



HAL
open science

Biofonctionnalisation, caractérisation et mise en oeuvre de particules magnétiques sur biocapteurs : application au géotypage plaquettaire

Marie Trévisan

► **To cite this version:**

Marie Trévisan. Biofonctionnalisation, caractérisation et mise en oeuvre de particules magnétiques sur biocapteurs : application au géotypage plaquettaire. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2011. Français. NNT : 2011ECDL0008 . tel-00713534

HAL Id: tel-00713534

<https://theses.hal.science/tel-00713534>

Submitted on 28 Nov 2012

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

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

ECOLE CENTRALE DE LYON

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE CENTRALE DE LYON

Ecole Doctorale : Electronique, Electrotechnique et Automatismes

Spécialité : STIC Santé et Micro et nano technologies

Par **Marie TREVISAN**

**Biofonctionnalisation, caractérisation et mise en œuvre de particules
magnétiques sur biocapteurs : Application au génotypage plaquettaire.**

Thèse préparée à l'INL-Ecole Centrale de Lyon

Sous la direction d'Eliane Souteyrand

Co dirigée par Jean-Pierre Cloarec

Soutenue le 30/03/2011 devant le jury composé de

| | | |
|------------------------|--|-----------------------|
| M. Dominique Rigal | Directeur adjoint et Directeur scientifique à l'Etablissement Français du Sang de Lyon – Lyon | Président |
| Mme. Anny Cupo | Professeur – Polytech'Nice - Sophia-Nice | Rapporteur |
| M. Pierre-Yves Renard | Professeur 1 ^{ère} classe - Université de Rouen-Rouen | Rapporteur |
| Mme. Eliane Souteyrand | Directeur de recherche CNRS - Ecole Centrale de Lyon | Directeur de thèse |
| M. Jean-Pierre Cloarec | Maître de Conférence-Ecole Centrale de Lyon | Co-directeur de thèse |
| M. Jérôme Bibette | Professeur – ESPCI - Paris | Examineur |

A la mémoire de papi Jacky et de Madelon

A ma famille, mes parents et ma sœur pour leur soutien tout au long des études.

A mes amis.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier M. Guy Hollinger de m'avoir accueillie au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon – UMR 5270 CNRS - site de l'Ecole Centrale de Lyon.

Je remercie très chaleureusement ma directrice de thèse Mme Eliane Souteyrand et mon co-directeur Jean-Pierre Cloarec pour leur soutien, leurs conseils et leur patience tout au long des années passées sous leur direction. Je sais que sans eux je n'aurai jamais pu réussir.

Sans les personnes suivantes, ce travail n'aurait jamais pu voir le jour, je remercie donc :

- M. Yves Mérieux pour m'avoir accueillie au laboratoire d'histocompatibilité de l'Etablissement Français du Sang (EFS) Rhône-Alpes. Merci de m'en avoir tant appris sur les plaquettes et leur transfusion et pour avoir lu, relu et corrigé une partie de ce manuscrit.
- M. Manfred Schawaller et Gerald Quapil pour avoir développé et prêté l'Evareader.
- M. Aurélien Duval et toute l'équipe MacSyBio du Laboratoire Charles Fabry de l'institut d'Optique. Merci de m'avoir reçu chez vous pour mes manip sur le banc de SPR. Merci aussi d'avoir accédé à toutes mes demandes concernant votre salle de chimie.
- Naoufel Haddour pour avoir développé les premiers protocoles concernant les filaments magnétiques.
- Isabelle Vial pour avoir trouvé les conditions d'utilisation de l'Evareader.

Mes remerciements vont aussi à Mme. Anny Cupo et M. Pierre-Yves Renard qui ont accepté de juger mon travail. Leur présence en tant que rapporteur est un honneur pour moi.

Je remercie M. Dominique Rigal d'avoir accepté de présider mon jury ainsi que M. Jérôme Bibette pour sa participation au jury.

Pour continuer, je tiens à remercier le personnel de l'institut des Nanotechnologies de Lyon.

Un grand merci au département d'enseignement Sciences et Techniques des Matériaux et des Surfaces et son directeur Yves Robach.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe d'enseignement Chimie de m'avoir permis de faire mes premières armes en tant qu'enseignante. Merci donc à Jean-Pierre Cloarec, Naoufel Haddour, Emmanuelle Laurenceau, Virginie Monnier, Magali Phaner-Goutorbe et Guy Stremdoerfer. Merci pour l'ambiance qui règne dans l'équipe d'enseignement. Merci aussi à Bertrand Vilquin de l'équipe Physique pour sa bonne humeur.

Puisque je remercie le département d'enseignement, je me dois de remercier les élèves-ingénieurs de l'Ecole Centrale de Lyon qui ont essuyé les pots cassés quand j'ai commencé à enseigner.

Je remercie ceux de l'équipe que je n'ai pas encore cité Yann Chevolut, Isabel Nabeth, Maryline Diserio, Thomas Gehin et Dimitri Charrier pour m'avoir intégrée dans l'équipe, pour les pauses café du matin aux conversations mémorables et leur soutien tout au long de ma thèse.

Aux compagnons de galère, qui comme moi sont doctorants dans l'équipe, un grand merci. Merci à Rémy Béland, Alice Goudot, Delphine Sicard, Ning Sui et Zhugen Yang. Un merci particulier à Jing Zhang et Maksym Iazykov qui ont partagé le même bureau pendant plus de deux ans. Nos conversations furent enrichissantes et l'occasion de grands éclats de rire.

Un petit salut aux stagiaires et à tous ceux rencontrés au laboratoire : Arnaud, Colin, Isabelle, Leslie, les deux Matthieu, Mélanie, Richard.

Maintenant j'adresse mes remerciements aux autres.

Je tiens à remercier M. Majid Chaadi. Vous m'avez transmis votre amour des sciences et pour cela je ne vous en remercierai jamais assez.

Merci aux personnes de la chorale Zarastro d'Ecully qui m'ont encouragé et m'ont permis pendant deux heures par semaine d'oublier mes soucis.

Merci à toute ma famille de sang et de cœur, mes parents, ma sœur et mes amis. Qu'aurais-je fait sans eux ?

Papa, Maman : merci de m'avoir supportée, de m'avoir consolée dans mes coups de blues et mes périodes les plus sombres. Je ne vous le dit jamais assez : je vous aime.

La sœurette et Jo : Merci à vous. Bonne chance...

Tatie : Merci de t'être si bien occupé de moi quand j'étais dans la région lyonnaise et pour tes encouragements.

Daniel : Merci

Les copains et copines, Adélaïde, ma petite Guan, Sophie, Meydi, Djuz et les autres de la région parisienne : Merci pour les fous-rires, les moments de joies, les délires et votre support.

Merci à la famille Fillion. Vous étiez, êtes et serez toujours dans mes pensées. Dédicace spéciale à M. Fillion : Je cherche toujours !

La dernière mais non des moindres : Ma meilleure amie Marina. Merci de m'avoir toujours supportée surtout dans mes pires moments. Merci pour d'être toujours là quand j'ai besoin de booster mon moral. Merci d'être toi et de faire ressortir une facette de moi que peu connaisse.

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 5 |
| SOMMAIRE | 7 |
| GLOSSAIRE | 13 |
| INTRODUCTION GENERALE | 19 |
| 1 LES PROPRIETES MAGNETIQUES..... | 19 |
| 2 STRUCTURE DES PARTICULES MAGNETIQUES..... | 22 |
| 3 LEUR APPLICATIONS..... | 23 |
| 4 OBJECTIFS DE LA THESE : | 24 |
| 5 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 24 |
| PARTIE A VERS UN GENOTYPAGE PLAQUETTAIRE | 27 |
| CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART | 29 |
| 1 IMMUNOLOGIE..... | 29 |
| 1.1 <i>Notions d'immunologie</i> | 29 |
| 1.2 <i>Immunohématologie</i> | 30 |
| 1.2.1 La composition du sang..... | 30 |
| 1.2.2 Les systèmes antigéniques des cellules sanguines..... | 33 |
| 1.3 <i>Système HPA (Human Platelet Antigen)</i> | 35 |
| 1.3.1 Définition..... | 35 |
| 1.3.2 Les maladies liées aux plaquettes..... | 36 |
| 1.4 <i>Le système HPA-1</i> | 38 |
| 1.4.1 La glycoprotéine GP IIIa..... | 38 |
| 1.4.2 Polymorphisme du gène codant le système antigénique HPA-1..... | 39 |
| 2 METHODES DE TYPAGE PLAQUETTAIRE..... | 40 |
| 2.1 <i>Phénotypage plaquettaire</i> | 40 |
| 2.2 <i>Techniques de génotypage par PCR</i> | 43 |
| 2.2.1 La synthèse des protéines..... | 43 |
| 2.2.2 Le principe de la PCR..... | 46 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.2.3 | Génotypage par PCR révélée par électrophorèse | 47 |
| 2.2.4 | PCR détectée par spectrophotométrie | 48 |
| 2.2.5 | PCR détectée en temps réel..... | 49 |
| 2.2.6 | PCR détection à l'aide de puces à billes..... | 50 |
| 2.2.6.1 | IDHPA..... | 50 |
| 2.2.6.2 | BeadChips™ | 51 |
| 2.2.6.3 | Inconvénients des techniques de génotypage par PCR | 52 |
| 3 | LES BIOCOCODES BARRES | 53 |
| 3.1 | <i>Principe</i> | 53 |
| 3.2 | <i>Les différentes techniques d'analyse des biocodes barres :</i> | 55 |
| 4 | CONCLUSION ET OBJECTIFS | 64 |
| 5 | RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 65 |

CHAPITRE 2 : BIOCOCODES BARRES MODIFIES ET COUPLES A L'ANALYSE PAR

| | |
|---|-----------|
| EVAREADER..... | 69 |
| 1 LES ELEMENTS DU BIOCOCODE BARRE..... | 71 |
| 1.1 <i>Principe</i> | 71 |
| 1.2 <i>Modèle biologique</i> | 72 |
| 1.3 <i>Fonctionnalisation et caractérisation des billes magnétiques</i> | 75 |
| 1.3.1 Biofonctionnalisation des billes magnétiques (MB)..... | 75 |
| 1.3.2 Caractérisation par spectrofluorimétrie | 76 |
| 1.3.3 Caractérisation par HPLC/UV-Visible | 78 |
| 1.4 <i>Fonctionnalisation et caractérisation des billes de latex</i> | 82 |
| 1.4.1 Biofonctionnalisation des billes de latex (LB)..... | 82 |
| 1.4.2 Spectroscopie UV-Visible | 83 |
| 2 DETECTION PAR EVAREADER | 86 |
| 2.1 <i>Principe de fonctionnement de l'Evareader</i> | 87 |
| 2.2 <i>Barrettes ou Evachips</i> | 90 |
| 2.3 <i>Les approches analytiques développées</i> | 91 |
| 2.3.1 Stratégie analytique par hybridation ODN/BCB-Cy5 sur Evachip..... | 91 |
| 2.3.1.1 Principe..... | 91 |
| 2.3.1.2 Limite inférieure de détection..... | 93 |

| | | |
|---|--|------------|
| 2.3.2 | Stratégie analytique par interaction BCB-biotine / neutravidine sur Evachip | 93 |
| 2.3.2.1 | Principe..... | 93 |
| 2.3.2.2 | Limite inférieure de détection :..... | 95 |
| 2.3.3 | Comparaison des deux approches analytiques | 95 |
| 3 | MISE EN ŒUVRE DES BIOCODES BARRES ET DETECTION..... | 100 |
| 3.1 | <i>Blocage des tubes de centrifugation.....</i> | <i>101</i> |
| 3.2 | <i>Spécificité de la reconnaissance.....</i> | <i>103</i> |
| 3.3 | <i>Influence de la densité relative des sondes sur les billes de latex</i> | <i>105</i> |
| 3.4 | <i>Influence de la concentration relative des deux types de billes.....</i> | <i>108</i> |
| 3.5 | <i>Performances analytiques de l'analyse par biocodes barres couplée à l'Evareader.</i> | <i>110</i> |
| 4 | COMPARAISON AVEC LA LITTERATURE ET LES METHODES DE TYPAGE PLAQUETTAIRE | 113 |
| 5 | CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES | 116 |
| 6 | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 117 |
| PARTIE B FILAMENTS MAGNETIQUES ET P-SPRI | | 119 |
| FILAMENTS MAGNETIQUES ET P-SPRI | | 121 |
| CHAPITRE 3 : ETAT DE L'ART..... | | 123 |
| 1 | FILAMENTS MAGNETIQUES DANS LA LITTERATURE..... | 123 |
| 2 | RESONANCE DE PLASMON DE SURFACE (SPR)..... | 124 |
| 2.1 | <i>SPR monocapteur.....</i> | <i>124</i> |
| 2.1.1 | Principe de la SPR..... | 124 |
| 2.1.2 | Utilisation de la SPR | 127 |
| 2.1.3 | Imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) | 130 |
| 2.2 | <i>Imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface (P-SPRI).....</i> | <i>132</i> |
| 3 | CONCLUSIONS ET OBJECTIFS..... | 134 |
| 4 | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 134 |
| CHAPITRE 4 : FILAMENTS MAGNETIQUES IMMOBILISES SUR SUPPORT | | 137 |
| 1 | FORMATION DE FILAMENTS MAGNETIQUES SUR SUPPORT DE VERRE | 137 |
| 1.1 | <i>Méthodologie générale</i> | <i>137</i> |
| 1.2 | <i>Méthodes de localisation de filaments magnétiques</i> | <i>139</i> |
| 1.3 | <i>Caractérisations des filaments magnétiques sur verre.....</i> | <i>142</i> |

| | | |
|-------|---|------------|
| 1.3.1 | Stabilité des filaments magnétiques | 142 |
| 1.3.2 | Orientation des filaments magnétiques..... | 142 |
| 1.3.3 | Caractéristiques géométriques des filaments formés | 143 |
| 1.4 | <i>Conclusions</i> | 145 |
| 2 | FILAMENTS MAGNETIQUES SUR UNE SURFACE D'OR | 145 |
| 2.1 | <i>Matériel et réactifs employés</i> | 145 |
| 2.2 | <i>Fonctionnalisation de surface d'or homogène</i> | 146 |
| 2.3 | <i>Formation des filaments sur surface d'or</i> | 147 |
| 2.3.1 | Préparation des billes magnétiques SIGMA | 147 |
| 2.3.2 | Préparation des billes Ademtech | 148 |
| 2.3.3 | Formation des filaments à partir des billes magnétiques activées | 148 |
| 3 | FORMATION DE FILAMENTS SUR DES SUPPORTS MIXTES OR/VERRE | 149 |
| 3.1 | <i>Supports</i> | 150 |
| 3.2 | <i>Double fonctionnalisation de surface des supports verre/or</i> | 151 |
| 3.3 | <i>Formation des filaments</i> | 152 |
| 3.4 | <i>Caractérisations par microscopie optique et microscopie électronique</i> | 153 |
| 3.4.1 | Caractérisation des filaments sur or homogène..... | 153 |
| 3.4.2 | Caractérisation des filaments sur support verre+or | 154 |
| 3.4.3 | Géométrie et comportement des filaments | 157 |
| 4 | REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 161 |
| | CHAPITRE 5 : EXEMPLES D'UTILISATION DE FILAMENTS MAGNETIQUES | 163 |
| 1 | MESURES D'IMAGERIE POLARIMETRIQUE PAR RESONANCE DE PLASMON DE SURFACE SUR FILAMENTS..... | 163 |
| 1.1 | <i>Le dispositif expérimental</i> | 163 |
| 1.1.1 | Le positionnement de l'aimant | 164 |
| 1.1.2 | Le système de cuve | 166 |
| 1.1.3 | La grille de points pour les mesures | 166 |
| 1.1.4 | La séquence de positionnement utilisée | 167 |
| 1.2 | <i>Résultats</i> | 167 |
| 2 | HYBRIDATION SUR FILAMENTS ET DETECTION PAR FLUORESCENCE | 169 |
| 3 | CONCLUSIONS..... | 172 |

| | |
|--|------------|
| 4 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 173 |
| CONCLUSION GENERALE | 175 |
| ANNEXES | 179 |
| ANNEXE I..... | 181 |
| ANNEXE II..... | 183 |
| ANNEXE III..... | 193 |
| ANNEXE IV | 203 |
| CURRICULUM VITAE..... | 211 |
| RESUME | 215 |
| ABSTRACT | 217 |
| DIRECTION DE LA RECHERCHE..... | 219 |
| AUTORISATION DE SOUTENANCE..... | 223 |

Glossaire

Å : Angström : 10^{-10} m

Ac : Anticorps

ADN db : Acide Désoxyribonucléique double brin

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

Ag : Antigène

Ag⁺ : ion argent (I)

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ARNt : Acide Ribonucléique de transfert

ASV : mesure du courant anodique

ATR : Attenuated Total Reflection/ Réflexion totale atténuée

\vec{B} : Champ magnétique

BCB : Biocode barre.

BEt : Bromure d'éthidium

BSA : Bovin Serum Albumin / Albumine de sérum bovin

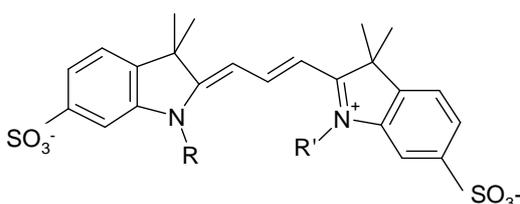
cBCB : complémentaire du biocode barre

CCD : Charge-coupled device

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité.

CV : Voltamétrie cyclique

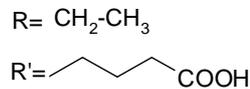
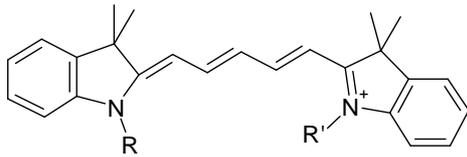
Cy3 : Cyanine 3. Marqueur fluorescent soluble dans l'eau. Sa longueur d'excitation est à ~550 nm et son émission maximum est à ~570 nm. Le Cy3 est utilisé pour marquer l'ADN dans le cadre de puces à ADN.



R= CH₂-CH₃

R'= CH₂-CH₂-CH₂-COOH

Cy5 : Cyanine 5. Marqueur fluorescent soluble dans l'eau excité au maximum à 649 nm et émet au maximum à 670 nm. Le Cy5 est utilisé pour marquer l'ADN dans le cadre de puces à ADN.



DCI : N,N'-diisopropylcarbodiimide

ΔR : Différence de réflectivité

EDCI : 1-[3-(Diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide méthodide

EFS : Etablissement Français du Sang

FITC : Fluorescéine

FRET : Fluorescent resonance energy transfert

G/L : giga par litre

GP : Glycoprotéine. Protéine portant un groupement oligosaccharide

HDL : High Density Lipoprotein

HLA : Human Leucocyte Antigen

HPA : Human Platelet Antigen

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IEF : l'Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay

Ig G : Immunoglobuline G.

IL-2 : Interleukine 2

Incidence et prévalence : L'incidence est le nombre de nouveaux cas d'une pathologie observés pendant une période et pour une population déterminée, elle est souvent donnée dans les revues scientifiques en nombre de cas sur 100 000 par an.

Elle se distingue de la prévalence qui est une mesure d'état qui compte tous les cas à un moment donné. Les incidences et prévalences proviennent du site <http://www.orpha.net/>, de leur cahier et du livre *ABC of clinical Haematology* [1]. En annexe I, les prévalences

indiquées correspondent aux moyennes des estimations la plus haute et la plus basse.

Lorsque l'incidence est la seule donnée disponible, la prévalence est calculée :

- pour les maladies qui n'apparaissent qu'à la naissance :

prévalence = incidence à la naissance x (espérance de vie des malades/espérance de vie de la population générale) ;

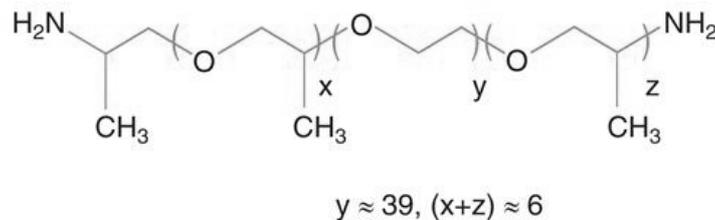
- pour les autres maladies :

prévalence = incidence x durée moyenne de la maladie.

IRM : Imagerie par résonance magnétique nucléaire

ISBT : International Society of Blood Transfusion

Jeffamine[®] 600 : O,O'-Bis(2-aminopropyl)propylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropyleneglycol ; M ≈ 600 g/mol.



LB : Latex Beads / Billes de latex

LCFIO : Laboratoire Charles Fabry Institut d'Optique-Graduate school

LDL : Low Density Lipoprotein

LID : Limite inférieure de détection

M : mol/l

- μM : micromol/l : 10^{-6} mol/l
- nM : nanomol/l : 10^{-9} mol/l
- pM : picomol/l : 10^{-12} mol/l
- fM : femtomol/l : 10^{-15} mol/l
- aM : attomol/l : 10^{-18} mol/l
- zM : zeptomol/l : 10^{-21} mol/l

mAb : Anticorps monoclonal

MAIPA : Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens

MALDI: Matrix-Assisted Laser desorption Ionization. Méthode d'ionisation utilisée en spectrométrie de masse souvent couplée à un détecteur temps de vol (TOF)

MB : Magnetic Beads / Billes magnétiques

MEB : Microscope électronique à balayage

MoMab : Anticorps monoclonal anti-souris

MYH9 : Myosin heavy chain 9. Protéine codée par le gène MYH9. Certaines mutations du gène MYH9 provoquent des macrothrombocytopénies héréditaires appelées aussi « Syndrome MYH9 ».

NAIT/TNA : Neonatal alloimmune thrombocytopenia/ Thrombocytopénie néonatale alloimmune

NHS : N-Hydroxysuccinimide

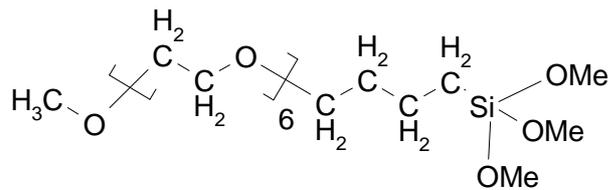
ODN : Oligonucléotide. C'est une courte séquence de nucléotides (ARN ou ADN), simple-brin et longs de quelques dizaines de bases. Il est en général obtenu par synthèse chimique.

OPD : o-Phényl diamine

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PEG-silane : Polyéthylène glycol $\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{6-9}\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-Si(OCH}_3\text{)}_3$



PPT/PTP : Purpura post transfusionnel/Post Transfusion purpura

PR : Platelet transfusion refractoriness / Etat réfractaire aux transfusions plaquettaires

P-SPRI : Imagerie polarimétrique de résonance de surface

Rh : Rhésus

RIU : Refractive Index Unit. L'indice de réfraction est une grandeur sans unité mais cette «unité » permet une meilleure compréhension de l'homogénéité d'une formule.

RU : Response Unit

rpm : rotations par minute

SAM : Self-assembled Monolayer / Monocouche auto-assemblée

SDS : Sodium dodécylsulfate

SNP : Single Nucleotide Polymorphism / Polymorphisme mononucléotidique. Il s'agit de la substitution d'une base azotée par une autre sur un brin d'ADN

SPR : Surface Plasmon Resonance/ Résonance plasmonique de surface

SPRI : Surface Plasmon Resonance Imagerie/ Imagerie par résonance plasmonique de surface

SSC : Saline Sodium Citrate

T : Tesla

T/l : Téra par litre

TE : Transverse électrique

THF : Tétrahydrofurane

Thrombocytopénie : taux bas de plaquettes sanguines (<150 G/L). Un taux bas augmente les risques d'hémorragie. La thrombocytopénie ne requiert pas de transfusions, à moins que le patient ne saigne ou que le taux soit descendu en dessous de 5 G/L. En cas de purpura thrombotique thrombocytopénique les transfusions sont contre indiquées car cela aggraverait la coagulopathie

Thrombocytose : taux élevé de plaquettes sanguines (> 500G/L) peut entraîner une thrombose

TM : Transverse magnétique

TOF : Time Of Flight (Temps de vol). Détecteur de spectrométrie de masse.

UV : ultraviolet

UV-Vis : ultraviolet-Visible

vWF : Facteur de Von Willebrand

Référence bibliographique :

1. Provan, D., *ABC of clinical Haematology*. second edition ed. Vol. 1. 2003: BMJ Books. 75.

Introduction générale

Ces dernières années, un intérêt croissant est porté aux particules magnétiques (Figure 1) et à leur capacité à manipuler et être manipulées par les champs magnétiques.

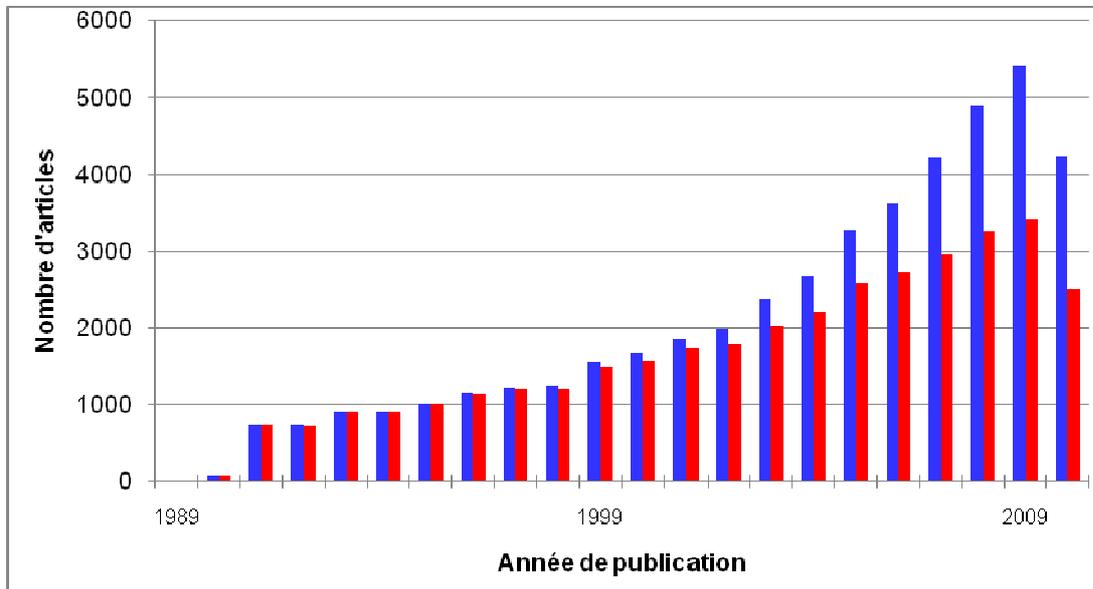


Figure 1 : Nombre d'articles par année de 1989 à 2010 (au 25/10/2010) ayant pour mots clés : en bleu "magnetic particles" ou "magnetic nanoparticles" ou "magnetic beads", en rouge "biodetection" et "magnetic particles" ou "magnetic nanoparticles". Interrogation de la base de données ISI Web of Knowledge en incluant les Proceedings.

Grâce à cet intérêt croissant, diverses méthodes de synthèse ont été développées permettant d'obtenir une variété en termes de taille, de matériaux et de fonctionnalités de surface de plus en plus importante [1]. Le choix du type de particules magnétiques dépend de l'application que l'on veut en faire, des propriétés que l'on veut exploiter ainsi que des avantages et désavantages de ces différents types.

1 Les propriétés magnétiques.

Les particules magnétiques les plus communes sont fabriquées à partir de nanocristaux enfermés dans une matrice inerte et biocompatible comme les polymères ou la silice [2]. Ces nanocristaux peuvent être composés d'oxyde de fer (Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) de métaux de transitions et de leurs composites (Ni, Fe, Co, Mg, Zn...) ou de composite de

terres rares (NdFeB ou SmCo). Ces matériaux sont choisis pour les propriétés magnétiques du matériau massif.

Le magnétisme des matériaux trouve son origine au niveau atomique où le moment cinétique de spin \vec{S} et le moment cinétique orbital \vec{L} contribue au moment magnétique d'un

magnétique :
$$\mu = -g_J \gamma |\vec{J}| = -\sqrt{J(J+1)} \mu_B \quad [3]$$

Avec g_L le facteur de Landé, le magnéton de Bohr $\mu_B = 9,274 \cdot 10^{-24}$ J/T et $\vec{J} = \vec{S} + \vec{L}$ et γ le rapport gyromagnétique de l'atome.

La force du moment magnétique d'un atome est déterminée par la structure de l'atome, en particulier de son nombre d'électrons et de leurs états quantiques.

Selon l'interaction de la matière avec un champ magnétique extérieur, on distingue différents types de magnétisme, les principaux étant le diamagnétisme, le paramagnétisme, le ferromagnétisme, l'antiferromagnétisme et le ferrimagnétisme qui sont représentés dans le tableau 1.

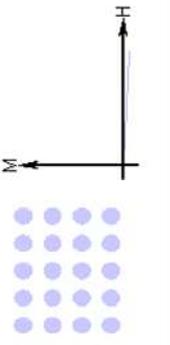
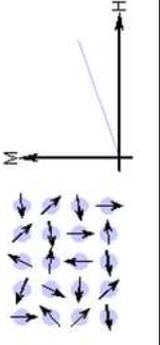
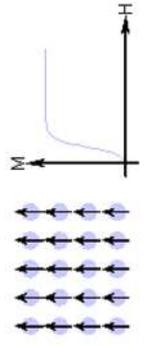
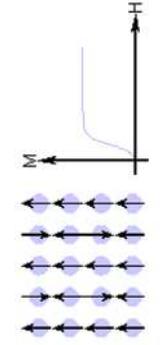
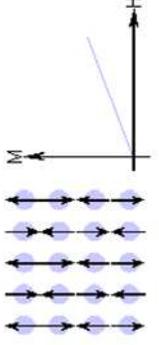
| Type de magnétisme | Susceptibilité | Comportement atomique/magnétique | Exemple | Susceptibilité |
|---------------------|---|--|--|----------------|
| Diamagnétisme | - Faible |  <p>Les atomes n'ont pas de moment magnétique</p> | Au | -2,74E-06 |
| | - Négative | | Cu | -7,70E-07 |
| Paramagnétisme | - Faible |  <p>Moments magnétiques orientés au hasard</p> | Pt | 2,10E-05 |
| | - Positive | | Mn | 66.10-6 |
| Ferromagnétisme | - Forte |  <p>Moments magnétiques parallèles alignés</p> | Fe | 10000 |
| | - Fonction du champ magnétique appliqué | |  <p>Mélange de moments magnétiques parallèles et anti-parallèles alignés</p> | Ferrite |
| Ferrimagnétisme | - Dépendant de la microstructure | | | |
| Antiferromagnétisme | - Faible |  <p>Moments magnétiques anti-parallèles alignés</p> | Cr | 3,6.10-6 |
| | - Positive | | | |

Tableau 1 : Comparaison des différents types de magnétisme (adapté de <http://www.magnets.bham.ac.uk/magneticmaterials/types.shtml>)

Puisque les particules magnétiques doivent réagir fortement à l'application d'un champ magnétique une forte susceptibilité magnétique est nécessaire. C'est

pourquoi les matériaux utilisés pour le cœur sont des matériaux ferri- ou ferromagnétiques. Cependant, lorsque la taille des nanocristaux est inférieure à une valeur seuil (de l'ordre de 9 nm pour les nanoparticules de Fe [4]) alors un nouveau phénomène entre en jeu. Dans un cas pareil, l'aimantation peut se renverser spontanément sous l'influence de la température. Le temps moyen entre deux renversements est appelé temps de relaxation de Néel. En l'absence de champ magnétique appliqué, si le temps utilisé pour mesurer l'aimantation de ces grains est beaucoup plus grand que le temps de relaxation de Néel, leur aimantation apparaît nulle : on dit qu'ils sont dans un état superparamagnétique [5]. Dans cet état, un champ extérieur peut aimanter les grains, comme dans un matériau paramagnétique (Figure 2). Néanmoins, la susceptibilité magnétique de grains superparamagnétiques est beaucoup plus grande que celle des matériaux paramagnétiques.

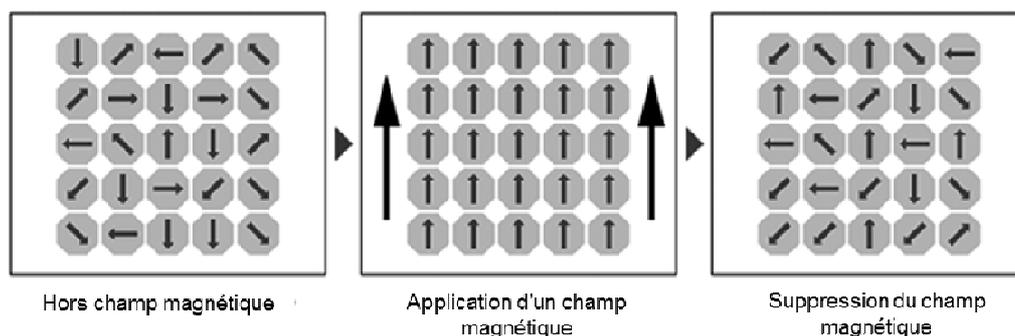


Figure 2 : Comportement d'un matériau superparamagnétique.

2 Structure des particules magnétiques

Pour former des particules magnétiques, des cœurs superparamagnétiques sont emprisonnés dans une matrice non magnétique (Figure 3).

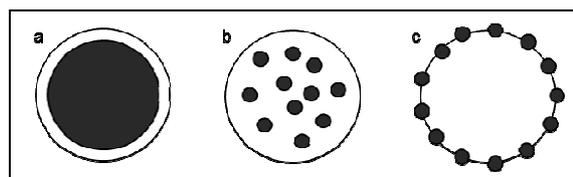


Figure 3 : Configuration de différents types de particules magnétiques. a- un unique cœur magnétique dans une matrice non magnétique (single core/shell). b- multiples cœurs magnétiques dans une matrice non magnétique (multiple cores/shell). c- multiple cœurs à la surface d'une matrice non magnétique (strawberry).

L'avantage des configurations a et b de la Figure 3 réside dans le fait que les matrices protègent les parties magnétiques d'interactions ou de réactions chimiques non désirées. De plus, si cette matrice est faite de polymère, il est possible de fonctionnaliser la surface et donc d'immobiliser des biomolécules (propriétés utilisées dans l'autre partie du manuscrit).

Les cœurs sont le plus souvent constitués d'oxyde de fer de type Fe_3O_4 ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ leur conférant des propriétés ferromagnétiques ou superparamagnétiques qui sont influencées par la taille et la quantité de matériaux magnétiques [6, 7].

Les particules que nous utilisons sont constituées de plusieurs cœurs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ à l'intérieur d'une matrice de polystyrène dont la surface est fonctionnalisée par des groupes carboxyliques. D'après les fournisseurs (Sigma Aldrich et Ademtech), les particules utilisées dans le cadre de ce travail ont des propriétés superparamagnétiques.

3 Leur applications

De nombreuses applications concernant les particules magnétiques ont vu le jour dans le domaine de la biologie, la biodétection (Figure 1) et du diagnostic [8]. Elles ont été utilisées pour marquer des cellules [9] ou augmenter le contraste [10] en imagerie médicale (scanner et IRM). Leurs propriétés magnétiques ont aussi servis pour la purification de cellules [11], la détection et la quantification, de protéines ou d'ADN que ce soit grâce à des tests d'agglutination [12] ou aux analyses par biocode barre (sujet développé dans l'autre partie de ce manuscrit) comme à la conception de biocapteurs (comme un magnéto-immunocapteur [13]) ou l'amélioration de la détection électrochimique [14, 15].

Récemment, l'intérêt s'est porté vers la capacité des particules magnétiques à s'assembler en filament lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique externe dans le but de développer un nouveau champ de recherche appelé « chimie macro-colloïdale » [16-18]. En présence d'un champ magnétique extérieur, tous les dipôles s'orientent dans la direction du champ et un moment magnétique global apparaît à l'échelle de la bille. Ceci conduit à l'organisation des billes sous forme de chaînes, orientées selon la direction du

champ. Cependant, lorsque le champ magnétique est annulé les particules se dispersent. Ces chaînes créées sous champ magnétique peuvent être rendues permanentes grâce à des molécules permettant de lier de manière covalente les particules entre elles. [19, 20]. L'utilisation de tels filaments a été étudiée expérimentalement [21] et théoriquement [22] pour le transport de fluide et de cellules : les filaments soumis à un champ magnétique oscillant se mettent à battre propulsant les cellules auxquelles ils sont attachés comme le font les flagelles des bactéries. En contrôlant le champ magnétique, il est possible de changer la vitesse et la direction des cellules transportées [21].

4 Objectifs de la thèse :

Dans ce travail de thèse, nous utiliserons les particules magnétiques de deux manières différentes :

- Comme moyen de capture de l'ADN dans le cadre d'une analyse par biocode barre.
- Comme chaînes de particules permanentes pouvant s'orienter suivant les lignes de champ pour une expérience de validation d'un banc de P-SPRI qui fut développé pour mesurer des anisotropies optiques.

5 Références bibliographiques

1. Horák, D., et al., *Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations*. Journal of Separation Science, 2007. **30**(11): p. 1751.
2. Gijs, M.A.M., *Magnetic bead handling on-chip: new opportunities for analytical applications*. Microfluidics and Nanofluidics, 2004. **1**(1): p. 22.
3. Guymont, M., *Structure de la Matière: Atomes, liaisons chimiques et cristallographie*. 1st ed. Belin sup Sciences, ed. E. Belin. 2003: Editions Belin. 448.
4. Carvell, J., et al., *Magnetic properties of iron nanoparticle*. Journal of Applied Physics, 2010. **107**(10): p. 103913.
5. Bean, C.P., *Hysteresis Loops of Mixtures of Ferromagnetic Micropowders*. Journal of Applied Physics, 1955. **26**(11): p. 1381.
6. Osawa, Z., et al., *Effect of polymer matrices on magnetic properties of plastic magnets*. Journal of Materials Science, 1988. **23**(7): p. 2637.
7. Leslie-Pelecky, D.L. and R.D. Rieke, *Magnetic Properties of Nanostructured Materials*. Chemistry of Materials, 1996. **8**(8): p. 1770.
8. Jaffrezic-Renault, N., et al., *Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads*. Sensors, 2007. **7**(4): p. 589-614.
9. Hinds, K.A., et al., *Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells*. Blood, 2003. **102**(3): p. 867-872.

10. Wang, Y.X.J., S.M. Hussain, and G.P. Krestin, *Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging*. European Radiology, 2001. **11**(11): p. 2319-2331.
11. Olsvik, O., et al., *Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology*. Clin. Microbiol. Rev., 1994. **7**(1): p. 43-54.
12. Polpanich, D., et al., *Detection of malaria infection via latex agglutination assay*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(12): p. 4690-4695.
13. Santandreu, M., et al., *Development of electrochemical immunosensing systems with renewable surfaces*. Biosensors & Bioelectronics, 1998. **13**(1): p. 7-17.
14. Helali, S., et al., *A disposable immunomagnetic electrochemical sensor based on functionalised magnetic beads on gold surface for the detection of atrazine*. Electrochimica Acta, 2006. **51**(24): p. 5182-5186.
15. Cosnier, S., et al., *Permeability Improvement of Electropolymerized Polypyrrole Films in Water Using Magnetic Hydrophilic Microbeads*. Electroanalysis, 2009. **21**(7): p. 887-890.
16. Boal, A.K., et al., *Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 746-748.
17. Cohen-Tannoudji, L., et al., *Polymer bridging probed by magnetic colloids*. Physical Review Letters, 2005. **94**(3).
18. Pedrero, F.M., et al., *Forming chainlike filaments of magnetic colloids: The role of the relative strength of isotropic and anisotropic particle interactions*. Journal Of Chemical Physics, 2006. **125**(8).
19. Goubault, C., et al., *Self-assembled magnetic nanowires made irreversible by polymer bridging*. Langmuir, 2005. **21**(9): p. 3725-3729.
20. Xiong, Y., et al., *The formation of legume-like structures of Co nanoparticles through a polymer-assisted magnetic-field-induced assembly*. Nanotechnology, 2007. **18**(34).
21. Dreyfus, R., et al., *Microscopic artificial swimmers*. Nature, 2005. **437**: p. 862-865.

Partie A

Vers un génotypage plaquettaire

Chapitre 1 : Etat de l'art

1 Immunologie

1.1 Notions d'immunologie

L'immunologie est la branche de la biologie qui étudie le système immunitaire et ces maladies.

