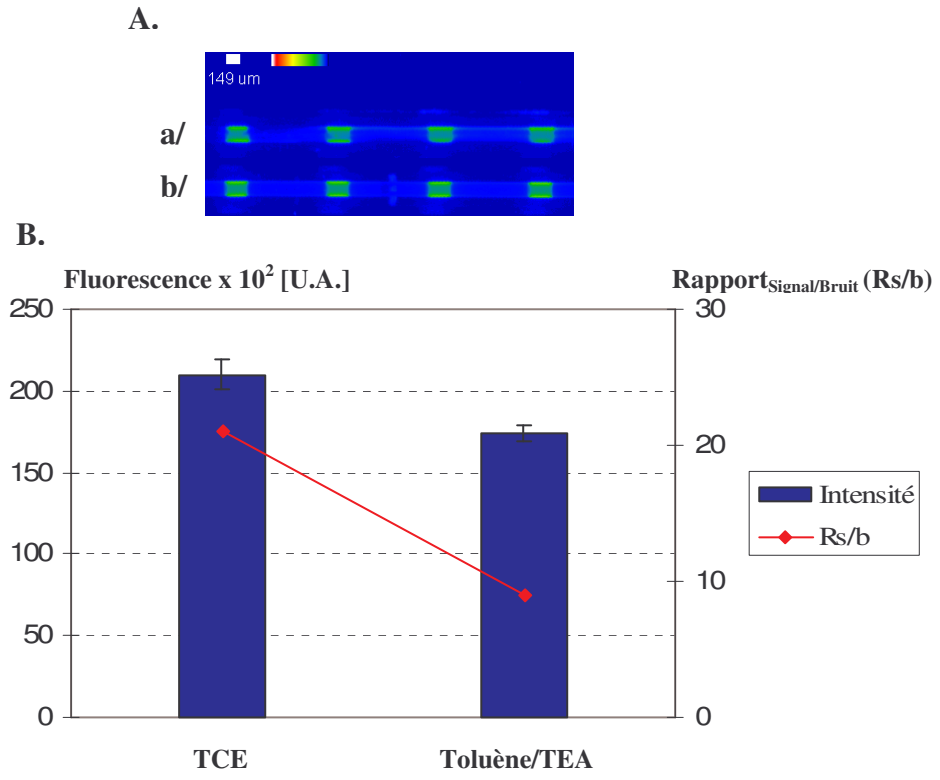


Figure 33 : Comparaison de silanisation dans le format capillaire. **A.** Images des capillaires après hybridation, **a/** Silanisation dans le mélange toluène / triéthylamine, **b/** Silanisation dans le trichloroéthylène ; **B.** Mesure d'intensité de fluorescence et rapport signal / bruit de fond **($R_{Signal/bruit}$)** (Gain 27).

On remarque d'une part, une intensité de fluorescence légèrement plus élevée des plots dans le cas de la silanisation au trichloroéthylène. D'autre part, l'intensité du bruit de fond est plus faible dans le cas de la silanisation dans le trichloroéthylène, comme le montre le rapport du signal sur le bruit de fond **($R_{Signal/bruit}$)**.

Nous avons montré que notre méthode de préparation de biopuce est efficace dans le format capillaire. Nous souhaitons maintenant étudier la sensibilité de la méthode.

- Spécificité de l'approche

Pour prouver l'efficacité de notre approche, plusieurs contrôle ont été réalisés : le premier consiste à faire réagir de l'acétone avec l'oxyamine libérée après photodéprotection par formation de liaison oxime. La deuxième consiste à immobiliser l'oligonucléotide séquence **1** modifié par le diol. Ainsi en utilisant le protocole standard **2**, on prépare trois capillaires :

1. Le premier capillaire : après photodéprotection on traite le capillaire avec l'acétone pendant 20 minutes puis après lavage avec l'oligonucléotide séquence **1** modifié par l'aldéhyde.
2. Le deuxième capillaire : après photodéprotection on fait réagir l'oligonucléotide séquence **1** modifié par le diol.
3. Le troisième capillaire : selon le protocole standard **2**.

Après hybridation de l'oligonucléotide complémentaire marqué FITC à 10 nM, on scan le capillaire. On obtient les résultats présentés dans la Figure 34. On observe d'une part, qu'aucune intensité de fluorescence n'est détectée après traitement à l'acétone ce qui prouve que l'immobilisation est effectuée par formation de liaison oxime (Figure 34 a). D'autre part, on observe une légère intensité de fluorescence lorsqu'on immobilise le diol. Cette fluorescence est due à l'immobilisation du diol par adsorption non covalente (interactions électrostatiques par exemple).

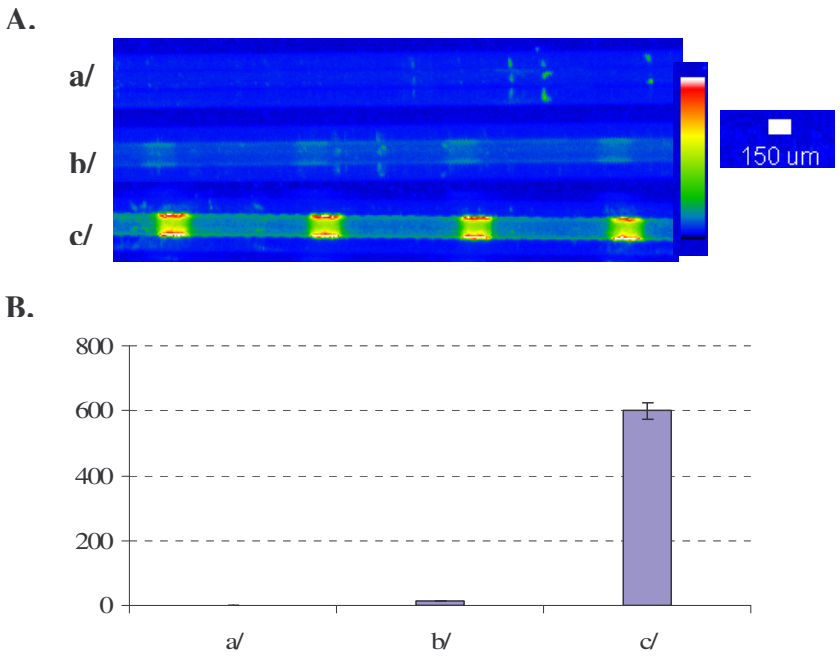


Figure 34 : contrôle de l'approche : **A.** images des capillaires après hubridation, **B.** intensité de fluorescence. **a/** réaction avec l'acétone après photodéprotection ; **b/** réaction avec l'oligonucléotide séquence **1** modifié par un diol ; **c/** protocole standard **2** (gain 37).

- Conclusion

L'accrochage se fiat bien par réaction de l'oxyamine libérée après photodéprotection avec le groupe aldéhyde de l'oligonucléotide.

- Etude de stabilité dans le temps

Un paramètre important est la stabilité du greffage de la biomolécule dans le temps (durée possible d'utilisation). Pour cela, une étude préliminaire a été réalisée en préparant trois capillaires en parallèle avec le protocole standard **2**. L'hybridation a ensuite été réalisée après un temps variable de stockage à l'air à température ambiante (1 minute, 2 jours et 19 jours). Après hybridation de l'oligonucléotide complémentaire marqué FITC à 10 nM, on scan le capillaire. On obtient les résultats présentés dans la Figure 35.

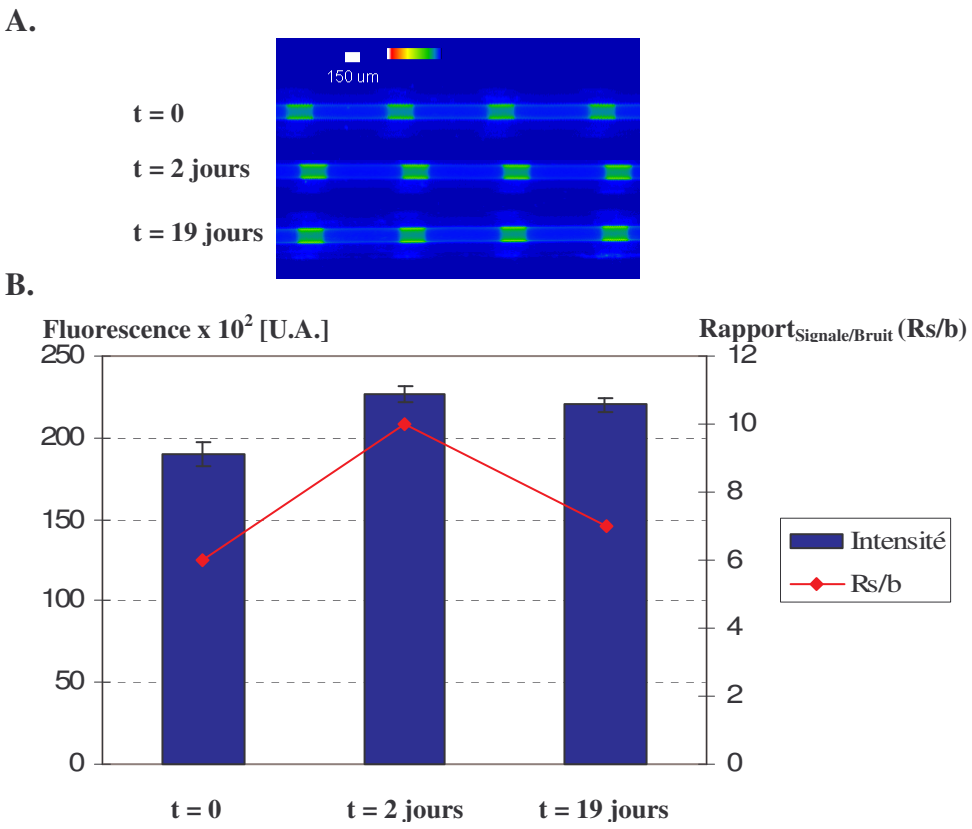


Figure 35 : Etudes de stabilité dans le format capillaire. **A.** Images scannées de l'hybridation, avec t = 0, t= 2 jours t = 19 jours ; **B.** Mesure d'intensité de fluorescence et le rapport du signale / le bruit de fond ($\mathbf{R_{Signale/bruit}}$) (Gain 27).