Le système immunitaire d'un organisme est défini comme un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi ». Ce qui est reconnu comme non-soi est considéré comme pathogène et détruit. Il existe différents types de pathogènes tels que les virus, les bactéries, les parasites, certaines particules ou molécules « étrangères » (dont certains poisons). Ainsi, par exemple, le système immunitaire est responsable du phénomène de rejet de greffe et des accidents transfusionnels.

Les antigènes sont des molécules qui couvrent la surface de toutes les cellules de l'organisme et participent à son identité. Les antigènes sont les cibles des anticorps lorsqu'ils sont identifiés comme appartenant à des organismes étrangers. Les antigènes concernent également des substances extérieures à l'organisme telles que le pollen, la poussière, certains aliments ou médicaments ...et contre lesquelles réagissent les anticorps. Dans le cas d'antigènes protéiques, on appelle épitope ou déterminant antigénique la partie de l'antigène reconnue par un anticorps ou un récepteur lymphocytaire. Un même antigène peut comporter plusieurs épitopes (identiques ou différents) et ainsi induire une réponse immunitaire variée.

Les anticorps sont des molécules produites par les lymphocytes B du système immunitaire qui réagissent avec les antigènes n'appartenant pas à l'organisme. Ils attaquent le non-soi. Certains anticorps sont fabriqués « à la demande », d'autres existent naturellement dans l'organisme.

Lors d'une réaction immunitaire, l'anticorps se lie à l'antigène qui lui correspond en formant un complexe immun (Figure I-1).

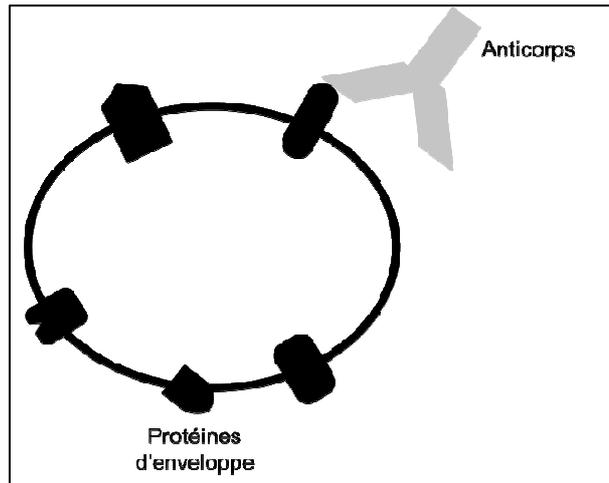


Figure I-1: Schéma d'un complexe immun formé entre une protéine membranaire d'une cellule (via ses antigènes) et un anticorps.

Lorsque le système immunitaire entre en contact avec des antigènes provenant d'un individu de la même espèce que son hôte et si ceux-ci sont différents des antigènes constituant le « soi », alors il se produit une réaction « dite allo-immune » au cours de laquelle les éléments du « non-soi » sont détruits. Lorsque le système immunitaire identifie des éléments du « soi » comme appartenant au « non-soi » (c'est-à-dire comme étrangère à l'organisme) une réaction dite « auto-immune » se produit. Le système immunitaire s'attaque et détruit alors les éléments du « soi ».

1.2 Immunohématologie

L'immunohématologie est la science consacrée à l'étude des propriétés antigéniques du sang, des réactions immunologiques correspondantes et des pathologies qui y sont associées.

1.2.1 La composition du sang

Le sang total est constitué de **plasma** et de **cellules circulantes** appelées éléments figurés du sang.

Le plasma, qui représente 55% du volume du sang total, est composé à 90 % d'eau et contient des oligo-éléments, des ions dissous, les gaz respiratoires, des nutriments (lipides, glucides, acides aminés), des déchets métaboliques (urée, acide urique, bilirubine), des

hormones et des protéines plasmatiques (60 à 80 g/l). Le plasma contiendrait 300 protéines différentes dont les plus représentées sont l'albumine (> 50%), les immunoglobulines (20 % essentiellement des IgG), le fibrogène (5%), l'alpha 1 antitrypsine (4%), l'alpha 2 macroglobuline (4%), la transferrine (3%) et les lipoprotéines (8% essentiellement des HDL (*high density lipoprotein*) et des LDL (*low density lipoprotein*)).

Les cellules circulantes présentes dans le sang total sont de trois types différents (Figure I-2) :

- **les érythrocytes** aussi appelés globules rouges ou hématies.
- **les leucocytes** ou globules blancs
- **les thrombocytes** aussi nommés plaquettes sanguines

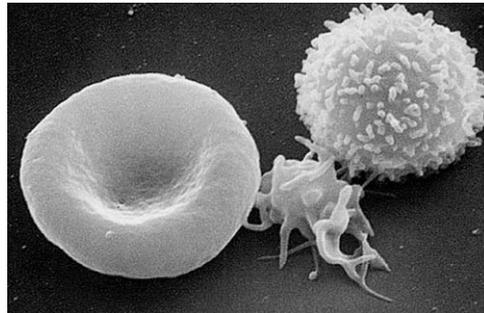


Figure I-2 : Cellules sanguines. De gauche à droite : Erythrocyte, thrombocyte, leucocyte. Image obtenu par microscopie électronique à balayage. (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Red_White_Blood_cells.jpg)

Les érythrocytes (globules rouges) sont des cellules anucléées (donc incapables de se diviser) dont le cytoplasme est riche en hémoglobine mais pauvre en organites. Elles assurent le transport des gaz respiratoires comme le dioxygène et le dioxyde de carbone. Le globule rouge normal est une sorte de poche contenant l'hémoglobine et ayant, de profil, la forme d'un disque biconcave et de face, celle d'un disque à centre plus clair. Cette forme confère une élasticité importante au globule lui permettant de remplir son rôle de transporteur d'oxygène à travers certains capillaires étroits. Le diamètre normal des globules rouges de face varie de 6,7 à 7,7 micromètres (moyenne 7,2 micromètres). Chez l'homme, on dénombre environ 5 millions de globules rouges par mm³ de sang (5 téra/litre ou 5T/l en unités internationales) et leur durée de vie dans l'organisme atteint 120 jours.

Les leucocytes (globules blancs) agissent comme cellules de l'immunité et combattent les infections. Les leucocytes observés dans le sang sont en transit. En effet, ils passent la majeure partie de leur temps hors du système circulatoire, et patrouillent dans les tissus où se déroule la plupart des luttes contre les agents pathogènes. On en dénombre entre 4000 et 10000 par mm³ de sang (entre 4 et 10 giga/litre i.e. entre 4 et 10 G/l en unités internationales)

Il existe trois grandes classes de leucocytes :

- les monocytes qui peuvent vivre plusieurs mois, sont des phagocytes qui ingèrent les bactéries et des cellules anormales, infectées ou mortes.
- les granulocytes sont des globules blancs qualifiés de « non spécifiques » dans la mesure où ils ne sont pas dirigés contre un seul antigène: ainsi, les neutrophiles sont des phagocytes bactéricides ; les éosinophiles participent notamment à la lutte contre les parasites et les basophiles jouent un rôle majeur dans l'inflammation. Les granulocytes ont une durée de vie brève dans l'organisme (entre 12 h à 9 jours).
- les lymphocytes sont impliqués dans l'immunité humorale liée à la production d'anticorps (lymphocyte B) et dans l'immunité cellulaire (lymphocyte T) liée à la prolifération de cellules effectrices (lymphocytes T cytotoxiques). Leur durée de vie varie de quelques heures à quelques dizaines d'années.

Les thrombocytes ou plaquettes, sont des fragments anucléés de cellules, provenant de leurs précurseurs les mégacaryocytes. Elles ont la forme de disques de 2 à 4 micromètres de diamètre et sont au nombre de 250 à 500 G/l de sang. Leur durée de vie dans l'organisme est d'environ 8 à 10 jours. Elles sont un des composants indispensables à l'hémostase primaire et donc à la coagulation sanguine. Lors de l'hémostase primaire (Figure I-3), les plaquettes se lient au collagène des parois vasculaires par l'intermédiaire du facteur Von Willebrand qui pontre le collagène du sous-endothélium à la glycoprotéine GP Ib/IX. Ce phénomène est très rapide et provoque l'activation des plaquettes. Les plaquettes activées

changent de forme et libèrent des substances telles que l'ADP (adénosine diphosphate), l'adrénaline, la noradrénaline, la thromboxane A2 ayant une action agrégante : ces éléments vont provoquer l'*agrégation plaquettaire* par l'intermédiaire des molécules de fibrinogène, qui en présence de calcium, se fixent sur un récepteur (la glycoprotéine GP IIb/IIIa) de la membrane plaquettaire. L'amas formé par ces plaquettes fusionnées est appelé le *clou plaquettaire de Hayem* ou *clou hémostatique* ou encore *thrombus blanc*.

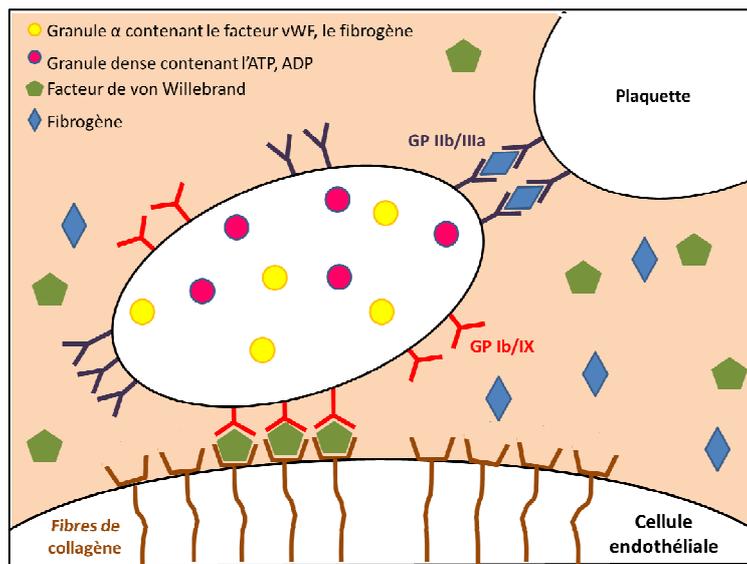


Figure I-3 : Schéma du fonctionnement d'une plaquette sanguine saine lors de l'hémostase primaire d'après ABC of clinical Heamatology [1]

Lors d'une transfusion de produits sanguins, il est nécessaire de s'assurer de la compatibilité entre le donneur et le receveur afin d'éviter les accidents transfusionnels. En effet, chacun des éléments figurés du sang est porteur d'antigènes spécifiques pouvant déclencher des réactions immunologiques.

1.2.2 Les systèmes antigéniques des cellules sanguines

Le groupage sanguin repose sur l'observation de la présence ou l'absence de substances antigéniques héritées à la surface des éléments figurés du sang. Ces antigènes peuvent être des protéines, des glucides, des glycoprotéines ou des glycolipides selon le système de groupe sanguin. Les différents groupes sanguins sont regroupés en systèmes.

L'ensemble des épitopes ou phénotypes résultant de l'action des divers allèles d'un même gène ou de gènes étroitement liés appartient à un même système de groupes sanguins.

Si les antigènes concernés par le groupage sont ceux présents spécifiquement sur **les hématies**, on parle de **groupe sanguin érythrocytaire** ou **groupe sanguin**. Les principaux groupes sanguins sont ceux qui définissent les **systèmes AB0 et Rhésus**, mais il en existe beaucoup d'autres. En pratique, ces deux systèmes sont de la plus haute importance avec le système **Kell**. Le premier, AB0, entraîne un accident transfusionnel immédiat en cas de transfusion incompatible. C'est le premier système à avoir été découvert [2-4]. Le second, Rhésus (Rh) [5, 6], est caractérisé par 5 antigènes (E, e, D, C, c). Deux de ses antigènes (D et c) sont les plus immunogènes et entraînent très fréquemment des immunisations, sources d'accidents transfusionnels et d'incompatibilités foeto-maternelles. Cependant, soulignons que les transfusions AB0 et Rh sont rendues compatibles depuis des années.

Si les antigènes concernés par le groupage sont ceux portés spécifiquement par les **globules blancs**, on parle alors de **groupe sanguin leucocytaire**. C'est en travaillant avec des anticorps anti-leucocytes, et en tentant d'identifier des groupes leucocytaires, que Jean Dausset (Prix Nobel de médecine en 1980) [7] a découvert dès 1958 **le système «Human Leucocyte Antigen »** (HLA). Il s'agissait en fait des antigènes d'histocompatibilité (complexe majeur d'histocompatibilité ou CMH) présents sur toutes les cellules de l'organisme. Ce système est en cause dans les réactions immunitaires et est responsable du rejet de greffe.

Si les antigènes concernés par le groupage sont spécifiquement sur **les plaquettes sanguines**, on parle alors de **groupe sanguin plaquettaire**. En analogie avec le système HLA, ce système est appelé **le système « Human Platelet Antigen »** (HPA). C'est ce système que nous avons utilisé comme modèle biologique lors des travaux rapportés dans cette thèse et que nous détaillons dans le paragraphe suivant.

1.3 **Système HPA (Human Platelet Antigen)**

1.3.1 **Définition**

A la surface des plaquettes, il y a de nombreux antigènes présents : ils appartiennent au système sanguin (ABO) ou au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH ou HLA antigène de classe I). Cependant, certains antigènes localisés sur les glycoprotéines (GP) de la membrane plaquettaire sont exprimés spécifiquement sur les plaquettes. Ces antigènes sont communément appelés antigènes spécifiques aux plaquettes et appartiennent au système HPA (Human Platelet antigen).

Depuis la première description en 1959 d'un anticorps spécifique anti-plaquettes par Van Loghem et al. [8], de nombreux systèmes antigéniques plaquettaires et leurs anticorps correspondants ont été découverts.

En 1990, l'ISBT (International Society of Blood Transfusion) a travaillé pour harmoniser la dénomination des antigènes spécifiques aux plaquettes, décidant alors de la nomenclature HPA qui fut révisée en 2003.

Metcalf et al. en 2003 [9] recense 24 allo-antigènes dirigés spécifiquement contre les plaquettes. 12 d'entre eux furent groupés en **six systèmes bialléliques** (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 et HPA-15). Plus récemment, G. Bertrand et C.Kaplan [10] ont rapporté la description **25 antigènes** dont 23 sont décrit sur un plan moléculaire.

Par convention dans les systèmes bialléliques HPA, l'allèle le plus fréquemment représenté dans la population mondiale est appelé allèle « a », le moins fréquent est appelé allèle « b ». La lettre « w » est, quant à elle, assignée au numéro de l'antigène lorsque l'anticorps dirigé contre l'antigène antithétique n'a pas été mis en évidence.

Le tableau des fréquences des différents systèmes HPA par pays peut être trouvé à l'adresse suivante : http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/freqs_1.html (décembre 2010)

Le plus problématique de ces systèmes est le système HPA-1 puis le système HPA-5, dont les anticorps anti HPA1-a et anti-HPA5-b sont impliqués respectivement dans 80 %

et 15 % des cas d'incompatibilités fœto-maternelles plaquettaires et inversement, 15% et 80% dans les états réfractaires à la transfusion.

Sur le plan biochimique, trois glycoprotéines (GP) appartenant à la famille des intégrines GP IIb/IIIa, GP Ia/IIa et GP Ib/IX sont reconnues pour entrer en jeu dans les phénomènes d'immunisation plaquettaire. En marge de ces pathologies d'origine immune, il existe des maladies liées aux plaquettes de nature congénitale.

1.3.2 Les maladies liées aux plaquettes

Les maladies liées aux plaquettes se manifestent cliniquement par des troubles de la coagulation. Ces troubles peuvent aussi bien se traduire par une thrombocytopénie (numération plaquettaire basse) ou plus rarement par une thrombocytose (numération plaquettaire haute). Ces maladies peuvent être de nature héréditaire ou immune. Les maladies de nature héréditaire, dues au mauvais fonctionnement des plaquettes, sont extrêmement rares (comme la thrombasthénie de Glazmann liée à l'absence de complexe GP IIb/IIIa sur les membranes plaquettaires ou la maladie de BERNARD SOULIER liée au complexe IbIX [11, 12]). La plus répandue est la maladie de von Willebrand, touchant le facteur de coagulation du même nom, qui est présente dans 1 % de la population mondiale. Les maladies de nature immune sont beaucoup plus répandues et sont le plus souvent de type allo-immunes. (cf. Annexe I)

Les maladies allo-immunes qui ont les répercussions cliniques les plus graves sont : la thrombocytopénie néonatale allo-immune, l'état réfractaire aux transfusions plaquettaires et le purpura post transfusionnel :

- La thrombocytopénie néonatale allo-immune (TNA ou NAIT pour neonatal allo-immune thrombocytopenia) [13, 14] est définie par une numération plaquettaire <150 G/l chez le nouveau-né. Elle est due à la destruction des plaquettes fœtales suite au passage transplacentaire d'anticorps de type IgG anti HPA-1a maternels dirigés spécifiquement contre des antigènes présents sur les plaquettes fœtales. Ces antigènes hérités du père ne sont pas reconnus par le système immunitaire de la mère.

La thrombocytopénie peut dans certains cas survenir in utero entraînant une hémorragie intracrânienne ou viscérale et dans les cas les plus graves, la mort intra-utérine du bébé. Ceci peut se produire dès la première grossesse contrairement à la maladie hémolytique du nouveau-né engendrée par incompatibilité foëto-maternelle érythrocytaire.

- L'état réfractaire aux transfusions plaquettaires (PR pour Platelet Refractoriness) [15] se définit par l'échec répété d'effet bénéfique aux transfusions plaquettaires. L'allo-immunisation anti-HLA est le plus souvent la cause de la destruction des plaquettes transfusées (environ 75 - 80% des cas). L'allo-immunisation anti-HPA représente quant à elle, de 8 et 20-25 % [16] des cas et est souvent associée à l'allo-immunisation anti-HLA. L'immunisation anti-HPA-5b est la plus fréquemment observée dans ce type de pathologie.

- Le purpura post transfusionnel (PPT ou PTP pour Post Transfusion Purpura) est une complication rare se produisant de 5 à 12 jours après une transfusion entraînant un épisode de thrombocytopénie sévère. Il touche le plus souvent des femmes HPA-1a négatives ayant été précédemment allo-immunisées par une grossesse ou par une précédente transfusion ayant occasionné une réponse immunitaire avec production d'anti-HPA-1a. La transfusion induit une réponse immunologique secondaire, augmentant la production d'anticorps anti-HPA-1a et entraînant la destruction des plaquettes transfusées. Le système immunitaire « s'emballe » ensuite et des auto-anticorps viennent détruire les propre cellules du patient.

Ces trois conditions cliniques sont principalement dues à des anticorps anti-HPA-1a et à des anticorps anti-HPA-5b d'où la nécessité d'étudier le système HPA-1 et HPA-5, les glycoprotéines GP IIIa et GP Ia/IIa qui leur sont respectivement associées et le polymorphisme des gènes codant pour ces mêmes protéines.

1.4 Le système HPA-1

Nous présentons le système antigénique plaquettaire HPA-1 de manière un peu plus détaillée puisque c'est celui que nous avons utilisé dans nos travaux. Il est présent sur la glycoprotéine IIIa.

1.4.1 La glycoprotéine GP IIIa

La glycoprotéine GP IIIa aussi appelée intégrine $\beta 3$ (Figure I-4) est une protéine membranaire des plaquettes qui, complexée avec GP IIb (ou intégrine αIIb), forme le récepteur GP IIb/IIIa jouant un rôle important dans l'hémostase et la thrombose. Ce récepteur hétérodimérique se lie spécifiquement au fibrinogène [17] facilitant l'agrégation plaquettaire ayant lieu en présence de calcium pendant l'hémostase primaire.

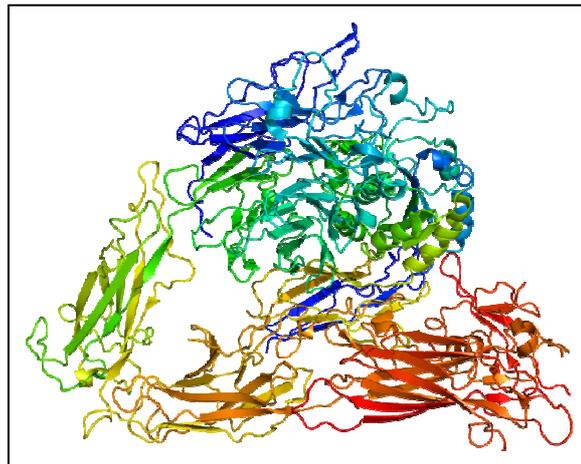


Figure I-4 : Structure de la protéine GP IIIa obtenue par le logiciel Pymol à partir de la séquence donnée par Zimrin et al [18]

Des études quantitatives utilisant des anticorps monoclonaux (mAb) ont établi que chaque plaquette exprime approximativement 80 000 récepteurs GP IIb/IIIa à sa surface [19] avec une réserve moins importante de ce complexe dans son cytoplasme. Ces complexes en réserve peuvent migrer vers la membrane par une activation de la thrombine par exemple. Une fois normalisée par rapport à la surface d'une plaquette, la densité de surface du complexe GP IIb/IIIa est extrêmement importante. Les complexes sont en moyenne séparés de moins de 200 Å ce qui en fait l'un des récepteurs d'adhésion/agrégation les plus denses de toute la biologie.

Ce récepteur est hautement polymorphique et est connu depuis longtemps pour avoir des allo-antigènes [20]. Newman et al. ont publié en 1989 [21] la première description moléculaire d'un polymorphisme associé à un allo-antigène dirigé contre les plaquettes et ont identifié les allèles HPA-1a et HPA-1b (appelés respectivement PI^{A1} et PI^{A2}) grâce à la digestion par une endonucléase de restriction de l'ADN obtenu à partir d'ARNm amplifié par PCR. Les allotypes HPA-1 portent une leucine en position 33 de la glycoprotéine GP IIIa alors que les allotypes HPA-1b portent une proline en cette même position. Ce polymorphisme de la protéine est le résultat de la mutation d'une seule base azotée (polymorphisme mononucléotidique ou SNP pour Single Nucleotide Polymorphisme) sur le gène codant pour la protéine GP IIIa.

1.4.2 Polymorphisme du gène codant le système antigénique HPA-1

Le gène codant pour la glycoprotéine GP IIIa présente de nombreux polymorphismes mononucléotidiques. A la substitution d'un nucléotide dans la séquence du gène correspond la substitution d'un acide aminé dans la séquence de la protéine que ce gène code. Ces substitutions ont des répercussions immunologiques et fonctionnelles [22]. Les systèmes alloantigéniques plaquettaires encodés par les SNP dans le gène de la GP IIIa sont d'une importance clinique. La substitution d'une cytosine par une thymine en position 1565 dans l'exon (séquence codante de l'ADN) 2 du gène codant pour la GP IIIa est la plus immunogène du système HPA [21]. Il s'agit du système bi-allélique HPA-1. L'allèle présentant la thymine est appelé HPA-1a, celui présentant la cytosine est nommé HPA-1b.

Le typage plaquettaire HPA-1 de manière systématique, au minimum chez la femme enceinte est une question récurrente discutée entre les biologistes et les obstétriciens. Mettre en place un typage systématique réclame un test simple, rapide et pouvant être exécuté malgré une quantité de matériel biologique faible.

2 Méthodes de typage plaquettaire

Nous avons identifié deux méthodologies différentes de typage plaquettaire basées soit sur le phénotypage, soit sur le génotypage des plaquettes.

La pratique sérologique *in vitro* utilisant la réaction de reconnaissance spécifique antigène-anticorps (Ag-Ac) est le phénotypage. Elle repose sur l'identification d'un antigène cellulaire de surface et nécessite l'utilisation de réactifs appelés anti-sérums. Ces anti-sérums contiennent des anticorps identifiés (monoclonaux issus de production industrielle) qui permettent la reconnaissance spécifique et donc l'identification des antigènes d'une cellule. Cette approche est largement utilisée pour les érythrocytes et les leucocytes. Mais il n'existe à l'heure actuelle, aucun anti-sérum anti-plaquette. Aussi, certains laboratoires utilisent des sérums polyclonaux provenant de patients immunisés pour réaliser un phénotypage plaquettaire. Dans le paragraphe suivant, nous présentons brièvement cette méthode pour montrer la complexité du test. (Voir 2.1)

Si l'on admet que les changements dans la séquence des protéines résultent des changements dans le code génétique, il est possible d'identifier les allotypes des protéines en effectuant un génotypage du gène codant pour cette protéine plutôt qu'un phénotypage de la protéine. Dans ce cas, l'information est détectée au niveau de l'ADN du gène codant et le génotypage est basée sur l'utilisation de technique d'amplification comme la PCR (« Polymerase Chain Reaction ») décrite au paragraphe 2.2.

2.1 Phénotypage plaquettaire

Le phénotypage plaquettaire est réalisé par la méthode MAIPA "Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet antigens Assay". Ce test décrit par Kiefel et collaborateurs [23] a été initialement développé pour l'identification des anticorps anti-plaquettes à l'aide de cellules dont le système antigénique plaquettaire est connu. Il peut également être utilisé pour réaliser un groupage plaquettaire. Les antigènes des cellules à déterminer sont alors identifiés grâce à des sérums polyclonaux issus de patients dont on connaît les anticorps présents.

Le principe du MAIPA pour l'identification de GP IIb/IIIa est schématisé sur la Figure I-5 et sa procédure est décrite ci-dessous.

1. Un mélange de plaquettes (issues d'un pool regroupant 10 donneurs de groupe érythrocytaire 0 sélectionnés pour leurs génotypes particuliers), et d'anticorps monoclonaux de souris (MoMab) dirigés contre la glycoprotéine étudiée (ici GP IIb/IIIa) est incubé avec :

(a) le sérum à tester (contenant ici des anticorps anti-HPA-1a)

(b) un sérum ne contenant pas d'anticorps anti-plaquettes qui servira de témoin négatif.

2. Après incubation, un complexe trimérique (a) ou dimérique (b) se forme. Les excès de sérum et de MoMab sont enlevés par lavage.

3. La membrane plaquettaire est solubilisée dans un détergent non-ionique qui relargue les complexes dans la phase liquide et les matières particulaires sont enlevées par centrifugation.

4. Les lysats contenant les complexes glycoprotéine/anticorps sont ajoutés dans les puits d'une microplaque préalablement fonctionnalisés (coatés) avec des immunoglobulines de chèvre anti-IgG de souris. L'anticorps monoclonal de souris couplé au complexe glycoprotéique, dont il est spécifique, et à l'éventuel anticorps anti-plaquettes humain est ainsi capturé au fond de la plaque.

5. La fixation du complexe est détectée par un anticorps anti-IgG humain de chèvre couplée à une peroxydase.

6. La révélation se fait par l'ajout de o-Phényl diamine (OPD).

7. La lecture est ensuite effectuée par spectrophotométrie à 492 nm : une coloration jaune brun apparaît témoignant de la présence d'un anticorps anti-GP IIb/IIIa dans le cas présenté.

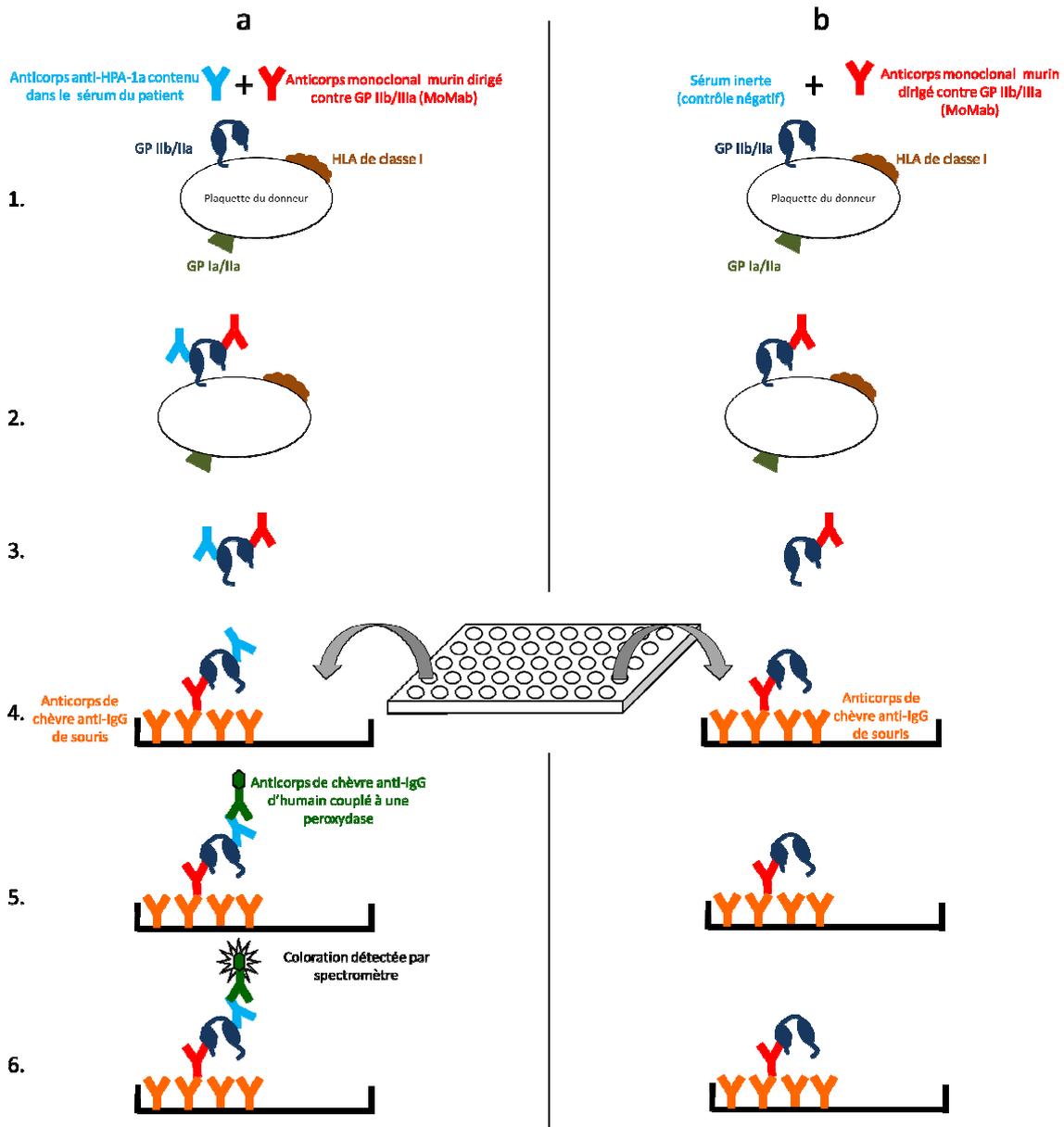


Figure I-5 : Technique de MAIPA utilisée pour identifier l'antigène HPA-1a d'après Norton et al.[24]

Cette approche n'est pas une solution optimale pour le groupage systématique, car les sérums sont en quantité limitée, non spécifiques et beaucoup d'antigènes ne peuvent être identifiés.

On ne peut donc pas établir une stratégie de diagnostic qualifié pour l'ensemble des systèmes antigéniques plaquettaire avec des sérums issus de patients dont la quantité et la spécificité ne sont pas garanties. Cette approche diagnostique ne peut servir qu'à confirmer l'information obtenue par génotypage. En effet il existe des cas où l'information génétique ne se traduit pas au niveau protéique.

2.2 Techniques de génotypage par PCR

Nous avons dit précédemment que les protéines sont l'expression du code génétique et sont issues d'un processus de synthèse complexe. Avant de décrire les techniques d'identification par génotypage, nous allons expliquer le processus permettant la synthèse des protéines et donc le lien entre le code génétique et son expression protéique.

2.2.1 La synthèse des protéines.

Pour passer du phénotypage au génotypage, il faut comprendre la relation existant entre le code génétique porté par l'ADN et les protéines pour les organismes eucaryotes. Le mécanisme de production des protéines est représenté schématiquement sur la Figure I-6.

La molécule d'ADN est le support de l'information génétique, elle ne quitte jamais le noyau des cellules. Or la production de protéine s'effectue dans le cytoplasme. Comment la synthèse des protéines est-elle possible ?

Une molécule appelée acide ribonucléique (ARN) est synthétisée dans le noyau à partir du modèle de l'ADN lors du processus biologique appelé **transcription**. La molécule d'ARN produite par synthèse enzymatique n'est pas utilisable pour la synthèse de protéine en l'état. Elle subit des modifications post-transcriptionnelles. La dernière de ces modifications s'appelle **l'épissage**. Avant cette dernière étape l'ARN des eucaryotes est sous forme de pré-ARNm (m pour messenger) qui contient toute la séquence du gène. Or celle-ci comporte des séquences codantes appelées exons et des séquences non codantes appelées introns. Seuls les premiers participent à la synthèse des protéines. Un complexe nucléoprotéique reconnaît les introns et les élimine ; les exons restants se relient ensuite entre eux formant un ARN plus court qui passe dans le cytoplasme et devient un ARN messenger mature (ARNm). L'épissage permet, de plus, d'obtenir différentes protéines à partir d'un même gène en sélectionnant quels exons seront conservés : c'est l'épissage alternatif.

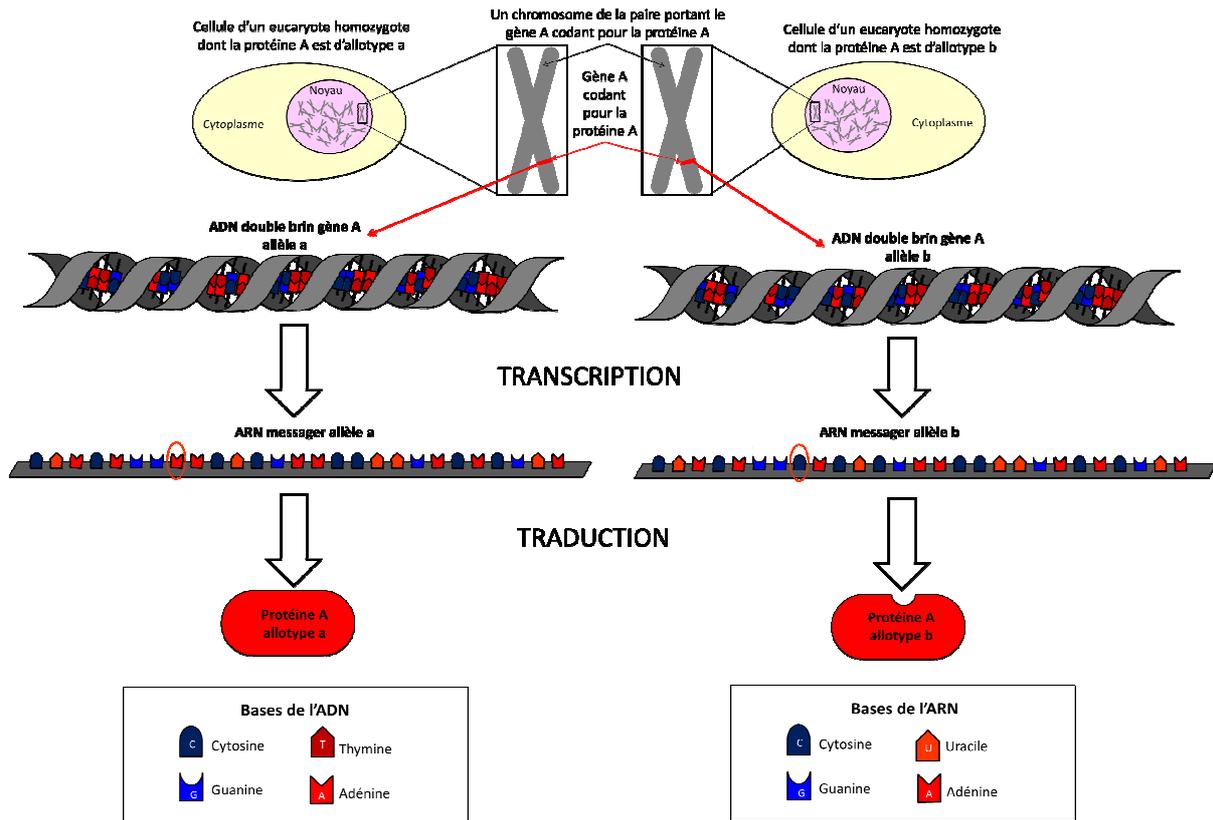


Figure I-6 : Du code génétique à la protéine pour un eucaryote. Encerclé la base azotée différente entre l'allèle a et l'allèle b.

Dans le cytoplasme, un ribosome, composé d'une petite sous-unité et d'une grande sous-unité, se fixe sur le brin d'ARNm. Le ribosome va assembler la séquence d'acides aminés de la protéine selon les "instructions" du code génétique : c'est l'étape de **traduction**. Chaque groupe de 3 nucléotides de l'ARNm appelé **codon** correspond à un acide aminé, sauf 3 codons, appelés codons-stop, qui provoquent l'arrêt de la traduction (UAA, UGA, UAG). Le codon AUG, appelé codon-initiateur, va permettre de commencer la traduction en formant l'acide aminé méthionine. Cet acide aminé se détachera plus tard de la chaîne polypeptidique. Le brin d'ARNm va être parcouru codon par codon par le ribosome (translocation). Par l'intermédiaire d'un ARN de transfert (ARNt), le ribosome va ajouter selon le codon lu un acide aminé à la protéine en cours de fabrication. La traduction se termine une fois un codon-stop atteint, la protéine est complète. Le ribosome se détache de la protéine et du brin d'ARNm, et la protéine est libérée dans le cytoplasme où elle peut subir des modifications post-traductionnelles. Le ribosome va se disloquer en ses deux sous-

unités et pourra faire une autre synthèse sur un autre ARNm ou sur ce même ARNm. Plusieurs ribosomes peuvent synthétiser simultanément une protéine à partir d'une même molécule d'ARNm puisqu'avant d'être détruite, cette molécule participe à la fabrication de 10 à 20 protéines. L'ensemble formé par un ARNm et plusieurs ribosomes se déplaçant dessus s'appelle un polysome.

Le moindre changement dans les séquences codantes de l'ADN se répercute dans l'ARNm qui en est sa réplique. Puisque celui-ci sert de plan pour la synthèse des protéines, les changements dans la séquence et donc dans les codons de celui-ci entraînera soit la substitution d'acides aminés dans la séquence de la protéine soit l'arrêt de la traduction (si le codon codant pour un acide aminé devient un codon-stop) soit la séquence de la protéine ne change pas (on parle de mutation muette) si le codon muté code pour le même acide aminé (redondance des codons).

Ainsi, par exemple sur la figure I-6, on considère que la protéine A est codée par le gène A dont les deux allèles (allèle a et allèle b) ne diffèrent que d'une base azotée. Le gène A codant pour la protéine A est porté par une paire de chromosomes. Les chromosomes, visibles dans le noyau de la cellule lors de la division mitotique, sont la forme compactée d'un ADN double brin enroulé autour de protéines (les histones). Dans le cas d'un homozygote pour le gène A, l'allèle du gène est identique pour les deux chromosomes. Puisque l'information génétique est identique pour les deux chromosomes, la cellule synthétisera un unique allotype de la protéine A. Dans le cas d'un hétérozygote pour le gène A, l'allèle du gène est différent pour les deux chromosomes. L'information génétique est différente et la cellule synthétisera les deux allotypes de la protéine A.

Génotyper les patients consiste à rechercher au niveau de l'ADN, le type d'allèle a ou b pour chacun des groupes HPA. Pour cela, il est nécessaire à partir d'un très faible volume d'échantillon sanguin de pouvoir obtenir une quantité importante et exploitable d'un fragment précis d'ADN comme par exemple le segment d'ADN codant la protéine A et contenant soit l'allèle a, soit l'allèle b. Ceci peut être obtenu grâce à la technique PCR (Polymerase Chain Reaction) inventée par K. Mullis en 1983.

2.2.2 Le principe de la PCR

La technique PCR consiste à amplifier l'ADN génomique en utilisant des séquences spécifiques appelées « amorces » (« primers ») et une enzyme polymérase. Les différentes étapes de l'amplification sont schématisées sur la figure I-7. En fait, cette technique qui nécessite essentiellement des rampes de températures très rapides et précises est maintenant entièrement automatisée. On amplifie ainsi de manière exponentielle la partie ciblée de l'ADN de l'échantillon. En effet, à partir de X double brins identiques au départ, on obtient en théorie après n cycle d'amplification 2^n X brins.

La PCR a été adaptée au typage plaquettaire et est désormais employée en laboratoire comme technique de routine [25-27]. La technique d'amplification par PCR est appropriée pour typer les donneurs et construire une bibliothèque de donneurs référencés et pouvoir pratiquer des transfusions compatibles.