Ces résultats préliminaire montrent, que l'intensité de fluorescence et le rapport signal sur bruit reste relativement égale au court du temps (0 à 19 jours). Ces résultats, nous confirment la bonne stabilité de notre chimie de surface jusqu'à 19 jours.

- Etude de la sensibilité

Pour cela, nous avons défini un protocole standard **2**, à partir de la mise au point des différentes étapes réalisées auparavant.

Protocole Standard 2 :

Après réhydratation, la silanisation de la surface est réalisée avec une solution de triéthoxysilane **15** à 10 mM dans le trichloroéthylène, pendant 1 nuit à température ambiante. On lave au trichloroéthylène puis à l'éthanol, puis on sèche à l'argon. Les capillaires sont ensuite mis à l'étuve à 110°C pendant 3 heures.

La photodéprotection du groupe NPPOC est réalisée par irradiation du capillaire pendant un temps court (2 secondes). L'irradiation est réalisée à une longueur d'onde de 365 nm, dans une solution aqueuse de pyridine à 5% au travers d'une fente de 150 µm de large. On lave à l'eau, puis on sèche à l'argon, puis la surface est rapidement utilisée pour l'immobilisation.

L'immobilisation de l'oligonucléotide 5'-aldéhyde, est réalisée à une concentration de 20 µM dans l'acétate d'ammonium à 0.4 M pH 4.6. La réaction est rapide et dure 2 minutes. On lave à l'eau et SDS 1% et de nouveau à l'eau puis on sèche à l'argon. La solution d'oligonucléotide séquence **1** fonctionnalisé par un aldéhyde est fraîchement préparée par oxydation à $NaIO_4$. L'oxydation est réalisée avec 50 éq de $NaIO_4$ dans le tampon l'acétate d'ammonium.

Enfin, l'hybridation est réalisée en dynamique (flux = 1 µL/min) à différentes concentrations en cible pendant une heure à 39°C. Après hybridation de la cible marquée à la fluorescéine, les capillaires sont lus au scanner de fluorescence.

Résultats

Nous avons utilisé le protocole standard **2** pour immobiliser l'oligonucléotide séquence **1** et étudier la sensibilité dans ce format capillaire. Différentes concentrations en cibles sont testées : 1 à 100 pM. Les résultats sont présentés dans la Figure 36.

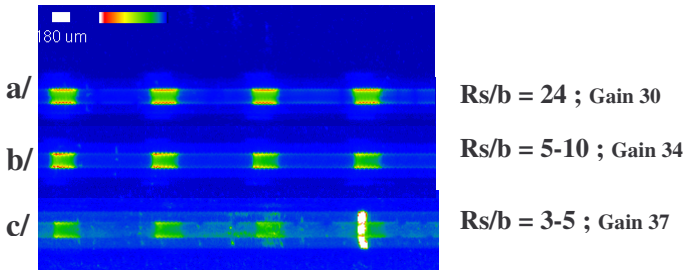


Figure 36 : Images des capillaires après hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire marqué au FITC à des concentrations variables : **a/** 100 pM, **b/** 10 pM, **c/** 1 pM. Les capillaires sont préparés selon le protocole standard **2**. (Avec **Rs/b** = rapport signal / bruit de fond)

Lorsque la concentration en cible marquée diminue, une baisse des intensités de fluorescence est observée sur les plots. La détection est sensible à la concentration de la cible présente dans le milieu. Même à faible concentration (1 et 10 pM), on observe d'une part, une différence significative entre l'intensité de fluorescence des plots par rapport à celle du bruit de fond (Figure 36). Le seuil de détection de notre méthode est de l'ordre de 1 pM en cible. D'autre part, à faible concentration en cible la fluorescence des plots diminue dans le sens du flux de la solution d'hybridation qui rend le rapport signal / bruit de fond variable selon la position du plot (Figure 37).

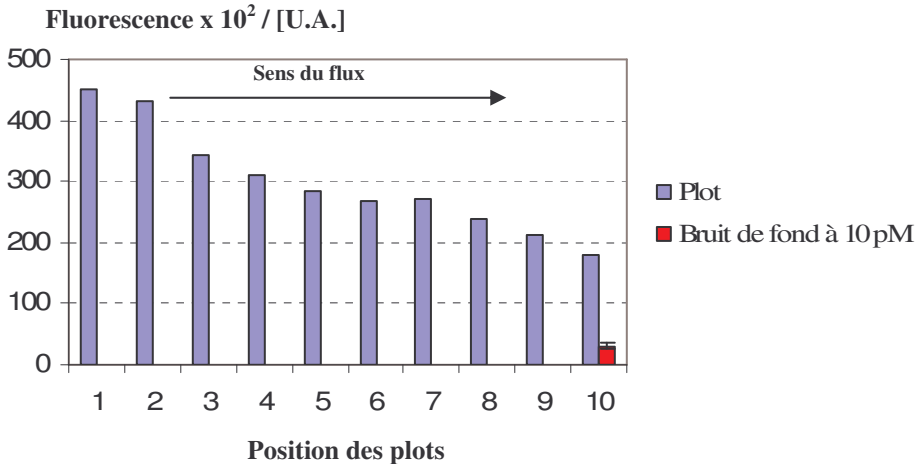


Figure 37 : Intensités de fluorescence des plots en fonction de leur position du plus proche (1) au plus loin (10) (après hybridation à 10 pM ; gain 34).

Ce phénomène est observé également lorsque, le flux est en double sens (solution d'hybridation pousser, puis aspirer). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les plots à proximité de la solution d'hybridation sont en contact avec une concentration constante en

cibles, alors que les plots les plus éloignés sont en contact avec solution de moins en moins chargée en cibles. Néanmoins, ce phénomène n'est visible qu'à de faibles concentrations en cibles.

- Irradiation à sec

La photodéprotection est une étape très importante dans notre méthodologie d'immobilisation d'oligonucléotides. Cette étape demande une irradiation à une longueur d'onde de 365 nm en présence de base (5 % pyridine). L'utilisation du solvant de photodéprotection peut s'avérer non adaptée pour une immobilisation d'une molécule (par exemple une molécule instable en milieux aqueux basique) en limitant notre méthodologie. D'où l'intérêt d'étudier la photodéprotection à sec afin de rendre notre méthodologie plus modulable.

Nous avons utilisé le protocole standard **2** pour une comparaison entre une photodéprotection à sec (le capillaire est chauffé à 110°C pendant 3 heures) et à 5 % pyridine. Les résultats sont présentés dans la Figure 38. On observe que l'intensité de fluorescence à sec est relativement égale à celle à 5 % de pyridine ce qui prouve que la photodéprotection est efficace sans utiliser un solvant. Ce résultat peut être expliqué par la présence d'eau physisorbée[6] permettant la photodéprotection.

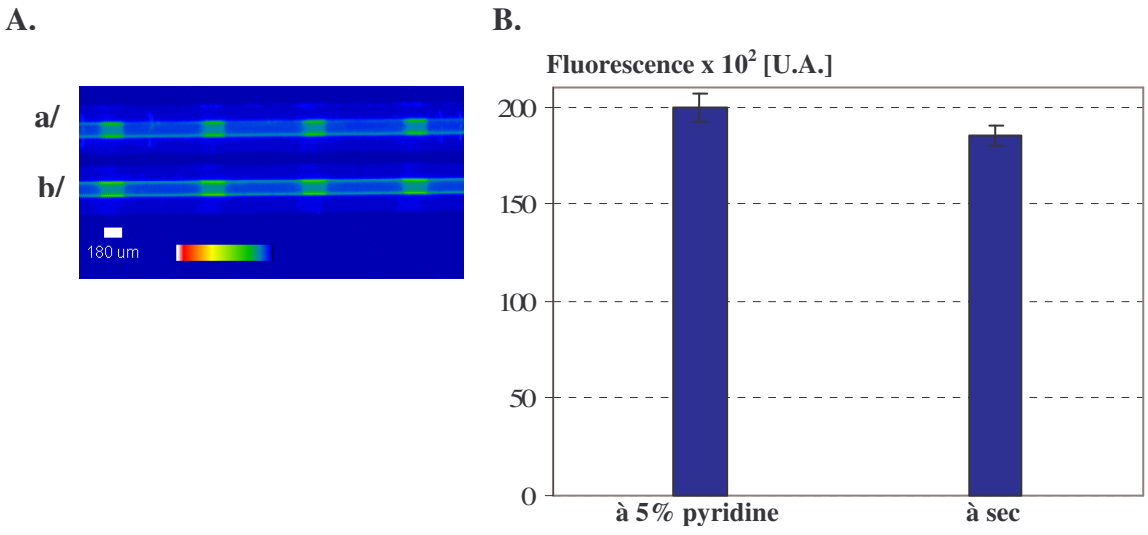


Figure 38 : Comparaison d'irradiation dans le format capillaire. **A.** Images des capillaires après hybridation, **a/** Irradiation à sec, **b/** Irradiation à 5 % pyridine ; **B.** Mesure d'intensité de fluorescence (Gain 27).

- Influence de l'extrémité d'ancrage de l'oligonucléotide

Nous avons vu dans le chapitre I que la synthèse d'oligonucléotides fonctionnalisés par la fonction aldéhyde en 5' est plus complexe et demande l'incorporation d'un phosphoramidite (préalablement synthétisé) lors de la synthèse automatisé alors que les oligonucléotides modifiés en 3' est plus simple et demande l'utilisation d'un support défini. Dans la logique de simplifier notre méthodologie, nous avons voulu comparer l'influence de l'extrémité d'ancrage en 5' ou 3' (Figure 39). Pour cela, nous avons utilisé le protocole standard **2** pour faire cette étude.