Hurd et al. [25] ont répertorié les différentes techniques utilisées pour le génotypage plaquettaire en laboratoire d'analyses. Les plus employées pour cet usage sont :

- La « polymerase chain reaction with sequence specific primers » (PCR-SSP)
- La « polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism » (PCR-RFLP)
- La « polymerase chain reaction-allele (sequence)-specific oligonucleotide » (PCR-ASO)
- Le génotypage plaquettaire par PCR en temps réel (par Fluorescent Resonance Energy Transfert (FRET) ou utilisation du système TaqMan™)

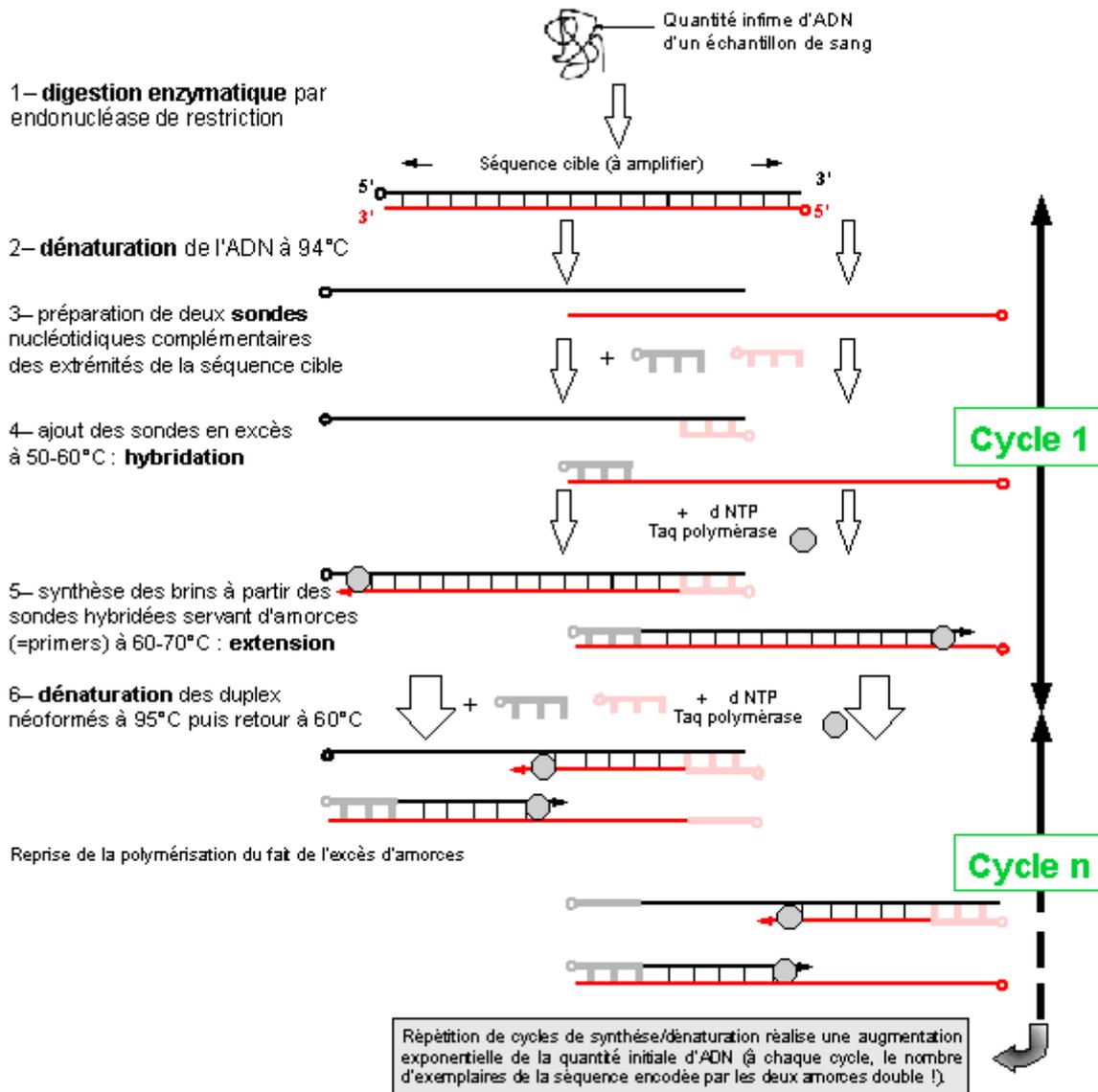


Figure I-7 : Les différentes étapes de la PCR

2.2.3 Génotypage par PCR révélée par électrophorèse

La **PCR-SSP** est la technique de génotypage la plus répandue. L'atelier international d'immunologie plaquettaire organisé par l'ISBT (Macao en 2008) a recensé que 22 laboratoires sur 31 l'utilisaient. Cette technique repose sur l'utilisation de deux amorces, l'une commune, l'autre spécifique à l'allèle à amplifier. L'amorce spécifique est créée pour que le nucléotide en 3' soit à l'emplacement du SNP du gène à amplifier. En effet, la Taq polymérase est incapable de réparer un mésappariement d'une base en 3' de l'amorce.

Ainsi, si le nucléotide en 3' de l'amorce spécifique est complémentaire à la séquence du gène, l'amplification a lieu. Si le nucléotide en 3' de l'amorce spécifique est mésapparié, il n'y a pas d'amplification. L'amorce commune sert à amplifier le gène et à contrôler l'efficacité de la PCR. Si le système est biallélique, on utilise deux paires d'amorces. Chacune de ces paires contient une amorce commune et une amorce spécifique à l'allèle à amplifier. L'ADN est amplifié par chacune des paires dans deux tubes PCR différents. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel (un tube de PCR par ligne) et révélés par transillumination UV. Chacune des lignes présente une bande pour l'amorce commune. La présence d'une seconde bande indique si l'amplification liée à l'amorce spécifique a eu lieu. Le génotype est déterminé par la présence ou l'absence de cette seconde bande.

La **PCR-RFLP** est la méthode de génotypage la plus ancienne et n'est maintenant utilisée que par des laboratoires de référence pour résoudre des difficultés d'interprétation. Cette méthode est basée sur le gain ou la perte, en fonction de la séquence de l'allèle, d'un site de restriction enzymatique sur le gène amplifié. Après amplification PCR, les amplicons (produits de l'amplification) sont soumis à une digestion par enzyme de restriction. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose ou sur PAGE (pour PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Le gel est révélé par illumination UV. Le profil de bandes est alors caractéristique du génotype.

2.2.4 PCR détectée par spectrocolorimétrie

La **PCR-ASO** (Allele Specific Oligonucleotide) est une technique utilisée dans les études initiales des antigènes HPA sur le plan moléculaire. Le principe de base de la PCR-ASO est la discrimination entre deux séquences d'ADN dont une seule base diffère à un endroit donné. L'utilisation de cette technique requiert d'effectuer deux réactions distinctes pour chaque individu à génotyper : une pour détecter l'allèle commun (ASO 1) et une pour l'allèle rare, dit muté (ASO 2). Une amorce spécifique pour chacun des allèles à détecter doit

être construite. La technique d'identification repose sur le principe d'hybridation des brins amplifiés et marqués sur des brins sondes spécifiques à chaque allèle immobilisés sur une membrane de nylon.

Chez un individu homozygote, la base en 3' de l'amorce s'appariera parfaitement au site polymorphique allèle commun, il y aura génération d'un amplicon par la paire ASO 1 / amorce commune et détection d'un signal de fluorescence par la suite lors de l'ajout du fluorochrome SYBR Green I. À l'inverse pour cet individu, dans le tube réactionnel contenant la combinaison amorce ASO 2 / amorce commune, il n'y aura pas d'appariement de la dernière base de l'amorce, et par conséquent, pas d'amplification. Le niveau de fluorescence mesuré sera assimilé au bruit de fond. Les amplicons détectés chez les homozygotes pour l'allèle rare seront formés par la paire amorce ASO 2 / amorce commune, alors que les deux paires d'amplicons seront présents chez les individus hétérozygotes.

2.2.5 PCR détectée en temps réel

Dans un **génotypage plaquettaire par PCR en temps réel**, l'amplification est quantifiée en temps réel via des fluorochromes dont l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

Dans la technologie « fluorescent resonance energy transfert » (FRET), deux sondes sont utilisées : une première sonde est marquée en 3' par un fluorochrome émetteur la seconde sonde, spécifique de l'allèle à génotyper, est marquée en 5' par un fluorochrome accepteur. Lorsque la sonde allèle-spécifique est fixée à l'ADN mère il y a transfert d'énergie entre les deux fluorochromes et émission de fluorescence par le fluorochrome accepteur. Le génotype est déterminé grâce à une courbe de fusion établie en fin d'amplification.

Dans le système TaqMan™, une seule sonde porte les fluorochromes rapporteur et « quencheur ». Le fluorochrome rapporteur est spécifique de chaque allèle étudié lors du génotypage. L'ADN polymérase utilisée lors de la PCR présente une activité exonucléasique 5'→3'. De ce fait, l'enzyme va dégrader la sonde éventuellement fixée à l'ADN mère et ainsi

libérer le fluorochrome rapporteur qui ne pourra plus transférer son énergie au fluorochrome « quencheur ». Seule la fluorescence du fluorochrome rapporteur sera donc quantifiée.

2.2.6 PCR détection à l'aide de puces à billes

Des méthodes alternatives à la détection par électrophorèse sur gel ont été développées par deux industriels. Elles sont à l'heure actuelle en évaluation.

2.2.6.1 IDHPA

Développée par **Progenika**, cette technique utilise la technologie xMAP® de Luminex®. [28]

1. La zone d'intérêt de l'ADN génomique est amplifiée par une PCR multiplexe. Les amplicons sont modifiés par des biotines (portées par les cytosines).
2. Les amplicons sont hybridés sur des sondes oligonucléotidiques attachées à des billes Luminex® déposées sur une puce.
3. On fait ensuite réagir de la streptavidine conjuguée à la phycoerythrine.
4. Les billes sont analysées avec le système « Luminex ® 100/200™ System ». La présence des polymorphismes est déterminée par la corrélation du signal de fluorescence intrinsèque de chaque bille avec la présence ou l'absence du signal de phycoerythrine correspondant. Un logiciel d'analyse de données interprète les signaux quantifiés, produit un dossier contenant les résultats du génotype pour chaque SNP et convertit les génotypes en phénotypes pour les antigènes testés.

Cette technique permet dans le cadre de l'immunologie plaquettaire l'analyse de 12 systèmes HPA (HPA-1 à 11 et HPA-15) en 5 heures après l'extraction dont 1 h de temps de manipulation pour le technicien de laboratoire.

2.2.6.2 *BeadChips™*

En développement chez **BioArray Solutions®**, cette technique est en évaluation dans certains laboratoires d'hématologie.

1. La zone d'intérêt de l'ADN est amplifiée par PCR multiplexe pendant 2h.
2. On procède au nettoyage de la PCR en éliminant les amorces et les désoxyribonucléotides. On utilise une λ -exonucléase pour générer des ADN simple brin.
3. Les ADN simple brins générés sont hybridés sur des billes. Les billes sont préalablement encodées par un code-couleur et sur chaque code couleur de billes se trouve les oligonucléotides spécifiques d'un polymorphisme d'intérêt et complémentaires des produits de PCR. La complémentarité entre le produit de PCR et l'oligonucléotide de la bille permet une étape d'élongation de l'oligonucléotide sonde greffé sur les billes avec l'incorporation de marqueurs.
4. La fluorescence du produit d'élongation sur la bille est détectée par lecture de la puce au microscope à fluorescence grâce à un système d'analyse d'image (Array Imaging System AIS 400). L'image est ensuite décodée et analysée sur le logiciel BASIS™ développé par BioArray Solutions®.

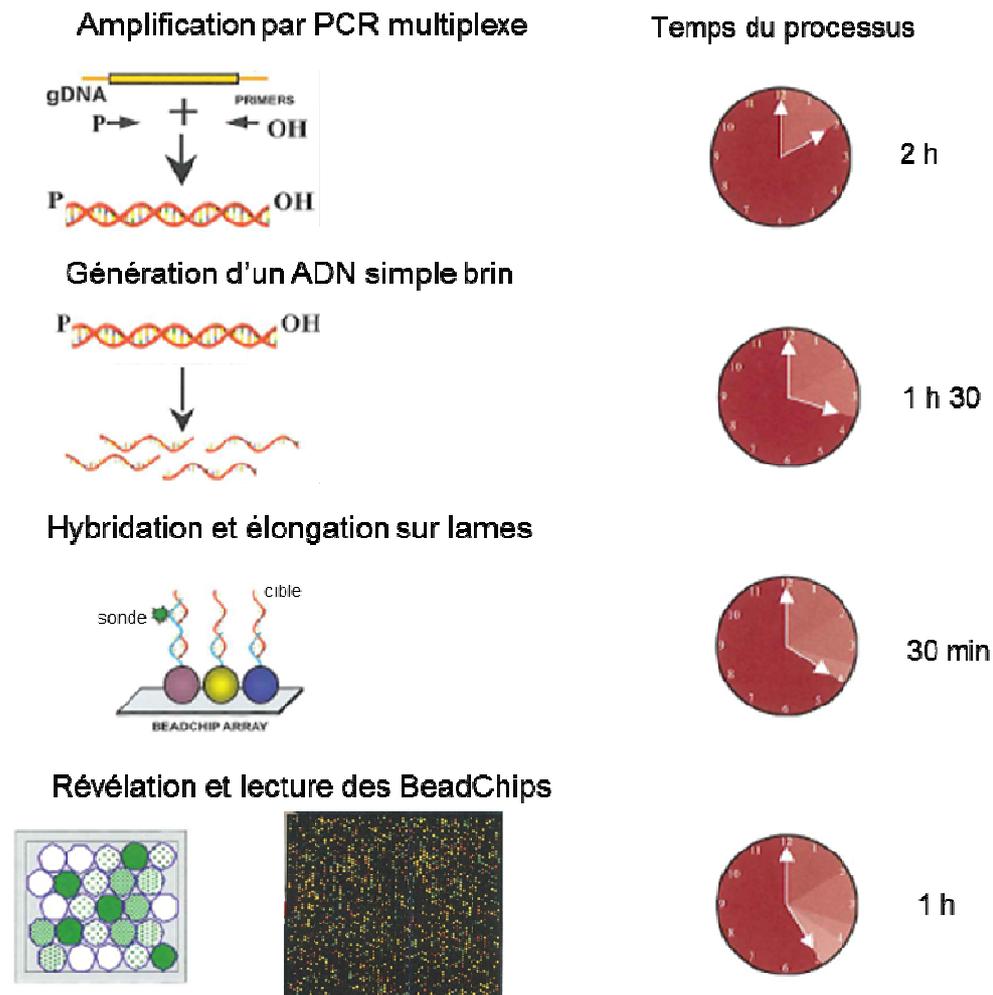


Figure I-8 : Schéma de l'utilisation des BeadChips™ de Bioarray Solutions®

Cette technique permet l'analyse de 12 systèmes HPA (HPA-1 à 11 et HPA-15) en 5 heures.

Les techniques de génotypage des groupes plaquettaires par la technique des puces à billes utilisent toujours une étape de PCR. Elles impliquent donc certains de ses inconvénients.

2.2.6.3 Inconvénients des techniques de génotypage par PCR

Les inconvénients de la PCR sont les suivants :

- Les brevets de la méthode PCR [29, 30] sont tombés dans le domaine publique en 2004, celui de la Taq polymérase [31] détenu par la société Roche (ainsi que plus de 800 autres en rapport avec la PCR d'après Roche [32]) n'est quant à lui pas dans le domaine publique et par conséquent le prix de ce réactif est très élevé car il s'agit d'un monopole.

- Les erreurs induites par la Taq polymérase entraînent des délétions dans les brins amplifiés et/ou l'arrêt de l'amplification. Ces brins qui ne sont pas des répliques exactes de l'ADN à amplifier diminuent le rendement de la PCR.
- La révélation des gels d'analyse utilise du bromure d'ethidium (BEt) qui est un produit toxique. Puisqu'il se lie à l'ADN, il possède un effet mutagène important. Il existe cependant des produits de révélation moins toxique comme le SYBR Green.
- La révélation d'une amplification par PCR prend du temps (la détection et l'amplification sont réalisées en deux étapes qui nécessitent de 24 à 72 h (voir page 256 de la référence [33])) or les plaquettes ne se conservent que 5 jours au maximum dans les conditions de stockage utilisées dans les établissements de transfusion (à savoir 20°C et agitation constante) faisant ainsi de la PCR une technique non compatible avec les situations d'urgence (mais utile pour la création de bibliothèque de donneurs compatibles).
- De plus, dans certaines situations, la quantité de matériel génétique n'est pas suffisante et des solutions alternatives sont à explorer. C'est le cas dans les NAIT [14] où une autre solution est requise pour un échantillon provenant du liquide amniotique ou un échantillon sanguin de bébé.

3 Les biocodes barres

3.1 Principe

La technique des biocodes barres a été développée par l'équipe de Mirkin. La première preuve de concept a été faite pour détecter des protéines [34, 35] puis de l'ADN [36]. Cette technique consiste à utiliser comme étiquettes (appelées biocode barre) des double brins d'ADN qui ont une capacité d'association et de séparation facile à mettre en œuvre.

Pour une recherche simultanée de différentes cibles, on peut attribuer une séquence définie d'ADN par cible. La figure I-9 décrit cette technique basée sur la formation de sandwichs à l'aide de deux types de particules : d'une part, des particules magnétiques fonctionnalisées de manière à capturer spécifiquement les cibles ; d'autre part des particules non magnétiques (nanoparticules d'or) bifonctionnalisées de manière i) à former un sandwich avec la cible capturée par la bille magnétique mais aussi ii) à porter une multitude de biocode barre. Les sandwichs formés sont séparés des cibles et des billes non magnétiques qui n'ont pas été reconnues par séparation magnétique, puis lavage. Une fois les sandwichs collectés dans une solution tampon, les biocodes barres sont relargués par simple élévation de température (dénaturation du double brin). Il reste ensuite à utiliser une méthode de détection des simples brins. Ainsi pour un évènement de reconnaissance, on a une amplification indirecte de la détection grâce à la multiplicité des biocodes barres greffés sur les nanoparticules d'or. Détecter la présence d'une cible revient donc à détecter les biocodes barres associés. Ces biocodes barres peuvent être détectés in situ s'ils portent eux même des marqueurs de détection ou bien dans le cas d'une recherche multiplexe, en utilisant des puces ADN avec les différentes techniques de détection associées à ces microarrays. Dans le paragraphe suivant, nous décrirons les différentes techniques de détection associées aux biocodes barres et leurs performances reportées dans la littérature.

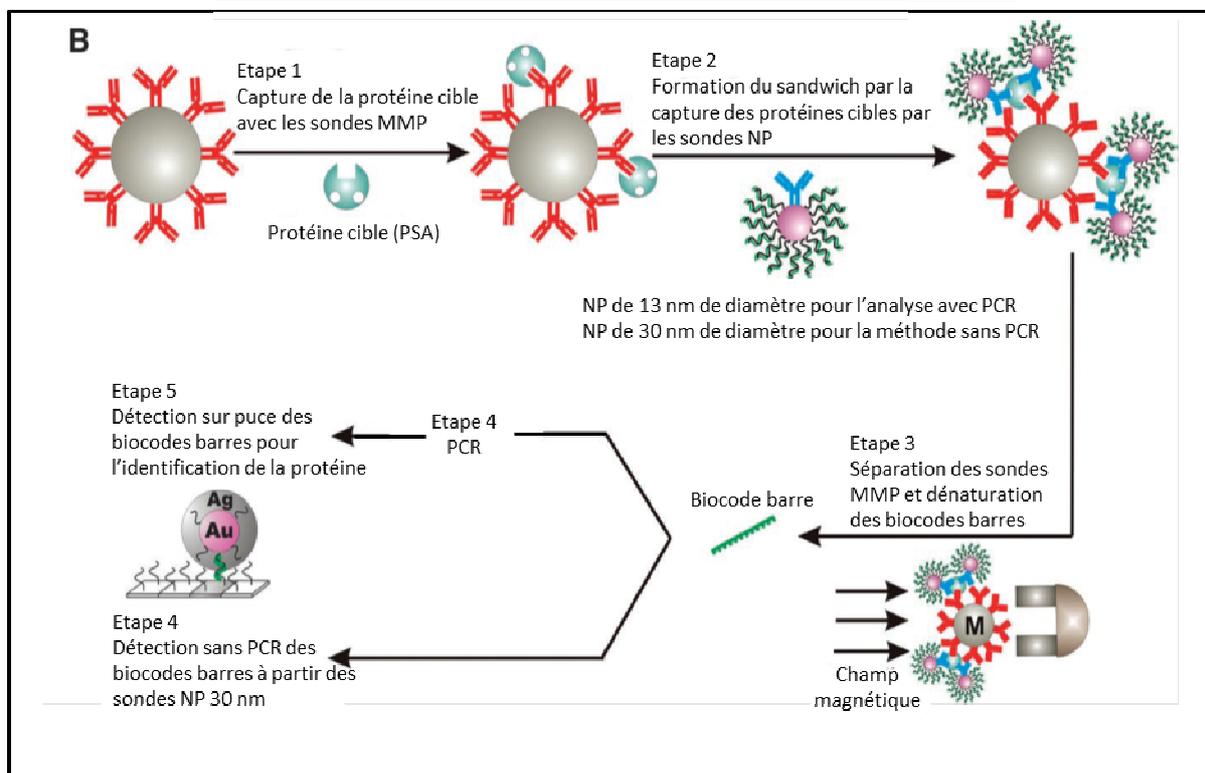
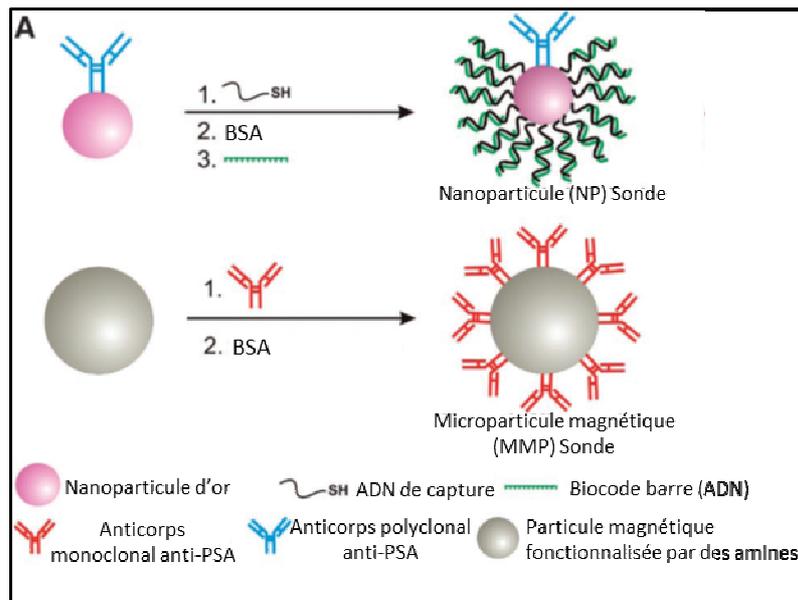


Figure I-9 : Principe de l'analyse par biocode barre développée par Mirkin [35] pour la détection de PSA.

3.2 Les différentes techniques d'analyse des biocodes barres :

Les marqueurs de détection peuvent être de nature différente comme des marqueurs fluorescents [37-40], des marqueurs de révélation (ions d'argent) ou des tags électrochimiques. Les méthodes de détection sont tout aussi variées. On peut citer la scanométrie [36, 37, 39-42], la lecture de la fluorescence sur puces à ADN [38] la

spectrométrie de masse [43], l'électrophorèse capillaire [44] des détections électriques et électrochimiques [45-49].

La méthode scanométrique décrite par Mirkin [50] consiste à considérer comme marqueur de détection les particules d'or portant les biocodes barres et est basée sur des changements de couleur. Ainsi, pour de fortes concentrations en cibles, un changement de couleur du rouge au violet au cours de la précipitation permet de déceler à l'œil nu la présence de la cible recherchée. Cependant, dans la réalité, on recherche de très faibles quantités. Dans ce cas, la détection de la formation du complexe avec la cible peut être détectée en mesurant en solution, la variation d'absorption en UV-Visible (260 nm) lié au changement de taille dû au sandwich. Cette méthode permet de révéler la présence d'une seule mutation mais ne permet pas l'analyse multiplexe [34]. Pour cela, il faut utiliser une puce ADN où chaque plot correspondra à un type de biocode barre et donc à une mutation définie. La révélation des étiquettes sur leur plot correspondant se fera en utilisant une solution d'hydroquinone contenant des ions argent qui au contact des particules d'or seront réduits en argent métallique. Cette décoration des particules d'or par l'argent permet ensuite une détection par simple microscope en enregistrant les différents niveaux de gris sur chacun des plots de la puce (Figure I-10). D'après l'état de l'art, cette méthode de détection, est actuellement la plus sensible. Elle nécessite une quantité de cible inférieure à celle nécessaire pour débiter une PCR. Elle permet la détection d'une concentration en cibles entre 500 fM et 500 zM. Mais le temps de détection important (6 heures) pose un problème pour une application au groupage plaquettaire.

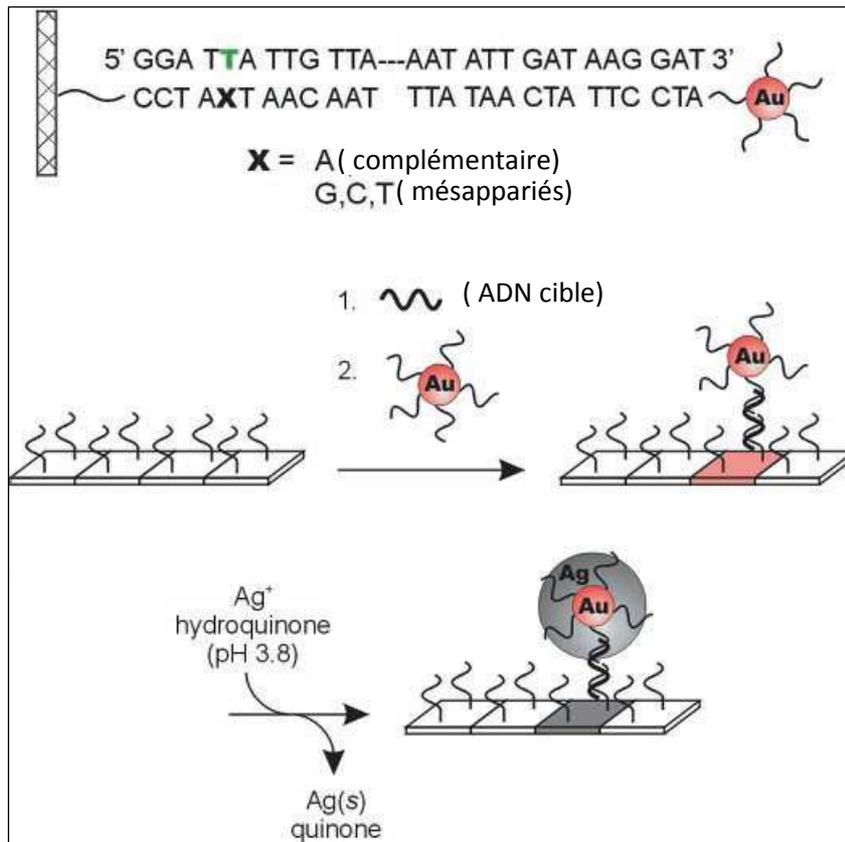


Figure I-10: Technique de détection par scanométrie sur puce (d'après Taton, Mirkin, Letsinger, [50])

Notons que dès 2006, Goluch et al [51] ont montré la possibilité d'insérer cette technique (biocode barre + détection scanométrique) dans un système microfluidique afin d'automatiser à terme ce type d'analyse. Appliqué à la détection de PSA (marqueurs de cancer), le système permet une détection in situ en 80 minutes dans une gamme de 40 pM à 40 fM avec une limite de détection de 10 fM, soit 2 ordres de grandeur de mieux que les systèmes d'analyse par ELISA actuellement utilisés. [52]. Cependant, à l'heure actuelle, cette technique prometteuse n'a été validée que pour la détection d'une seule protéine par analyse.

La méthode électrochimique consiste à marquer les biocodes barres avec un marqueur électrochimique. Ces marqueurs peuvent être soit des ions que l'on va réduire (par exemple Ag⁺ [53], (Ru(NH₃)₆)³⁺, [47] soit des particules métalliques que l'on va oxyder : PbS [46], CdS [45], CuS [48]. La détection des biocodes barres se fait alors via des techniques classiques de mesure d'une réaction redox telles que la voltamétrie cyclique (CV) ou ASV (mesure du courant anodique), la chronocoulométrie, la spectroscopie d'impédances. Les

méthodes électrochimiques sont quantitatives, très sensibles et sélectives. Un exemple de ce type de détection est donné sur la figure I-11. Les biocodes barres accrochés sur la particule d'or sont marqués par des nanoparticules de CdS. Après séparation sous champ magnétique, les sandwiches (et même les billes magnétiques n'ayant rien capturées) sont introduits dans une cellule à 3 électrodes contenant une solution acide permettant à une valeur de potentiel donnée (potentiel Redox) de provoquer la réaction d'oxydation du CdS révélant ainsi leur présence. L'amplitude du pic anodique est proportionnelle à la quantité d'ions Cd^{2+} produits. En prenant la valeur maximale du pic pour différentes concentrations initiales de protéines à détecter, Ding et al , ont déterminé une gamme linéaire de détection de 0,02 to 3,5 ng/ml avec une limite de détection de 9,6 pg/mL, En utilisant d'une part une électrode de travail en or nanoporeux (augmentation de la surface spécifique) et en utilisant comme marqueur électrochimique du chlorure de Ruthénium (transfert de 3 électrons par ions) Hu (2008) parvient à une limite de détection de 28 aM et obtient une gamme de détection de $8. 10^{-17}$ à $1,6. 10^{-12}$ M.

La détection par méthode électrochimique est donc extrêmement sensible et permet un dosage quantitative, mais d'une cible unique. On pourrait envisager une détection multiple à condition d'utiliser différents marqueurs électrochimiques et de s'assurer préalablement de leur compatibilité électrochimique. Ainsi, en balayant en potentiel, on aurait différents pics d'oxydation correspondant chacun à une cible donnée. Cependant, nous n'avons pas trouvé de publications relatant ce type d'expérience. Soulignons aussi, que le marquage des biocodes barres par un marqueur électrochimique n'est pas commercial, il doit être fait au laboratoire à partir de quantum dots. Enfin, aucune discrimination de SNP n'a été à notre connaissance achevée par une méthode de détection électrochimique.

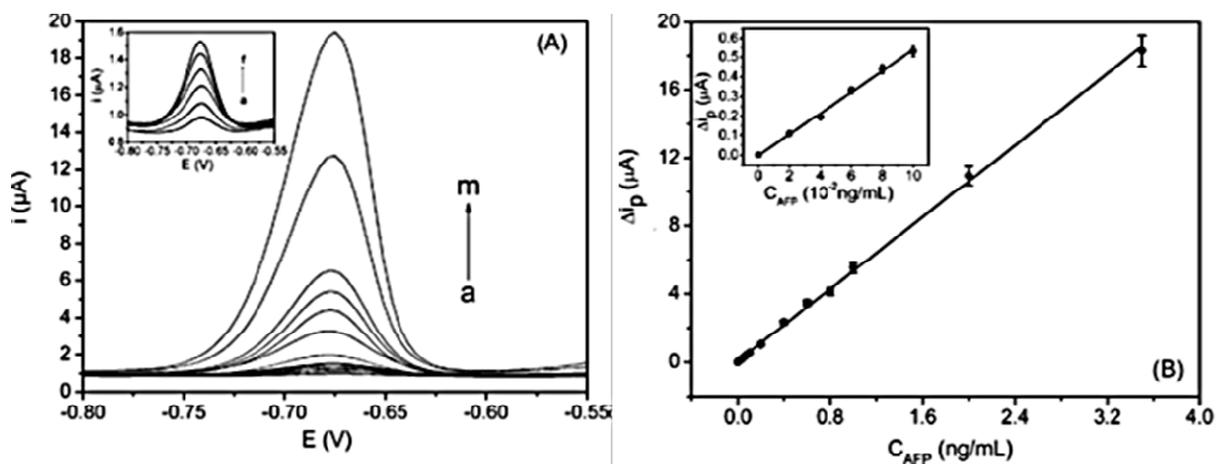
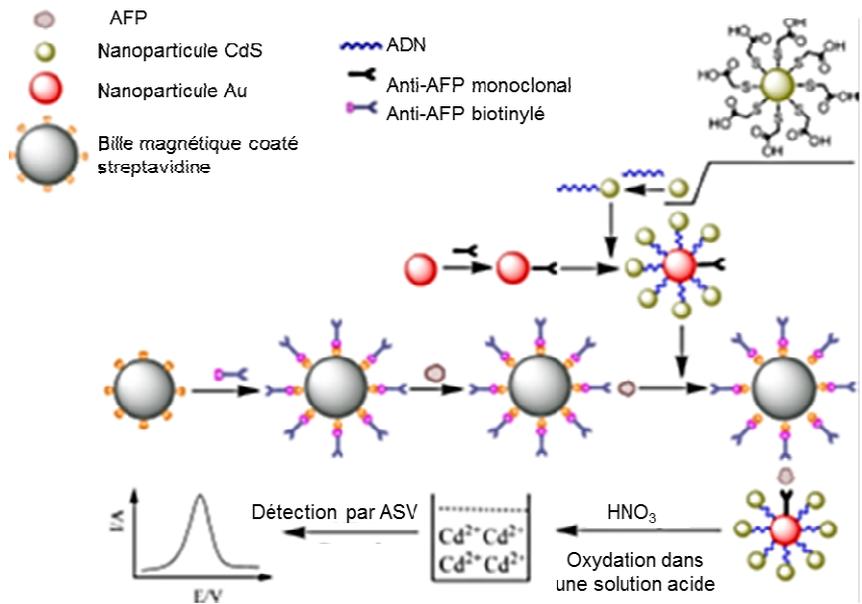


Figure I-11 : Technique de détection par méthode électrochimique d'après Ding 2009 [45]

Un mode de **détection électrique** a été rapporté par Chang et al [54] grâce à l'utilisation d'électrode à nanogap. Dans ce cas, c'est la nanoparticule d'or qui porte les biocodes barres qui est détectée par la mesure du courant de drain (Figure I-12). Une limite de détection de 1 fM a été obtenue. Cette technique nécessite de maîtriser l'élaboration d'un ou mieux de réseaux de transistors à des échelles nanométriques et ceci reste encore à un stade de recherche.

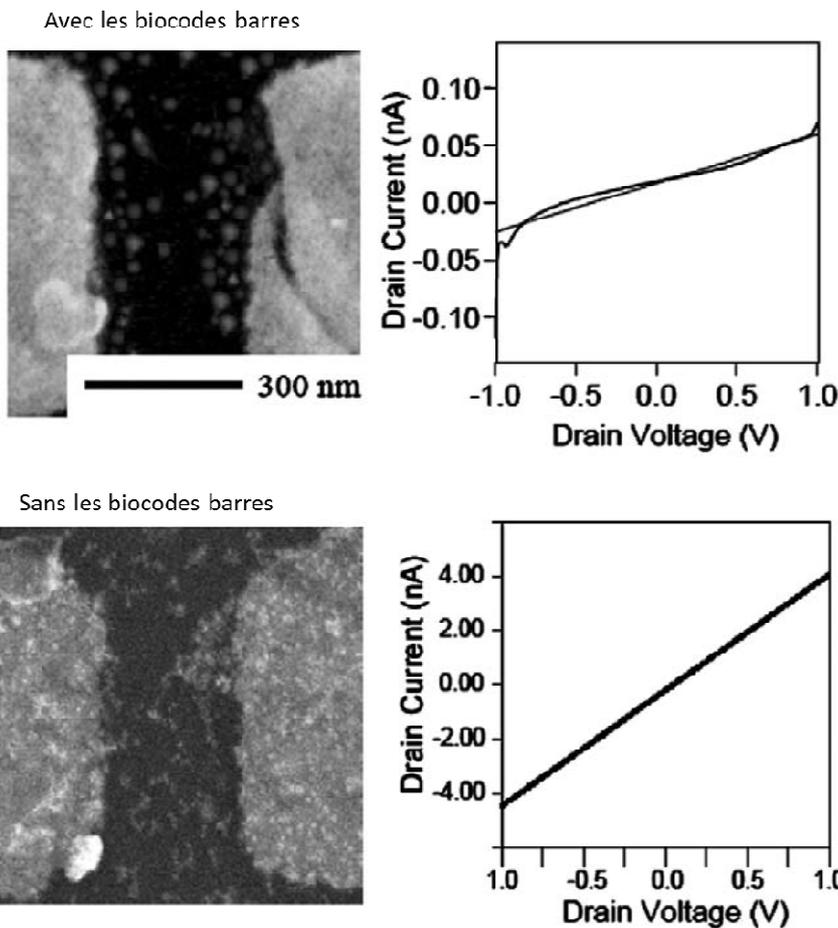
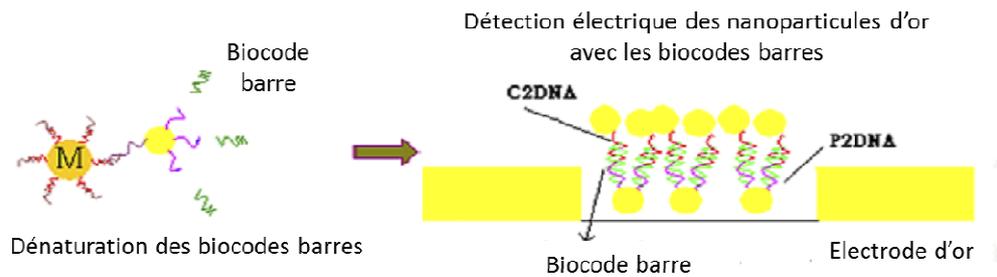


Figure I-12 : Technique de détection électrique d'après Chang 2006 [54]

La détection par marquage fluorescent est largement utilisée sur les puces à ADN et a donc été employée pour les biocodes barres. On retrouve comme marqueur fluorescent attachés aux biocodes barres des marqueurs classiques comme les FITC (fluorescéine) ou des cyanines (Cy3, Cy5). Ainsi Nie et al [38] montrent la possibilité de distinguer une mutation SNP sur une séquence synthétique d'ADN avec un seuil de détection de 1 pM. Un inconvénient de cette méthode est la détection en point final.

Par **électrophorèse capillaire** et en utilisant un appareil commercial (capillary 3730 DNA analyzer de AB I- USA), He et al [44] parviennent en 40 minutes à distinguer 4 virus simultanément avec une limite de détection de 5 pM.

Un mode de détection par **spectrométrie de masse** a été rapporté par Qiu et al. [43]. Les cibles sont hybridées avec des sondes immobilisées sur des plaques de MALDI, on y incube ensuite des particules d'or fonctionnalisées pour reconnaître la cible et détectés par spectromètre de masse Time of Flight (TOF). L'analyse du spectre de masse permet de conclure à la présence de biocodes barres. Une limite de détection de 100 pM a été atteinte. La méthode est encore en phase d'optimisation et de développement.