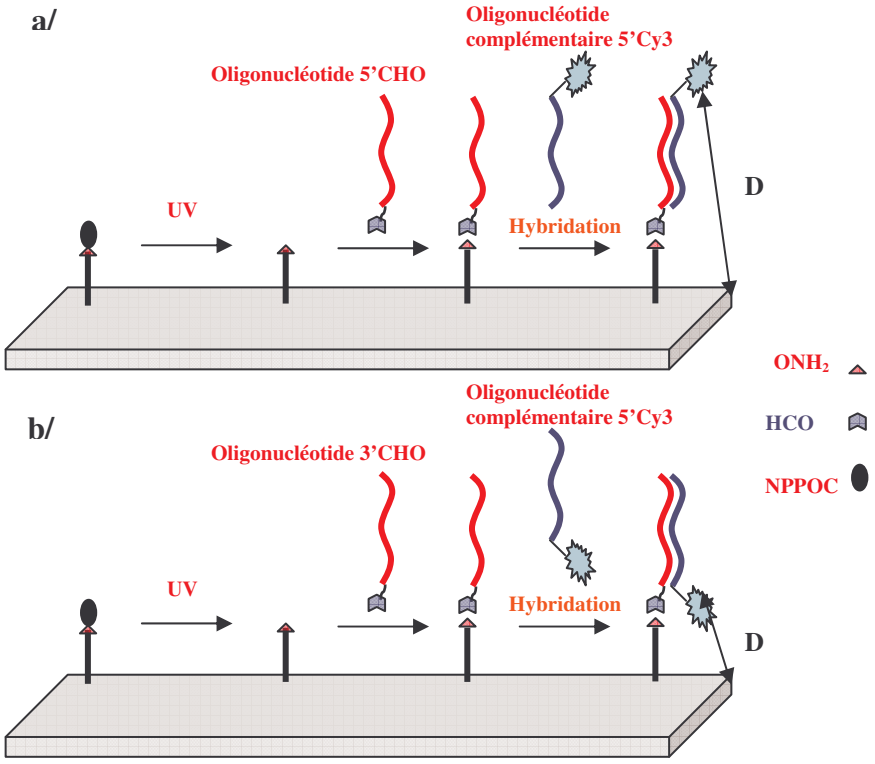


Figure 39 : Comparaison d'immobilisation d'oligonucléotide. **a/** greffage oligonucléotide 5' aldéhyde. **b/** greffage oligonucléotide 3' aldéhyde. **D :** distance entre le fluorophore et la surface.

Après hybridation de l'oligonucléotide complémentaire marqué en 5' par Cy3 à 10 nM, on scan le capillaire (fluorescence du Cy3). On obtient les résultats présentés dans la Figure 40. Les résultats montrent une différence de fluorescence très significative entre les deux extrémités de greffage 5' et 3'.

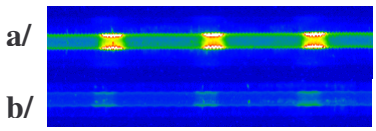


Figure 40 : Image des capillaires après hybridation avec l'oligonucléotide complémentaire marqué 5' Cy3 à une concentration de 10 nM. Les capillaires ont été insolés pendant 2 secondes à travers une fente de 150 µm et l'immobilisation a été réalisé avec les oligonucléotides fonctionnalisés par une fonction aldéhyde à l'extrémité 5'**(a)** et 3'**(b)** à une concentration de 20µM dans $ACONH_4$ (0.4M), pendant 2 minutes (Gain 34).

La différence de fluorescence entre le greffage d'oligonuclétides 5' et 3' aldéhyde peut s'expliquer par :

- Une plus faible réactivité de l'oligonucléotide 3'aldéhyde.
- Une inhibition de la fluorescence par la surface, dans le cas où le fluorophore est proche de la surface (cas d'hybridation b/ Figure 37).

Pour déterminer l'origine de cette différence nous avons fait une comparaison entre le greffage 5' et 3' en hybridant respectivement avec le complémentaire 5' et 3' FITC pour avoir la même distance entre le fluorophore et la surface (Figure 41).

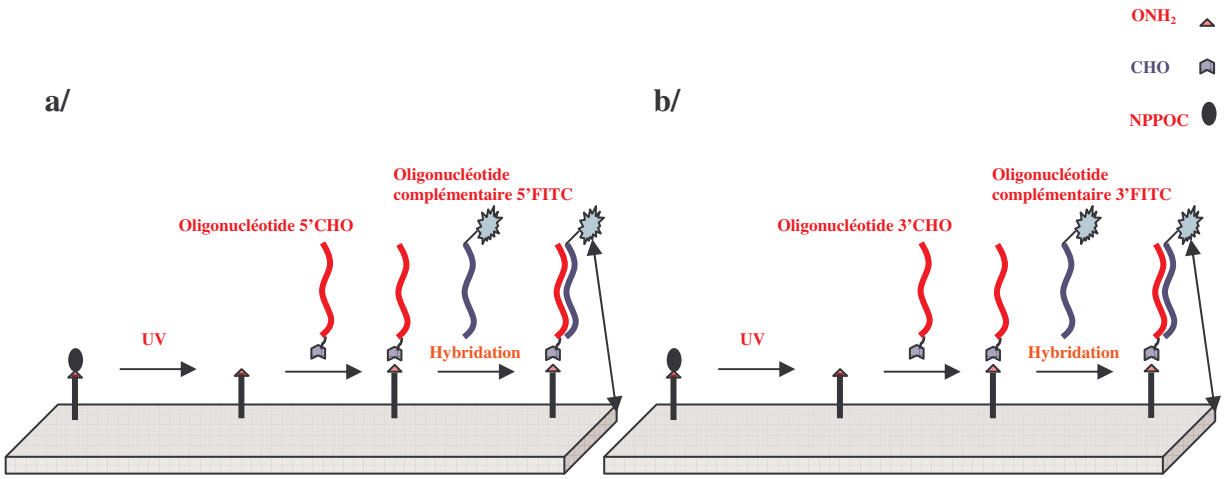


Figure 41 : Comparaison d'immobilisation d'oligonucléotide. **a/** Hybridation d'oligonucléotide complémentaire 5' FITC avec l'oligonucléotide immobilisé du côté 5'.**b/** Hybridation d'oligonucléotide complémentaire 3' FITC avec l'oligonucléotide immobilisé du côté 3'. **D :** distance entre le fluorophore et la surface.

Après hybridation à 10 nM, on scan les différents capillaires. Pour mieux interpréter les résultats, nous avons quantifié l'intensité de la fluorescence pour les différentes conditions et on a calculé les différents rapports d'intensité (**R_{1-6}**). Les résultats sont présentés dans la Figure 42.

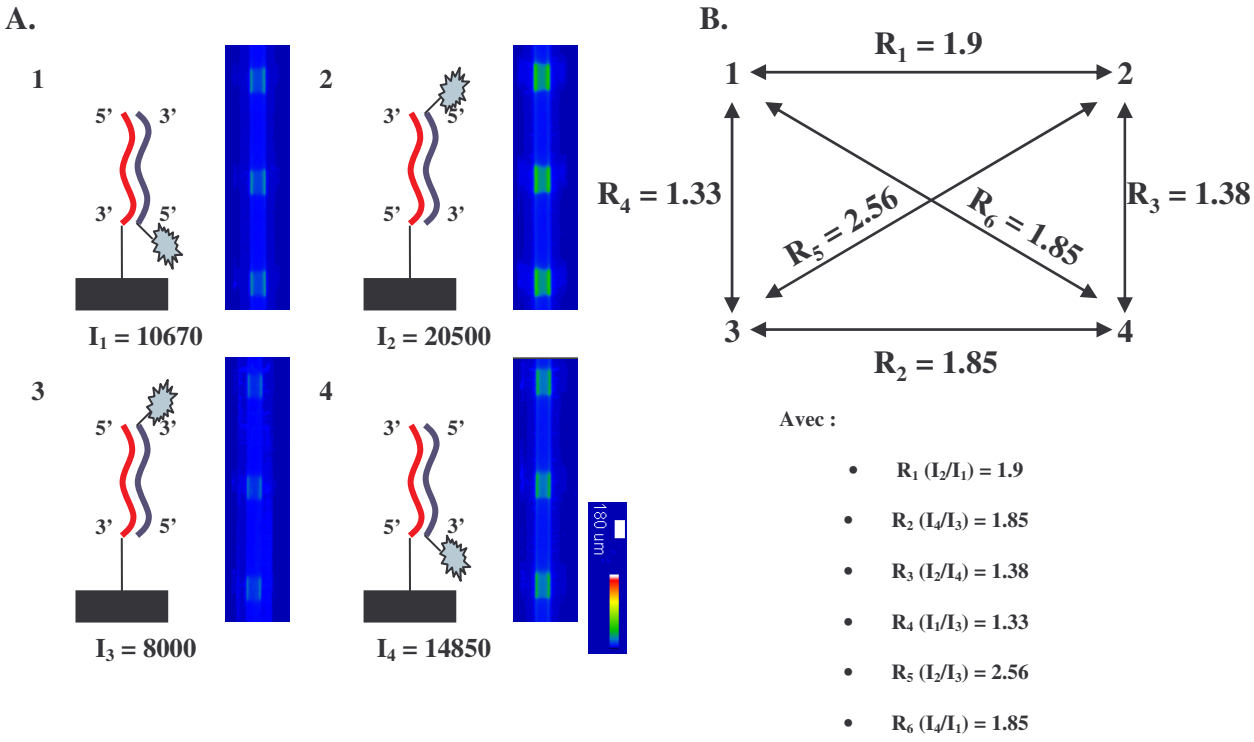


Figure 42 : A. Images et mesures d'intensités de fluorescence des différentes conditions étudiées. **B.** différents rapports d'intensités (Gain 27).

On observe d'une part, que l'intensité de fluorescence lorsque les oligonucléotides ont été immobilisés du côté 5' est nettement plus élevée par rapport à ceux immobilisés du côté 3'. Cette augmentation est observée quelque soit le type hybridation (5' ou 3' marqué FITC). Ainsi, on trouve une réactivité plus élevée avec un facteur égal à 1.9 ($R_1 = R_2 \approx 1.9$). D'autre part, on observe que l'intensité de fluorescence avec le complémentaire marqué 5' FITC est plus élevé que celle avec le complémentaire marqué 3' FITC quelque soit le type d'ancrage (côté 5' ou 3') avec un facteur égal à 1.38 ($R_3 = R_4 \approx 1.38$). Cette augmentation est probablement due à la différence de pureté entre les cibles commerciales. Ces résultats démontrent que la différence d'intensité de fluorescence observée est due à une plus faible réactivité de l'oligonucléotide 3'-aldéhyde par rapport à l'oligonucléotide 5'-aldéhyde, et non pas due à l'inhibition de la fluorescence par la surface à proximité du fluorophore.

II. 3. 4. Caractérisation de la surface oxyamine photoactivable

La surface oxyamine photoactivable est préparée à partir du protocole standard **1** décrit dans ce chapitre. Plusieurs techniques ont été exploitées pour caractériser la surface. Sont regroupées ici les principales méthodes : angle de contact, spectroscopie infrarouge en réflexion interne multiple, microscopie à force atomique et l'ellipsométrie. Le principe des différentes méthodes est donné en annexe.