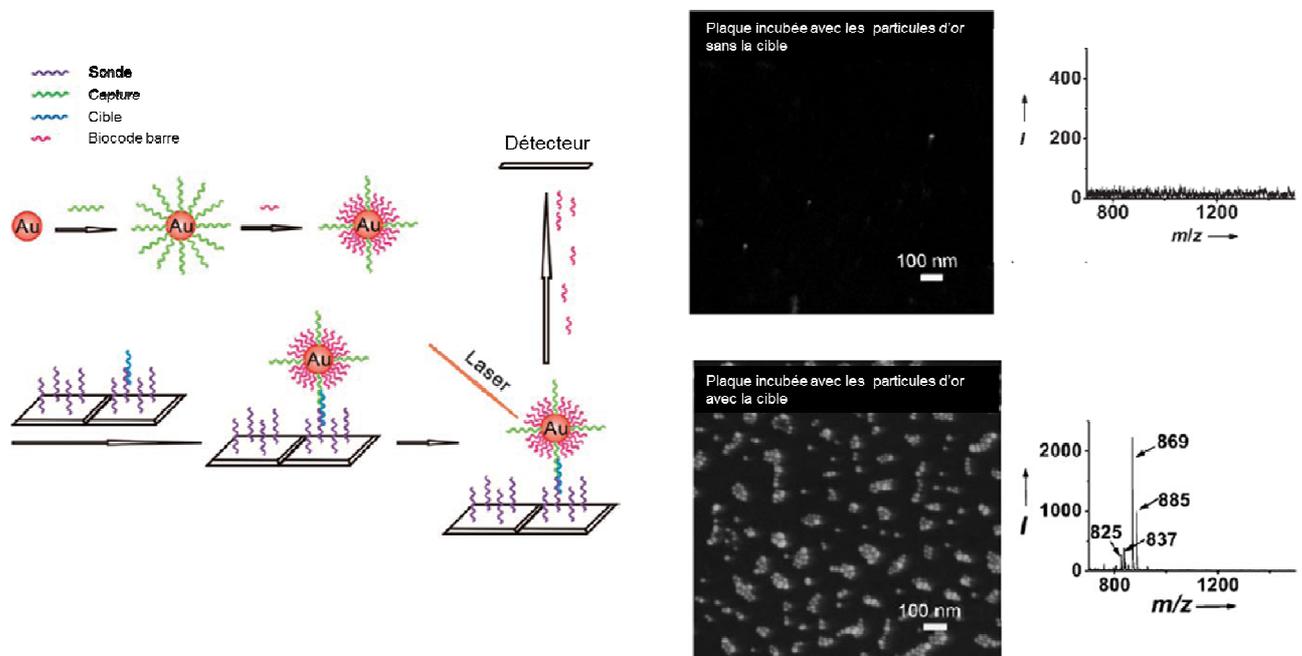


Figure I-13 : Technique de détection par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) d'après Qiu et al[43].

La **méthode électroluminescente** (Figure I-14) utilisée par Zhu et al.[49] consiste à immobiliser les sandwichs formés lors de l'analyse sur une électrode placée dans une cellule électrochimique. On ajoute dans celle-ci un composé chimique qui grâce à l'ajout de courant va former des intermédiaires activés. Ces intermédiaires vont réagir avec les intermédiaires activés du marqueur des biocodes barres, cette réaction chimique va produire de la lumière. On compte alors le nombre de photons produits. Cette méthode permet d'atteindre une limite de détection de 1 fmol de fragments d'ADN de graines de soja génétiquement modifié

présent dans un volume de 25 μl . Les fragments détectés n'ont pas été purifiés avant l'analyse et proviennent de la digestion enzymatique de l'ADN extrait et purifié des graines de soja.

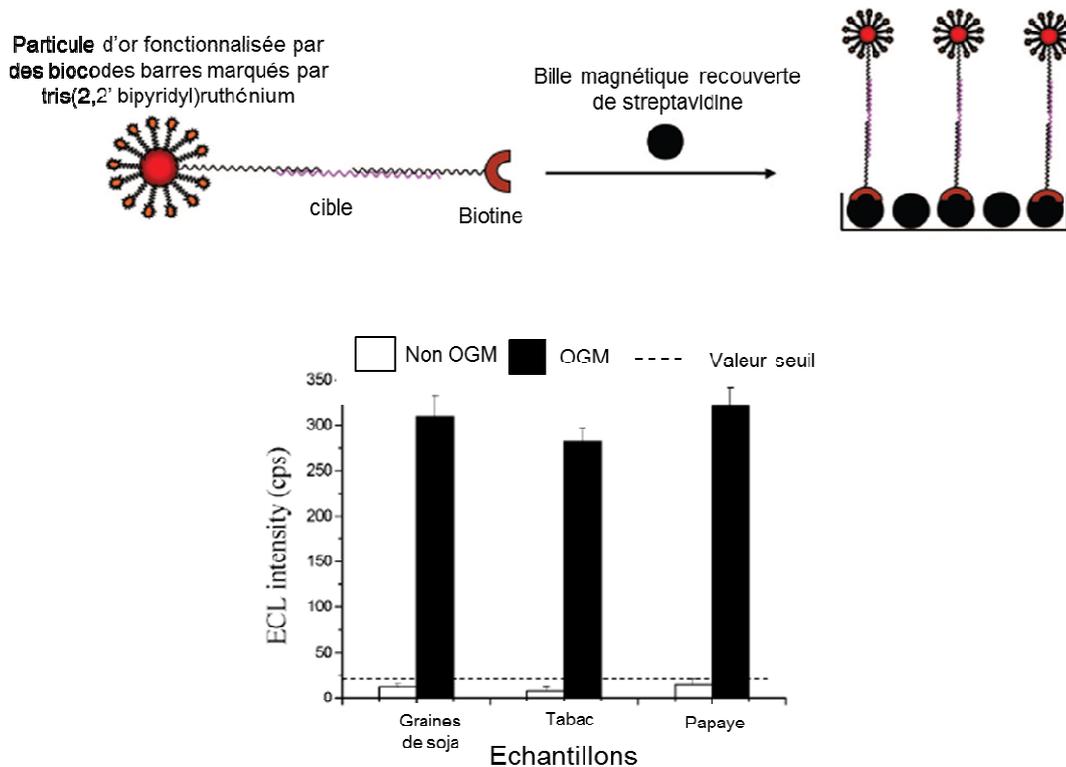


Figure I-14 : Technique de détection par électroluminescence d'après Zhu et al.[49]

Le Tableau I-1 rassemble les performances des différentes techniques de détection utilisée pour la recherche de cibles après amplification par biocode barre. D'après ce tableau, on remarquera que Nam, Stoeva et Mirkin [36] ont montré qu'il était possible de détecter de manière sélective une séquence oligonucléotidique portant une seule mutation à un niveau de 500 zeptomolaire (zM) soit l'équivalent de 10 copies dans un volume total d'échantillon de 30 μl . Ces valeurs permettent de considérer la technique d'amplification par biocode barre comme une alternative à la PCR qui nécessite 5 à 10 copies minimum.

| Références | Méthode de détection | LID | TD | Type de cible | Spécificité | Avantages | Inconvénients |
|---------------------------|---|----------------------------|--------|---------------------------|--|--|--|
| Chang et al. 2006 [54] | Electrique | 1 fM | 2000 s | ADN | | Pas de marquage | Recherche amont |
| Ding et al. 2009 [45]. | Electrochimique CdS + ASV | 4,2 fM | NA | ADN | Détection d'un mésappariement de deux bases | Quantification Dosage | Marquage des BCB avec NP de CdS. Temps d'hybridation 12h. |
| Du et al. 2009[46]. | Electrochimique PbS + ASV | 5 fM | NA | ADN | Détection d'un mésappariement de deux bases | Quantification Dosage | Marquage des BCB avec NP de PbS. |
| Zhang, XR et al. 2009[48] | Electrochimique CuS | 1,5 pM | NA | ADN | | Détection de 1,5 pM d'ADN cible | Le temps d'accumulation est de 240s. |
| Hu et al. 2008[47] | Electrochimique chlorure d'Hexaammineruthenium(III). | 28 aM | NA | | Détection d'un mésappariement d'une base | Le biocapteur à base de verre nanoporeux peut être régénéré. | L'électrode modifiée peut être stockée au réfrigérateur pendant une semaine. |
| He et al. 2008[44] | Electrophorèse capillaire | 5 fM | NA | | Reconnaissance de l'ADN de 4 virus totalement différents | Temps total d'analyse 40 min. Automatisation possible de la totalité du processus | |
| Hill et al. 2007[41] | Scanométrique | 2,5 fM | 6 h | ADN génomique double brin | | | |
| Nam et al. 2004[36] | Scanométrique | 500 zM | 6 h | | Détection d'un mésappariement d'une base | | |
| Stoeva et al. 2006[42] | Scanométrique | 500 fM | 6 h | ADN | | | |
| Thaxton et al. 2005[39] | Scanométrique | 7 aM | 6 h | ADN | | | |
| Thaxton et al. 2005[39] | Fluorescence | 7 pM | NA | ADN | | Le fluomètre peut analyser des plaques de 96 puits | |
| Nie et al. 2009[38] | Fluorescence | 1 pM | NA | ADN | Polymorphisme mononucléotidique | | Analyse des BCB sur puce à ADN:. |
| Zhang, D et al. 2009[40] | Fluorescence | $2,15 \times 10^{-16}$ mol | NA | ADN | | Détection de $2,15 \times 10^{-16}$ mol d'ADN cible. | |
| Qiu et al. 2008[43] | Spectrométrie de masse | 100 pM | NA | | | Le multiplexage peut être simple | |
| Zhu et al. 2008[43] | Electro luminescence | 1 fmol | NA | | | Détection rapide | Détection de 1 fmol dans 25 µl |

Tableau I-1 : Comparaison des performances des analyses par biocodes barres dans la littérature. « LID » indique la limite inférieure de détection. « TD » correspond au temps de détection de la méthode d'analyse utilisée après une amplification par biocode barre.

De plus, si la PCR permet d'amplifier le matériel génétique (ADN), la technique de biocode barre est basée sur l'amplification d'un signal lié à un évènement de reconnaissance. Elle peut donc être adaptée pour toute cible biomoléculaire (ADN, protéines, glycomimétiques...) contrairement à la PCR.

4 Conclusion et objectifs

En science transfusionnelle, la compatibilité entre donneur et receveur est un enjeu majeur. La compatibilité de transfusion des groupes ABO et Rh est effective depuis des années. Cependant, ces groupes sanguins érythrocytaires ne sont pas les seuls à devoir être pris en compte dans la compatibilité transfusionnelle, il faut aussi prendre en compte les groupes plaquettaires. Dans ce cadre, différentes méthodes d'identification des antigènes ont été développées. La méthode sérologique permettant le phénotypage des groupes plaquettaires comporte de nombreux inconvénients (manque de sérums monoclonaux monospécifiques, méthode longue...) aussi, les méthodes de génotypage par PCR lui sont préférées en routine. Cependant, la PCR comporte elle aussi des inconvénients. Une alternative possible à la PCR est la technique d'analyse par biocode barre qui repose sur des étapes de capture, de reconnaissance et d'amplification indirecte de l'ADN et peut être couplée avec de nombreuses méthodes de détection permettant de détecter un faible nombre de copies.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons développé une analyse par biocode barre couplé avec un nouveau biocapteur à ondes évanescentes en nous servant comme modèle du système biallélique HPA-1. Dans la suite de ce manuscrit, nous présentons les étapes de mise au point des différents éléments du biocode barre, les propriétés du nouveau biocapteur à ondes évanescentes et les performances obtenues de l'analyse par biocode barre couplée à notre moyen de détection.

5 Références bibliographiques

1. Provan, D., *ABC of clinical Haematology*. second edition ed. Vol. 1. 2003: BMJ Books. 75.
2. von Decastello, A. and A. Sturli, *Ueber die Isoagglutinine im Serum gesunder und kranker Menschen*. Münchener Medizinische Wochenschrift, 1902. **49**: p. 1090-1095.
3. Landsteiner, K., *Ueber agglutinationerscheinungen normalen menschlichen Blutes*. Wiener Klinische Wochenschrift, 1901. **14**: p. 1132-1134.
4. Landsteiner, K., *Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe*. Zentralbl Bakteriol [B], 1900. **27**: p. 361.
5. Landsteiner, K. and A.S. Wiener, *An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1940. **43**: p. 223.
6. Levine, P. and R.E. Stetson, *An unusual case of intra-group agglutination*. J Am Med Assoc, 1939. **113**(2): p. 126-127.
7. Dausset, J., *Iso-leuco-anticorps*. Acta Haematologica, 1958. **20**(1-4): p. 156.
8. Van Loghem, J.J., et al., *Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw)*. Vox Sanguinis, 1959. **4**(2): p. 161 -169.
9. Metcalfe, P., et al., *Nomenclature of human platelet antigens*. Vox Sanguinis, 2003. **85**(3): p. 240-245.
10. Bertrand, G. and C. Kaplan, *[Genotyping applied to platelet immunology: when? How? Limits]*. Transfus Clin Biol, 2009. **16**(2): p. 164-9.
11. Phillips, D.R. and P.P. Agin, *Platelet membrane defects in Glanzmann's thrombasthenia. Evidence for decreased amounts of two major glycoproteins*. Journal Of Clinical Investigation, 1977. **60**(3): p. 535-45.
12. Caen, J.P., et al., *Bernard-Soulier syndrome: a new platelet glycoprotein abnormality. Its relationship with platelet adhesion to subendothelium and with the factor VIII von Willebrand protein*. J Lab Clin Med, 1976. **87**(4): p. 586-96.
13. de Vries, L.S., et al., *Recurrent intracranial haemorrhages in utero in an infant with alloimmune thrombocytopenia. Case report*. Br J Obstet Gynaecol, 1988. **95**: p. 299 - 302.
14. Winters, J.L., et al., *Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia due to Anti-HPA-1b (PL^{A2}) (Zw^b)*. Vox Sanguinis, 1998. **74**(4): p. 256-259.
15. Rebutta, P., *A mini-review on platelet refractoriness*. Haematologica, 2005. **90**(2): p. 247-253.
16. Barnes, W.L., et al., *Photonic surfaces for surface plasmon polaritons*. J. Opt. Soc. Am. A, 1997. **14**: p. 1654.
17. Bennett, J.S. and G. Vilaire, *Exposure of platelet fibrinogen receptors by ADP and epinephrine*. The Journal of clinical investigation, 1979. **64**(5): p. 1393-401.
18. Zimrin, A.B., et al., *Structure of platelet glycoprotein IIIa. A common subunit for two different membrane receptors*. Journal Of Clinical Investigation, 1988. **81**(5): p. 1470-5.
19. Wagner, C.L., et al., *Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets*. Blood, 1996. **88**(3): p. 907.
20. Kunicki, T.J. and P.J. Newman, *The Molecular Immunology Of Human Platelet Proteins*. Blood, 1992. **80**(6): p. 1386-1404.
21. Newman, P.J., R.S. Derbes, and R.H. Aster, *The Human-Platelet Alloantigens, Pia1 And Pia2, Are Associated With A Leucine-33 Proline-33 Amino-Acid Polymorphism In Membrane Glycoprotein Iiia, And Are Distinguishable By Dna Typing*. Journal Of Clinical Investigation, 1989. **83**(5): p. 1778-1781.
22. Lucas, G.F. and P. Metcalfe, *Platelet and granulocyte glycoprotein polymorphisms*. Transfusion Medicine, 2000. **10**(3): p. 157-174.
23. Kiefel, V., et al., *Monoclonal-Antibody Specific Immobilization Of Platelet Antigens (Maipa) - A New Tool For The Identification Of Platelet-Reactive Antibodies*. Blood, 1987. **70**(6): p. 1722-1726.

24. Norton, A., D.L. Allen, and M.F. Murphy, *Review: platelet alloantigens and antibodies and their clinical significance*. *Immunohematology*, 2004. **20**(2): p. 89-102.
25. Hurd, C.M., et al., *Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms*. *Vox Sanguinis*, 2002. **83**(1): p. 1-12.
26. Metcalfe, P. and A.H. Waters, *Hpa-1 Typing By Pcr Amplification With Sequence-Specific Primers (Pcr-Ssp) - A Rapid And Simple Technique*. *British Journal Of Haematology*, 1993. **85**(1): p. 227-229.
27. Merieux, Y., et al., *Human platelet antigen frequencies of platelet donors in the French population determined by polymerase chain reaction with sequence-specific primers*. *Pathologie Biologie*, 1997. **45**(9): p. 697-700.
28. <http://www.progenika.com/eu/images/stories/pdf/brochure/Brochure%20BLOODchipD.pdf>.
29. Mullis, K., et al., *Process for amplifying, detecting, and/or cloning nucleic acid sequences*, USPTO, Editor. 1987, Cetus Corporation: USA.
30. Mullis, K., *Process for amplifying nucleic acid sequences*, USPTO, Editor. 1987, Cetus Corporation: USA.
31. Gelfand, D., et al., *Purified thermostable enzyme*, USPTO, Editor. 1989, Cetus Corporation: USA.
32. http://www.roche.com/investors/ir_update/inv-update-2005-09-12.htm.
33. Ameziane, N., et al., *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique*. Campus référence, ed. Elsevier. 2005, Paris: Elsevier. XIII, 705 p.
34. Nam, J.M., S.J. Park, and C.A. Mirkin, *Bio-barcode based on oligonucleotide-modified nanoparticles*. *Journal Of The American Chemical Society*, 2002. **124**(15): p. 3820-3821.
35. Nam, J.M., C.S. Thaxton, and C.A. Mirkin, *Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins*. *Science*, 2003. **301**(5641): p. 1884-1886.
36. Nam, J.M., S.I. Stoeva, and C.A. Mirkin, *Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity*. *Journal Of The American Chemical Society*, 2004. **126**(19): p. 5932-5933.
37. Hill, H.D. and C.A. Mirkin, *The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange*. *Nature Protocols*, 2006. **1**(1): p. 324-336.
38. Nie, L.B., et al., *Amplification of Fluorescence Detection of DNA Based on Magnetic Separation*. *Analytical Sciences*, 2009. **25**(11): p. 1327-1331.
39. Thaxton, C.S., et al., *A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(24): p. 8174-8178.
40. Zhang, D., D.J. Carr, and E.C. Alcocilja, *Fluorescent bio-barcode DNA assay for the detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(5): p. 1377-1381.
41. Hill, H.D., R.A. Vega, and C.A. Mirkin, *Nonenzymatic detection of bacterial genomic DNA using the bio bar code assay*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(23): p. 9218-9223.
42. Stoeva, S.I., et al., *Multiplexed DNA detection with biobarcoded nanoparticle probes*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2006. **45**(20): p. 3303-3306.
43. Qiu, F., et al., *Monolayer-barcoded nanoparticles for on-chip DNA hybridization assay*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008. **47**(27): p. 5009-5012.
44. He, M.X., et al., *Rapid bio-barcode assay for multiplex DNA detection based on capillary DNA Analyzer*. *Journal Of Virological Methods*, 2008. **151**(1): p. 126-131.
45. Ding, C.F., et al., *Electrochemical detection of DNA hybridization based on bio-bar code method*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(10): p. 3140-3143.
46. Du, P., H.X. Li, and W. Cao, *Construction of DNA sandwich electrochemical biosensor with nanoPbS and nanoAu tags on magnetic microbeads*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(11): p. 3223-3228.

47. Hu, K.C., et al., *Electrochemical DNA Biosensor Based on Nanoporous Gold Electrode and Multifunctional Encoded DNA-Au Bio Bar Codes*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(23): p. 9124-9130.
48. Zhang, X.R., et al., *Amplified electrochemical aptasensor for thrombin based on bio-barcode method*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **25**(1): p. 259-262.
49. Zhu, D.B., et al., *PCR-free quantitative detection of genetically modified organism from raw materials. An electrochemiluminescence-based bio bar code method*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(10): p. 3566-3571.
50. Taton, T.A., C.A. Mirkin, and R.L. Letsinger, *Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes*. Science, 2000. **289**(5485): p. 1757-1760.
51. Goluch, E.D., et al., *A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection*. Lab On A Chip, 2006. **6**(10): p. 1293-1299.
52. Goluch, E.D., et al., *A microfluidic detection system based upon a surface immobilized biobarcode assay*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **24**(8): p. 2397-2403.
53. Cai, H., et al., *An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label*. Analyst, 2002. **127**(6): p. 803.
54. Chang, T.L., et al., *Electrical detection of DNA using gold and magnetic nanoparticles and bio bar-code DNA between nanogap electrodes*. Microelectronic Engineering, 2006. **83**(4-9): p. 1630-1633.

Chapitre 2 : Biocodes barres modifiés et couplés à l'analyse par Evareader

Nous avons vu précédemment les problématiques liées au typage plaquettaire et les méthodes d'analyse actuelles qui font appel à des techniques d'amplification par PCR. Un enjeu majeur pour l'Etablissement Français du Sang est l'amélioration des outils d'analyse pour le typage plaquettaire. Aussi, un des objectifs de ce travail est d'étudier des solutions alternatives permettant de s'affranchir :

- i) de l'utilisation de la PCR (brevetée) pour les analyses de biologie moléculaire.
- ii) des brevets déposés par l'équipe de Mirkin [1] concernant les biocodes barres, tout en parvenant à des gammes de détection similaires.

Dans ce chapitre, nous présentons donc le travail réalisé pour la mise au point d'une analyse par biocode barre adaptée au typage plaquettaire et couplée à une détection par biocapteur à onde évanescente.

L'originalité de notre analyse se situe dans l'utilisation combinée:

- de billes de latex pour l'élaboration des biocodes barres. Dans tous les travaux reportés dans la littérature et les brevets correspondants, les biocodes barres sont élaborés à partir de particules d'or fonctionnalisées.
- d'un biocapteur par onde évanescente.

Dans un premier temps, nous décrivons les étapes d'élaboration et de caractérisation des différents éléments nécessaires à l'analyse par biocodes barres pour le typage plaquettaire. Nous décrivons le principe de détection par biocapteur à onde évanescente, la conception de l'appareil de mesure particulièrement adapté à des tests en série. Et les deux stratégies analytiques développées pour la détection des biocodes barres. Puisque les performances des stratégies analytiques dépendent de la fonctionnalisation des différents éléments et de certains paramètres concernant l'analyse, nous discutons des résultats expérimentaux de caractérisation et d'optimisation des éléments utilisés dans une analyse

par biocode barre. Enfin, nous comparons les performances des deux stratégies analytiques entre elles et par rapport à la littérature.

1 Les éléments du biocode barre

1.1 Principe

L'analyse par biocode barre (Figure II-1) fait intervenir deux éléments majeurs: (i) une microparticule magnétique greffée avec une sonde spécifique capable de reconnaître de manière très sélective la cible d'intérêt et (ii) une nanoparticule sur laquelle sont greffées une seconde sonde de capture et de très nombreux ADN double brins. En fait ces ADN sont des oligonucléotides simple brin complémentaires et donc capables de s'hybrider. Le Biocode barre (noté BCB) est l'oligonucléotide marqué par un fluorophore. La séquence complémentaire (noté biocode barre complémentaire ou cBCB) est l'oligonucléotide fixé sur la nanoparticule. L'idée est de former un sandwich autour de la cible d'intérêt à l'aide de la particule magnétique et de la nanoparticule portant les biocodes barres fluorescents. Après réaction avec le milieu d'analyse, un champ magnétique permet de concentrer et de collecter les sandwiches et les billes magnétiques n'ayant rien capturées. Cependant, seuls les sandwiches complets sont porteurs de sondes fluorescentes. Ainsi, si la reconnaissance entre l'ADN cible et la sonde greffée sur la bille magnétique est effective, on récupère le sandwich complet et donc les BCB fluorescents qui vont donner un signal de fluorescence. Si la reconnaissance entre l'ADN cible et la sonde greffée sur la bille magnétique ne se fait pas, on ne récupère pas le sandwich complet et les BCB fluorescents sont éliminés avec le milieu réactionnel, on n'obtient donc pas de signal de fluorescence. Les solutions finales contenant ou non les biocodes barres fluorescents sont analysées à l'aide d'un capteur ou d'une puce à ADN dont on analyse la fluorescence. Cette technique permet une amplification du signal de reconnaissance de la cible recherchée.

Dans les travaux de C. Mirkin, précurseur de l'analyse par biocode barres, les nanoparticules sont en or pour permettre ensuite une détection par scanométrie. Ensuite, tous les autres travaux rapportés dans la littérature ont également été développés à partir de nanoparticules d'or quelque soit le mode de détection utilisée. Pour nos travaux, nous avons utilisé des billes de latex (Sigma) qui portent des groupements carboxyles en surface et nous

permettent d'utiliser les protocoles d'activation et de greffage des surfaces déjà développées au Laboratoire.

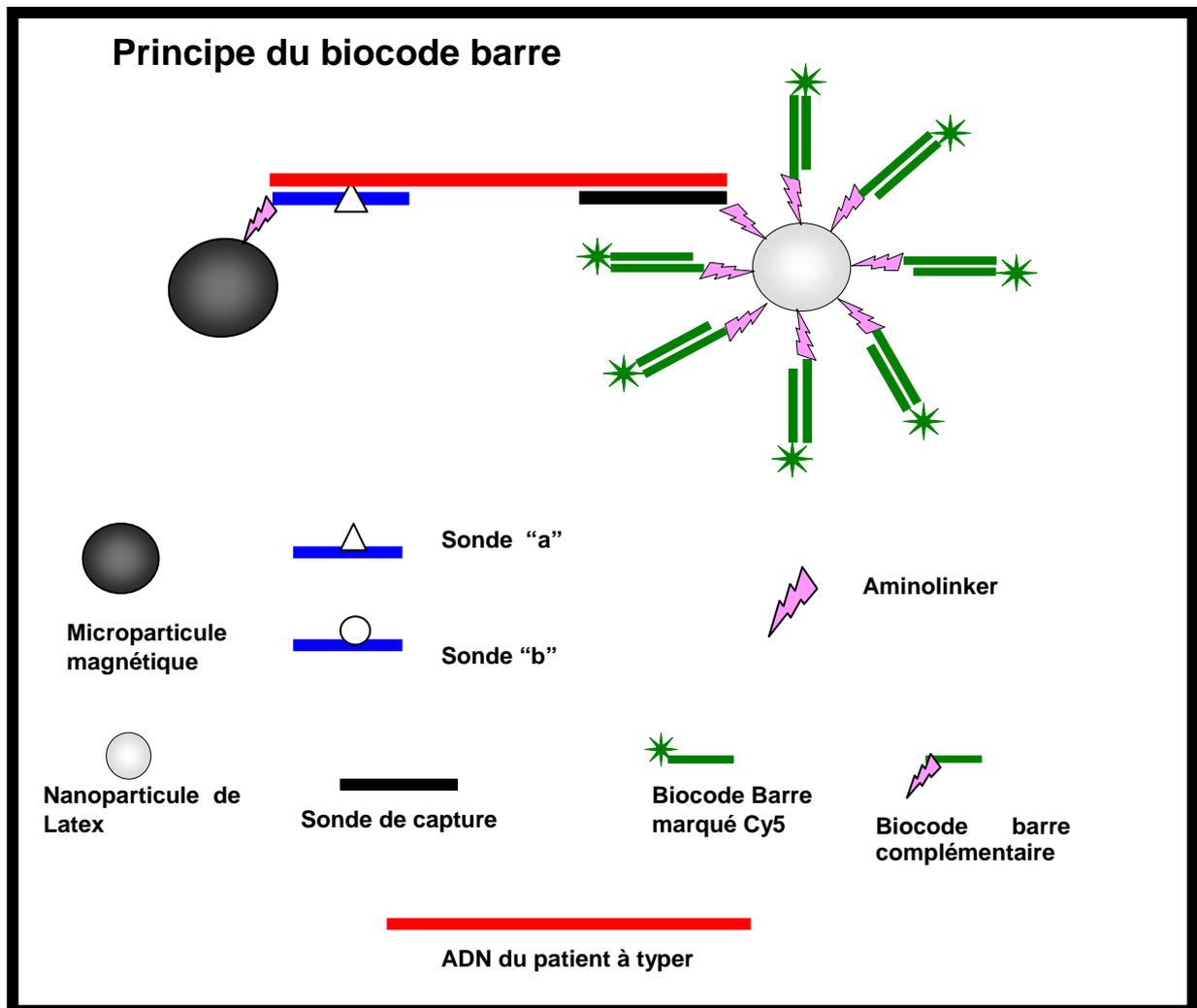


Figure II-1 : Les différents éléments du sandwich permettant une analyse par biocode barres

1.2 Modèle biologique

Le système biologique utilisé pour valider l'analyse par biocode barre est le système HPA-1 [2]. Ce système est composé de deux allèles, différant entre eux d'un seul nucléotide (formes HPA-1a et HPA-1b). La détection du génotype HPA-1 par hybridation sur puce à ADN a déjà été étudiée au laboratoire [2, 3]. Les billes magnétiques seront donc greffées soit avec les sondes spécifiques HPA-1a (noté sonde a) ou HPA-1b (noté sonde b). Les sondes sont des séquences oligonucléotidiques de 25 mers avec la base mutante placée en position centrale. L'ajout de 6 carbones avec un aminolinker en terminaison 3' permet d'immobiliser

la sonde de manière covalente sur le support. Les carbones jouent le rôle d'espaceur afin de réduire un possible effet de la surface sur les mécanismes d'hybridation. Dans notre modèle biologique, l'ADN de patient est représenté par des séquences de 84 mers notés cible a (HPA-1a) ou cible b (HPA-1b). Elles ont été déterminées en fonction des amorces de PCR disponibles. Les séquences sont données sur le Tableau II-1.

Les billes de latex sont doublement biofonctionnalisées par un oligonucléotide de capture de l'ADN cible et le complémentaire du biocode barre (cBCB) sur lequel le biocode barre fluorescent (BCB) est hybridé. La sonde de capture de 31 mers est complémentaire des cibles a et b.

Selon la stratégie de détection testée, on a utilisé 2 familles biocodes barres (BCB) :

- 1) des BCB formés d'une séquence 15 mers portant un groupement fluorescent Cy5 et leur complémentaire (cBCB) portant un aminolinker qui permet leur immobilisation covalente sur la bille de latex. Les barrettes (cf. partie 2.2 et 2.3.1) ont été fonctionnalisées avec des sondes biotinyllées de même séquence que les cBCB. Cette séquence permet une hybridation dans les puits des barrettes à la température régnant dans l'appareil car l'utilisation d'une séquence plus longue (comme ci-après) aurait nécessité une étape de chauffage du surnageant pour permettre l'hybridation dans les cuvettes.
- 2) Une deuxième famille de BCB formés de la même séquence de 15 mers portant un groupement fluorescent Cy5, auquel on a rajouté une biotine. Pour éviter les problèmes d'encombrement stérique entre Cy5 et Biotine et afin que la présence de la biotine n'entrave l'hybridation avec les cBCB, 15 bases A ont été rajoutées. Les cBCB portent la séquence complémentaire au BCB et un groupement aminolinker pour sa fixation sur les billes de latex. L'ajout de bases A sur les BCB et de bases T sur les cBCB permet, de plus, de rapprocher la température d'hybridation de celle utilisée entre les sondes HPA-1 et les oligonucléotides cibles, il sera possible à terme d'effectuer toutes les hybridations en une unique étape.

| Nom | Séquences des oligonucléotides (5' -> 3') |
|---|--|
| Oligonucléotide sonde allèle HPA-1a (sonde «a»)* | CGAGGTGAGCCC <u>A</u> GAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Oligonucléotide sonde allèle HPA-1b (sonde «b»)* | CGAGGTGAGCCC <u>G</u> GAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| AL-HPA1aAS18-Cy3 | Cy3-AGCCC <u>A</u> GAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Oligonucléotide de capture (capture) | GGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Sonde biotinylée | ATGCCCTCTTTGATATT-biotine |
| Complémentaire du biocode barre pour l'expérience ODN-ODN (cBCB+2T) | ATGCCCTCTTTGATATT-C ₆ -NH ₂ |
| Biocode barre pour l'expérience ODN-ODN (BCB) | Cy5-TATCAAAGAGGGCAT |
| Complémentaire du biocode barre pour les expériences ODN-biotine / neutravidine (cBCB+15T) | ATGCCCTCTTTGATATTTTTTTTTTTTTTTTTT-C ₆ -NH ₂ |
| Biocode barre marqué Cy5 et biotinylé pour (biot-BCB) | Cy5(biotine)-AAAAAAAAAAAAAAAAATATCAAAGAGGGCAT |
| Oligonucléotide cible allèle HPA-1a (cible «a»)* | GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGT GACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA |
| Oligonucléotide cible allèle HPA-1b (cible «b»)* | GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>C</u> GGGCTCACCTCGCTGT GACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA |

Tableau II-1 : Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'analyse par biocode barre et la caractérisation de ses éléments. Les SPN sont soulignés dans les séquences d'ADN.

1.3 Fonctionnalisation et caractérisation des billes magnétiques

1.3.1 Biofonctionnalisation des billes magnétiques (MB)

Préparation des tubes eppendorfs

Etant donné que l'on travaille avec de très faibles concentrations de matériels, il est important de limiter l'adsorption non spécifique des oligonucléotides et des billes magnétiques sur les parois des tubes de stockage ou d'analyse. Aussi, on prépare autant de tubes eppendorfs de 1,5 ml que nécessaires pour une analyse. Les tubes sont remplis d'une solution d'albumine de sérum bovin (BSA) à 4% en masse dans du PBS 1X (pH 7,4). On laisse incuber les tubes pendant 2h dans une étuve à 37°C. Ils sont par la suite vidés et séchés. Les tubes ainsi préparés sont dit bloqués par la BSA qui limite les phénomènes d'adsorption. Toutes les étapes de fonctionnalisation de billes magnétiques et de billes de latex ont été réalisées en utilisant des tubes eppendorfs préalablement « bloqués ».

Préparation des billes magnétiques (étape 1)

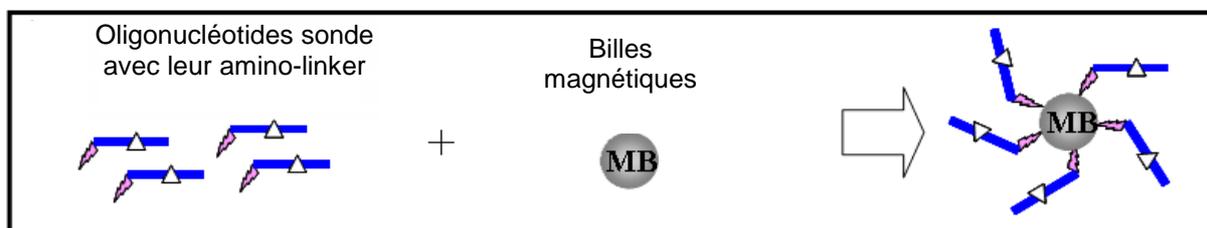


Figure II-2 : Schéma de greffage des billes magnétiques.

10 μ l de billes magnétiques dans leur tampon de stockage sont transférées dans des tubes eppendorfs et suspendues dans 490 μ l d'eau ultrapure. On utilise ensuite un aimant néodyme pour procéder à une séparation magnétique. L'aimant attire les billes permettant ainsi de pipeter la totalité du surnageant. On suspend les billes dans 500 μ l d'eau ultrapure. Ce procédé de lavage est appliqué 3 fois successivement puis les billes sont suspendues dans 450 μ l de PBS 1X.

Les billes magnétiques ont en surface des fonctions carboxyliques que l'on active par la chimie classique NHS/carbodiimide à partir d'une solution d'activation (1 ml de PBS

1X + 4 mg EDCI + 4 mg NHS) [4]. Pour éviter l'hydrolyse du carbodiimide en solution aqueuse, la solution d'activation est préparée au moment de s'en servir.

On ajoute 50 µl de solution d'activation dans chacun des tubes et les billes sont incubées sous agitation à 550 rpm pendant 2h à 25°C dans un thermomixer. Une fois l'activation terminée, les billes sont lavées en suivant la même procédure que décrite ci-dessus en remplaçant l'eau par du PBS 1X.

Après le troisième lavage au PBS 1X, les billes magnétiques sont suspendues dans 450µl de PBS 1X. On ajoute dans chacun des tubes 50 µl d'une solution à 25 µM dans du PBS 1X, les oligonucléotides sonde « a » ou sonde « b » suivant l'analyse que l'on veut faire. On obtient ainsi une concentration finale pour le greffage de sondes spécifiques de 2,5 µM. Notons que ces oligonucléotides portent un aminolinker qui permet un greffage covalent à la surface des billes via les fonctions acides carboxyliques activées. L'incubation des billes s'effectue dans un thermomixer sur la nuit (15 h) à 25°C et sous agitation constante (550 rpm). Les billes magnétiques ainsi greffées sont lavées avec du SSC 5X en suivant la procédure décrite ci-dessus et sont finalement suspendues dans 450 µl de SSC 5X en attendant d'être utilisées pour une analyse par biocode barre. De par la nature des séparations utilisées lors des lavages des billes magnétiques, la quasi totalité des billes est récupérée lors des différentes étapes. Les billes magnétiques fonctionnalisées peuvent être conservées pendant 1 mois à température ambiante.

1.3.2 Caractérisation par spectrofluorimétrie

Il est nécessaire de s'assurer que le protocole de biofonctionnalisation des billes magnétiques est effectif, aussi, dans un premier temps, les billes ont été fonctionnalisées avec des oligonucléotides fluorescents afin de les caractériser par spectrofluorimétrie.

Dans le cadre de cette analyse, on a mesuré la fluorescence 1) des billes magnétiques seules, 2) des billes magnétiques non activées mises en présence de 20 µM d'oligonucléotides sondes marqués avec du Cy3 (AL-HPA1aAS18-Cy3) et 3) des billes magnétiques activées mises en présence de 20 µM d'oligonucléotides sondes marqué avec

du Cy3 et on les a comparé à la fluorescence des oligonucléotides sondes marqués Cy3 en solution à une concentration de 20 nM (Figure II-3). La longueur d'excitation est de 530nm.

La solution de billes magnétiques utilisée comme blanc ne présente aucune fluorescence (courbe bleue) ce qui indique que les billes magnétiques seules ne fluorescent pas à la longueur d'excitation utilisée. La fluorescence des sondes libres en solution présente un pic à 566 nm (courbe rouge) qui correspond à la fluorescence du Cy3 pour les oligonucléotides sondes.

Les billes magnétiques activées mises en présence de la sonde AL-HPA1aAS18-Cy3 (courbe rose) donnent un pic de fluorescence à 576 nm. La différence de longueur d'onde de l'apparition du pic de fluorescence entre les sondes libres et les sondes mises en présence des MB activées est due à l'interaction entre les fluorophores et leur environnement chimique (proximité de la surface, composition de la surface...).

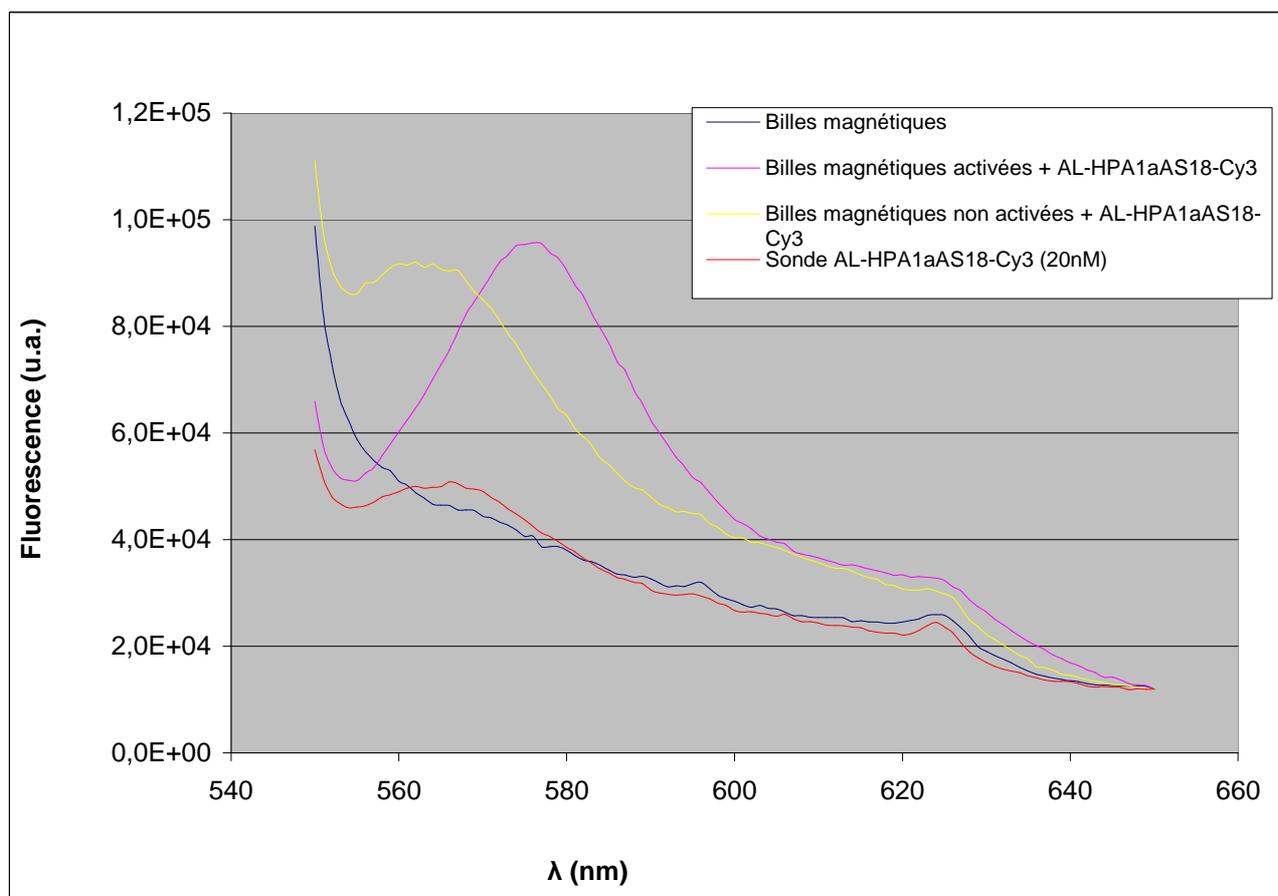


Figure II-3 : Analyse par spectrofluorimétrie des billes magnétiques. Bleue : fluorescence des billes magnétiques seules. Jaune : fluorescence des billes magnétiques activées mises en présence des oligonucléotides sondes marqués Cy3. Rose : fluorescence des billes magnétiques non activées mises en présence des oligonucléotides sondes marqués Cy3. Rouge : fluorescences des oligonucléotides sondes marqués Cy3 en solution pour une concentration de 20 nM.