Pour les études, les "wafers" ont été réalisés à partir de silicium dopé (type P) et poli simple face de 500 µM d'épaisseur d'oxyde. Pour faciliter la caractérisation en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, les "wafers" ont été préparés à partir de silicium dopé (type P) et poli double face de 100 µM d'épaisseur d'oxyde.

II. 3. 4. 1. Angle de contact

Lorsqu'on dépose une goutte sur une surface, elle peut, selon les cas, s'étaler ou au contraire ne pas mouiller la surface[35]. On peut quantifier ce phénomène en mesurant l'angle de contact (θ) de la goutte sur la surface (Figure 43) dont le principe de la méthode est donné en annexe. Pour des mesures reproductibles, la surface doit être la plus plane possible. La rugosité de la surface modifie les propriétés de mouillage. Par exemple une surface très rugueuse peut devenir complètement hydrophobe[36]. Dans le cas de l'eau, si l'angle θ est supérieur à 90° on parle de surface hydrophobe et hydrophile sinon.

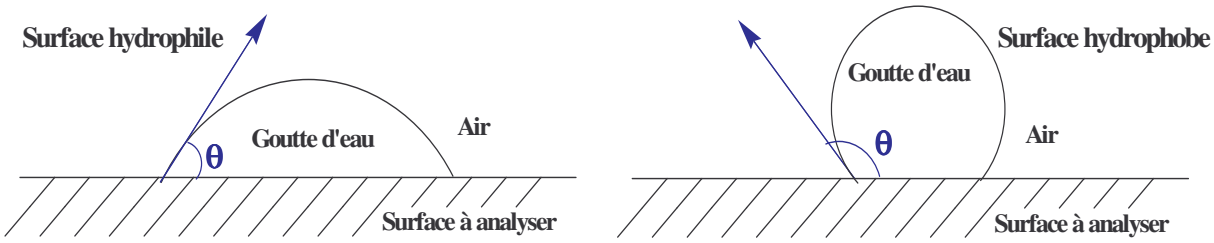


Figure 43 : l'angle (θ) entre la tangente à la goutte au point de contact et la surface solide.

Cet angle dépend des interactions entre le liquide et la surface et permet de remonter à l'énergie de surface. Nous obtenons ainsi des informations sur la nature chimique des groupes en surface ainsi que leurs orientations. Cet angle offre donc un moyen rapide et fiable de vérifier la préparation et le traitement des surfaces. Selon la surface considérée, nous chercherons à déterminer seulement son caractère hydrophile ou hydrophobe, auquel cas seule

une mesure d'angle avec l'eau est effectuée, ou bien, de façon plus complète, nous estimerons son facteur de polarité. Des mesures d'angles de gouttes avec le diiodométhane seront alors réalisées et nous calculerons la composante dispersive et la composante polaire de la surface. Les résultats des mesures réalisées sur les différentes étapes de préparation de surface sont rassemblés dans le Tableau 1.

Les mesures de l'angle de contact ont été réalisées dans l'eau et le diiodométhane de la même façon, avec la même quantité de liquide (1 µl), à température ambiante. Afin d'évaluer la reproductibilité des mesures, plusieurs mesures sont répétées à plusieurs endroits de la surface puis moyennées.

Surface	θ_{H_2O} (°)	$\theta_{CH_2I_2}$ (°)	γ_S^d **(mN/m)**	γ_S^p **(mN/m)**	X_p
Si/SiO_2	48 ± 2				
SiOH	<10				
Silane **15** greffé en surface	79° ± 1	42° ± 1	40.4	3.7	10%

Tableau 1 : Valeurs des angles de contact effectuées au court de la préparation de la surface fonctionnalisée par le silane **15** dans les conditions optimales (protocole **1**).

On constate que la méthode d'hydratation des surfaces est efficace : la valeur d'angle de contact de l'eau pour la surface SiOH est très faible et caractéristique d'une surface très hydrophile (groupement silanol de surface). Le caractère hydrophobe de la surface non traitée (48°) est dû à la présence de groupements siloxanes et de contaminants en surface. L'augmentation de l'angle de contact (79°) après greffage du silane **15**, nous confirme l'efficacité de la silanisation. Le caractère hydrophobe est apporté par la chaîne carbonée du silane. Le calcul de la composante dispersive et de la composante polaire de l'énergie de cette surface permet de mettre en évidence son faible caractère polaire.

II. 3. 4. 2. La Spectroscopie Infrarouge en Réflexion Interne Multiple (MIR-FTIR)

La Spectroscopie Infrarouge en Réflexion interne multiple (ou MIR-FTIR : multiple internal reflexion Fourier Transformed InfraRed Spectroscopy) est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé[38-40]. Elle permet via la détection des

vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes dans le matériau. Le principe du MIR, est décrit en annexe.

Après la silanisation avec le silane **15**, nous observons en MIR les bandes caractéristiques de l'organosilane **15** (Figure 35). La présence de la bande à 1725 cm^{-1} caractéristique du groupement carbonyle du carbamate, nous confirme le greffage du silane **15**. On observe également des bandes à 1550, 2850 et à 2920 cm^{-1}, qui correspondent respectivement au nitro et aux groupements méthyles avec vibration symétrique et antisymétrique du silane **15**.

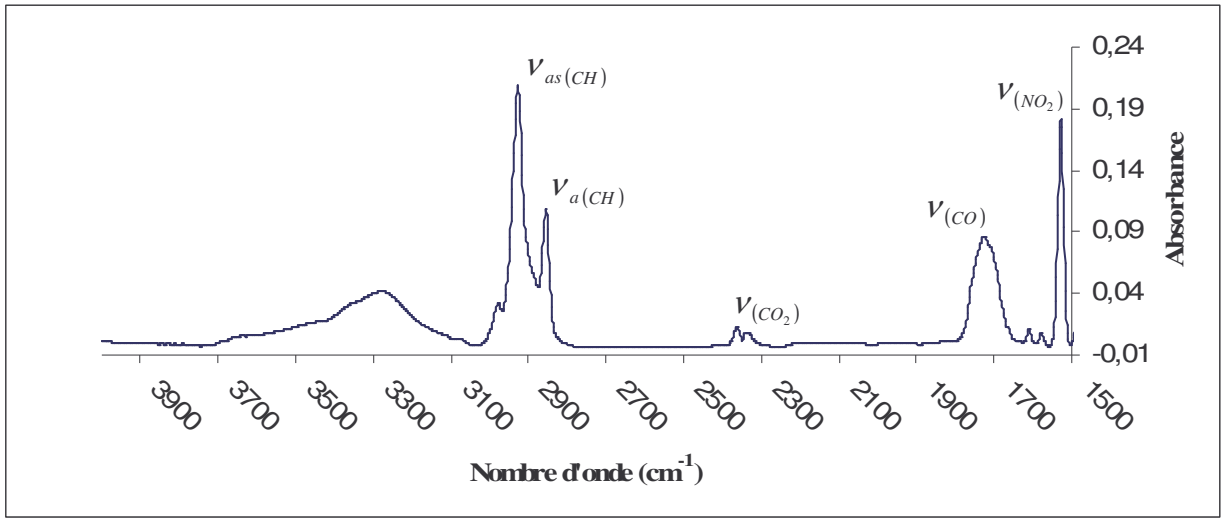


Figure 44 : Spectre infrarouge de la surface après greffage du silane **15**.

II. 3. 4. 3. Microscopie à Force Atomique (AFM)

La **microscopie à force atomique**[41-43] (ou **AFM** pour ***atomic force microscopy***) est une méthode dérivée du microscope à effet tunnel (ou Scanning Tunneling Microscopy, STM), qui peut servir à visualiser la topologie de la surface d'un échantillon ne conduisant pas l'électricité. Le principe se base sur les interactions entre l'échantillon et une pointe montée sur un microlevier. La pointe balaie (scanne) la surface à représenter, et l'on agit sur sa hauteur selon un paramètre de rétroaction. Un ordinateur enregistre cette hauteur et peut ainsi reconstituer une image de la surface.

L'étude de la surface oxyamine photoactivable par microscopie à force atomique, nous permet d'obtenir des informations sur l'homogénéité et la planéité de la surface. De plus, on peut estimer la rugosité de la surface (rms, pour roughness mean square) qui s'exprime en nm. Cette valeur est à considérer avec beaucoup de précaution. En effet, elle dépend de la

structure de la surface et aussi des amas présents qui peuvent changer la valeur de façon considérable.

La surface oxyamine photoactivable préparée selon le protocole standard **2**, est utilisée pour réaliser des mesures AFM (Figure 45). Les mesures sont réalisées en mode "tapping", le principe de AFM, est décrit en annexe. Les résultats obtenus pour diverses surfaces sont rassemblés dans le Tableau 2.

	Surface SiO_2	Surface silane **15**
Rugosité (nm)	0.1	4

Tableau 2 : Mesures de la rugosité de surface par AFM en mode **tapping**.

La valeur de rugosité de la surface Si/SiO_2 est révélatrice d'une surface homogène et lisse. En revanche, le traitement de surface par le silane **15** induit une augmentation considérable de la rugosité révélatrice d'une surface hétérogène due à la présence d'agrégats (Figure 45).

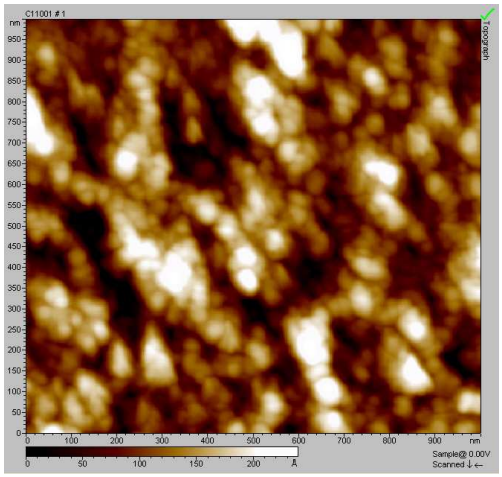


Figure 45 : Image AFM du support oxyamine photoactivable via la stratégie du silane **15** (protocole **1**). La rugosité (RMS) = 4 nm.

II. 3. 4. 4. Ellipsométrie spectroscopique

L'ellipsométrie est le nom donné à la technique consistant à mesurer la modification de la polarisation d'un faisceau à la réflexion sur un échantillon[44]. Le principe est décrit en annexe. Il s'agit de caractériser ou contrôler un échantillon généralement plan à surface polie constitué d'un empilement de films minces à faces parallèles. La modification de la

polarisation étant très sensible aux indices de réfraction et aux épaisseurs des couches de l'échantillon, cette étude se révèle donc un moyen puissant d'investigation de la constitution fine de celui-ci.

Les points forts de l'ellipsométrie sont : son caractère non destructif, sa large gamme de mesure (mesure d'épaisseur depuis une fraction de couche monoatomique jusqu'à quelques micromètres), sa possibilité de contrôle *in situ* permettant la mesure d'épaisseur de couches pendant leur croissance en temps réel. La technique permet aussi, d'étudier des structures complexes : multicouche, rugosité d'interface, homogénéité, etc.

L'ellipsométrie a été utilisée pour déterminer l'épaisseur et les propriétés optiques de la couche silane **15** greffée sur la surface d'oxyde de silicium (Si/SO_2). Nous avons utilisé la relation de dispersion de Cauchy, pour le modèle de l'indice de réfraction de l'oxyde de silicium. Après modélisation, on a déterminé l'épaisseur de la couche SiO_2 non modifiée, qui est égale à 504,42 **±** 0.02 nm avec $n(\lambda) = 1.4537+5634/\lambda^2$. L'épaisseur de couche SiO_2 obtenu par ellipsométrie est identique à celui donner par notre fournisseur de surface SiO_2 (500 nm). Par ailleurs, pour déterminer l'épaisseur du silane **15** greffé, on a pris un modèle à quatre couches Si/SiO_2/silane **15**/air, en considérant que la silanisation ne modifie, ni l'épaisseur, ni les propriétés optique de la couche SiO_2 précédemment calculées. Après modélisation sous ces conditions, nous avons déterminé l'épaisseur de la couche du silane **15**, égale à 5.32 **±** 0.98 nm avec $n(\lambda) = 0.76993+2559.4/\lambda^2$. On observe une faible valeur inattendu de l'indice de réfraction de la couche du silane **15**, comparée avec la valeur de 1.6 largement décrit dans la littérature[45]. D'autre part, la surface oxyamine photoactivable est assez rugueuse avec un RMS = 4.04 nm, alors que l'épaisseur est légèrement plus haut à 5.32 nm. Par conséquence, l'ellipsométre calcule l'épaisseur d'une couche rugueuse et donc non homogène, mais un système biphasique couche du silane **15 /** l'air, ce qui explique la faible valeur de l'indice de réfraction obtenu par cette méthode.

III. APPLICATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR L'ADRESSAGE DE TROIS OLIGONUCLEOTIDES

Possédant maintenant une méthodologie validée de fonctionnalisation de surfaces par des oligonucléotides dans le format capillaire, nous souhaitons tester notre stratégie pour l'adressage de trois séquences oligonucléotidiques différentes dans le même capillaire.

III. 1. Principe de l'adressage des oligonucléotides

Pour cela, nous utilisons le protocole standard **2** défini pour l'immobilisation d'oligonucléotides modifiés par une fonction aldéhyde dans le format capillaire. Trois séquences oligonucléotidiques différentes fonctionnalisées par l'aldéhyde seront immobilisées dans le tube capillaire de manière séquentielle. Le procédé consiste à illuminer sélectivement le capillaire à travers une fente (150 µm), ce qui donne accès à des régions activées où un premier couplage chimique va pouvoir s'opérer. Une nouvelle illumination sur une autre région du capillaire est réalisée, et permet d'effectuer un autre couplage. Par répétition du procédé, on réalise ainsi l'immobilisation des oligonucléotides avec le nombre voulu (Figure 46).

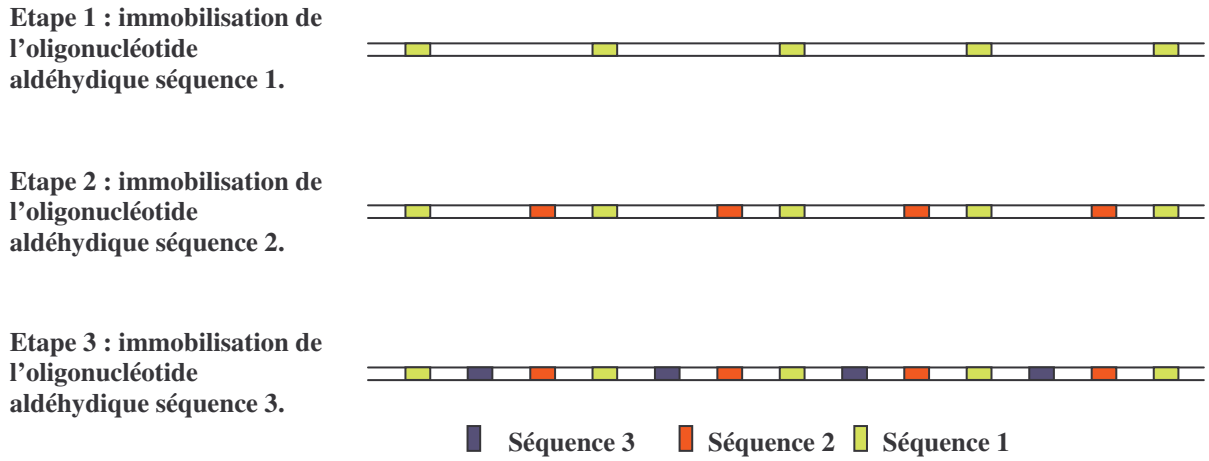


Figure 46 : Adressage photochimique de trois séquences d'oligonucléotides aldéhydiques différentes (plot de 150 µm).

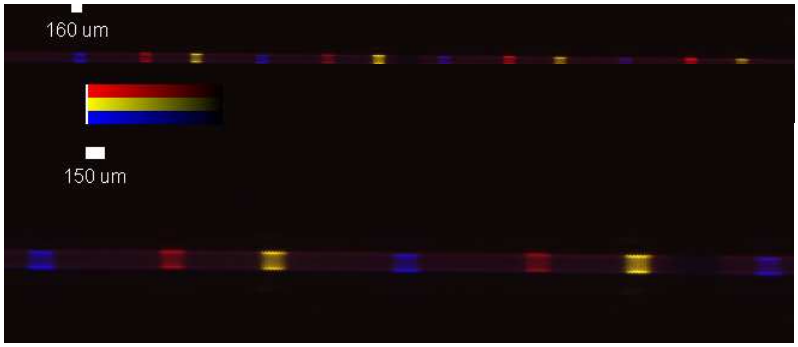
III. 2. Résultats expérimentaux

Après immobilisation des trois oligonucléotides séquence **1**, séquence **2** et séquence **3**, on procède à leur détection par hybridation. Les oligonucléotides complémentaires des séquences **1**, **2** et **3** sont marqués respectivement par la Fluorescéine, la Cy5 et le Texas Red. L'hybridation avec le mélange des trois séquences complémentaires à 10 nM est réalisée pendant 1 heure à 39°C. Après l'hybridation on fait un lavage au SSC2X et on sèche.

L'utilisation de marqueurs différents des oligonucléotides complémentaires permet de faciliter la détection simultanée des trois oligonucléotides immobilisés dans le capillaire, ainsi que la détection d'éventuelle hybridation non spécifique. Enfin, un scanner fait la lecture de la

fluorescence des trois fluorophores et on obtient ainsi une image combinée. Pour faciliter l'interprétation des résultats, nous avons utilisé un code de couleur : bleu, rouge, et jaune pour désigner respectivement la fluorescence des oligonucléotides complémentaires FITC, Cy5 et Texas Red (Figure 47A).

A.



B.

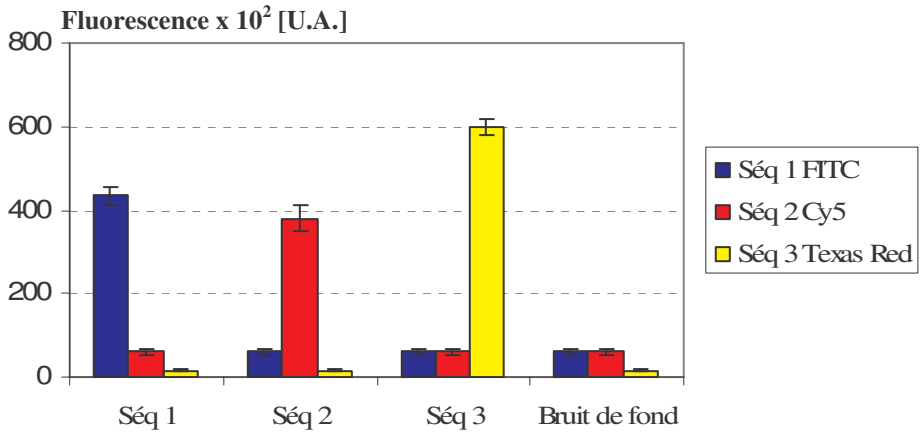


Figure 47 : Adressage photochimique des trois oligonucléotides, Séq **1**, Séq **2** et Séq, **3** dans le format capillaire. **A.** Images combinées des différents scans des fluorophores après hybridation avec un mélange des trois séquences complémentaires ; **B.** Mesure d'intensité de fluorescence de chaque séquence complémentaire marqué sur un plot définis, immobilisé par une séquence aldéhydique. Code de couleur : bleu-FITC ; rouge-Cy5 ; jaune-Texas Red.

Les résultats montrent, que chaque oligonucléotide complémentaire marqué est hybridé respectivement avec leur sonde spécifique, séquence **1**, **2** et **3**. D'autre part, la quantification de la fluorescence sur les plots confirme qu'il n'y a aucune hybridation non spécifique. La plus forte intensité de fluorescence mesurée sur un plot correspond à la fluorescence de la cible spécifique, alors que les deux faibles intensités mesurées correspondent au deux cibles non spécifiques (Figure 47B).

Ces résultats montrent l'efficacité de notre stratégie pour l'adressage par photochimie de trois oligonucléotides différents.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. INDICATIONS GENERALES

Tous les composés chimiques et les solvants (Fluka, Sigma-Aldrich, Merck, CARLO ERBA, Riedel-Dehaën) sont de qualité analytique et ont été utilisés directement sans purification.