Cependant les billes magnétiques non-activées puis mises en présence de la sonde (courbe jaune) montrent elles aussi un pic de fluorescence à 562 nm correspondant à la fluorescence du Cy3. On distingue donc la présence d'oligonucléotides fluorescents pour les billes non activées. La différence de longueur d'onde de fluorescence observée entre les MB activées et non activées est probablement due à la présence d'une liaison covalente entre les sondes et les MB activées alors que les sondes ne sont qu'adsorbées physiquement (faible liaison) sur les MB non activées.

La ligne de base étant différente pour chacun des spectres, il est difficile d'établir une courbe d'étalonnage en fluorescence pour une éventuelle quantification. On a quantifié les concentrations en sondes présentes sur les billes en calculant les aires des pics par pesée (Tableau II-2).

| Courbes | Poids du pic | Concentrations en sonde |
|------------------------------------|--------------|-------------------------|
| Sondes AL-HPA1aAS18-Cy3 libres | 7 mg | 20 nmol/l |
| MB non activées + AL-HPA1aAS18-Cy3 | 13 mg | 37 nmol/l |
| MB activées + AL-HPA1aAS18-Cy3 | 46 mg | 130 nmol/l |

Tableau II-2 : Quantifications des sondes AL-HPA1aAS18-Cy3 par pesée des pics de spectrofluorimétrie.

La quantification est rendue difficile du fait du changement de longueur d'onde préférentielle et de la convolution du spectre d'émission avec l'excitation lumineuse à cause de la diffusion de la lumière par les billes en solution.

C'est pourquoi, on a préféré une méthode d'analyse indirecte: la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie UV-Visible.

1.3.3 Caractérisation par HPLC/UV-Visible

La méthode pour réaliser la caractérisation par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectroscopie UV-visible (HPLC/UV-vis) des billes fonctionnalisées est schématisée sur la Figure II-4. Pour chaque expérience de caractérisation, une solution mère de billes magnétiques est séparée en deux lots. Le premier lot est activé au NHS+EDCI en tampon PBS, puis fonctionnalisé par des

oligonucléotides comportant un linker amine primaire terminal. Le surnageant de cette expérience est appelé surnageant 1. Le deuxième lot, servant de témoin négatif, est seulement traité au tampon PBS (en l'absence de NHS+EDCI), puis mis en contact avec des oligonucléotides comportant un linker amine primaire terminal. Le surnageant de cette expérience est nommé surnageant 2. Les surnageants récupérés sont ensuite analysés par HPLC/UV-vis (caractéristique de l'analyse par HPLC/UV-vis en annexe III).

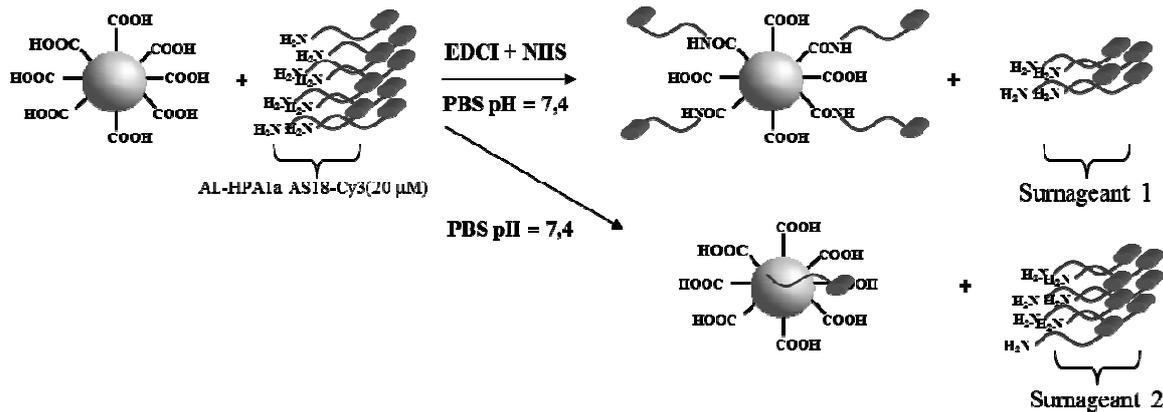


Figure II-4 : Schéma expliquant les différents surnageants dosés par HPLC/UV-Visible

Le surnageant 1 permet de déterminer la quantité de sondes greffées car il représente la concentration de sondes restantes après leur mise en présence avec les billes activées. Le surnageant 2 permet de déterminer la quantité de sondes adsorbées à la surface des billes car il représente la concentration de sondes restantes après leur mise en présence avec les billes non activées

En HPLC, l'aire sous un pic du chromatogramme est proportionnelle à la concentration du produit qui est élué sous ce pic pour peu qu'il soit pur. Afin de pouvoir évaluer quantitativement les quantités d'oligonucléotides restant dans les surnageants, nous avons d'abord procédé à un étalonnage de nos mesures HPLC/UV-vis en utilisant quatre concentrations différentes (20, 15, 10, 5 μ M) du même oligonucléotide sonde. Pour chaque concentration, on obtient un pic (Figure II-5) dont l'aire est reportée sur la courbe d'étalonnage. (Figure II-6). L'analyse des surnageants par HPLC/UV-vis donnent des pics caractérisés par un temps de rétention d'environ 40 min cohérent avec le temps de rétention mesuré pour les solutions étalons du même oligonucléotide (Figure II-5). A partir de l'aire

des pics et avec la courbe d'étalonnage, on peut calculer la concentration des sondes restantes dans la solution et en déduire la quantité immobilisée sur les billes magnétiques.

Toutes les mesures sont reportées dans le tableau II-3.

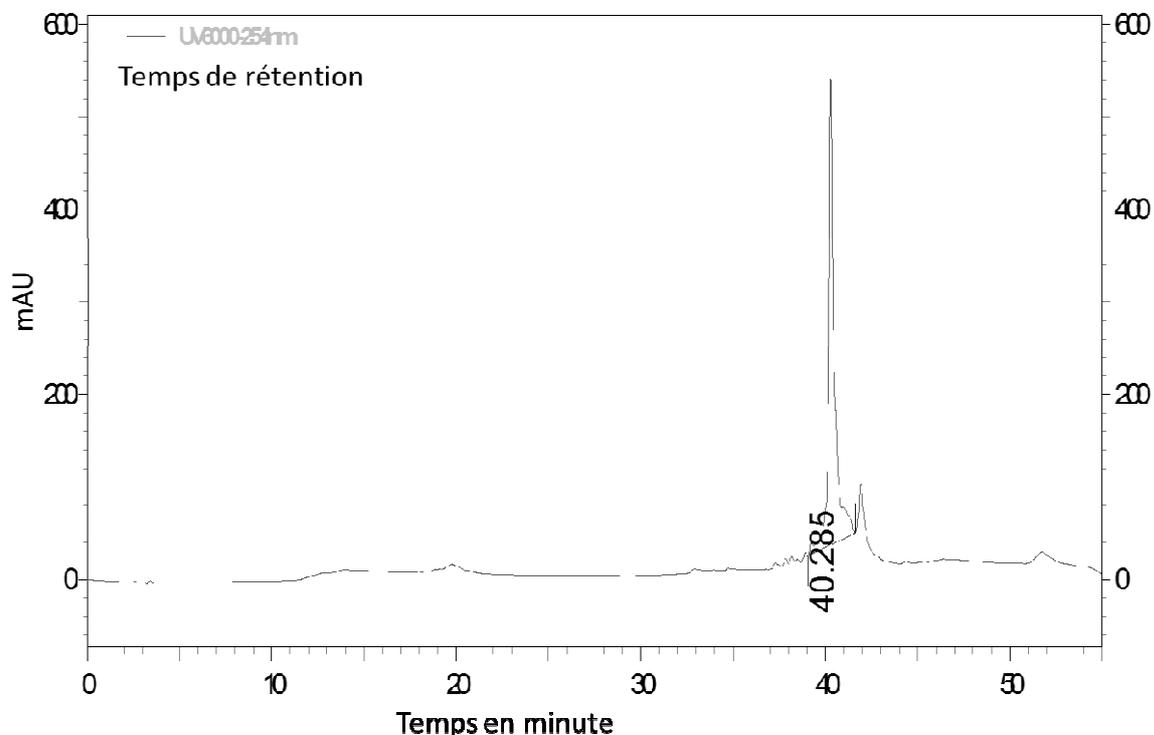


Figure II-5 : Chromatogramme de la solution mère de AL-HPA1aAS18-Cy3 à une concentration de 20 µM

Toutes les mesures sont reportées dans le tableau II-3.

| Solution | Aire sous le pic (u.a.) | Concentration en sondes (µM) |
|------------------------|-------------------------|------------------------------|
| Solution mère étalon 1 | 11,06 .10 ⁶ | 20 |
| Solution étalon 2 | 7,67.10 ⁶ | 15 |
| Solution étalon 3 | 5,25.10 ⁶ | 10 |
| Solution étalon 4 | 2,20.10 ⁶ | 5 |
| Surnageant 1 | 9,64.10 ⁶ | 18,1 |
| Surnageant 2 | 10,57.10 ⁶ | 19,8 |

Tableau II-3 : Valeurs des aires sous les pics relevées sur les chromatogrammes et concentrations des solutions correspondantes

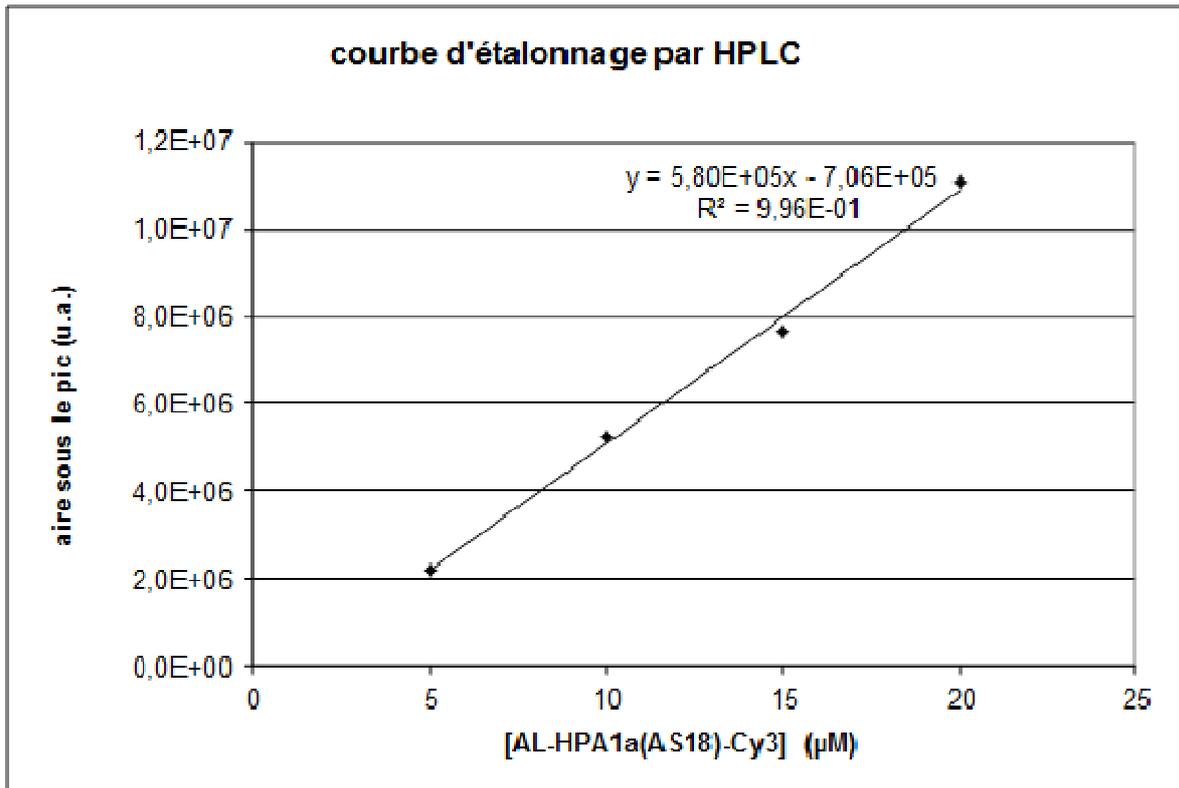


Figure II-6 : Droite d'étalonnage des aires sous les pics en fonction de la concentration en sondes fluorescentes.

A partir de l'équation de la droite de régression linéaire, on peut à partir de l'aire mesurée, trouver la concentration grâce au calcul suivant :

$$A = a \cdot C + b, \text{ d'où } C = (A + 7,06 \cdot 10^5) / 5,80 \cdot 10^5$$

Où A : aire sous le pic ; a le coefficient directeur de la droite de régression linéaire de la courbe d'étalonnage, C la concentration en AL-HPA1aAS18-Cy3 et b l'ordonnée à l'origine de la droite de régression linéaire

La différence de concentration entre la solution mère et le surnageant 1 ($\approx 2 \mu\text{M}$) prouve qu'il y a bien fonctionnalisation des billes magnétiques. Le taux de greffage covalent est de 50% soit $5 \cdot 10^{14}$ sondes/cm² sont immobilisées de manière covalente à la surface des billes. La différence de concentration entre le surnageant 2 et la solution mère ($0,2 \mu\text{M}$) montre qu'il y a un peu d'oligonucléotides adsorbés sur les billes ou sur les parois des tubes. Le taux d'adsorption est de 5% ($0,2 \mu\text{M}$ de sondes pour $4 \mu\text{M}$ de fonctions carboxyliques).

Les deux outils d'analyse indiquent que le greffage chimique des sondes sur la surface des billes magnétiques est bien effectif.

1.4 Fonctionnalisation et caractérisation des billes de latex

1.4.1 Biofonctionnalisation des billes de latex (LB)

Préparation des billes non magnétiques (étape 2)

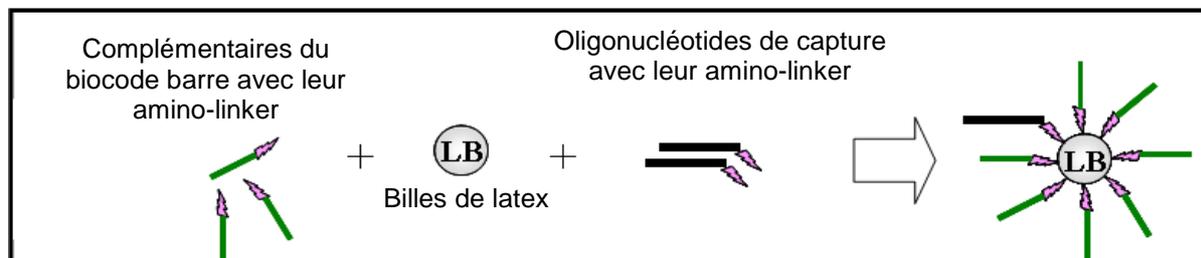


Figure II-7 : Schéma de greffage des particules de latex non magnétiques.

On a utilisé le même protocole de biofonctionnalisation que celui développé pour les billes magnétiques. En effet, les billes magnétiques sont composées d'un cœur formé de grains d'oxyde de fer enveloppé par une gangue de latex portant des fonctions carboxyliques à sa surface, il est logique de penser que le protocole est adapté à des billes composées entièrement de latex (dites billes de latex LB) portant aussi des fonctions carboxyliques à leur surface. Cependant, deux difficultés sont à relever : on doit immobiliser deux types de sondes différentes (les sondes de captures en faible quantité et les oligonucléotides complémentaires aux biocodes barres notés cBCB en quantité importante puisque celle-ci va déterminer le facteur d'amplification de la reconnaissance). L'accrochage des deux types de sondes se faisant avec le même aminolinker, on procédera par dilution relative des concentrations des 2 sondes. Un paramètre important dans la suite des travaux sera le rapport des cBCB sur sondes de capture sur chaque bille. Ces billes de latex n'étant pas magnétiques, une autre difficulté réside dans la récupération des billes fonctionnalisées. Les protocoles expérimentaux sont donnés en annexe II. Il faut tout de même vérifier que la fonctionnalisation est effective. Pour cela, on a utilisé la spectroscopie UV-Visible.

1.4.2 Spectroscopie UV-Visible

L'ADN et donc les oligonucléotides absorbent la lumière à 260 nm. La présence d'un pic à cette longueur peut indiquer la présence d'oligonucléotides à la surface des billes de latex. On a effectivement observé la présence d'un pic à 260 nm pouvant indiquer que les billes sont effectivement fonctionnalisées. Cependant, il faut comparer ces spectres à un spectre d'absorbance effectué pour des billes de latex non greffées à la même concentration. Or durant les étapes de fonctionnalisation des billes, et notamment à cause des étapes de lavages, on perd une quantité non négligeable de billes (entre 30 et 60% de la quantité de billes initiale). Il faut donc pouvoir quantifier les quantités de billes fonctionnalisées obtenues pour comparer correctement les spectres.

On trace la droite d'étalonnage de l'absorbance en fonction du nombre de billes dans les 5 μ l contenu dans la microcuve de chemin optique 0,2 mm.

Dans un premier temps, on enregistre le spectre du SSC 5X qui est le tampon d'analyse des billes de latex greffées et sert de ligne de base pour tous les spectres suivants. Puis, on enregistre les spectres d'absorbance pour différents nombres de billes de latex non greffées dans du SSC 5X. Chaque microcuve contient 5 μ l de solution et présente un chemin optique 0,2 mm. On trace la droite d'étalonnage obtenue pour les LB non greffées à la longueur d'onde $\lambda_{\max} = 390$ nm. Chaque point de cette courbe est obtenu grâce à deux mesures.

Cette courbe permet de calculer le coefficient d'extinction molaire ϵ_{λ} à partir de la loi de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \epsilon_{\lambda}CL$$

où A est l'absorbance à λ donné, ϵ_{λ} le coefficient d'extinction molaire en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; C la concentration en mol/l et L la longueur de la cuve en cm.

$$\text{D'où } a = \epsilon_{\lambda}L$$

Avec a le coefficient directeur de la droite de régression linéaire de la courbe d'étalonnage.

Le coefficient d'extinction molaire est donc :

$$\epsilon_{\lambda} = 4.10^{10}/0,02 = 2.10^{12} \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$$

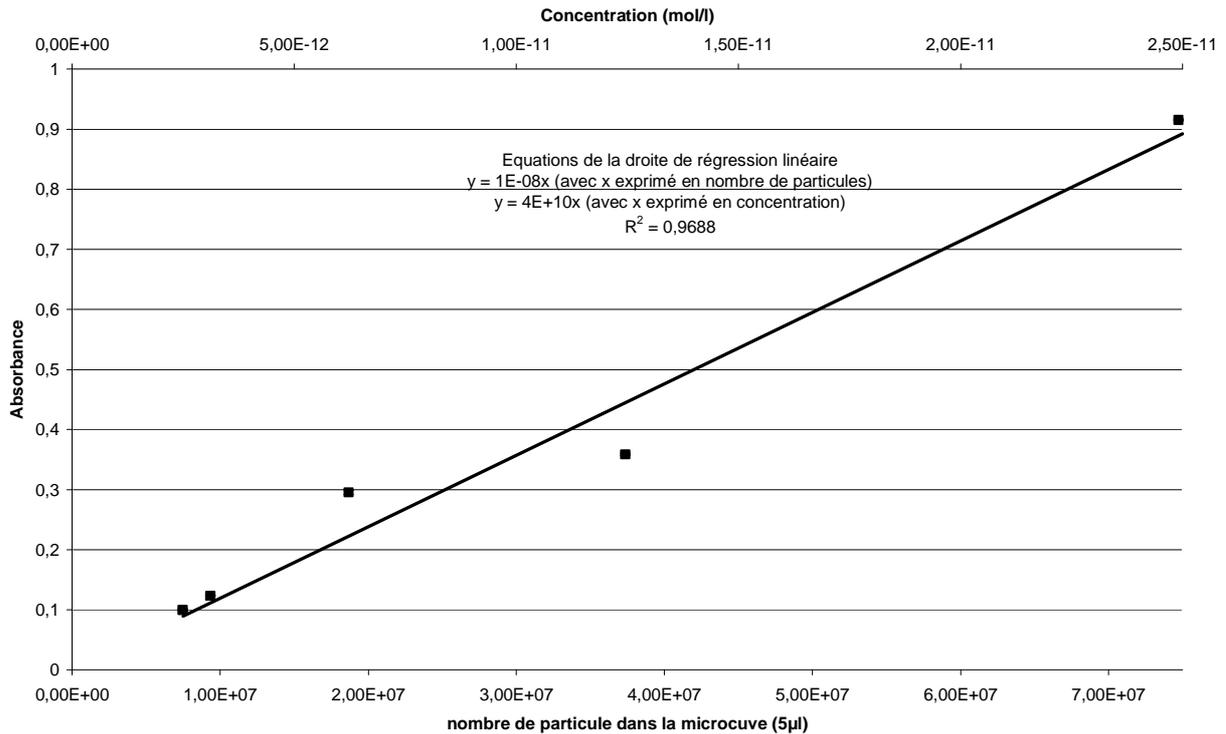


Figure II-8 : Courbe d'étalonnage de l'absorbance à $\lambda_{max} = 390 \text{ nm}$ en fonction de la concentration en billes de latex dans la microcuvette (axe du haut) ; nombre de particules dans la microcuvette (axe du bas). Chaque point est la moyenne de deux mesures. Les écart-types sont présents sur la figure mais ne sont pas visibles

Grâce au calcul du coefficient d'extinction molaire, pour chaque mesure d'absorbance, on peut déduire la concentration en LB greffées et ensuite préparer des lots de LB greffées et non greffées d'une concentration bien définie.

Le tableau II-4 indique la correspondance entre le nombre de billes dans la microcuvette, leur concentration pour une absorbance moyenne mesurée. On peut ainsi déduire le pourcentage de billes conservées par rapport à la quantité de billes présente avant le greffage et les lavages.

| Nombre de billes de latex dans la microcuvette | Concentration en billes de latex (mol/l) | Pourcentage de billes conservées | Absorbance moyenne |
|--|--|----------------------------------|--------------------|
| $7,50.10^7$ | $2,49.10^{-11}$ | 100% | 0,9154 |
| $3,75.10^7$ | $1,25.10^{-11}$ | 50% | 0,3588 |
| $1,88.10^7$ | $6,23.10^{-12}$ | 25% | 0,2952 |
| $9,38.10^6$ | $3,11.10^{-12}$ | 12,5% | 0,1232 |
| $7,50.10^6$ | $2,49.10^{-12}$ | 10% | 0,0996 |

Tableau II-4 : Tableau de valeurs des absorbances en fonction du nombre

Ainsi après les étapes de fonctionnalisation et les différents lavages et en faisant attention de ne pas déranger le culot de billes, on a mesuré que l'on récupère entre 40% à 70% des billes de latex initiales du fait de la séparation par centrifugation. Puisque la centrifugation est faite à la vitesse de rotation maximale de notre appareil, on a effectué des tests sur le temps de centrifugation pour améliorer le rendement de récupération. Même en doublant le temps de centrifugation (de 10 min à 20 min), une partie des billes de latex reste à l'interface liquide/air et est donc prélevée avec le tampon de lavage quand celui-ci est enlevé.

On a décidé de se placer dans la fourchette basse pour fabriquer des lots ayant un nombre constant et égale à $3 \cdot 10^9$ billes fonctionnalisées par tube. Par dilution, on peut ensuite ajuster la concentration en fonction des besoins expérimentaux.

Ainsi, par exemple, pour s'assurer que les billes sont bien fonctionnalisées, on a comparé les spectres d'absorbance obtenus avec des billes greffées et non greffées pour la concentration de $1,25 \cdot 10^{-11}$ mol/l (Figure II-9). Cette figure montre que l'on a bien la même concentration de billes puisque les 2 maximums sont positionnés à la même longueur d'onde ($\lambda_{\max} = 390$ nm) et ont la même valeur.

On observe que les billes de latex absorbent dans l'UV. Cela est dû à leur composition. Les billes dites de latex sont fabriquées en polystyrène qui est la forme polymérisée du styrène (bande d'absorption caractéristique à 244 nm). A cause de la présence de nombreux noyaux benzéniques, le polystyrène absorbe dans la large bande d'absorption du benzène comprise entre 230 et 270 nm qui est appelée bande B correspondant aux transitions $\pi-\pi^*$ du benzène. Mais c'est aussi dans cette zone du spectre que les bases azotées de l'ADN absorbent la lumière à environ 260 nm (Toutes les bases ont généralement 2 maximums d'absorption 190-230 nm et 240-290 nm),

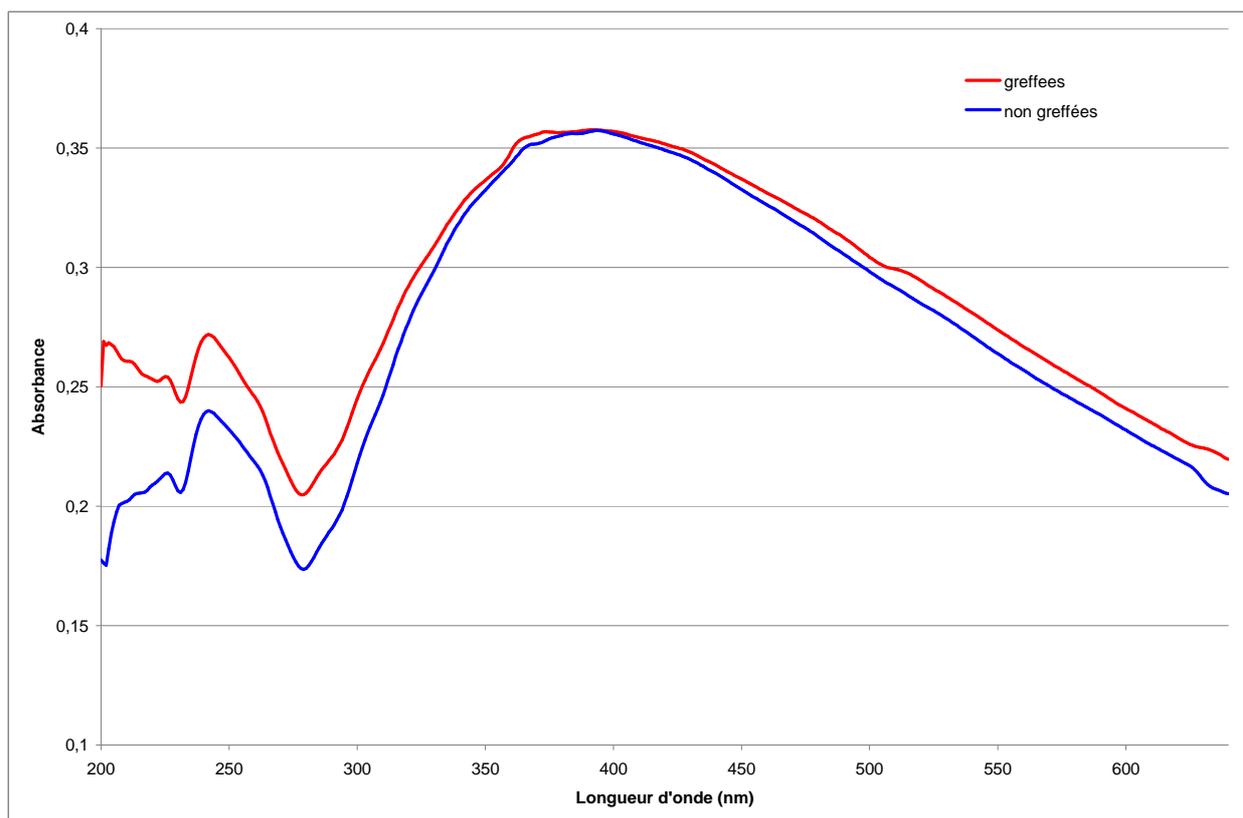


Figure II-9 : Spectres d'absorbance des billes de latex à la concentration $1,25 \cdot 10^{-11}$ mol/l. en fonction de la longueur d'onde. En bleu : billes de latex non greffées. En rouge : billes de latex greffées $[cBCB]/[capture]=2000$. Les spectres sont obtenus dans une microcuve de chemin optique 0,2 mm. Le spectre du solvant SSC 5X est utilisé comme ligne de base et soustrait automatiquement.

Cependant, on peut raisonnablement attribuer le décalage des courbes d'absorbance dans cette zone à la présence des oligonucléotides sur les billes greffées.

2 Détection par Evareader

La détection des biocodes barres a été réalisée grâce à l'utilisation d'un biocapteur basé sur la mesure en temps réel de fluorescence à excitation par onde évanescente. Ce biocapteur, appelé Evareader, est développé par la société Evasensor créée par Manfred Schawaller (Neuchâtel, Suisse). Cet appareil (voir Figure II-10) est un prototype. Il est constitué d'un boîtier rassemblant les éléments optiques d'excitation et de détection et les cartes électroniques permettant de piloter les tests de mesures et d'enregistrer en temps réel les données expérimentales. Un compartiment adapté permet l'introduction bien contrôlée dans le boîtier de la barrette d'analyse.

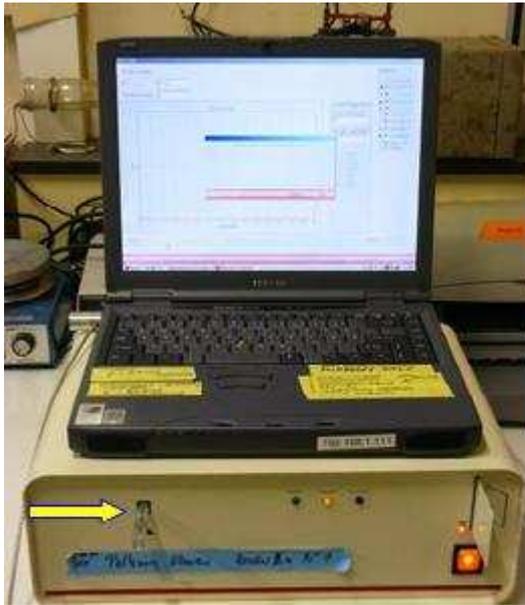


Figure II-10 : (à gauche) photographies de l'Evareader mis à disposition par Evasensor. La flèche indique le compartiment d'introduction de la barrette ; (à droite) barrette en polystyrène comportant 8 puits

2.1 Principe de fonctionnement de l'Evareader

Le principe de l'Evareader (Figure II-11) est basé sur l'excitation par ondes évanescentes des fluorophores sur ou proche de la surface biofonctionnalisée d'un prisme. Un faisceau incident injecté dans le prisme permet de créer une onde évanescente excitatrice (635 nm) à la surface d'une cuvette. Un détecteur placé sous le prisme détecte les photons (670 nm) émis par les fluorophores excités. Ce champ évanescent excite les fluorophores présents à la surface ou proche de la surface (typiquement dans les 200 premiers nm, voir Figure II-12). Dans le cas de l'Evareader, le prisme est sous forme de barrette présentant 8 cuvettes permettant de tester simultanément huit solutions différentes.

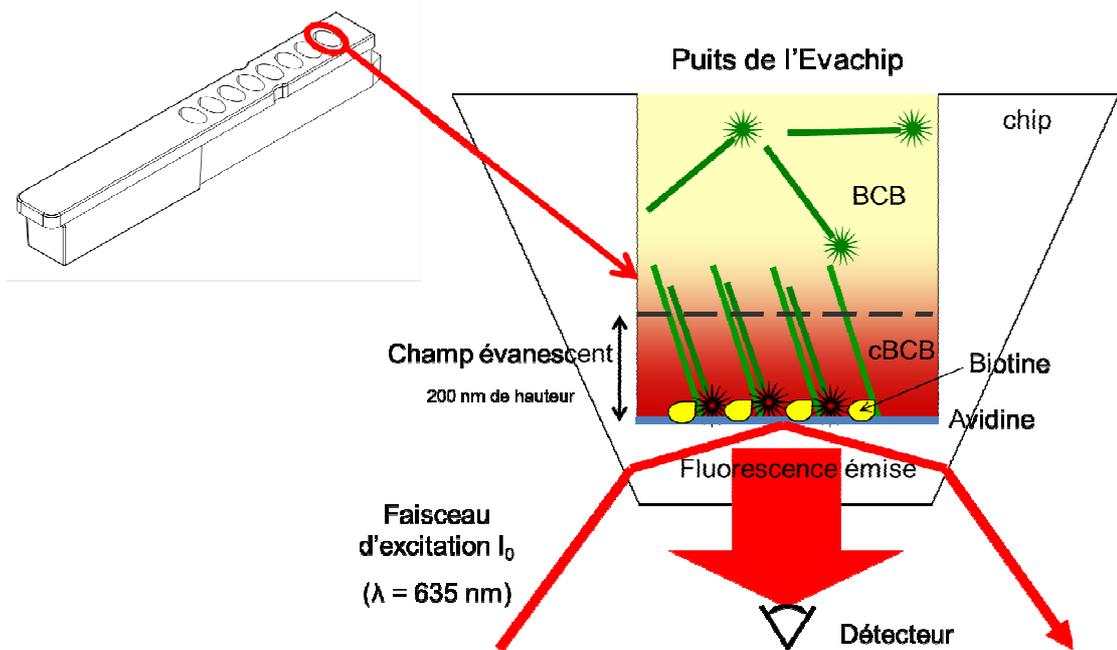


Figure II-11: Schéma du principe de fonctionnement de l'Evareader

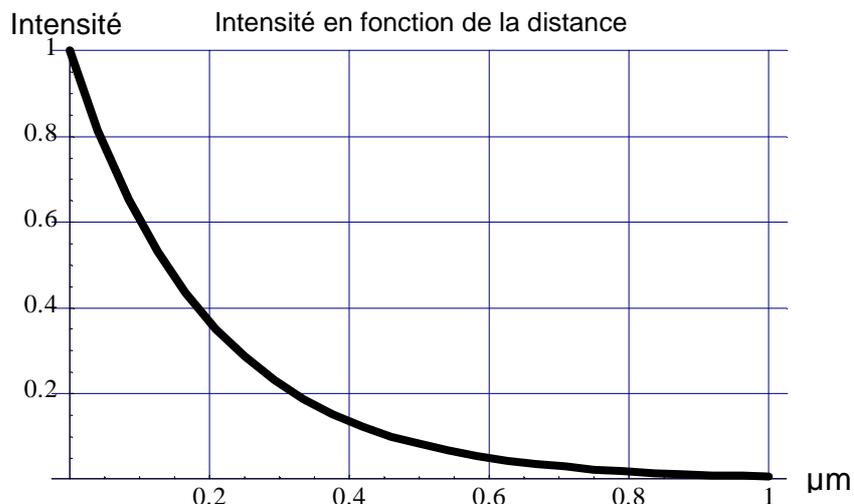


Figure II-12: Intensité du champ évanescent en fonction de la distance par rapport à la surface du puits (données fournies par Evasensor).

Le système analyse cycliquement chaque cuvette pendant 1 s, de manière à générer une mesure en temps réel de la fluorescence de la surface de chaque cuvette. Les mesures sont réalisées à 29°C, sans agitation, et permettent de détecter toute cible biomoléculaire (analyte) marquée avec un fluorophore de type Cy5 ou équivalent.

Les puits n'étant pas agités, la réaction de reconnaissance au fond de chaque puits est contrôlée par la diffusion. Puisque tous les paramètres sont constants à l'exception de la

concentration en analyte, l'application de la seconde loi de Fick donne une relation de proportionnalité directe entre le signal obtenu et la concentration en analyte.

Cette corrélation est donnée par la pente de régression linéaire des courbes de fluorescence obtenues, calculée typiquement pour nos mesures entre 10 et 150 s. Cette pente, nommée dC par le logiciel de l'Evareader, est le paramètre que nous employons pour comparer différentes cinétiques d'association entre sonde immobilisée et cible fluorescente.

(Figure II-13)

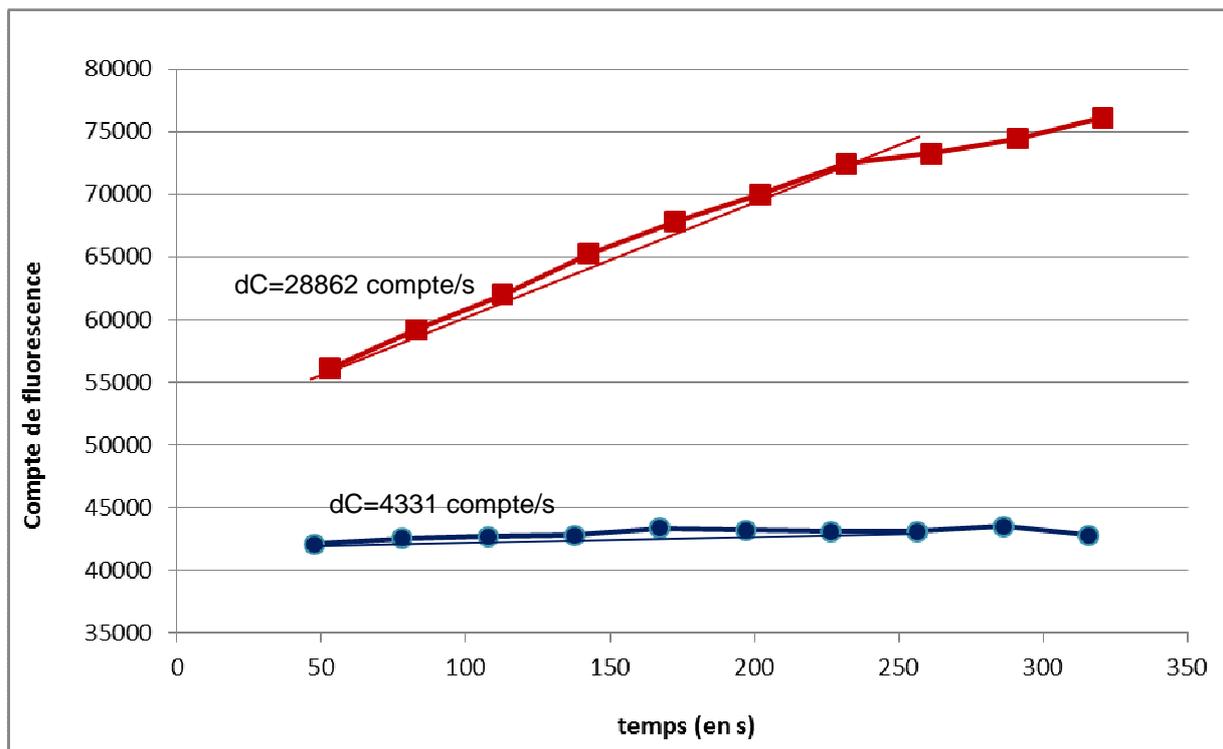


Figure II-13 : Exemple de mesures obtenues par l'Evareader. La valeur globale de dC est calculée par régression linéaire de la pente de fluorescence (en pointillé) entre deux points choisis par l'utilisateur (typiquement entre 10 et 150s). Carrés : hybridation de la sonde « a » avec la cible complémentaire « a » : réponse positive. Ronds : hybridation de la sonde « a » avec la cible « b » non complémentaire : réponse négative. Pour chaque courbe, $[cBCB]/[capture]=1000$. La concentration en cible pour ces mesures est de $2,5 \mu M$.

La valeur de dC pour laquelle la réponse est considérée comme négative est d'environ 4000 comptes par seconde, c'est la valeur de dC relevée pour un bruit de fond (analyse d'une barrette avec tampon sans fluorophore).

Comparativement à l'utilisation d'un scanner de fluorescence, les avantages que présente l'Evareader sont :

- Une analyse cinétique. Contrairement aux puces à ADN « classiques » dont la détection de l'hybridation par marquage fluorescent des cibles est lue à l'aide d'un scanner de

fluorescence en point final, l'analyse se fait en temps réel. On peut arrêter celle-ci dès que nécessaire.

- La suppression d'étapes de lavages. Après l'hybridation de cibles fluorescentes sur une puce à ADN, il est nécessaire de laver la puce pour enlever les cibles adsorbées et les cibles mésappariées. Cette étape de lavage contraignante est supprimée avec l'utilisation de l'Evareader simplifiant l'analyse.
- Le multiplexage. Il est possible de détecter ainsi les différents systèmes HPA sur quelques barrettes. Notons toutefois qu'une unique puce à ADN permet tout de même un multiplexage beaucoup plus important qu'une seule Evachip.

2.2 Barrettes ou Evachips

Les barrettes sont fabriquées par injection d'un polystyrène de nature chimique identique à celui couramment utilisé pour la fabrication de microplaques ELISA. Cependant, la densité de ce polystyrène est bien plus élevée que pour une plaque ELISA classique, ce qui confère aux barrettes des propriétés optiques permettant une réflectivité totale atténuée. Une irradiation des cuvettes par une source Co-60 gamma à 25 kGray permet de rendre la surface propice à l'adsorption de protéines. Ce processus est le même que celui utilisé pour augmenter l'affinité des plaques ELISA (Nunc Polysorb, Nunc Maxisorb).

Les barrettes (Figure II-14) comportent deux parties. La première est constituée de 8 puits d'analyse. La seconde partie est un prisme optique conçu spécifiquement pour l'Evareader. Le tableau II-5 donne les dimensions caractéristiques des barrettes.

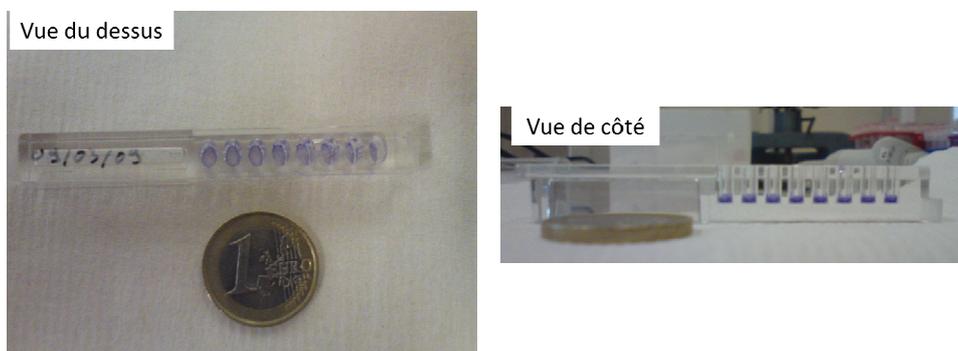


Figure II-14 : Image d'une barrette d'Evareader

| | | | |
|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| Longueur de la barrette | Largeur de la barrette | Hauteur de la barrette | Ecart entre les puits |
| 87 mm | 11 mm | 14 mm | 1,2 mm |
| Grand axe des puits | Petit axe des puits | Profondeur des puits | volume des puits |
| 5 mm | 3 mm | 7 mm | 84 μ l |

Tableau II-5 : Dimensions caractéristiques des barrettes

2.3 Les approches analytiques développées

Pour que la détection des biocodes barres fluorescents soit effective, nous avons vu qu'il faut que ceux-ci soient très proches de la surface d'analyse par système évanescent. Aussi, nous avons envisagé deux stratégies d'immobilisation des biocodes barres à la surface du fond des puits de la barrette, l'une par hybridation ODN/BCB-Cy5, l'autre par interaction neutravidine/ biotine- BCB- Cy5.

2.3.1 Stratégie analytique par hybridation ODN/BCB-Cy5 sur Evachip

2.3.1.1 Principe

Les biocodes barres sont des oligonucléotides portant un groupement fluorescent Cy5. Pour qu'ils se fixent sur la surface, on va procéder à leur hybridation sur des sondes complémentaires préalablement immobilisées au fond des puits. Pour cela, on dépose au fond des puits de la barrette (Evachip) de la neutravidine puis on immobilise des sondes biotinylées complémentaires aux biocodes barres via l'interaction neutravidine/biotine (voir en annexe II, le protocole de préparation des Evachips ODN/BCB). La reconnaissance biologique qui se produit à la surface évanescente est une hybridation entre les biocodes barres fluorescents et leurs séquences complémentaires fixées en surface. (Figure II-15)

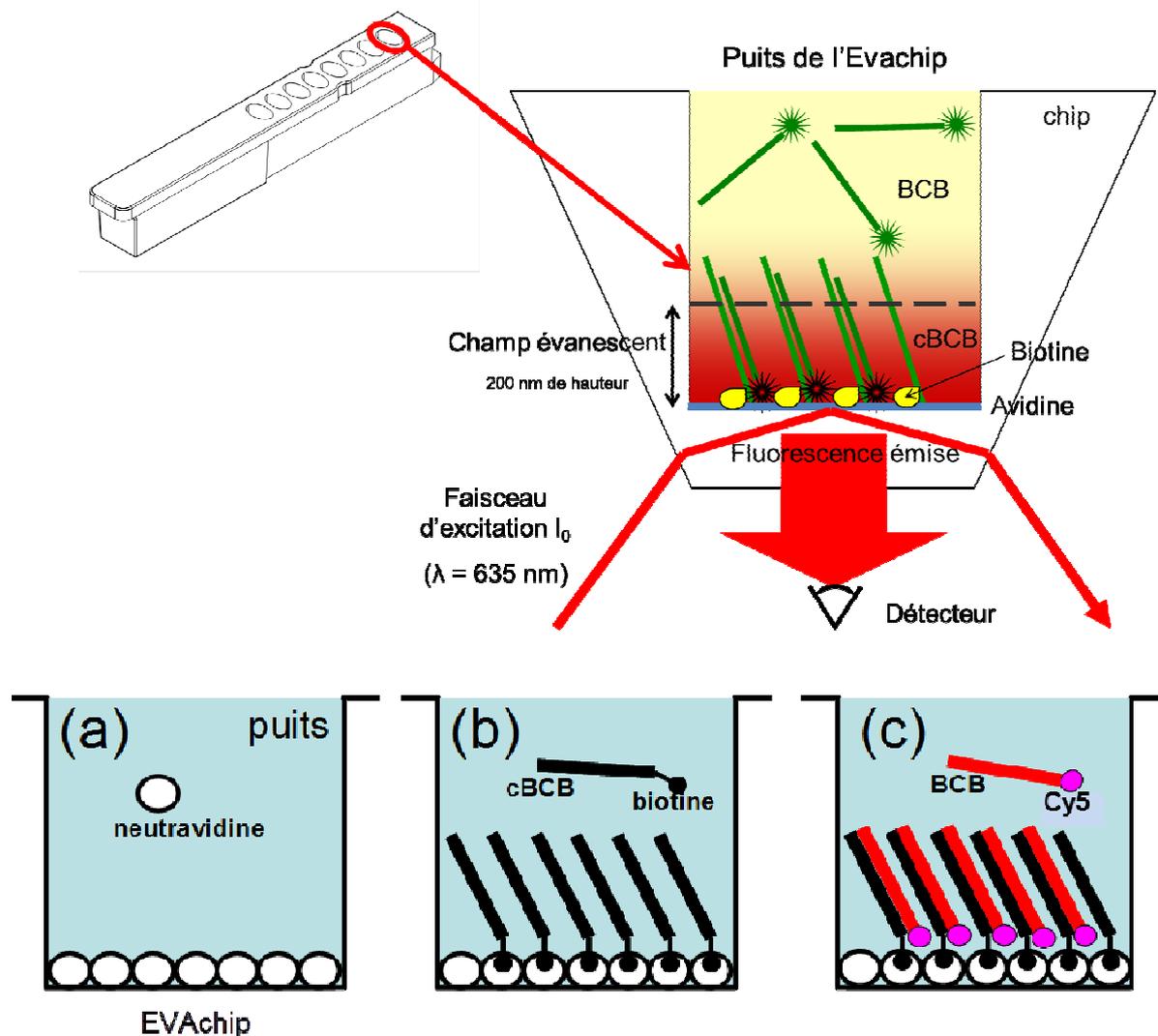


Figure II-15 : Fonctionnalisation des Evachips pour une stratégie d'analyse par hybridation. (a) adsorption d'une monocouche de neutravidine en fond de puits. (b) ancrage en fond de puits de sondes cBCB terminés par une biotiny, grâce à l'interaction biotiny/neutravidine ; (c) reconnaissance de biocodes barres (BCB) fluorescents (Cy5) par hybridation avec cBCB.

Cette approche a été testée en s'appuyant sur des travaux préalables [2] utilisant des puces à ADN pour le génotypage plaquettaire. Dans ces premiers travaux, les puces à ADN étaient mises en œuvre pour l'hybridation compétitive de différentes cibles sur une puce comportant plusieurs sondes. Les puces étaient ensuite analysées par imagerie de fluorescence en mesure de type « point final ». Dans le cadre de cette thèse, nous avons repris les mêmes séquences et des protocoles similaires pour effectuer des mesures en temps réel sur Evachip.

2.3.1.2 Limite inférieure de détection

On a d'abord recherché la limite de détection de l'appareil pour cette approche par hybridation des biocodes barres sur oligonucléotides complémentaires. On immobilise des sondes biotinylées au fond des puits (voir annexe II). L'hybridation des sondes fluorescentes correspondant aux biocodes barres est faite pour différentes concentrations. La courbe de calibration est donnée sur la Figure II-16. Il faut cependant noter que cette courbe a été tracée sans prendre en compte les points aberrants liés à l'hybridation. On considère que le bruit de l'Evareader correspond à des valeurs de dC inférieures à 4000. La limite inférieure de détection est donc approximativement de $3,5 \cdot 10^{-10}$ mol/l de cibles fluorescentes.

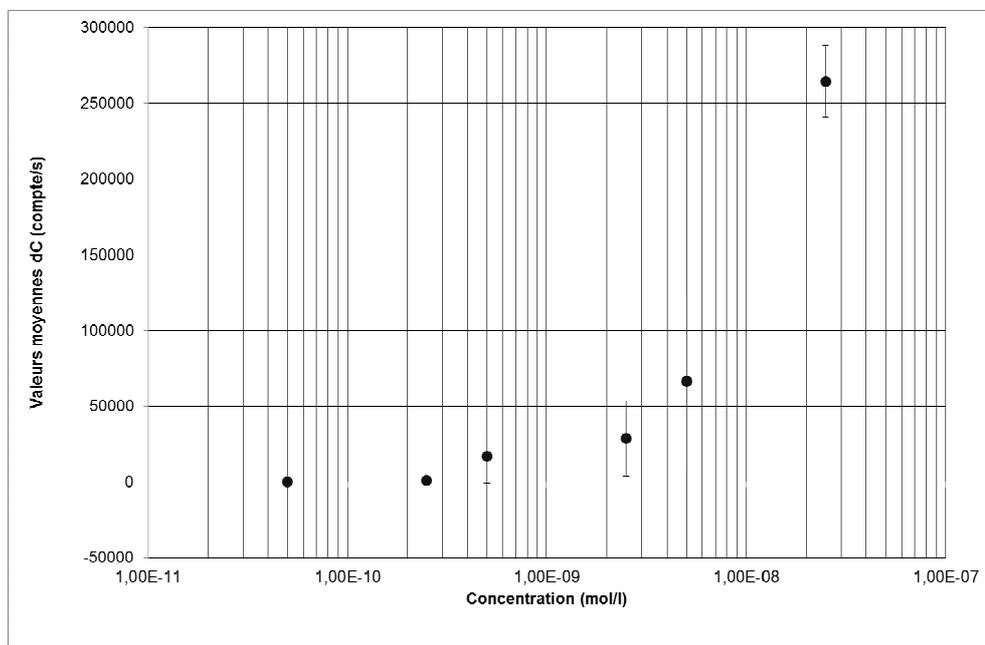


Figure II-16 : Courbe de calibration de l'Evareader par l'approche par hybridation

2.3.2 Stratégie analytique par interaction BCB-biotine / neutravidine sur Evachip

2.3.2.1 Principe

La reconnaissance « ODN/BCB » décrite dans la partie précédente présente l'avantage initial d'employer des séquences déjà validées et identifiées pour des reconnaissances sur support solide. Toutefois cette stratégie de détection avait été initialement conçue pour être employée dans le cadre d'hybridations compétitives sur puce, en l'occurrence pour l'analyse

simultanée de différents gènes sur une puce. L'EVAreader est un biocapteur qui permet de procéder à 8 analyses simultanées, mais en hybridation non compétitive. En effet, chaque puits de mesure est fonctionnalisé avec un seul type de sondes, et n'est censé mesurer qu'un seul type de cible. Dans la mesure où des modifications de l'EVAreader n'étaient pas prévues par ses concepteurs, nous avons fait évoluer notre stratégie de biocode barre pour l'adapter à notre système de détection. Le but est de simplifier l'analyse et d'adapter les biocodes barres à l'appareil de détection. Dans cette approche, les biocodes barres portent une biotine qui va permettre leur immobilisation directement sur la surface grâce à l'interaction neutravidine/biotine sur des Evachips neutravidine (Figure II-17).

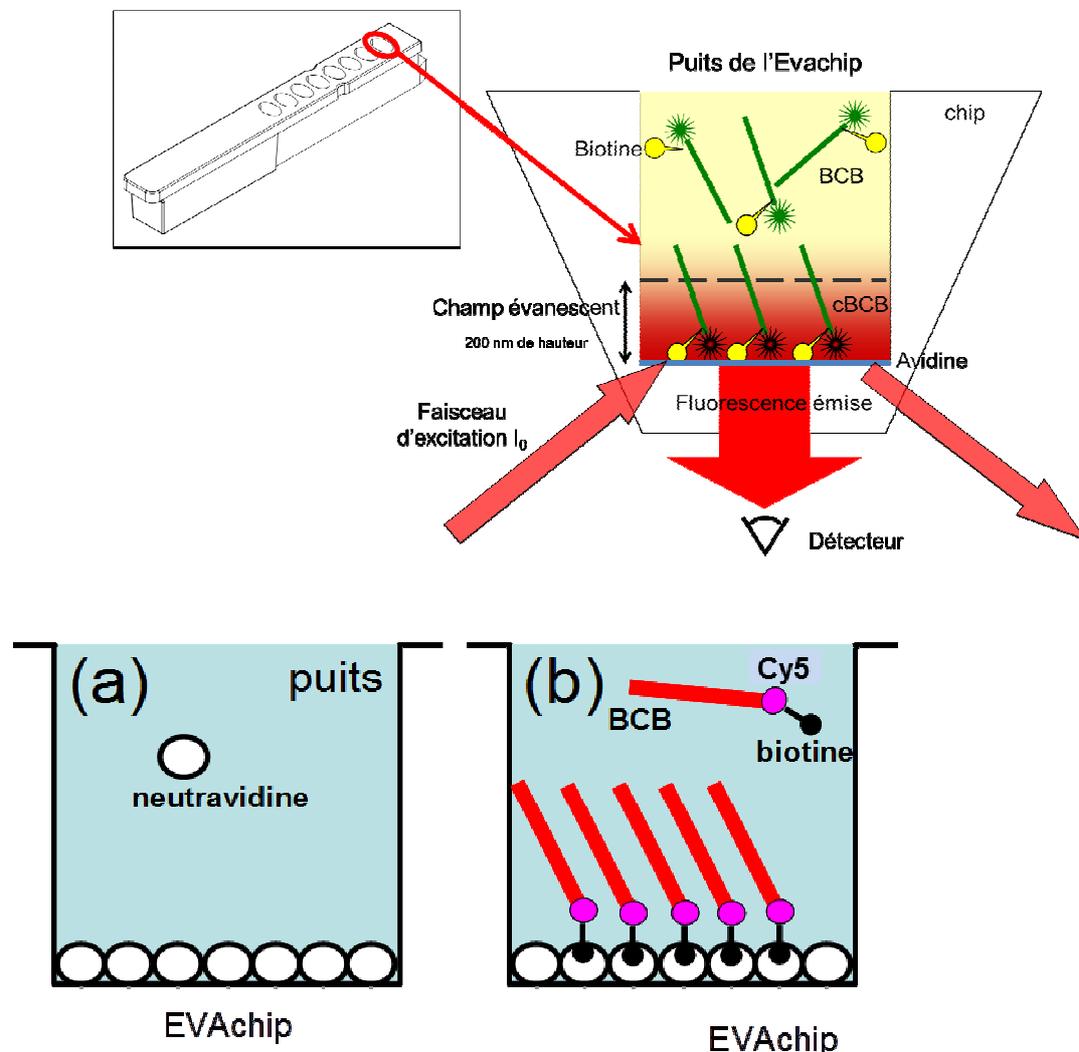


Figure II-17: Fonctionnalisation des Evachips pour une stratégie d'analyse par interaction neutravidine/ biotine. (a) adsorption d'une couche de neutravidines en fond de puits. (b) reconnaissance des biocode barres (BCB) fluorescents (Cy5) par interaction neutravidine/biotine.

2.3.2.2 Limite inférieure de détection :

La limite de détection de l'appareil pour cette approche est donnée par la courbe de calibration des dC obtenus en fonction de la concentration en oligonucléotides fluorescents. Lorsque les valeurs de dC sont inférieures à 4000, le signal de fluorescence appartient alors au bruit de l'Evareader. La limite inférieure de détection est d'approximativement $2,5 \cdot 10^{-10}$ M cibles fluorescentes. (Figure II-18).

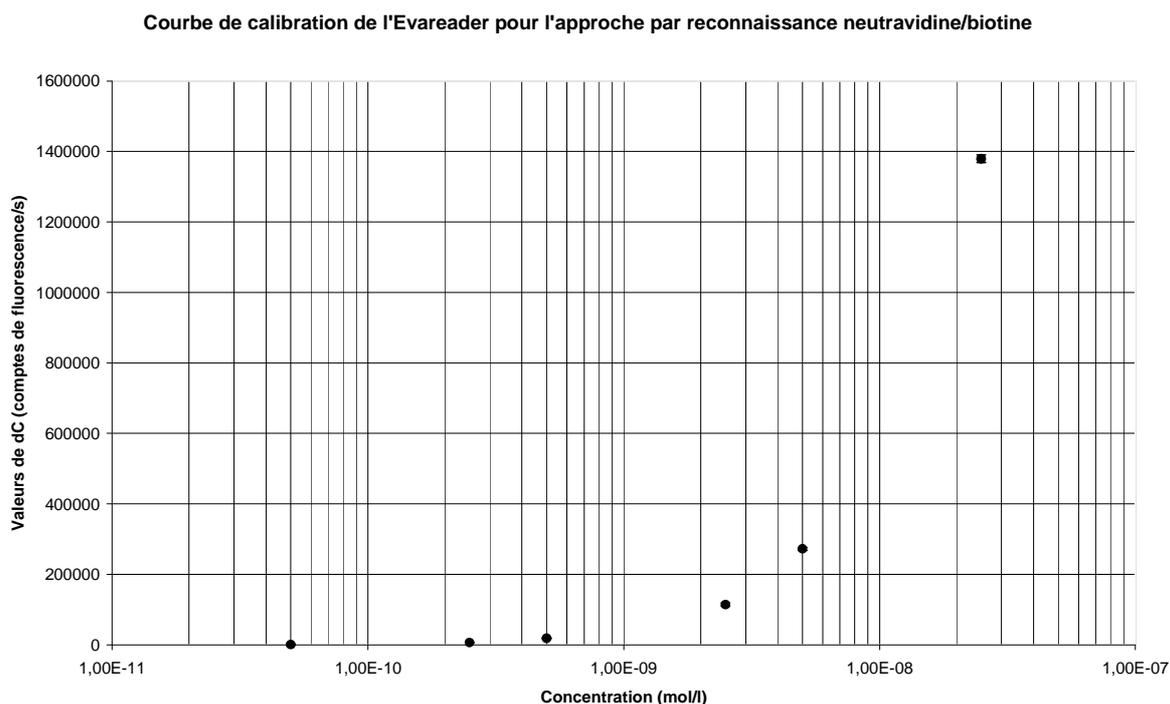


Figure II-18 : Courbe de calibration de l'Evareader par l'approche interaction neutravidine/biotine

2.3.3 Comparaison des deux approches analytiques

Nous avons testé deux approches analytiques différentes, la première utilisant une reconnaissance des biocodes barres par hybridation à leur complémentaire au fond de la barrette d'analyse, la seconde utilisant la reconnaissance neutravidine/biotine.

Comme nous avons utilisés des BCB différents, nous avons vérifié le marquage par Cy5. Les spectres d'absorbance des biocodes barres fluorescents biotinylés (Cy5-biotine-BCB) et des biocodes barres fluorescents non biotinylés (Cy5-BCB) à une même concentration (100 μ M), montre clairement que le marquage en Cy5 est plus performant pour les Cy5-BCB que pour les Cy5-biotine-BCB d'un facteur 1,5 (Figure II-19). Cette différence

dans le marquage peut être due à la complexité du biocode barre utilisé pour l'interaction neutravidine/biotine. En effet, cet oligonucléotide est porteur en 5' d'un marqueur Cy5 et d'une biotine ce qui rend le marquage difficile.

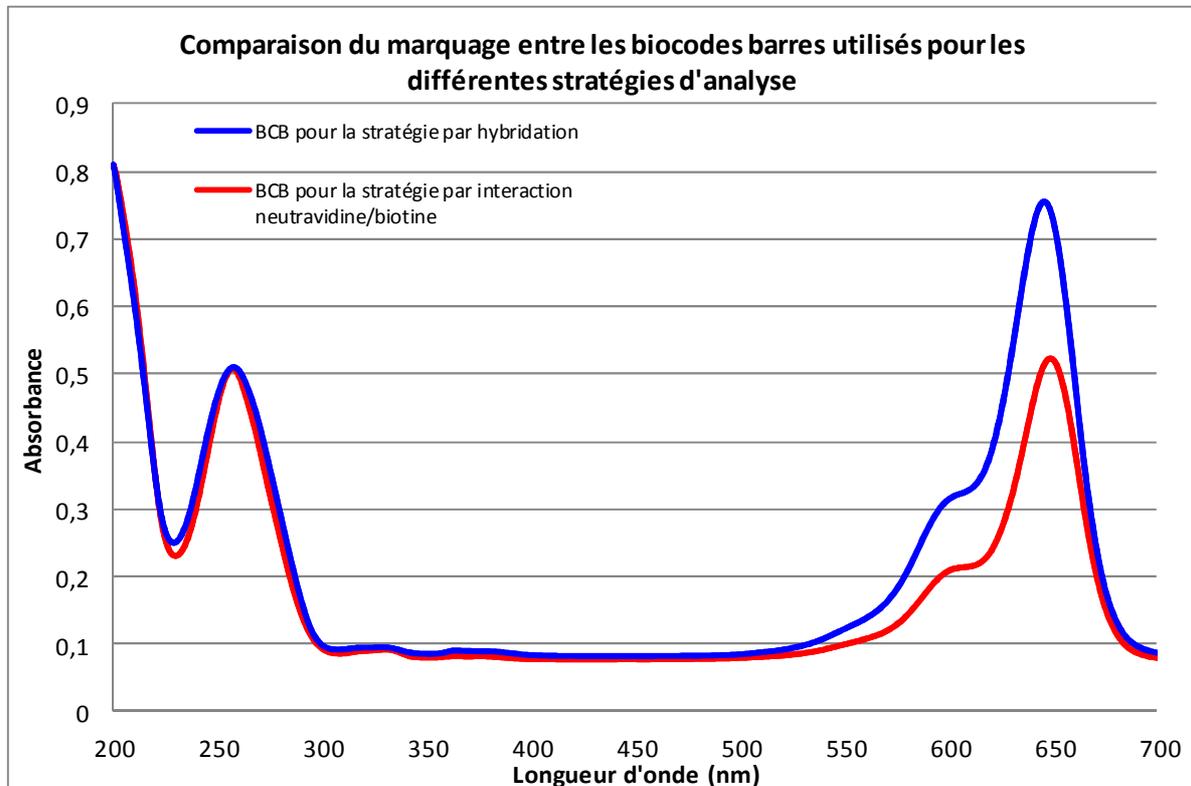


Figure II-19 : Comparaison par spectroscopie UV-Vis du marquage des différents types des biocodes barres pour les différentes stratégies analytiques.

D'autre part, nous avons noté des points aberrants lors des mesures par hybridation. Aussi, nous comparons dans un premier temps les deux approches en tenant compte de l'ensemble des points aberrants. (Figure II-20). Pour une même concentration en biocode barre, l'approche par hybridation donne un signal entre 4 et 6 fois moins fort que pour l'approche par interaction neutravidine/biotine.

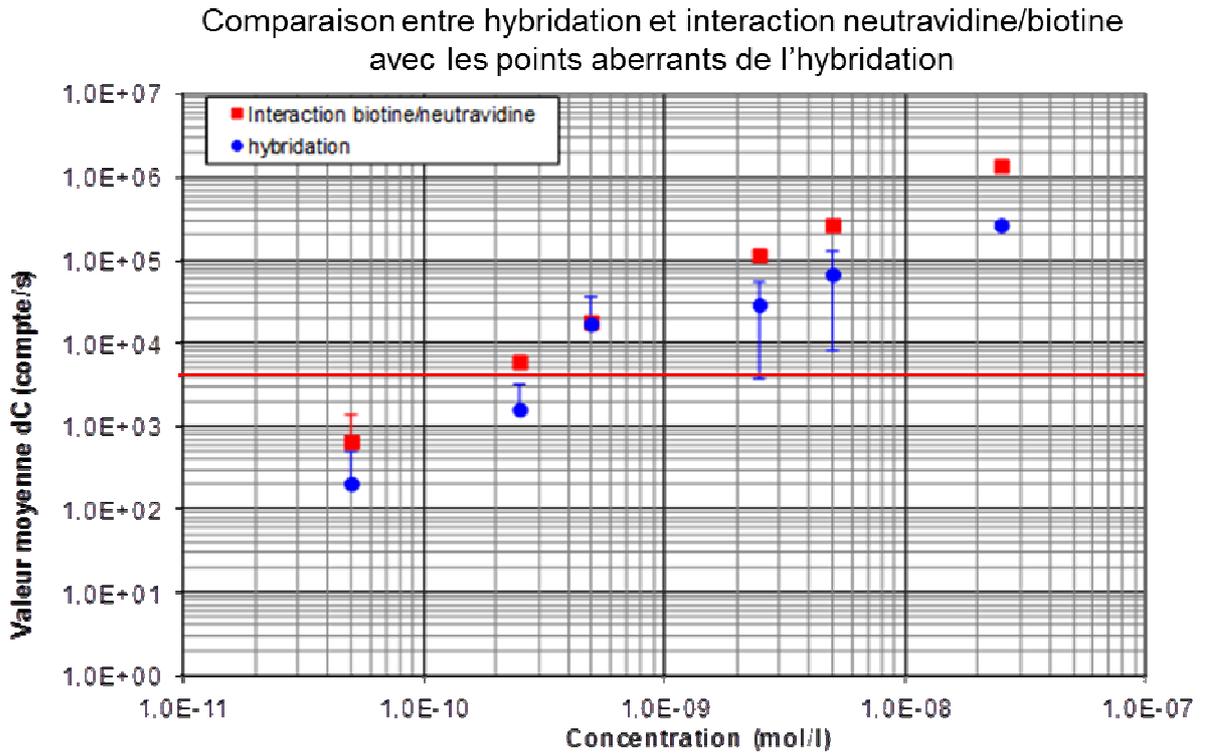


Figure II-20: Comparaison entre hybridation et interaction neutravidine/biotine sur Evachips. Ces courbes prennent en compte les mesures aberrantes de l'hybridation. Chaque point correspond à la moyenne sur 4 mesures.

Bien que le marquage pour les biocodes barres de la stratégie par hybridation soit plus performant, la limite inférieure de détection pour cette stratégie est plus haute que pour la stratégie neutravidine/biotine. On en déduit que la méthode d'analyse par hybridation est moins performante que pour une stratégie par interaction neutravidine/biotine. Cependant, les points de mesure comportent des mesures aberrantes. Pour ces points de mesure, les écart-types sont importants (écart type supérieur à 100000 pour le point à la concentration 5.10^{-9} mol/l). Cela pose le problème de la reproductibilité des barrettes. Pour vérifier les différences dans les performances des deux stratégies, on a donc aussi comparé les stratégies d'analyse en ne prenant pas en compte les mesures aberrantes. (Figure II-21).

Comparaison entre hybridation et interaction neutravidine/biotine sans les points aberrants de l'hybridation

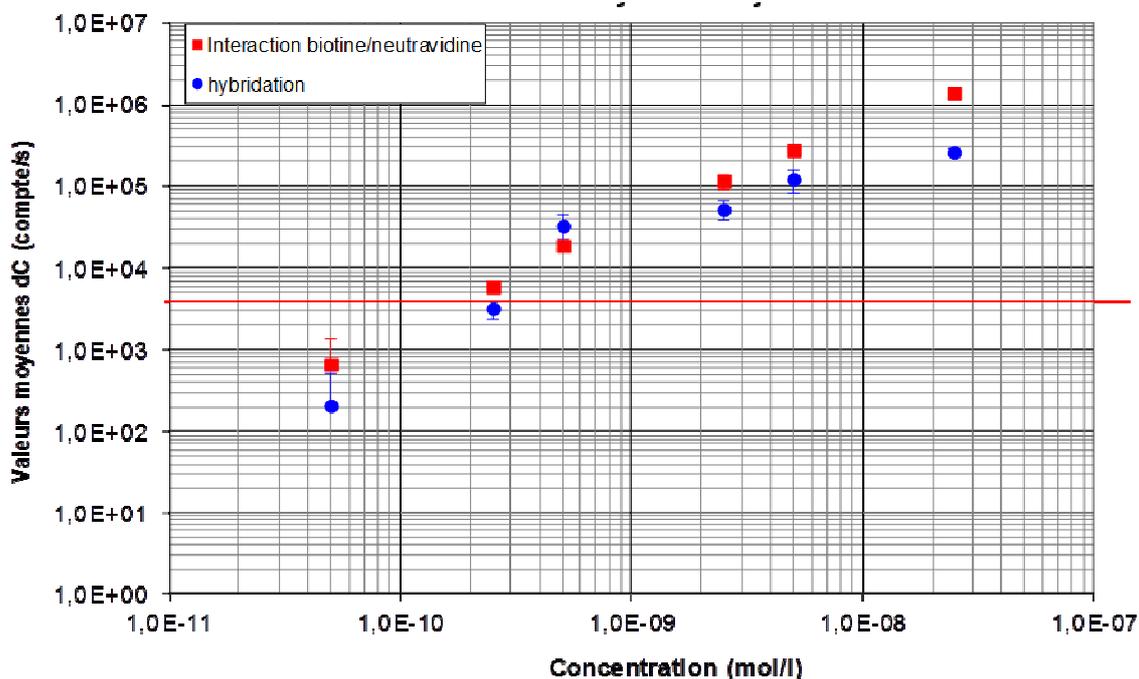


Figure II-21 : Comparaison entre les courbes de calibration de l'hybridation et de l'interaction neutravidine/biotine sur Evachips. Ces courbes ne prennent pas en compte les points aberrants de l'hybridation. Chaque point pour l'interaction neutravidine/biotine correspond à la moyenne sur 4 mesures. Chaque point pour l'hybridation correspond à la moyenne sur 2 mesures. La droite rouge représente la limite du bruit pour l'Evareader.

On remarque que les écart-types des points de mesure pour l'hybridation sont équivalents à ceux de la stratégie neutravidine/biotine lorsque les mesures aberrantes ont été supprimées. La courbe de calibration pour la stratégie par hybridation est située légèrement en dessous de celle de la stratégie par interaction neutravidine/biotine, on peut alors penser que les performances des deux stratégies sont équivalentes. Par calcul, la limite inférieure de détection (LID) de l'appareil vaut :

$$\text{LID} = \text{limite du bruit} + 3 \cdot \text{S/N}$$

Où S/B désigne le rapport signal sur bruit (écart-type) ; $\text{S/B} \approx 2000$ dans ce cas

$$\text{D'où LID} = 10000 \text{ comptes/s}$$

Cette limite de détection est atteinte pour une concentration en biocode barre d'environ $3,5 \cdot 10^{-10}$ mol/l pour les deux stratégies de détection si on ne prend pas en considération les mesures aberrantes de la stratégie d'hybridation.

Pour conclure, on peut dire que la limite de détection est la même pour les deux stratégies mais avec un marquage des sondes plus performant pour la stratégie d'hybridation. A marquage équivalent, la stratégie par hybridation est moins performante que la stratégie par neutravidine/biotine. D'autre part, la stratégie par hybridation ajoute une étape supplémentaire de fonctionnalisation des barrettes par l'oligonucléotide et montre aussi un problème au niveau de la reproductibilité des barrettes d'analyse d'où les mesures aberrantes observées pour la stratégie par hybridation. L'approche par hybridation nécessite de faire attention à la température d'hybridation car l'appareil n'est pas thermostaté. Si les séquences des biocodes barres et de leur complémentaire ne sont pas judicieusement choisies, il faut ajouter une étape contraignante à l'analyse pendant laquelle les biocodes barres doivent être portés à une température permettant leur hybridation au fond du puits d'analyse.

Compte tenu des problèmes de reproductibilité rencontrés et de la complexité de la stratégie par hybridation, **nous avons préféré la stratégie neutravidine/biotine pour analyser les performances du couplage entre une analyse par biocode barre et le détecteur par ondes évanescentes.**

3 Mise en œuvre des biocodes barres et détection

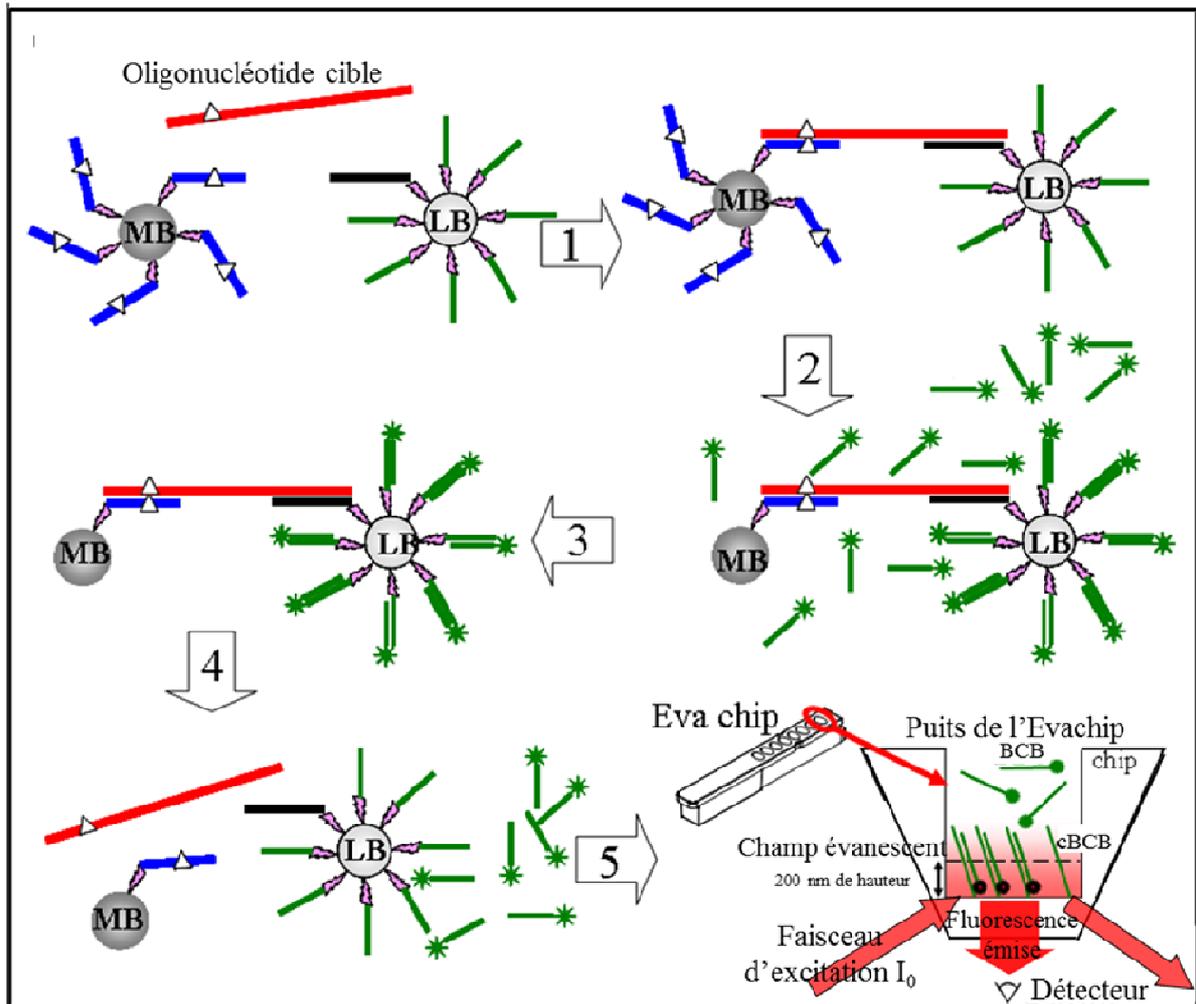


Figure II-22 : Schéma de la mise en œuvre d'une analyse par biocode barre. (1) Hybridation des oligonucléotides cibles avec les billes magnétiques (MB) et les billes de latex (LB), Formation de sandwichs MB/cible/LB. (2) Hybridation de biocodes barres (BCB) marqués Cy5. (3) Séparation magnétique des sandwichs MB/cible/LB/BCB de l'excès de cibles et de BCB non hybridés. (4) Dénaturation des sandwichs. (5) Détection des biocodes barres fluorescents grâce à l'Evareader (la détection par hybridation est schématisée dans cette figure).

La mise au point de nos tests biocode barre a nécessité d'identifier un certain nombre de paramètres permettant d'améliorer les performances analytiques de nos tests. Tout d'abord, nous avons réduit un fort taux initial de faux positifs en procédant à un blocage de la surface des tubes centrifuges employés dans nos tests. Deuxièmement, nous nous sommes assuré que la formation des sandwichs résultait bien de la reconnaissance spécifique sonde/cible à détecter. Ensuite, nous avons exploré l'influence des densités respectives des

deux types d'oligonucléotides immobilisés conjointement sur les LB. Enfin, nous avons évalué l'impact des concentrations relatives en MB et LB dans nos tests.

3.1 Blocage des tubes de centrifugation

Les premiers tests de biocode barre que nous avons effectués étaient caractérisés par l'existence de faux positifs.

Nous avons émis l'hypothèse que la physisorption de biocodes barres sur les parois des tubes centrifuges faussait nos analyses par biocode barre. Il s'agit d'un problème bien connu pour les puces à ADN dans notre laboratoire. A ce jour ce détail technique n'était mentionné dans la littérature que pour l'adsorption des biocodes barres sur les parois de canaux microfluidiques (Goluch et al. 2006 [5]), mais pas dans le cadre d'un protocole de biocode barre en tube centrifuge classique.

Pour pallier à ce problème, nous avons utilisé une méthode classiquement pratiquée notamment dans le laboratoire [6] : le blocage de surfaces par physisorption d'Albumine de Sérum Bovin (Bovine Serum Albumine, ou BSA). La BSA est une protéine connue pour s'adsorber très facilement sur des surfaces, soit par interactions hydrophobes, soit par liaisons hydrogène. Une fois la BSA adsorbée, il est plus difficile pour d'autres molécules comme des protéines ou des acides nucléiques d'interagir avec la surface bloquée. Nous avons incubé des tubes centrifuges pendant 2 heures à 37°C avec une solution de BSA à 4% (m :m) dans du PBS 1X (pH 7,4).