- L'eau ultra pure (résistivité $\rho = 18\ M\Omega.m^{-1}$) est fournie par un appareil MILLIPORE.

- Les mesures de l'angle de contact sont réalisées sur un appareil Digidrop (GBX) en utilisant l'eau et le diiodométhane. La mesure de l'angle se fait à partir d'images capturées par un PC via une caméra traitée par un logiciel qui détermine l'angle grâce à des méthodes d'interpolation à l'équilibre.

- Les mesures d'infrarouge de surface sont réalisées sur un spectromètre FTIR Bruker IFS55.

- Les mesures de rugosité (rms, pour roughness mean square) des surfaces sont réalisées par microscope à force atomique en utilisant un appareil AFM PicoPlus system (Molecular Imaging). Les mesures sont effectuées en mode Tapping (MAC mode).

- Les mesures d'épaisseur de surface sont réalisées sur un Ellipsométre EP3-SE de chez Nanofilm Technology GmbH (Allemagne). Les mesures sont effectuées *ex-situ* sous l'air libre à 20 longueurs d'ondes différentes (de 366.3 à 1001.9 nm) avec des angles d'incidences variable de 50° à 80° par palier de 2°. La modélisation optique est réalisée par un logiciel EP3View de chez Nanofilm Technology GmbH. Un modèle à quatre couches est utilisé, Si/SiO2/Silane/Air. Les propriétés optiques de la surface nue, sont précédemment mesurées en utilisant un modèle de trois couches, Si/SiO2/Silane/Air.

- Les "wafers" de silicium (réseau cristallin : (1.0.0)) utilisés sont dopés (dopage : P), poli monoface et oxydés à 1050°C pendant 64 minutes dans un flux d'oxygène pur.

L'oxydation est réalisée sur un équipement TEMPRESS 5. les "wafers" sont découpés en plaques de 5 mm^2. Ce traitement, qui donne des surfaces de silice déshydratée, a été effectué au CEA-LETI à Grenoble. La couche de silice de rugosité de surface de 0,1 nm est d'environ 500 nm d'épaisseur.

- Les "wafers" de silicium (réseau cristallin : (1.0.0)) utilisés pour l'étude en FTIR sont dopés (dopage : P), poli double face et oxydé à 1050°C pendant 13 minutes dans un flux d'oxygène pur. L'oxydation est réalisée sur un équipement TEMPRESS 5. les "wafers" sont découpés en plaques de 1 x 10 cm. Ces substrats ont été préparés au CEA-LETI à Grenoble. La couche de silice a une rugosité de surface de 0,1 nm est d'environ 100 nm d'épaisseur.

- La silanisation sur substrat est réalisé dans une boite en téflon de chez LESBRE CCRD.

- Les capillaires UV-transparent TSU100375, sont fournis par la société Polymicro Technologie (Marly-Le-Roi, France). Le capillaire est constitué en silice de 129 µm d'épaisseur et de 100 µm de diamètre, enrobé par une gaine protectrice de 12 µm d'épaisseur.

- La détection de fluorescence des différents fluorophores a été effectués par un appareil Gentac Scanner (Genomic Solution).

- Les oligonucléotides complémentaires marqués aux Cy3, Cy5, Fluorecéine (FITC), et Texas Red utilisés proviennent de chez MWG Biotech.

- L'excitation et l'émission des différentes cibles sont reportées dans le tableau 3.

Fluorophore	$\lambda_{Excitation}$ en nm	$\lambda_{Emission}$ en nm
Fluorescéine (FITC)	494	518
Texas Red	595	615
Cy5	649	670
Cy3	550	570

Tableau 3 : longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des différents fluorophore utilisés.

- La solution d'hybridation (Hybridization solution 2X concentrate Buffered with SSC) utilisé provient de chez Sigma.

- Tampon d'immobilisation d'acétate d'ammonium 1M à pH 4.6 :

On prépare une solution de 250 mL de tampon en diluant tout d'abord 14.30 mL d'acide acétique (60.053 $g.mol^{-1}$; d = 1.0499 ; 15.01 g ; 0.25 mol) dans 100 mL d'eau distillée.

Le pH est ensuite ramené à 4.6 à l'aide d'une solution d'ammoniaque à 22%.

La solution est alors transférée dans une fiole jaugée de 250 mL que l'on complète jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée en prenant garde à ce que le pH reste à 4,6. La solution est ensuite conservée au frigidaire.

II. Mode d'irradiation :

L'irradiation UV est réalisée par un microscope inversé Olympus IX60, équipé par une lampe à mercure de 100 W (15 mW/cm^2). Le microscope est muni d'une fente modulable de 50 μm^2 à 5 mm^2. Ainsi, on peut distinguer deux modes d'irradiation :

- Irradiation sur substrat plan :

L'irradiation est réalisé à 365 nm à travers un masque (film pour impression à haute résolution 5000 dpi de chez XYRIUS, Seyssinet) qui présente des plots de 100 µm de diamètre (Figure 48).

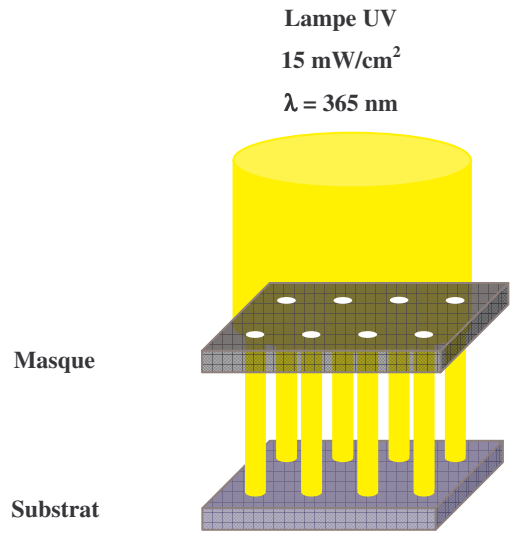


Figure 48 : Mode d'irradiation sur substrat plan.

Irradiation dans le capillaire :

L'irradiation est réalisée à 365 nm à travers la fente du microscope de 150 µm de diamètre (Figure 49).

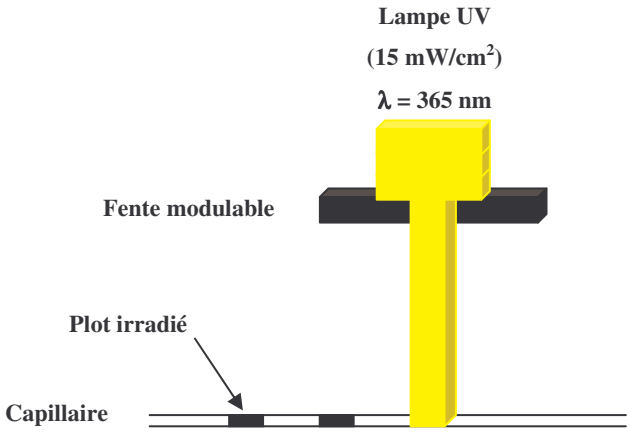


Figure 49 : Mode d'irradiation sur substrat plan.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bergna, H.E. Advances in Chemistry Series. The Colloid Chemistry of Silica. *Washington DC : American Chemical Society*, **1994**.

2. Iler, R.K. The Chemistry of Silica, Solubility, Polymerization, Colloid, and Surface Properties and Biochemistry, *New-York : Wiley-Interscience*, **1979**.

3. Morrow, B. A. Surface Groups on Oxides. *In Studies in Surface Science and Catalysis*; **1990**, 161-224.

4. Martin, F. Surfaces Modifiées par des Organisilanes à Terminaisons Fonctionnelles – Application aux Puces à ADN, *Thèse Montpellier II*, **2004**.

5. Sagiv, J. Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 92-98.

6. Angst, D.L. and Simmons, G.W. Moisture Absorption Characteristic of Organosilane Self-Assembled Monolayers. *Langmuir*, **1991**, *7*, 2236-2242.

7. Finklea, H. O.; Robinson, L. R.; Blackburn, A.; Richter, B.; Allara, D. L.; Bright, T. Formation of an Organized Monolayer by Solution Adsorption of Octadecyltrichlorosilane on Gold: Electrochemical Properties and Structural Characterization**.** *Langmuir*, **1986**, *2*, 239-244.

8. Vrancken, K.C.; Van der Voort, P.; Possemiers, K.; Grobet, P. and Vansant, E.F. The Physisorption and Condensation of Aminosilanes on Silica Gel. *Chemically Modified Surfaces*. **1996**, 46-56.

9. Hair, M.L. and Tripp, C.P. Alkylchlorosilane reactions at the silica surface. *Colloids and surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects*. **1995**, *105*, 95-103.

10. Plueddemann, E. P. Silane Coupling Agents. *Plenum Press: New York*, **1982**.

11. Wasserman, S.R.; Tao, Y. and Whitesides, G.M. Structure and Reactivity of Alkylsiloxane Monolayers Formed by Reaction of Alkyltrichlorosilanes on Silicon Substrates. *Langmuir*, **1989**, *5*, 1074-1087.

12. Duchet, J.; Chabert, B.; Chapel, J.-P.; Gérard, J. F.; Chovelon, J. M.; Jaffrezic-Renault, N. Influence of the Deposition Process on the Structure of Grafted Alkylsilane Layers. *Langmuir*, **1998**, *13*, 2271-2278.

13. Gun, J.; Sagiv, J. On the Formation and Structure of Self-Assembling Monolayers : III. Time of Formation, Solvent Retention, and Release. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *112*, 457-472.

14. McGovern, M.E.; Kallury, K.M.R.; Thompson, M**.** Role of Solvent on the Silanization of Glass with Octadecyltrichlorosilane. *Langmuir*, **1994**, *10*, 3607-3614.

15. Brzoska, J.B.; Ben Azouz, I.; Rondelez, F. Silanization of Solid Substrates: A Step Toward Reproducibility. *Langmuir*, **1994**, *10*, 4367-4373.

16. Rye, R. R. Transition Temperatures for *n*-Alkyltrichlorosilane Monolayers. *Langmuir*, **1997**, *13*, 2588-2590.

17. Iimura, K.; Nakajima, Y.; Kato, T. A study on Structures and Formation Mechanisms of Self-Assembled Monolayers of n-Alkyltrichlorosilanes using Infrared Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Thin Solid Films*, **2000**, *379*, 230-239.

18. Parikh, A. N.; Allara, D. L.; Azouz, I. B.; Rondelez, F. An Intrinsic Relationship Between Molecular Structure in Self-Assembled Alkylsiloxane Monolayers and Deposition Temperature. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7577-7590.

19. Silberzan, P.; Léger, L.; Ausserré, D.; Benattar, J. J. Silanation of Silica Surfaces. A New Method of Constructing Pure or Mixed Monolayers. *Langmuir*. **1991**, *7*, 1647-1651.

20. Banga, R.; Yarwood, J.; Morgan, A. M.; Evans, B.; Kells, J. In-situ FTIR Studies of the Kinetics and Self Assembly of Alkyl and Perfluoroalkyl Trichlorosilanes on Silicon. *Thin Solid Films*. **1996**, *285*, 261-266.

21. Trens, P.; Denoyel, R.; and Rouquerol, J. Adsorption of (.gamma.-Aminopropyl)Triethoxysilane on Silica from Aqueous Solution: A Microcalorimetric Study. *Langmuir*, **1995**, *11*, 551-554.

22. Schena, M.; Shalon, D.; Davis, R.W.; Brown, P.O. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. **1995**, *270*, 467-470.

23. Gosnell, M.C.; Mottola, H.A. Determination of Reactive Aldehyde Groups Immobilized on Silica using (p-Nitrophenyl)hydrazine as a Chromophoric probe. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 631-636.

24. Adessi, C.; Matton, G.; Ayala, G.; Turcatti, G.; Mermond, J. J.; Mayer, P.; and Kawashima, E. Solid Phase DNA Amplification : Characterisation of Primer Attachment and Amplification Mechanisms. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, e87.

25. Taylor, S.; Smith, S.; Windle, B.; and Guiseppi-Elie, A. Impact of Surface Chemistry and Blocking Strategies on DNA Microarrays. *Nucleic Acids Res*. **2003**, *31*, e87.

26. O'Donnell, M. J.; Tang, K.; Koster, H.; Smith, C. L.; and Cantor, C. R. High-Density, Covalent Attachment of DNA to Silicon Wafers for Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. **1997**, *69*, 2438-2443.

27. Benters R., Niemeyer C.M., Drutschmann D., Blohm D and Wöhrle D. DNA Microarrays with PAMAM Dentritic Linker Systems. *Nucleic Acids Res*. **2002**, *30*. *e10*.

28. Strother, T.; Hamers, R. J.; and Smith, L. M. Covalent Attachment of Oligodeoxyribonucleotides to Amine-Modified Si (001) Surfaces. *Nucleic Acids Res*. **2000**, *28*, 3535-3541.

29. Salo, H.; Virta, P.; Hakala, H.; Prakash, T.P.; Dyms, A.M.; Monoharan, M.; Lönnberg, H. Aminooxy Functionalized Oligonucleotides: Preparation, On-Support Derivatization, and Postsynthetic Attachment to Polymer Support. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 815-823.

30. Defrancq, E.; Hoang, A.; Vinet, F.; and Dumy, P. Oxime Bond Formation for the Covalent Attachment of Oligonucleotides on Glass Support. *Bioorg & Med Chem Lett*. **2003**, *13*, 2683-2686.

31. Boncheva, M.; Scheibler, L.; Per Lincoln, H.V.; Åkerman, B. Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces. *Langmuir*. **1999**, *15*, 4317-4320.

32. Martin, F.; Diran, A.; Durand, J-O.; Granier, M. and Desmet, R. Hydroxylamine-Functionalised Silica Surface for Biochips Applications. *Tetrahedron Lett*. **2005**, *46*, 7973-7975.

33. Beaucage, S. L. and Iyer, R. P. Advances in the Synthesis of Oligonucleotides by the Phosphoramidite Approach. *Tetrahedron*. **1992**, *48*, 2223-2311.

34. Caruthers, M. H. ; Barone, A. D. ; Beaucage, S. L. ; Dodds, D. R. ; Fisher, E. F. ; McBride L. J. ; Matteucci, M. ; Stabinsky, Z. ; Tang, J. Y. Chemical Synthesis of Deoxyoligonucleotides by the Phosphoramidite Method. *Methods Enzymol*. **1987**, *154*, 287-313.

35. Owens, D. K.; Wendt, R. C. Estimation of the Surface Free Energy of Polymers. *J. Appl. Polymer Sci*. **1969**, 13, 1741-1749.

36. Barthlott, W.; Neinhuis, C. Purity of the Sacred Lotus, or Escape from Contamination in Biological Surfaces. *Planta.* **1997**, *202*, 1-8.

37. Tripp, C. P.; Hair, M. L. An Infrared Study of the Reaction of Octadecyltrichlorosilane with Silica**.** *Langmuir.* **1992**, *8*, 1120-1126.

38. Tripp, C. P.; Hair, M. L. Reaction of Alkylchlorosilanes with Silica at the Solid/Gas and Solid/Liquid Interface. *Langmuir*. **1992**, *8*, 1961-1967.

39. Kandilioti, G.; Siokou, A.; Papaefthimiou, V.; Kennou, S.; Gregoriou, V. G. Molecular Composition and Orientation of Interstitial versus Surface Silicon Oxides for Si(111)/SiO_2 and Si(100)/SiO_2 Interfaces using FT-IR and X-ray Photoelectron Spectroscopies. *Applied Spectroscopy*. **2003**, *57*, 628-635.

40. Buffeteau, T.; Desbat, B.; Turlet, J. M. Polarization Modulation FT-IR Spectroscopy of Surfaces and Ultra-thin Films: Experimental Procedure and Quantitative Analysis. *Applied Spectroscopy*. **1991**, *45*, 380-389.

41. Binning, G.; Quate, C. F.; and Gerber, C. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930-933.

42. Kaijyama, T.; Tanaka, K.; Ge, S.R.; Takahara, A. Morphology and Mechanical Properties of Polymer Surfaces via Scanning Force Microscopy. *Progress in Surface Science*. **1996**, *52*, 1.

43. Meyer, G.; Amer, N. M. Erratum: Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys.Lett.* **1988**, *53* (24), 2400-2402.

44. Gun, J.; Iscovici, R.; Sagiv, J. On the Formation and Structure of Self-Assembling Monolayers : II. A Comparative Study of Langmuir-Blodgett and Adsorbed Films using Ellipsometry and IR Reflection-Absorption Spectroscopy. *J.Colloid Interface Sci.***1984**, *101*, 201-213.

45. Franquet, A.; De Laet, J.; Terryn, H.; Subramanian, V.; vanreecken, W.J. Determination of the Thickness of Thin Silane Films on Aluminium Surfaces by Means of Spectroscopic Ellipsometry. *Thin Solide Films*. **2001**, *384*, 37-45.

Chapitre III : UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR D'AUTRES APPLICATIONS

La stratégie d'immobilisation dans les capillaires a été étendue à l'immobilisation d'autres molécules tels que les sucres, peptides ou molécules hydrophobes et hydrophiles. Ce chapitre présente les résultats préliminaires en utilisant le protocole développé dans le chapitre II. Néanmoins, l'utilisation de molécules autre que les oligonucléotides, demande une adaptation de protocole selon la molécule immobilisée.

I. UTILISATION DE LA SURFACE OXYAMINE PHOTOSENSIBLE POUR L'ADRESSAGE DE SUCRES

I. 1. Stratégies du greffage des sucres

Le greffage covalent se fait par la formation d'une liaison d'éther oxime entre un carbonyle présent sur le sucre et l'oxyamine libérée après photodéprotection (Figure 1). Le carbonyle sera introduit sur le sucre sous forme d'une méthyle-cétone (en utilisant une matrice "RAFT"), ou par l'ouverture de son extrémité réductrice pour donner un aldéhyde.

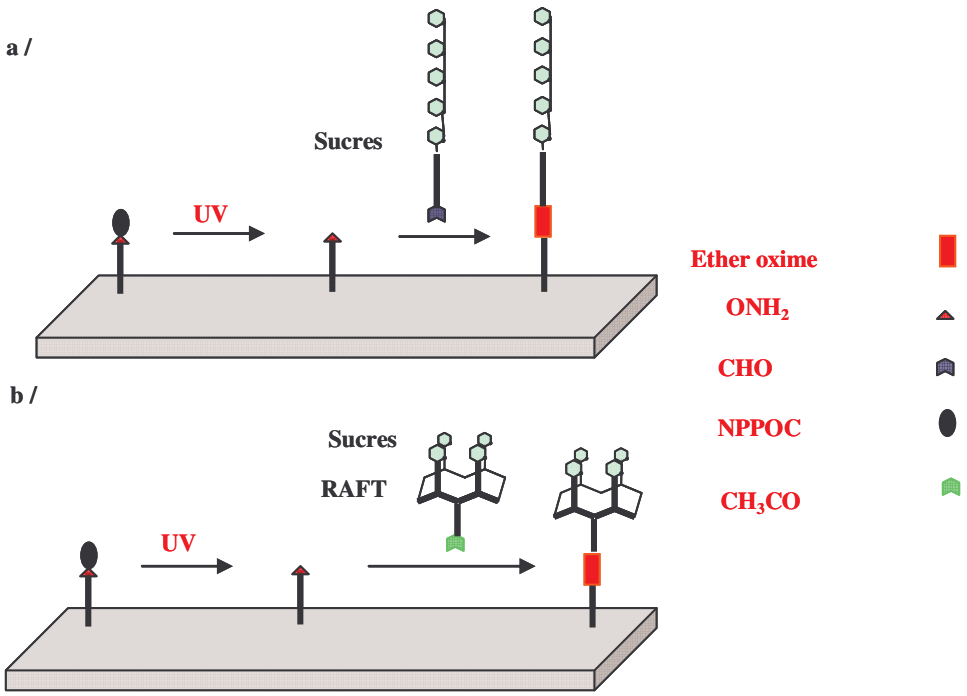


Figure 1 : greffage covalent de sucres. a / greffage via un aldéhyde ; b / greffage via une méthyle-cétone.