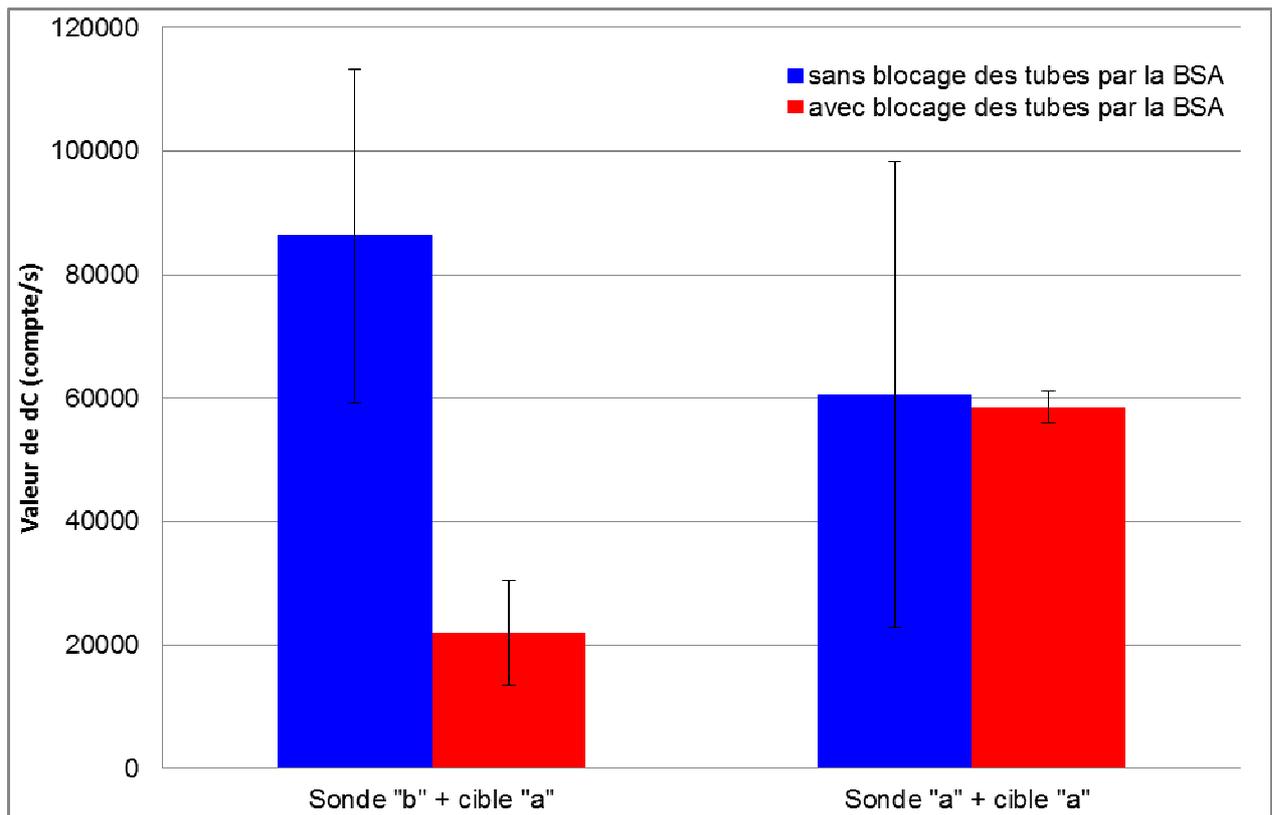


Figure II-23 : Influence du blocage des tubes sur les faux positifs. En bleu : Analyse par biocode barre effectuées dans des tubes sans blocage à la BSA. En rouge : Analyse par biocode barre effectuées dans des tubes avec blocage à la BSA.

La figure II-23 permet de comparer les performances des mêmes analyses biocode barre, menées soit en tube de centrifugation « bloqués » à la BSA, soit menées en tubes de centrifugation non traités à la BSA. Notre approche biocode barre a été employée pour analyser l'hybridation de cibles ODN parfaitement complémentaire (cibles « a », qui correspondent à l'allèle a de HPA-1) de nos sondes (sondes « a »). Dans le même temps, nous avons testé avec notre approche biocode barre l'hybridation de cible « b » avec des sondes « a ». Dans ce cas sondes et cibles différaient d'un nucléotide central (SNP).

Les tests effectués dans des tubes de centrifugation non bloqués ont donné des valeurs de dC similaires pour les brins appariés (sonde « a »+cible « a ») : $6,1.10^4 \pm 3,8.10^4$ comptes/s. Les témoins négatifs avec mésappariement d'une base (cible « a » + sonde « b ») donnaient des signaux plus important : $8,6.10^4 \pm 2,7.10^4$ comptes/s. Les coefficients de variation étaient respectivement de 31 et 62 %. (3 mesures pour les tubes non bloqués).

Le rapport entre les dC obtenus pour les hybridations avec appariement total, et les dC mesurés pour les témoins négatifs est d'environ 0,7.

Les tubes bloqués à la BSA ont permis d'obtenir des signaux de l'ordre de $5,9 \cdot 10^4 \pm 0,2 \cdot 10^4$ compte/s (4 mesures pour les tubes bloqués) pour une analyse sonde « a » + cible « a », et de l'ordre de $2,1 \cdot 10^4 \pm 0,8 \cdot 10^4$ compte/s pour une analyse sonde « a »+cible « b ». Le rapport entre les dC obtenus pour les hybridations avec appariement total, et les dC mesurés pour les témoins négatifs est d'environ 2,8.

Par ailleurs, nous sommes passés de coefficients de variation de 30-60% pour les tubes non bloqués, à des coefficients de variation de l'ordre de 5-30% pour les tubes bloqués.

Ces résultats semblent confirmer l'hypothèse de l'adsorption de biocodes barres sur les parois des tubes non bloqués. Dans ces conditions, les biocodes barres adsorbés peuvent être relargués dans le milieu de mesure et détectés par l'Evareader.

Lorsque les parois des tubes sont bloqués à la BSA, avant leur utilisation, l'adsorption de biocodes barres fluorescents est limitée. Dans ces conditions, seuls les biocodes barres fluorescents capturés selon la voie attendue dans notre test sont analysés par fluorescence.

Le blocage des tubes par la BSA permet donc de supprimer les faux positifs, et d'améliorer d'un facteur 3 au moins le coefficient de variation des mesures.

La totalité des tests dans la suite ont été effectués dans des tubes bloqués par la BSA.

3.2 Spécificité de la reconnaissance

La spécificité de la reconnaissance est un paramètre important pour la discrimination des polymorphismes mononucléotidiques (SNP). Pour évaluer la capacité de notre analyse par biocode barre à discriminer les SNP du gène HPA-1, on a comparé les signaux obtenus par l'Evareader dans les 4 cas possibles décrit dans le Tableau II-6 ci-après :

| Nombre | Sondes immobilisées sur les particules magnétiques | Cible à détecter |
|--------|--|------------------|
| 1 | Sonde « b » | Cible « a » |
| 2 | Sonde « b » | Cible « b » |
| 3 | Sonde « a » | Cible « b » |
| 4 | Sonde « a » | Cible « a » |

Tableau II-6 : Evaluation de la spécificité de la reconnaissance

La Figure II-24 rapporte les valeurs de dC obtenues pour une analyse par biocode barre avec une concentration en solution de cible de 2,5 μ M et des billes de latex ayant un rapport [cBCB]/[capture] non optimisé de 1000.

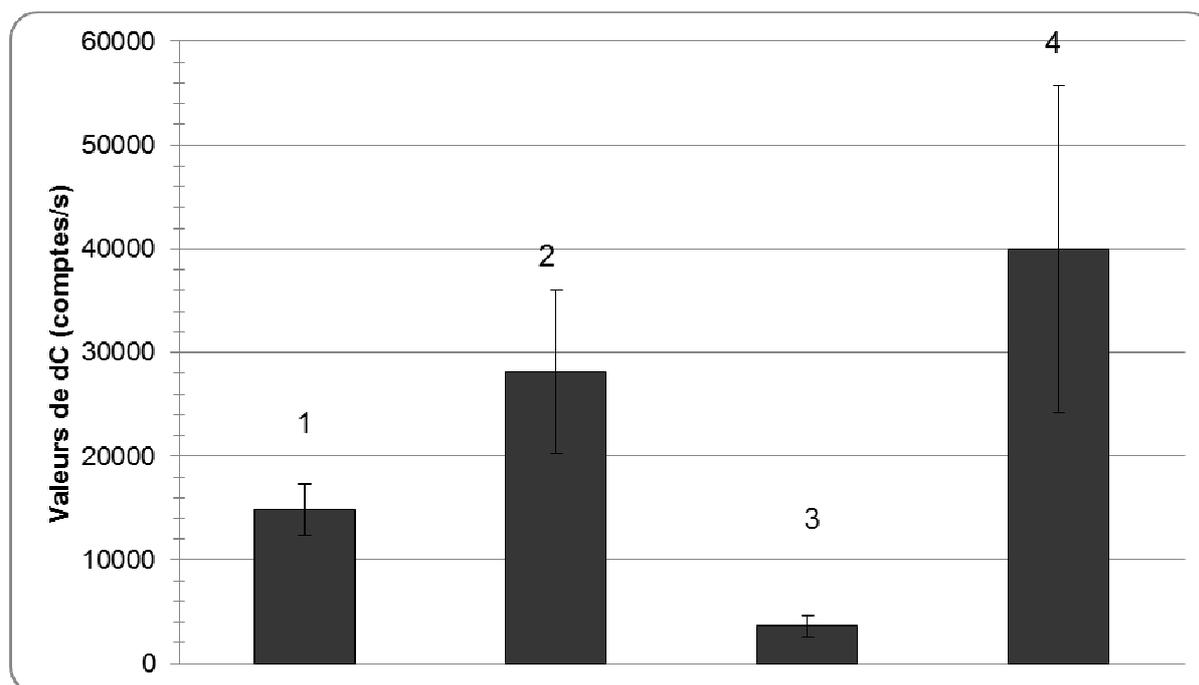


Figure II-24 : Mesures des dC pour les tests de spécificité. Les barres d'erreur représentent l'écart type. Chaque valeur sur le graphique correspond à des mesures dupliquées.

La valeur de dC pour le duplex parfaitement complémentaire sonde « b »-cible « b » (colonne 2 Figure II-24) est deux fois plus grande que pour le système avec le mésappariement d'une seule base sonde « b »-cible « a » (colonne 1 Figure II-24).

Pour le système complémentaire sonde « a »-cible « a », la valeur de dC est dix fois plus importante que lors de l'hybridation du système sonde « a »-cible « b » contenant une mutation ponctuelle (colonne 4 et 3 Figure II-24).

Ainsi, on montre que même pour des conditions pas encore optimisées, l'analyse par biocode barre avec reconnaissance ODN-biotine/neutravidine sur

Evachip a une bonne spécificité de la reconnaissance et permet de bien discriminer les SNP.

Dans cette partie, **l'analyse par biocode barre permet d'avoir une discrimination de deux allèles d'un gène d'intérêt mais en utilisant une forte quantité de cible.** Cette sélectivité est importante pour notre modèle biologique puisque près de 2% de la population caucasienne court le risque d'être immunisée par l'antigène HPA-1a après une grossesse ou une transfusion. Cependant, la quantité de matériel génétique disponible pour des tests de phénotypage est souvent faible d'où l'intérêt d'optimiser ce type d'analyse par biocode barre pour rendre possible la détection d'une très faible quantité de cible en solution.

3.3 Influence de la densité relative des sondes sur les billes de latex

En vue d'optimiser les performances analytiques de nos analyses biocode barre, nous avons cherché la meilleure densité relative entre oligonucléotides cBCB et oligonucléotides de capture (« CAPT ») à la surface de nos LB.

En effet, la présence d'un grand nombre de cBCB sur une LB doit permettre de fixer un maximum de BCB fluorescents, et donc d'obtenir un signal final maximal pour chaque événement de reconnaissance d'une cible dans notre test.

A cet effet, nous avons recherché le meilleur compromis entre le nombre de marqueurs fluorescents et le nombre de cibles qui peuvent être capturées par les billes de latex. Si le nombre d'oligonucléotides de capture est insuffisant alors la cible a peu de possibilité d'être capturée par la bille non magnétique entraînant la formation de peu de sandwichs MB/cible/LB et donc un faible signal. Si au contraire le nombre de marqueurs fluorescents est insuffisant alors bien qu'on recueille par séparation magnétique de nombreux sandwichs MB/cible/LB l'augmentation du signal ne sera pas suffisamment significative pour être détectée par l'appareil de mesure. Il est donc nécessaire d'examiner l'influence des différents rapports entre la densité de complémentaire de biocode barre qui s'hybride avec le biocode barre fluorescent et la densité de l'oligonucléotide de capture.

Dans un premier temps, les rapports $[cBCB]/[capture]$ utilisés pour cette optimisation sont 100 ; 1000 ; 2000 ; 10000 ; 25000 et 50000. On a procédé à la détection par des billes magnétiques greffées avec la sonde « a » d'une solution de cible « a » à une concentration finale de 250 nmol/l donnant en théorie un signal de fluorescence positif. Les résultats obtenus sont comparés avec la fluorescence du tampon SSC 0,2 X. Chacun des points de mesure est obtenu en analysant 4 fois le surnageant final de chacune des expériences avec 4 barrettes différentes provenant du même lot de fabrication.

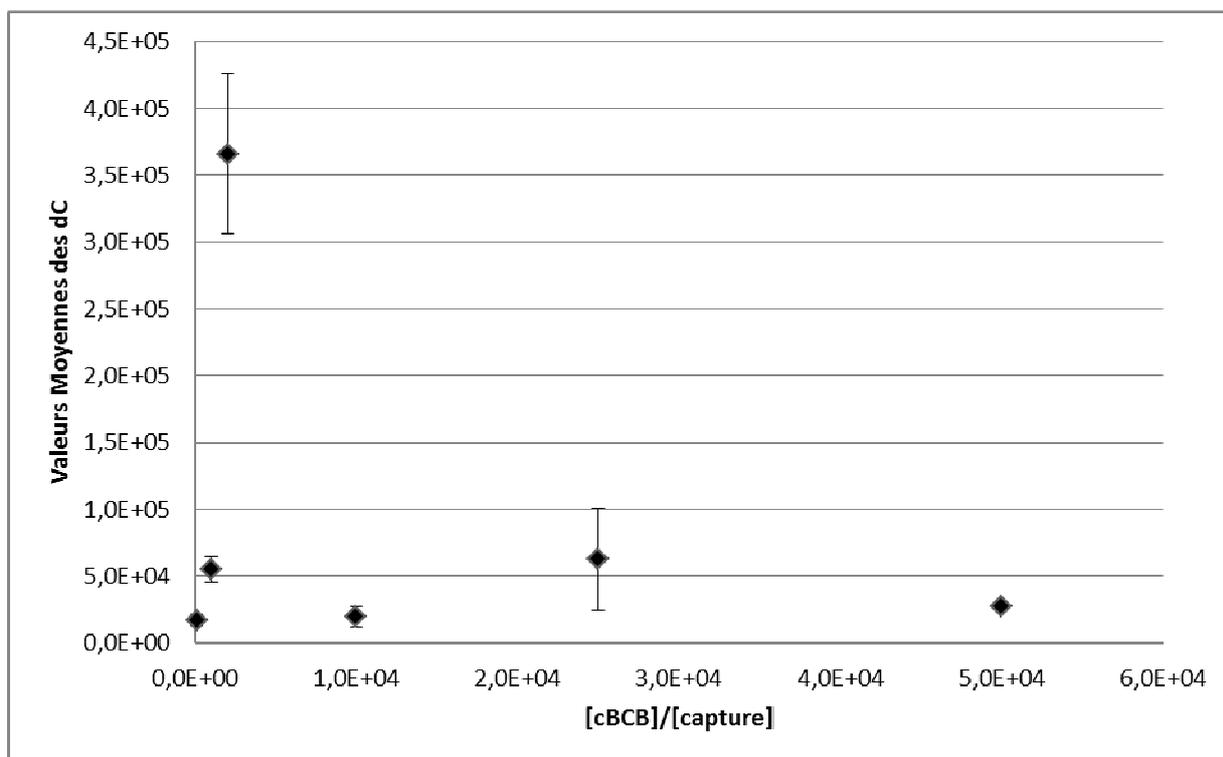


Figure II-25 : Influence de la densité relative des sondes $[cBCB]/[capture]$ sur les mesures de dC. Analyse faite pour sonde « a » + cible « a ». La concentration finale de cible pour chacun des rapports est de 250 nM. Les mesures sont effectuées 4 fois. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type.

La figure II-25 montre l'obtention d'un maximal pour le rapport $[cBCB]/[capture]$ de 2000. Le coefficient de variation pour cette mesure est de 16%. Il faut noter que l'analyse avec le ratio $[cBCB]/[capture]$ égal à 10000 n'a pas fonctionné.

Dans un second temps, des rapports $[cBCB]/[capture]$ plus proches du maximum déjà obtenu expérimentalement ont été examinés. Ces rapports sont égaux à 100 ; 500 ; 1000 ; 2000 ; 5000, 10000 et 25000. L'analyse par biocode barre a été faite dans les mêmes

conditions de concentration en cible et le même type de cible « a » ainsi qu'avec le même type de billes magnétiques i.e. greffées avec des sondes « a ». Chacun des points de mesure est obtenu en analysant 3 fois le surnageant final de chacune des expériences dans des barrettes différentes provenant du même lot de fabrication.

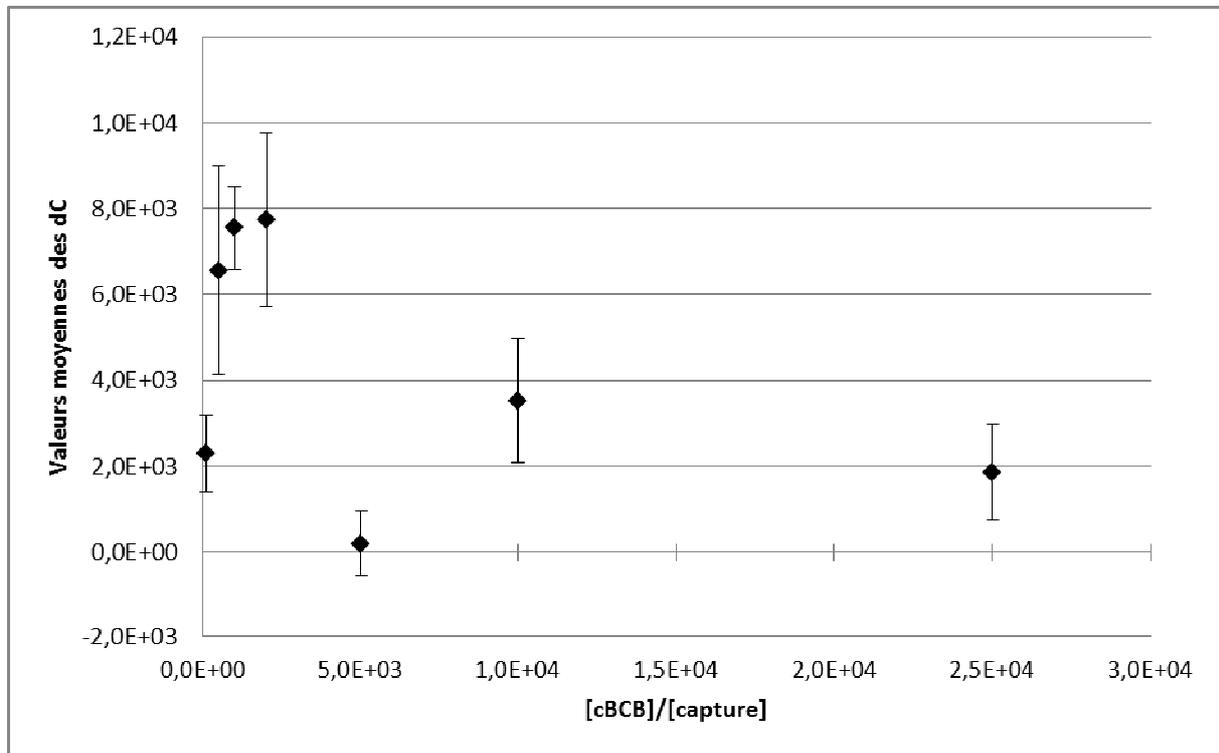


Figure II-26 : Influence de la densité relative des sondes [cBCB]/[capture] sur les mesures de dC. Analyse faite pour sonde « a » + cible « a ». La concentration finale de cible pour chacun des rapports est de 250 nM. Les barres d'erreurs indiquent l'écart type.

La Figure II-26 montre que l'on a de nouveau un maximum pour le rapport [cBCB]/[capture] égal à 2000. Le coefficient de variation vaut 26%. On observe que l'analyse avec le ratio [cBCB]/[capture] égal à 5000 n'a pas fonctionné.

Si on considère la surface d'une bille:

$$S = 4\pi r^2 \quad \text{avec } r = 450 \text{ nm.}$$

$$\text{On a donc : } S = 4\pi \cdot (4,5 \cdot 10^{-5})^2 \approx 2,5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$$

En admettant, d'après la référence [7], une densité de greffage est de l'ordre de $\eta = 10^{11}$ sondes/cm²

Le nombre total d'oligonucléotides greffés par bille serait de :

$$N = S \cdot \eta \approx 2,5 \cdot 10^{-8} \cdot 10^{11} \text{ soit d'environ } 2500 \text{ sondes}$$

Cela signifie qu'une sonde de capture serait suffisante pour former le sandwich. Ce calcul permet de comprendre pourquoi on a un maximum du signal de fluorescence. Celui-ci est obtenu pour le rapport $[cBCB]/[capture]$ égal à 2000.

Ce rapport fut utilisé pour les expériences concernant les performances de l'analyse par biocode barre.

L'intensité du signal est beaucoup plus faible lors de la seconde expérience (facteur 100). Cela est dû à un autre paramètre important pour l'intensité du signal : La concentration relative des particules de latex par rapport aux particules magnétiques.

3.4 Influence de la concentration relative des deux types de billes.

La concentration relative des particules de latex par rapport aux particules magnétiques joue un rôle important pour l'intensité du signal. En effet, les billes non magnétiques permettent une amplification indirecte par la multiplicité des marqueurs de détection greffés sur les particules. Il faut s'assurer d'avoir une concentration de billes de latex suffisante pour obtenir cette amplification, c'est-à-dire qu'il faut avoir suffisamment de billes de latex pour qu'à chaque reconnaissance entre les billes magnétiques et les cibles on ait aussi une reconnaissance entre les cibles et les billes de latex. Puisque une bille magnétique peut effectuer plusieurs reconnaissances avec les cibles simultanément, il faut que la concentration en billes de latex soit plus importante que celle en billes magnétiques (Figure II-27).

Pour chaque lot de billes de latex fonctionnalisées avec des rapports différents des sondes $[cBCB]/[capture]$, on a procédé à une analyse complète par biocode barre pour différents rapports de billes magnétiques et billes de latex $[MB]/[LB] = 1/2$ et $[MB]/[LB] = 1/30$.

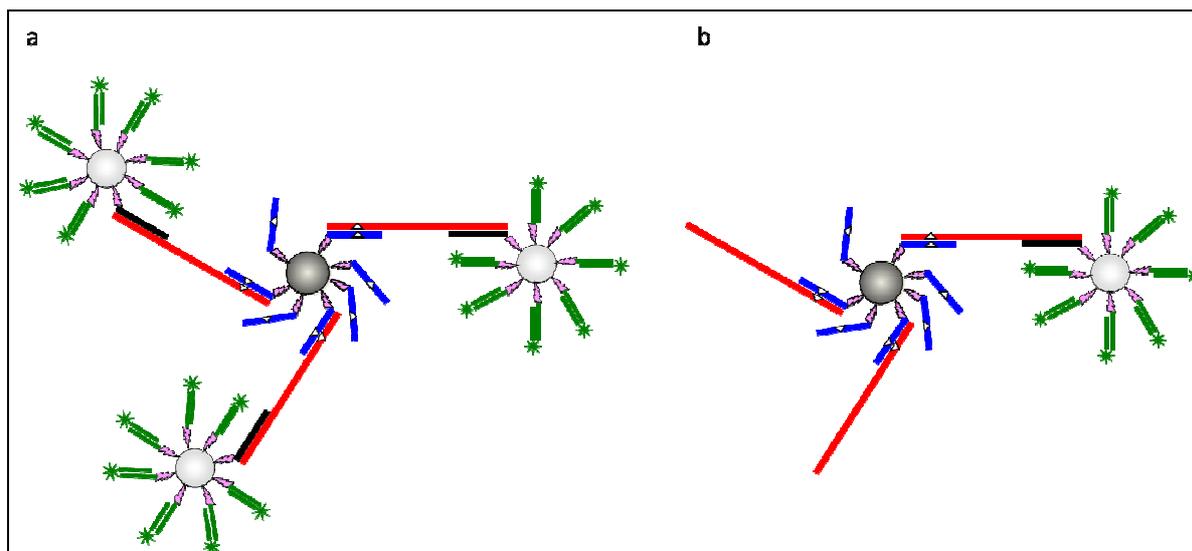


Figure II-27 : Schéma de l'influence des concentrations relatives des différents types de billes. a- chaque reconnaissance MB/cible entraîne une amplification par reconnaissance cible/LB. b- les reconnaissances MB/cible entraîne une amplification partielle du signal due à une concentration en LB trop faible.

Le tableau II-7 rassemble l'ensemble des valeurs de dC obtenues pour les mêmes conditions d'analyse (partie 3.3) à l'exception de la concentration relative de MB par rapport aux LB.

| Rapport [cBCB]/[capture] | dC moyen pour un rapport [MB]/[LB] = 1/2 | dC moyen pour un rapport [MB]/[LB] = 1/30 |
|--------------------------|--|---|
| 100 | 2288 | 17037 |
| 1000 | 7545 | 55488 |
| 2000 | 7738 | 366033 |
| 10000 | 3521 | 19858 |
| 25000 | 1862 | 62423 |

Tableau II-7 : Tableau de valeurs des dC en fonction du rapport [billes magnétique]/[billes latex] pour différents rapports [cBCB]/[capture]. Les valeurs de dC sont celles présentées dans les figures II-25 et II-26.

On constate :

- 1) que l'on obtient bien un maximum de fluorescence pour le rapport [cBCB]/[capture] =2000 sur les billes de latex, quelque soit ensuite les concentrations relatives des billes magnétiques et billes de latex utilisées.
- 2) que la fluorescence est toujours plus importante lorsque la quantité de billes de latex utilisées est largement supérieure à la quantité de billes magnétiques.

- 3) une augmentation du signal d'un facteur 47 entre les rapports [MB]/[LB] de 1/2 et 1/30 pour le ratio [cBCB]/[capture] optimal des billes de latex.

3.5 Performances analytiques de l'analyse par biocodes barres couplée à l'Evareader.

En tenant compte de l'ensemble des résultats précédents, on recherche la limite de détection de l'ensemble de l'analyse par biocode barre couplée à l'Evareader. Les tests ont été fait avec des billes de latex ayant un rapport [cBCB]/[capture] =2000, et un rapport 1/30 entre billes magnétiques et billes de latex. La détection sur Evareader est faite par l'approche neutravidine/biotine.

Pour vérifier la formation des sandwichs et avoir une idée de l'amplification du signal apportée par l'approche biocode barre, on teste la fluorescence obtenue en fonction de différentes concentrations finales de cibles à capturer. La courbe obtenue est ensuite comparée à la courbe de calibration de l'appareil (Figure II-28). On trouve une limite inférieure de détection d'environ 2.10^{-15} M d'oligonucléotide cible.

La comparaison entre les deux courbes de calibrations montre que pour une même valeur de dC lors de l'utilisation de l'analyse par biocode barre, notre capteur est capable de détecter une concentration de cible approximativement 125000 fois plus faible que si notre cible était directement marquée. L'analyse par biocode barre abaisse donc bien la limite inférieure de détection grâce à la capture, la reconcentration de cibles en faible concentration et l'amplification indirecte du signal de fluorescence.

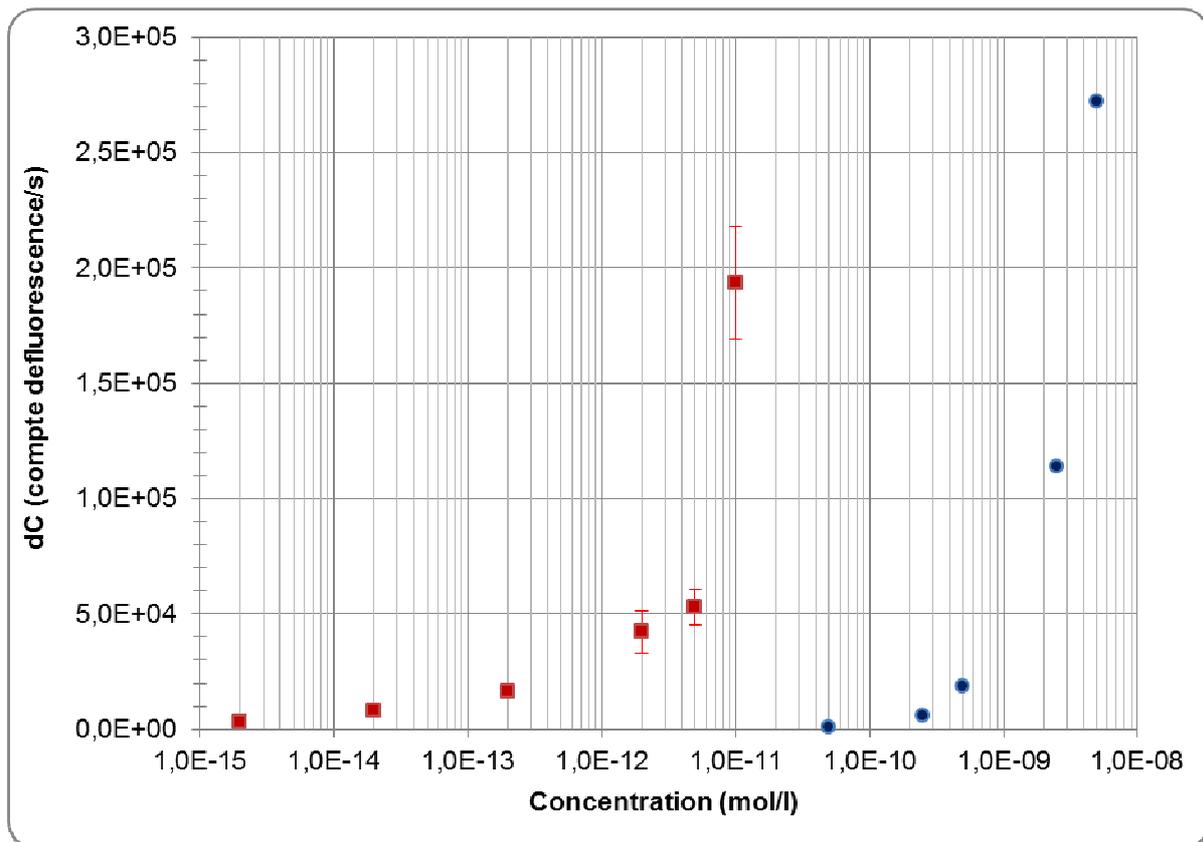


Figure II-28 : Courbes de calibration pour une analyse par biocode barre et une analyse directe des oligonucléotides biot-BCB. Carrés : biot-BCB détectés par l'Evareader après une analyse par biocode barre (sonde « b » + cible « b »). Ronds : Détection directe des oligonucléotides fluorescents (biot-BCB) sans analyse par biocode barre préalable. L'axe des abscisses représente pour les carrés la concentration en cible « b » et pour les ronds la concentration en cibles fluorescentes. On a aussi $[cBCB+15T]/[capture] = 2000$ et $[MB]/[LB]=1/30$.

Une limite de détection basse est importante pour l'application de l'analyse par biocode barre qu'on veut traiter à savoir le typage plaquettaire sans avoir recours à la PCR mais la discrimination entre les allèles du gène HPA-1 est essentielle si l'on veut pouvoir penser à mettre en place les protocoles développés sur des échantillons réels de patients.

On s'est intéressé ensuite à la discrimination des allèles du gène HPA-1. On a comparé, (Figure II-29), la courbe de calibration du signal obtenu pour des sondes et des cibles parfaitement complémentaires (sonde « b » + cible « b ») représentée par les carrés avec celle obtenue pour des sondes et des cibles non complémentaires à cause du mésappariement d'une base (sonde « b » + cible « a ») représentée par des triangles.

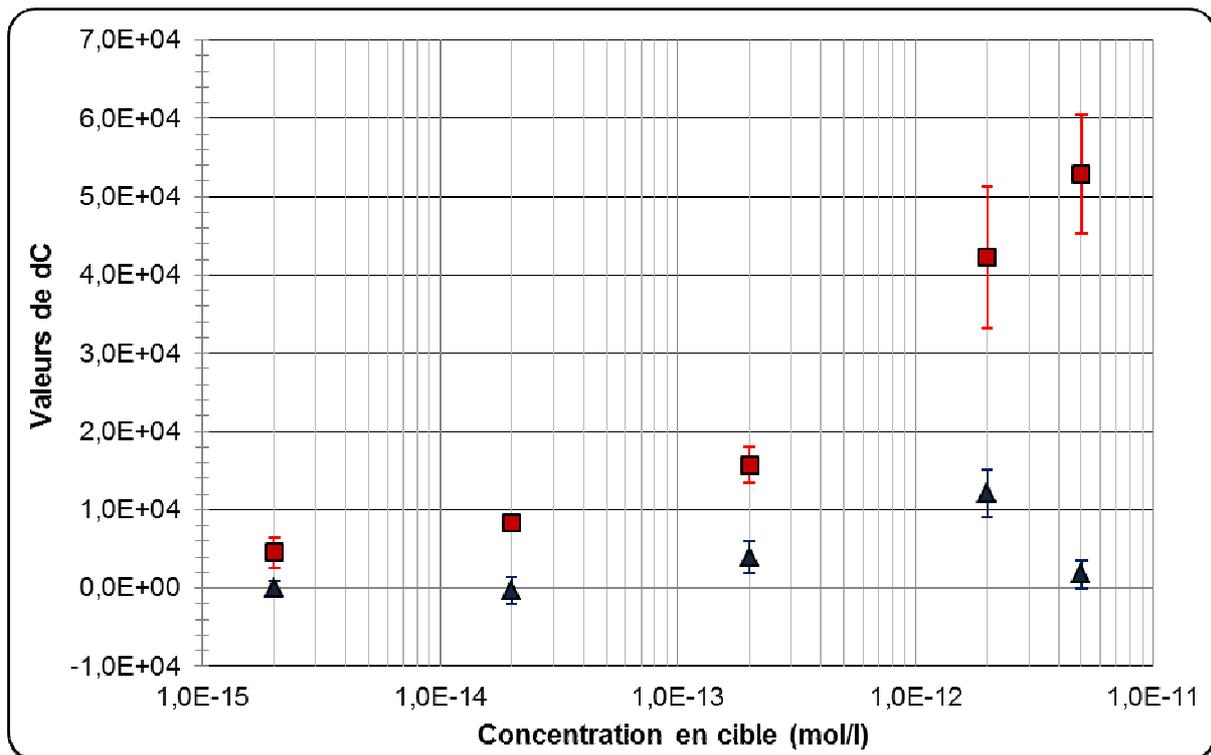


Figure II-29 : Courbes de calibration des analyses par biocode barre. Carrés : brins appariés (sonde «b» + cible «b»); Triangles: mésappariement (sonde «b» + cible «a»). Toutes les analyses ont été effectuées avec $[cBCB]/[capture] = 2000$. Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type. Les points du graphique pour des concentrations en cible inférieures à $2 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l}$ correspondent à 4 mesures. Les points du graphique pour des concentrations en cible supérieures à $2 \cdot 10^{-12} \text{ mol/l}$ correspondent à 3 mesures.

Aux deux concentrations de cibles les plus basses testées, les duplex sonde/cible comportant un mésappariement d'une base donnent une valeur de dC négative alors que les duplex parfaitement complémentaires font obtenir une valeur de dC supérieure à la limite du bruit de l'appareil. Pour les autres concentrations en cible, les SNP sont discriminés par l'obtention d'un rapport d'environ 4 entre les brins appariés et les brins mésappariés.

Ainsi, l'utilisation des Evachips neutravidine pour la détection du signal obtenu après une analyse par biocode barre pour notre modèle correspondant au génotypage plaquettaire pour le gène HPA-1 a permis de détecter une concentration de cible de 2 fmol/l, ce qui représente dans notre volume final de 500 µl la détection d'approximativement 600 000 oligonucléotides cibles tout en ayant la possibilité de discriminer les polymorphismes mononucléotidiques.

4 Comparaison avec la littérature et les méthodes de typage plaquettaire

Nous avons comparé notre méthode avec les autres méthodes de génotypage plaquettaire. Le tableau II-8 rassemble ces données.

S'il est vrai qu'en termes de limite de détection, notre utilisation d'un biocapteur à ondes évanescentes couplé à la fluorescence obtient des performances bien en deçà de celles de la scanométrie d'un ordre de grandeur allant de 200 à 4000 (2 fM de cibles détectées pour notre approche contre 7 aM de cibles détectées pour Thaxton et al.[8] et 500 zM de cibles détectées pour Nam et al.[9]) pour des cibles synthétiques, la détection par scanométrie prend beaucoup plus de temps (6 h) par rapport à notre méthode de détection qui ne met que 150 s pour analyser une Evachip et donc 8 surnageants simultanément.

Nanosphere ,Inc. [10] a développé une méthode d'hybridation sur puce de l'ADN cible avec une détection par scanométrie (l'appareil NIS 2000 étant un prototype) permettant la détection de 6.10^6 copies d'ADN génomique cible (200 fM dans 50 μ l) avec un temps d'hybridation d'une heure. Cette technique se rapproche d'une analyse par biocode barre (utilisation de nanoparticules pour la détection d'une cible et l'amplification du signal) et a des performances au niveau du temps total d'analyse bien supérieures aux nôtres (1h contre 6h) mais au point de vue de la limite de détection, nous détectons 10 fois moins de cibles. Cependant, de futurs travaux prévoient d'améliorer la sensibilité et la discrimination de SNP.

La majorité des méthodes de détection par électrochimie sont aussi rapides, voir plus rapide que notre moyen de détection tout en étant dans les mêmes gammes pour la limite inférieure de détection mais leurs inconvénients résident dans le marquage des biocodes barres effectué avec des quantum dots dans les laboratoires où sont développés ces techniques ajoutant ainsi de nombreuses heures de travail alors que nos biocodes barres fluorescents sont commerciaux.

Notre approche de l'analyse par biocode barre utilise la fluorescence mais donne une limite de détection bien meilleure d'un facteur 1000 environ que les méthodes traditionnelles de détection de la fluorescence utilisée dans la littérature comme la détection de

fluorescence sur puce tout en prenant beaucoup moins de temps grâce à l'utilisation de l'Evareader.

L'Evareader est un moyen de détection aussi voire plus performant que la plupart des moyens de détection mis en œuvre après une analyse par biocode barre et cela avec un temps de détection très court.

La question de la comparaison des performances de l'analyse par biocode barre avec les méthodes traditionnelles de typage plaquettaire se pose maintenant.

La technique MAIPA de détection et d'identification d'anticorps anti-plaquettes actuellement utilisée demande de 6 à 7 heures de travail. Ce qui représente 1 à 2 heures de travail supplémentaire par rapport au protocole utilisé pour une analyse par biocode barre et biocapteur à onde évanescente dans le cadre de ces travaux. Il faut noter que les temps d'hybridation de nos protocoles ne sont en aucun cas optimisés et peuvent être améliorés. De plus, la technique MAIPA nécessite des plaquettes humaines difficiles à obtenir et encore plus à conserver alors que le matériel génétique nécessaire pour l'analyse par biocode barre est beaucoup plus simple à obtenir (par extraction) et à conserver (conservation à -18°C sans perte des propriétés de l'ADN). Les anticorps monoclonaux que demande la technique MAIPA sont aussi très difficile à obtenir quand ceux-ci ne sont tout simplement pas absents alors que la fonctionnalisation des billes bien que nécessitant de nombreuses heures de travail est aisée à réaliser et leur stockage peut durer un mois en solution et à température ambiante.

| | Nombre de copies | Volume d'échantillon | Durée totale de l'analyse | Durée de détection | Seuil inférieur de détection |
|---|--------------------------|---|---------------------------|--------------------|------------------------------|
| PCR + électrophorèse | 1 000 000 pré-PCR | 10 µl d'ADN extrait d'un échantillon de 7 ml de sang et reconcentré à 100 000 copies par µl | 4 h-4h30 | 1h15 | |
| IDHPA | | 10 µl d'ADN pré-PCR | 5 h | 1 h | |
| BeadChip | | 8 µl d'ADN pré-PCR | 5 h | 1 h 30 | |
| Biocode barre + scanométrie [9] | 10 | 30 µl | 7 h 45 | 6 h | 500 zM |
| Biocode barre + biocapteur à onde évanescente (Thèse) | 600 000 i.e. 6.10^5 | 100 µl de sang | 5 h | 150 s | 2 fM |

Tableau II-8 : Comparaison des performances de notre analyse par biocodes barres couplée à l'Evareader avec la littérature et les méthodes de génotypage plaquettaire.