I. 2. Choix des sucres

Contrairement aux oligonucléotides et aux peptides, les oligosaccharides sont plus difficiles à obtenir par des synthèses chimiques. Cette difficulté est liée à leur structure

complexe : d'une part, les chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées, et d'autre part, les blocs monosaccharides ont des configurations anomériques α ou β et les monosaccharides adjacents peuvent se lier en différentes positions. Pour ces raisons, de multiples étapes de protections et déprotections sélectives sont nécessaires sur les groupes hydroxyles des monosaccharides pendant la synthèse chimique. Néanmoins, malgré les difficultés rencontrées, la synthèse d'un nombre considérable d'oligosaccharides complexes a été réalisée[1-3] et les produits obtenus ont été extrêmement utiles dans les études sur la spécificité de reconnaissance avec des anticorps et d'autres protéines interagissant avec les sucres.

I. 2. 1. Mannose

Les processus de reconnaissance cellulaire dépendent des interactions protéine (lectine)-sucre. L'interaction, lectine avec son ligand est impliquée dans la signalisation cellulaire, l'identification de pathogène et la réponse inflamatoire[4, 5]. Ces processus de reconnaissance mettent en jeu des interactions de type multivalente, caractérisées par la liaison simultanée de plusieurs ligands à une entité biologique. En particulier, les interactions multivalentes peuvent être plus fortes collectivement que ne le seraient des interactions monovalentes correspondantes[6, 7]. Ce phénomène est largement décrit dans la littérature et est nommé "effet cluster". Au sein du laboratoire, les "RAFTs" (pour Regioselectively Addressable Functionalized Template) ont notamment été développés pour construire diverses architectures multivalentes. Il a été démontré que ces constructions augmentait la reconnaissance du ligand pour la protéine cible par rapport au ligand monovalent[8, 9]. La molécule **1** étant disponible au laboratoire, nous avons souhaité étudier son immobilisation localisée dans un tube capillaire et vérifier si ces propriétés de reconnaissance étaient intactes (Figure 1).

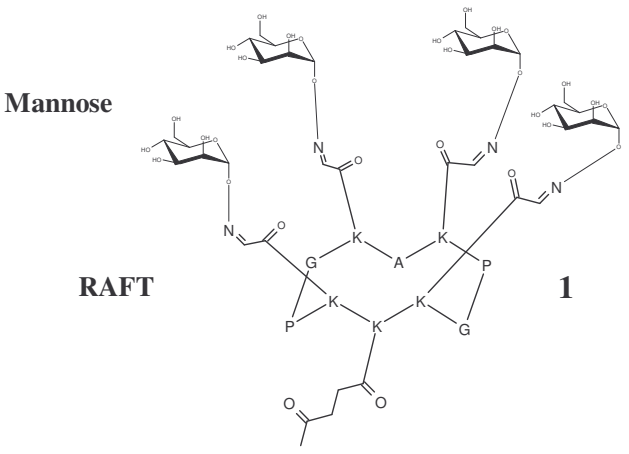


Figure 2 : RAFT (4 mannoses) méthyle cétone **1**.

I. 2. 2. Glycosaminoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des hétéropolysaccharides complexes formés par la répétition d'unités disaccharidiques sulfatées, présents en grande quantité à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire. Ces molécules ont la capacité de se lier par liaison covalente à un très grand nombre de protéines différentes, formant des structures appelées protéoglycanes. Ces protéoglycanes sont impliqués dans divers processus biologiques (par exemple, la croissance et la migration cellulaire, les réponses immunes et inflammatoires)[10]. Cette grande diversité fonctionnelle est étroitement liée à une grande diversité structurale qui permet de générer un très grand nombre de sites d'interactions pour des protéines différentes. Nous nous intéressons plus particulièrement à des GAGs de type héparine (HP) (Figure 3). Notre protéine modèle est la chimiokine SDF-1 (pour Stromal cell-Derived Factor-1). La liaison de SDF-1 avec l'HP a été caractérisée : les études ont montré une affinité relativement importante (Kd # 30 nM) et que la liaison est dépendante de la taille[11]. La molécule **2** a été fournie par le groupe de Lortat-Jacob de l'Institut de Biologie Structurale (IBS). Cette molécule sera immobilisée via son extrémité réductrice de façon localisée dans un tube capillaire pour vérifier la possibilité d'immobiliser des sucres non modifiés.

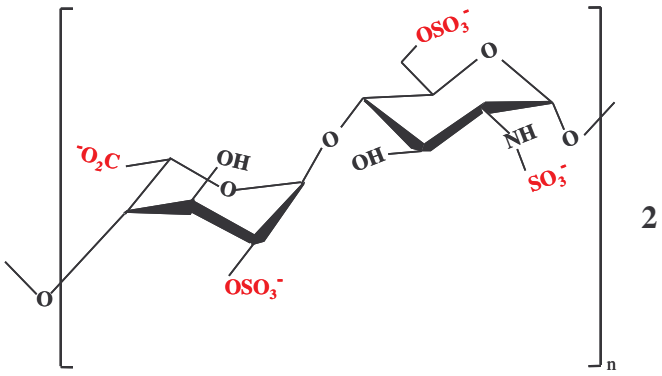


Figure 3 : Glycoaminoglycanes de type héparine (n = 8).

I. 3. Résultats

- *Via une méthyle cétone*

Après photodéprotection, l'oxyamine libérée est mise en réaction avec une solution à 400µM de la molécule **1** dans une solution aqueuse d'acide acétique à 10% pendant 1 heure à T° ambiante (Figure 4). Après les étapes de lavage, une saturation des sites non spécifiques est réalisée à l'aide d'une solution de BSA (pour Bovin Serum Albumin).

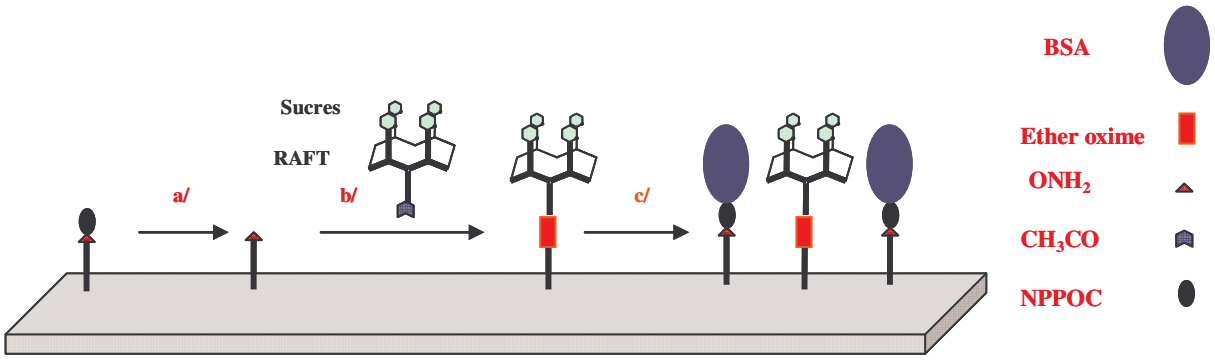


Figure 4 : Greffage covalent de la molécule **1** sur le support via la fonction méthyl-cétone. **a/** Photodéprotection dans 5% pyridine/eau à 365 nm pendant 2 secondes ; **b/** Immobilisation de la molécule **1** à 0.4M dans l'acide acétique à 10%, 1h ; **c/** Saturation des sites non spécifiques avec la BSA.

Reconnaissance du Mannose

L'efficacité du greffage du mannose est mise en évidence par l'interaction avec la Concanavaline A marquée par une fluorescéine (FITC) (Figure 5a) ou par une biotine (Figure 5b).

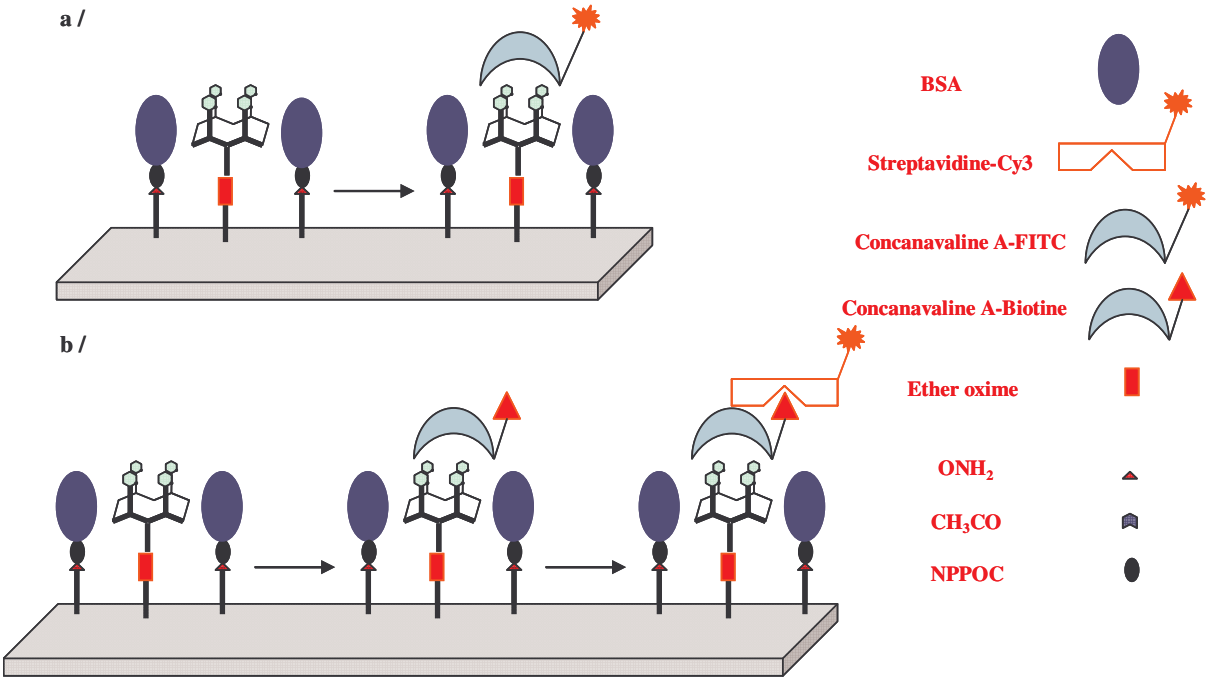


Figure 5 : Reconnaissance Sucre - Protéine. **a/** reconnaissance du mannose par une concanavaline A marquée à la fluorescéine (FITC) ; **b/** reconnaissance du mannose par une Concanavaline A-biotinylée reconnue par une streptavidine marquée à la Cy3.