L'analyse par biocode barre a de nombreux avantages par rapport à la technique MAIPA mais qu'en est-il de la PCR ?

A partir d'un prélèvement sanguin de 7 ml contenant 7500 globules blancs par microlitre (seules cellules du sang à contenir de l'ADN) en moyenne, on extrait environ 50 millions de copies d'ADN natif. Ces copies sont concentrées dans 500 µl. Pour débiter une amplification PCR, l'Etablissement Français du Sang de la région Rhône-Alpes utilise 10 µl de cette solution reconcentrée de fragments d'ADN natif. L'EFS utilise donc un million de copies pour débiter une PCR-SSP. Les produits de PCR sont détectés grâce à l'électrophorèse sur gel d'agarose. Grâce à une limite inférieure de détection de 600000 copies dans le volume d'analyse on peut dire que l'utilisation de l'analyse par biocode barre

couplée à l'Evareader permet du moins théoriquement d'éviter l'utilisation de l'amplification par PCR. Il faut prendre en compte que tous nos résultats ont été obtenus sur les oligonucléotides de synthèse et qu'il y ait de fortes chances que la détection des différents allèles de HPA-1 ne puisse pas se faire sur l'ADN natif mais que l'on doive passer par une étape de digestion enzymatique après l'extraction de l'ADN à partir des globules blancs pour mettre en œuvre la technique des biocodes barres.

L'analyse par biocode barre par biocapteur à onde évanescente pour le génotypage plaquettaire a de très nombreux avantages par rapport au phénotypage par la méthode MAIPA et permet de s'affranchir en théorie de l'amplification PCR ce qui fait partie du cahier des charges donné par l'Etablissement Français du Sang.

5 Conclusions et perspectives

Nous avons, dans un premier temps, déterminé par diverses méthodes l'efficacité de la biofonctionnalisation des différents éléments de l'analyse. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les paramètres influençant l'analyse. Nous avons ainsi déterminé et fixé ces paramètres. Les tubes servant pour l'analyse doivent être bloqués pour empêcher l'adsorption non spécifique des biocodes barres sur les parois du tube. On fixe les concentrations relatives entre les particules magnétiques et les particules de latex à un rapport 1/30 et le rapport [cBCB]/[capture] à 2000. Deux approches analytiques différentes, la première utilisant une reconnaissance des biocodes barres par hybridation à leur complémentaire au fond de la barrette d'analyse, la seconde utilisant la reconnaissance neutravidine/biotine, sont comparées. La stratégie d'analyse par reconnaissance neutravidine/biotine plus simple à mettre en œuvre donne de meilleures performances que la stratégie par hybridation. L'utilisation des Evachips neutravidine pour la détection du signal obtenu après une analyse par biocode barre pour notre modèle (le génotypage plaquettaire pour le gène HPA-1) permet de détecter une concentration de cible de 2 fmol/l, ce qui représente dans notre volume final de 500 μ l la détection d'approximativement 6.10^5

oligonucléotides cibles tout en ayant la possibilité de discriminer les polymorphismes mononucléotidiques.

Grâce à une limite inférieure de détection de 6.10^5 de copies dans le volume d'analyse, l'analyse par biocode barre couplée à l'Evareader permet du moins théoriquement d'éviter l'utilisation de l'amplification par PCR.

Toutefois de premiers tests effectués sur de l'ADN génomique natif (molécule entière) extrait de globules blancs et sans traitement autre qu'une purification n'ont pas donné les résultats escomptés. On devra passer par une étape de digestion enzymatique ou de sonication (pour fragmenter la molécule d'ADN) pour mettre en œuvre la technique des biocodes barres et continuer à améliorer le temps total de l'analyse en diminuant les temps d'hybridation utilisés.

6 Références bibliographiques

1. Mirkin, C.A., S.J. Park, and J.M. Nam, *Bio-barcode based on oligonucleotide-modified nanoparticles*, USPTO, Editor. 2005, Northwestern University: US.
2. Bres, J.C., et al., *New method for DNA microarrays development: Applied to human platelet antigens polymorphisms*. Biomedical Microdevices, 2005. **7**(2): p. 137-141.
3. Haddour, N., et al., *Use of magnetic field for addressing, grafting onto support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(38): p. 8266.
4. Swingle, D.M., J.V. Staros, and R.W. Wright, *Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions*. Anal. Biochem, 1986. **156**: p. 220-222.
5. Goluch, E.D., et al., *A bio-barcode assay for on-chip attomolar-sensitivity protein detection*. Lab On A Chip, 2006. **6**(10): p. 1293-1299.
6. El Khoury, G., *Tests immunologiques miniaturisés pour le développement de puces à peptides et à protéines*. 2008, Ecole Centrale de Lyon: Ecully.
7. Dugas, V., et al., *Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization: covalent binding or adsorption?* Sensors And Actuators B-Chemical, 2004. **101**(1-2): p. 112-121.
8. Thaxton, C.S., et al., *A bio-bar-code assay based upon dithiothreitol-induced oligonucleotide release*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(24): p. 8174-8178.
9. Nam, J.M., S.I. Stoeva, and C.A. Mirkin, *Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity*. Journal Of The American Chemical Society, 2004. **126**(19): p. 5932-5933.
10. Storhoff, J.J., et al., *Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **19**(8): p. 875-883.

Partie B

Filaments magnétiques et P-SPRI

Filaments magnétiques et P-SPRI

Précédemment, nous avons utilisé les billes magnétiques pour former des « sandwichs » à deux particules, une magnétique et l'autre non magnétique, pour élaborer des tests biologiques de type biocode barre.

Dans cette partie du mémoire, nous présentons comment nous avons employé des particules magnétiques pour former des filaments permanents sur support solide. Notre objectif a été, plus précisément, d'employer ces filaments magnétiques pour caractériser un montage optique d'imagerie de plasmon de surface sensible à l'anisotropie. Ce système était développé par le groupe MacSyBio du Laboratoire Charles Fabry de l'institut d'Optique (LCFIO), dans le cadre du projet ANR « Nanobioforme ». Un des buts de l'équipe Chimie et Nanobiotechnologie de l'INL était de fournir un système de validation de cet imageur.

Aussi, dans le chapitre 3, nous aborderons un état de l'art succinct sur les propriétés d'assemblage de particules magnétiques, et quelques concepts sur les analyses SPR (Surface Plasmon Resonance).

Le chapitre 4 détaillera les méthodes employées pour, à partir des différentes billes magnétiques, fabriquer des filaments, les manipuler et les fixer sur différents supports d'or fonctionnalisés.

Le chapitre 5 présentera les mesures de SPRI (imagerie par résonance de plasmon de surface) obtenues sur le montage sensible à l'anisotropie (montage d'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface P-SPRI) avec nos filaments magnétiques. De plus, le savoir-faire acquis dans l'élaboration de tels filaments nous a conduits à les utiliser pour en faire de nouveaux biorécepteurs.

Chapitre 3 : Etat de l'art

1 Filaments magnétiques dans la littérature

Nous avons présenté les propriétés des particules magnétiques dans l'introduction. Récemment, l'intérêt des chercheurs s'est porté vers la capacité des particules magnétiques à s'assembler en filament lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique externe dans le but de développer un nouveau champ de recherche appelé « chimie macro-colloïdale » [1-3].

En présence d'un champ magnétique extérieur, tous les dipôles s'orientent dans la direction du champ et un moment magnétique global apparaît à l'échelle de la bille. Ceci conduit, par des phénomènes d'attraction et de répulsion, à l'organisation des billes sous forme de chaînes, orientées selon la direction du champ. Cependant, lorsque le champ magnétique est annulé les particules se dispersent (Figure III-1). Ces chaînes créées sous champ magnétique peuvent être rendues permanentes grâce à des molécules permettant de lier de manière covalente les particules entre elles. [4-6].

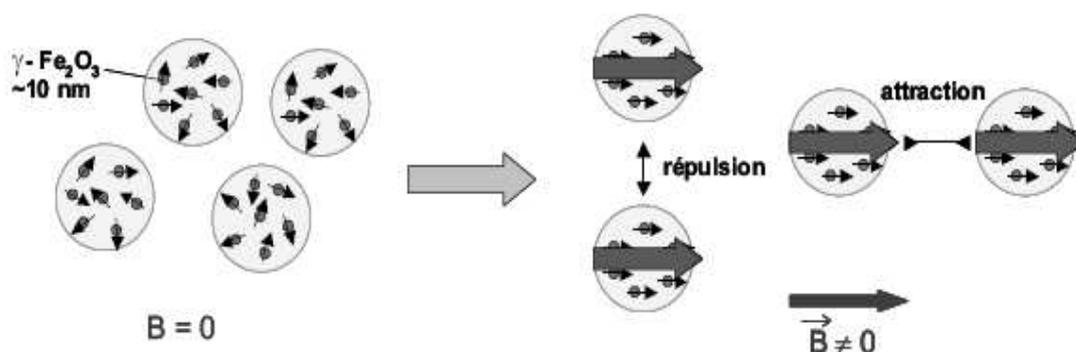


Figure III-1 : Organisation des particules magnétiques suivant le champ magnétique. Sans champ magnétique externe, les particules magnétiques sont dispersées, elles ne possèdent pas de moment magnétique global. En présence d'un champ magnétique externe, les moments magnétiques des cœurs de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ des particules s'orientent dans la direction du champ externe, créant un moment magnétique global. Il existe alors des phénomènes d'attraction et de répulsion entre les particules qui font qu'elles s'organisent en chaînes.

L'utilisation de tels filaments a été étudiée expérimentalement [7] et théoriquement [8] pour le transport de fluide et de cellules : les filaments soumis à un champ magnétique oscillant se mettent à battre propulsant les cellules auxquelles ils sont attachés comme le fait

les flagelles des bactéries. En contrôlant le champ magnétique, il est possible de changer la vitesse et la direction des cellules transportées [7].

Un film du déplacement d'un globule rouge est disponible dans les données additionnelles (vidéo 2) de l'article Dreyfus et al. [7] à l'adresse suivante :

<http://www.nature.com/nature/journal/v437/n7060/supinfo/nature04090.html>

Nous avons utilisé les propriétés d'orientation des filaments magnétiques selon le champ magnétique externe pour valider l'hypothèse qu'un banc d'imagerie de plasmon de surface peut être sensible à l'anisotropie. Nous présentons donc dans la partie suivante le principe de la résonance de plasmon de surface et les différentes méthodes d'analyse basées sur son utilisation.

2 Résonance de plasmon de surface (SPR)

La résonance de plasmon de surface est une technique de détection utilisant les propriétés optiques du milieu. Ce système permet un suivi thermodynamique et cinétique des propriétés d'association et de dissociation de molécules et biomolécules sur une surface fonctionnalisée sans utiliser de marquage.

2.1 SPR monocapteur

Dans cette partie, nous expliquons le principe de formation des plasmons de surface et comment le plasmon de surface est utilisé pour obtenir un biocapteur par SPR.

2.1.1 Principe de la SPR

Le principe de la résonance plasmonique de surface tire profit de la formation d'ondes évanescentes à l'interface de deux milieux d'indice de réfraction différents.

Lorsque la lumière frappe à l'interface de deux milieux d'indices de réfraction n_1 et n_2 avec $n_1 > n_2$ (et où le milieu 1 est le milieu incident) à un angle d'incidence θ_i supérieur à un angle d'incidence critique θ_c tel que $\theta_c = \arcsin(n_2/n_1)$, son intensité lumineuse est alors totalement réfléchi : c'est le phénomène de réflexion totale interne. Cela s'accompagne de la formation, dans le milieu de plus faible indice, d'une onde évanescente dont l'intensité

s'atténue en s'éloignant de l'interface. Cette onde est sensible aux perturbations aux environs de l'interface ce qui en fait un outil pour l'étude d'interactions biologiques.

Si une fine couche métallique est utilisée pour séparer les deux milieux alors, pour un angle $\theta_i < \theta_c$, l'intensité lumineuse est fortement réfléchiée car les métaux réfléchissent la lumière visible. Pour des angles supérieurs à θ_c on observe une baisse de la réflectivité attribuée à l'excitation des plasmons de surface pour atteindre 0 à un angle θ_r appelé angle de résonance. L'absorption de l'énergie lumineuse par le métal lors de l'excitation résultant d'un couplage de la lumière incidente et des électrons de conduction du métal provoque cette diminution de la réflectivité.

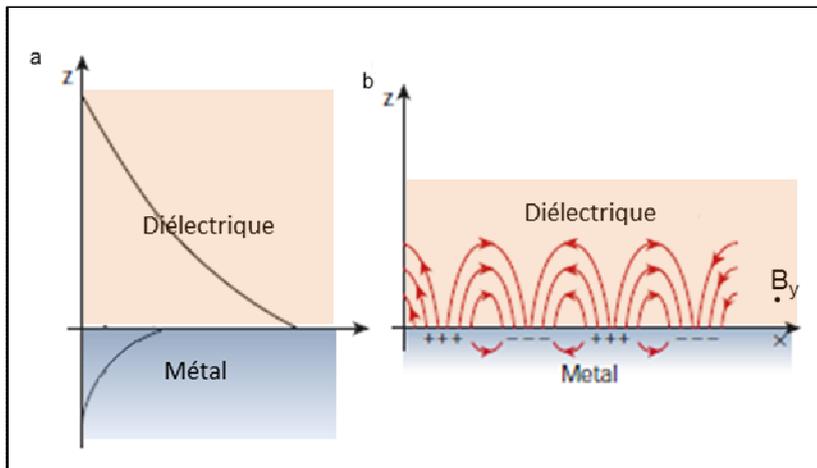


Figure III-2 : Plasmon de surface. a- Formation d'une onde évanescente à l'interface diélectrique/métal. b- Oscillations des électrons propageant le plasmon le long de l'interface.

Au niveau de l'interface milieu diélectrique 2/métal, le plasmon issu du couplage d'une oscillation des électrons se propageant le long de cette interface [9] avec le champ électromagnétique génère une onde évanescente dans le milieu diélectrique 2 (Figure III-2).

Afin de pouvoir coupler l'onde incidente avec un mode de plasmon de surface, Otto [11] propose l'utilisation d'un prisme à fort indice au-dessus de la couche de diélectrique pour augmenter la valeur du vecteur d'onde de la lumière. Le problème posé par cette configuration est qu'elle est très sensible aux inhomogénéités du diélectrique dans le cas où celui-ci est un liquide. La configuration dite de Kretschmann pour laquelle le prisme est en contact avec le métal lui est en général préférée. Ces deux configurations sont représentées en Figure III-3.

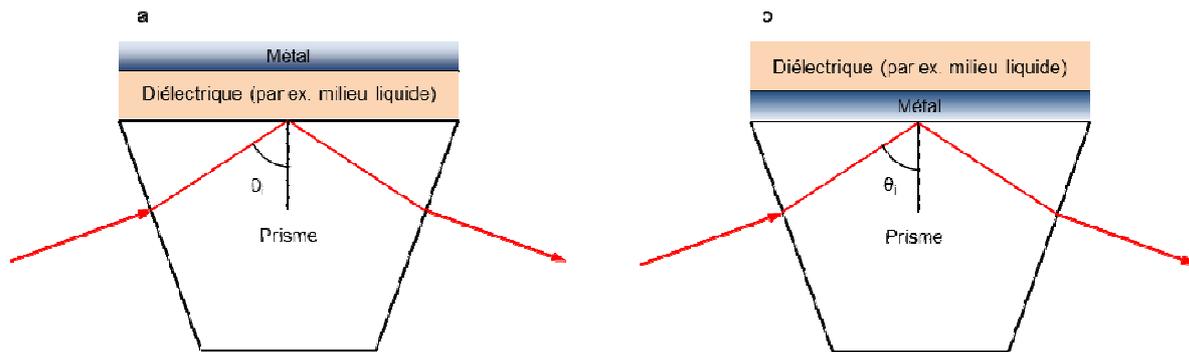


Figure III-3 : Schéma des configurations possibles utilisant un prisme à fort indice pour observer la résonance de plasmon de surface. a- configuration d'Otto. b- Configuration de Kretschmann.

La nature du métal utilisé joue aussi un rôle important dans le couplage. En effet, chaque métal a une résonance de plasmon à une longueur d'onde qui lui est propre ainsi que des caractéristiques de dispersion qui vont influencer le couplage entre l'onde incidente et le plasmon de surface (Tableau III-1).

| Métal support du plasmon de surface | Argent | | Or | |
|---|------------------------------|------------------------------|--|---|
| | Longueur d'onde d'excitation | Longueur de propagation (mm) | Profondeur de pénétration dans le métal (nm) | Profondeur de pénétration dans le diélectrique (nm) |
| Longueur d'onde d'excitation | 630 nm | 850 nm | 630 nm | 850 nm |
| Longueur de propagation (mm) | 19 | 57 | 3 | 24 |
| Profondeur de pénétration dans le métal (nm) | 24 | 23 | 29 | 25 |
| Profondeur de pénétration dans le diélectrique (nm) | 219 | 443 | 162 | 400 |
| Concentration du champ dans le diélectrique (%) | 90 | 95 | 85 | 94 |

Tableau III-1 : Caractéristiques des plasmons de surface à une interface métal/eau d'après Homola et al. [10]

Pour la mise au point d'un système optique de SPR, (thèse d'Aurélien Duval [12]), les métaux employés doivent avoir des résonances plasmons dans le visible ou le proche infrarouge (entre 400 nm et 1200 nm environ). Des métaux tels l'or, l'argent, le cuivre ou l'aluminium présentent cette propriété. Cependant, le métal doit rester stable sans le temps. Les métaux les plus couramment utilisés sont l'argent et l'or, l'argent donnant la meilleure qualité de résonance [13] mais de par sa stabilité chimique et sa biocompatibilité, l'or est le métal de choix pour la conception de puce pour la SPR.

Nous avons présenté le principe de formation des plasmons de surface, nous allons maintenant expliquer brièvement comment le plasmon de surface est utilisé pour obtenir un biocapteur optique.

2.1.2 Utilisation de la SPR

Les plasmons résultent donc du couplage du champ électromagnétique de la lumière incidente et de l'oscillation des électrons de la couche métallique et ils se propagent le long de l'interface entre un diélectrique et un métal. La propagation de cette onde électromagnétique évanescente est sensible aux changements de constante diélectrique se produisant sur la couche de métal. Ainsi, le dépôt d'une couche de matériau diélectrique sur la surface de métal entraîne des modifications dans le couplage entre l'onde incidente et le plasmon de surface qui se traduisent par un décalage de la courbe de résonance (Figure III-4).

On peut suivre les changements d'indices au niveau de la surface en mesurant soit la variation de l'angle de résonance $\Delta\theta$, soit la variation de réflectivité ΔR à un angle fixe correspondant au point d'inflexion de la pente de réflectivité pour avoir la meilleure sensibilité. Puisqu'il existe une relation entre le changement de réflectivité et la quantité de matériel biologique ou non sur la surface, on peut ainsi quantifier dans le cadre de biopuce les interactions biologiques ayant lieu. De plus, en mesurant ces variations dans le temps, on peut suivre les cinétiques de modification d'indice optique au niveau de l'interface et ainsi dans le cas de biopuce SPR les interactions biologiques ayant lieu sur celle-ci en temps réel sans l'utilisation de marqueurs.

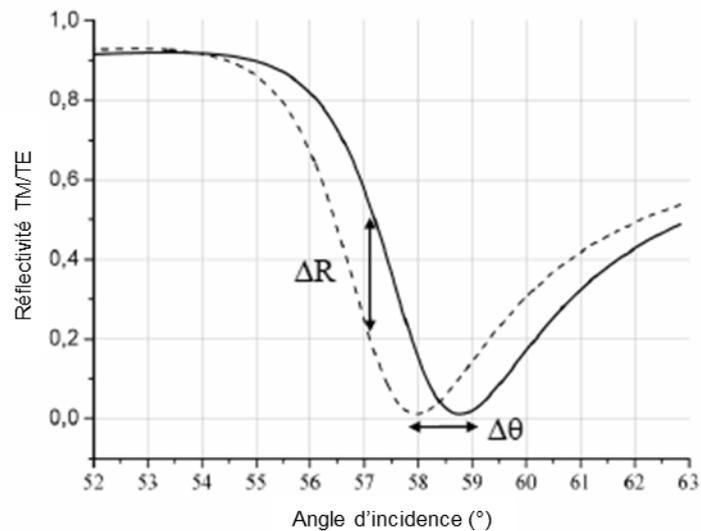


Figure III-4 : Réflectivité angulaire d'un montage mono-capteur simulé pour une différence d'indice de 10^{-2} RIU. En trait plein : un milieu d'indice 1,33. En pointillé : un milieu d'indice 1,34.

La Figure III-5 montre l'évolution temporelle de la réflectivité d'un biocapteur à SPR lors de l'adsorption sélective d'une biomolécule A sur une surface fonctionnalisée S. L'injection dans le milieu liquide de biomolécules A au temps t_0 augmente la réflectivité de ΔR indiquant un changement de quantité de matière sur la surface de la lame correspondant à l'adsorption de la biomolécule sur cette surface (formation de SA). Le lavage de la lame au temps t_1 abaisse la réflectivité indiquant la désorption de la biomolécule (dissociation de SA en S+A).

La sensibilité et la réponse en différence de réflectivité (ΔR) dépendent de nombreux facteurs [14-17] tels que la densité de surface de l'élément de reconnaissance, la concentration de l'analyte, la masse de l'analyte (taille de la séquence pour de l'ADN, la taille de la protéine), la force ionique, le pH, la température ...)

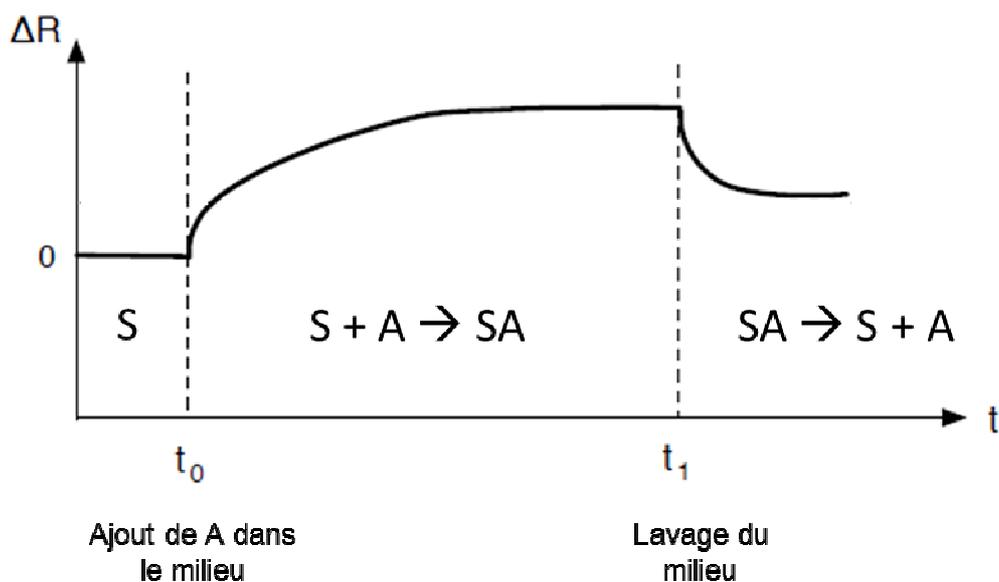


Figure III-5 : Evolution temporelle de la réflectivité ΔR d'un biocapteur à SPR lors de l'adsorption sélective d'une biomolécule sur une surface fonctionnalisée.

Par exemple, pour l'hybridation de l'ADN, la sensibilité de la SPR est de l'ordre du nanomolaire. Une limite de détection de 10 pM a été atteinte pour l'hybridation d'oligonucléotides 24-mers (avec une densité de surface $\leq 8 \times 10^8$ molécules/cm²) [18]. Le tableau III-2 donne quelques exemples d'études d'interactions biomoléculaires faites par SPR.

| Publication | Type de reconnaissance (sonde/cible) | Concentration cible en | Réponse ΔR |
|---------------------|--|------------------------|---------------------------|
| Hottin et al. [14] | ADN/ADN (19-mers) | 15 μ M | 0,8 % |
| Goodrich et al.[19] | ARN/ADN (20-mers) | 500 nM | 1 % |
| Corne et al.[20] | ADN db / Enzyme (Fpg) | 50 nM | 0,75% |
| | ADN db avec un brin endommagé / Enzyme (Fpg) | 50 nM | 1,8-2% |
| Myszka.[21] | Récepteur α interleukine-2 (IL-2)/ IL-2 | 233 nM | 8 RU (pour Response Unit) |

Tableau III-2 : Exemples d'interaction étudiée en SPR et de leur réponse en réflectivité

La SPR monocapteur est à l'heure actuelle largement utilisée pour étudier les cinétiques d'interactions entre 2 biomolécules ou entre une biomolécule et un type de surface. Cependant, la limitation principale d'un tel système reste le manque de multiplexage des données, notamment pour l'analyse de biopuces. Aussi, afin de permettre des mesures

parallèles, l'idée d'une SPR multicapteur a été proposée : c'est l'imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI).

2.1.3 Imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI)

L'imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) a été développée par le groupe de Knoll [22] pour observer l'hybridation d'oligonucléotides.

Un appareil d'imagerie (Figure III-6) par résonance de plasmon de surface consiste en une source de lumière polarisée p . Ce faisceau est acheminé à la surface par un prisme de couplage. La lumière est réfléchiée par la surface vers un détecteur de type caméra CCD (Charge-Coupled Device).

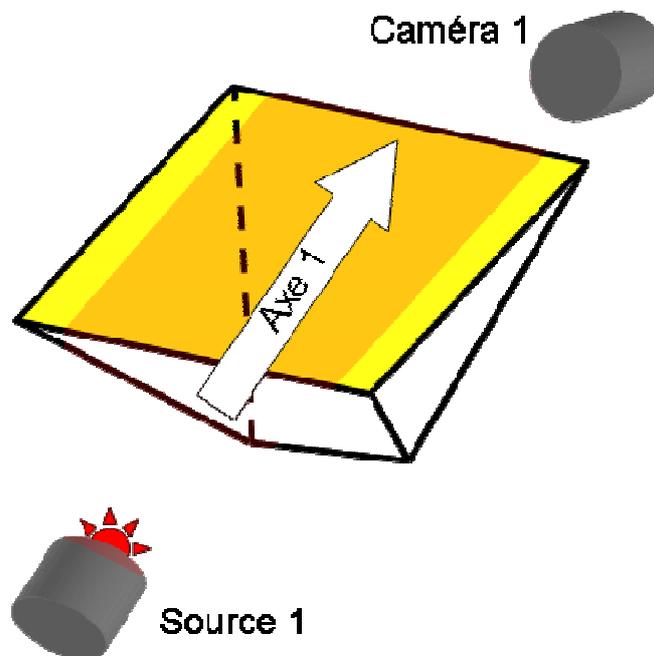


Figure III-6 : Schéma d'un montage d'imagerie par résonance de plasmon de surface.

La méthode de mesure la plus répandue en imagerie SPR consiste à suivre, pour un angle d'incidence et une longueur d'onde fixés, les variations de la réflectivité dues au déplacement du pic d'absorption de la SPR. Cette méthode est appelée interrogation en réflectivité. Dans ce cas, la surface d'or est éclairée à un angle donné (l'angle correspondant au point d'inflexion de la pente de réflectivité) par un faisceau laser d'une longueur d'onde donnée. La caméra CCD va collecter l'intensité de la lumière réfléchiée en tant qu'image. Chaque pixel de l'image obtenue correspond à un endroit spécifique de la surface d'or et

permet d'obtenir des informations sur les changements intervenant en ce point de la surface. Les changements d'intensité de lumière sont proportionnels aux changements d'indice de réfraction dus à la fixation de biomolécules (ou tous autres ligands) à la surface. L'intensité des niveaux de gris de l'image est corrélée à la quantité de matériel liée à la zone de la surface analysée. L'image permet de générer des sensogrammes qui sont analysés par l'utilisateur de l'appareillage SPRI (Figure III-7).

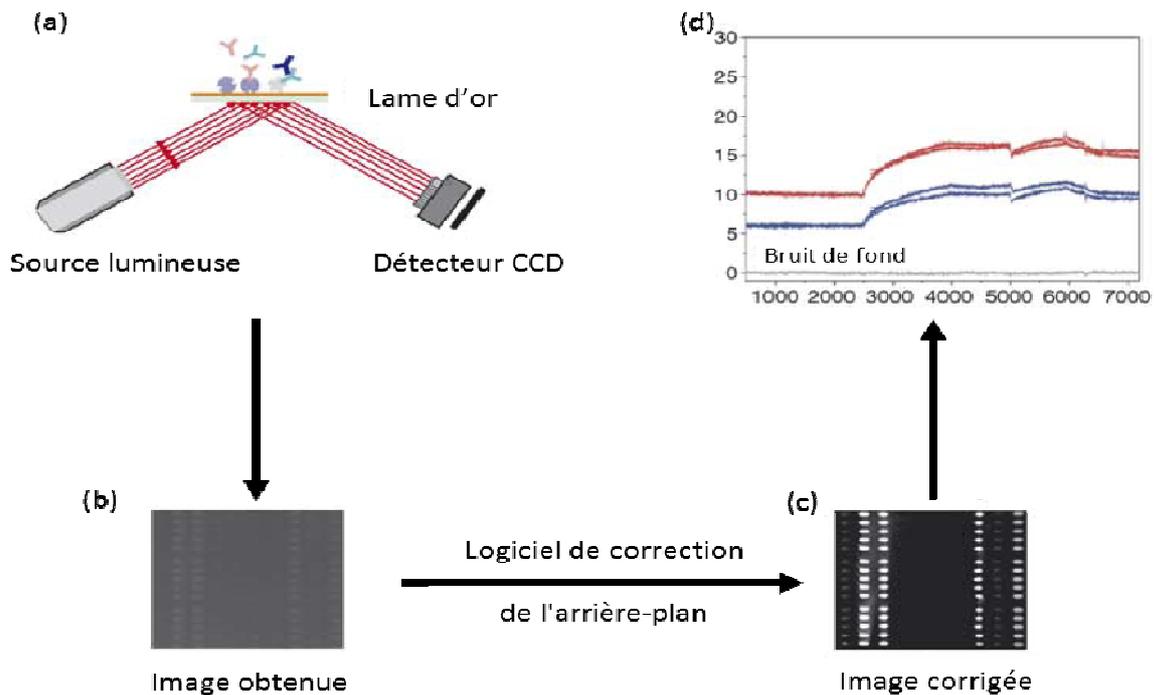


Figure III-7 : (a) Interaction biologique détectée par SPRI. (b) Obtention d'une image brute grâce à une caméra CCD. (c) Soustraction de l'arrière-plan en utilisant un logiciel de correction et obtention d'une image corrigée. (d) Sensogrammes générés par l'analyse de l'image corrigée. D'après Boozer et al.[23]

Puisque tous les pixels de la caméra sont analysés simultanément, ce système permet des analyses à haut débit de la quantité adsorbée par rapport à la position sur la surface. Il est compatible pour la production et l'analyse de biopuces (puces à ADN, puces à protéines, puces à sucres etc..). On trouvera par exemple des puces SPR Biacore sur le site :

(http://www.biacore.com/lifesciences/technology/introduction/types_interaction/index.html)

L'imagerie par résonance de plasmon de surface présente deux avantages importants par rapport à la SPR classique :

- La capacité de visualiser la surface complète de la puce SPR en temps réel
- La possibilité d'analyser plusieurs interactions moléculaires en continu et simultanément.

2.2 Imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface (P-SPRI)

L'équipe MacSyBio du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique (LCFIO) a développé différents bancs originaux pour l'imagerie de plasmon de surface. Parmi ces bancs, ils ont notamment mis en place un imageur SPR sensible à l'anisotropie des objets déposés sur la surface d'or. [12, 24].

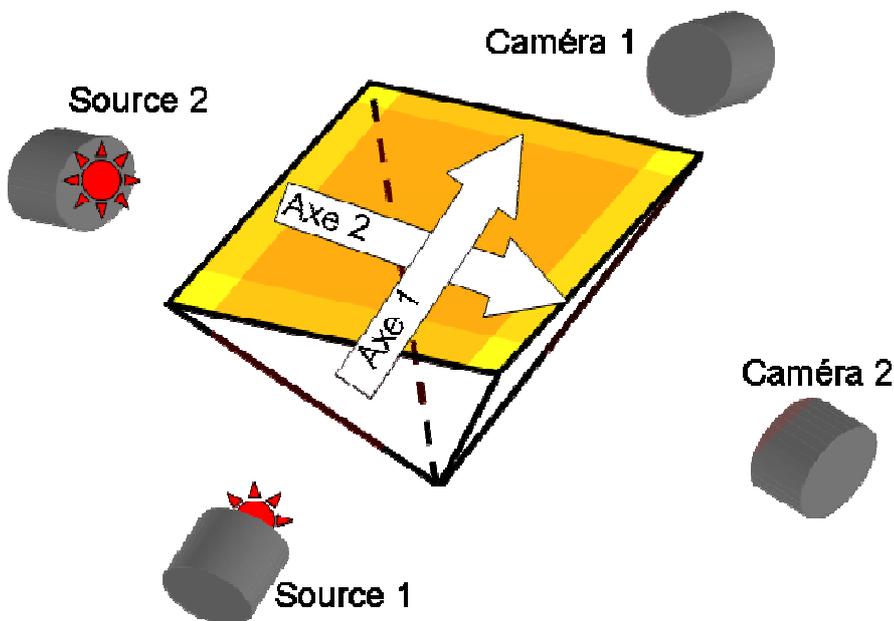


Figure III-8 : Schéma d'un montage d'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface

Un imageur SPR classique emploie un faisceau lumineux orienté selon un axe unique. Ce faisceau, émis par exemple par un laser, est acheminé vers la surface d'or grâce à un prisme. La réflexion du faisceau incident sur l'or est captée par une caméra.

Le système SPRI en anisotropie du LCFIO fait intervenir une pyramide à la place du prisme. Ceci permet d'employer deux axes source/caméra, orientés à 90° l'un de l'autre, pour sonder les propriétés de la surface d'or. Chaque axe permet de générer une image SPR. Tous les phénomènes isotropes optiquement devraient renvoyer un même type de signal SPR, pour l'axe 1 et l'axe 2. Par contre, des objets présentant une anisotropie optique,

c'est-à-dire les objets pour lesquels la réfraction de la lumière diffère selon les directions de l'espace (biréfringence), devraient renvoyer deux types de signaux SPR pour l'axe 1 et l'axe 2. Pour chaque axe du système, le miroir ainsi que la caméra sont pilotés informatiquement. L'équipe MacSyBio a opté pour un contrôle de chaque axe de manière autonome, le dispositif utilise donc deux ordinateurs de pilotage du banc. Le logiciel de pilotage du banc a été développé sous Labview. Il permet d'effectuer aussi bien un balayage angulaire pour déterminer l'angle de travail, que des acquisitions en temps réel des données à angle fixe. Ce logiciel permet d'afficher des images de différence par rapport à une image de référence et de visualiser en direct les courbes de réflectivité de points sélectionnés. Un outil de post traitement des données a été développé pour traiter les images obtenues en temps réel, pour calculer les différences de réflectivité entre les deux axes et afficher l'anisotropie en temps réel.

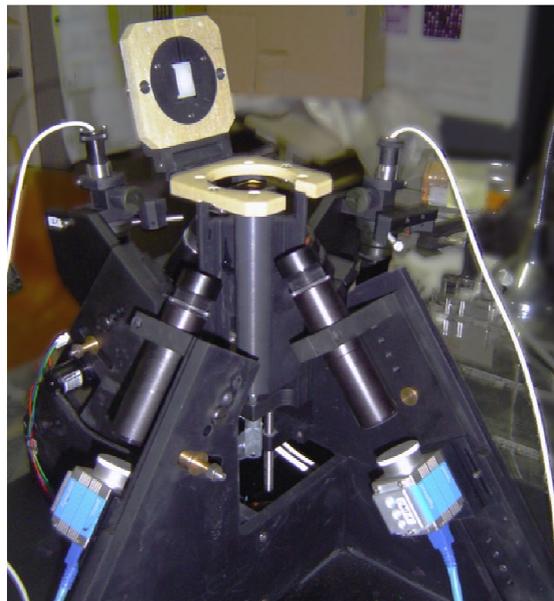


Figure III-9 : Photographie du banc de P-SPRI, les deux caméras sont visibles en bleu. Le prisme pyramidal est disposé au centre de la colonne.

Pour valider le banc de P-SPRI (Figure III-9) dans son utilisation pour des mesures d'anisotropie, nous avons conçu des filaments de billes immobilisés à la surface qui soumis à un champ magnétique changent d'orientation et permettent de vérifier que le banc détecte bien une différence d'indice en fonction de cette orientation.

3 Conclusions et objectifs

L'imagerie par résonance de plasmon de surface (SPRI) est une méthode de détection permettant des mesures cinétiques de reconnaissance biologique sans marquage. Elle permet le multiplexage sur puce. Le développement d'imageurs originaux permettra d'obtenir de nouvelles informations sur les interactions entre biomolécules. L'équipe MacSyBio du LCFIO a développé un banc de SPRI devant être sensible à l'anisotropie optique du milieu. Dans le cadre d'une collaboration entre nos deux équipes (Projet Nanobioforme » soutenu par l'ANR P-Nano, nous avons développé une expérience permettant de valider leur nouveau banc en utilisant des filaments magnétiques permanents.

Un des objectifs de cette thèse a été de développer des protocoles de fabrication de filaments magnétiques permanents immobilisés sur une surface dont la partie supérieure est mobile et sensible au champ magnétique.

Dans la suite de ce mémoire, nous présentons les procédés de fabrication de ces filaments sur différents supports et pour différents matériels de base (billes de différents diamètres) ainsi que leur caractéristique géométrique. Deux applications ont été réalisées à partir de ces filaments :

- la première concerne la validation du banc de P-SPRI construit par l'équipe MacSyBio,
- la seconde est leur utilisation pour la reconnaissance biologique sur puce du gène HPA-1

4 Références bibliographiques

1. Boal, A.K., et al., *Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates*. Nature, 2000. **404**(6779): p. 746-748.
2. Cohen-Tannoudji, L., et al., *Polymer bridging probed by magnetic colloids*. Physical Review Letters, 2005. **94**(3).
3. Pedrero, F.M., et al., *Forming chainlike filaments of magnetic colloids: The role of the relative strength of isotropic and anisotropic particle interactions*. Journal Of Chemical Physics, 2006. **125**(8).
4. Goubault, C., et al., *Self-assembled magnetic nanowires made irreversible by polymer bridging*. Langmuir, 2005. **21**(9): p. 3725-3729.
5. Xiong, Y., et al., *The formation of legume-like structures of Co nanoparticles through a polymer-assisted magnetic-field-induced assembly*. Nanotechnology, 2007. **18**(34).
6. Goubault, C., et al., *Flexible Magnetic Filaments as Micromechanical Sensors*. Physical Review Letters, 2003. **91**(26): p. 260802.
7. Dreyfus, R., et al., *Microscopic artificial swimmers*. Nature, 2005. **437**: p. 862-865.

8. Gauger, E.M., M.T. Downton, and H. Stark, *Fluid transport at low Reynolds number with magnetically actuated artificial cilia*. European Physical Journal E, 2009. **28**(2): p. 231-242.
9. Ritchie, R.H., *Surface plasmons in solids*. Surface Science, 1973. **34**(1): p. 1.
10. Homola, J., S.S. Yee, and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B: Chemical, 1999. **54**(1-2): p. 3.
11. Otto, A., *Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection*. Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 1968. **216**(4): p. 398.
12. Duval, A., *Système de biopuces à imagerie plasmonique polarimétrique pour caractérisation dynamique de l'anisotropie de films nano-fonctionnalisés et nano-structurés*. 2009, Institut d'Optique Graduate School.
13. Debruijn, H.E., R.P.H. Kooyman, and J. Greve, *Choice Of Metal And Wavelength For Surface-Plasmon Resonance Sensors - Some Considerations*. Applied Optics, 1992. **31**(4): p. 440-442.
14. Hottin, J., et al., *Plasmonic DNA: Towards Genetic Diagnosis Chips*. Plasmonics, 2007. **2**(4): p. 201.
15. Jeenanong, A. and H. Kawaguchi, *Effect of pH and temperature on the behavior of microgel in SPR sensor*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2008. **315**(1-3): p. 232.
16. Myszka, D.G., *Analysis of small-molecule interactions using Biacore S51 technology*. Analytical Biochemistry, 2004. **329**(2): p. 316.
17. Rich, R.L. and D.G. Myszka, *Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature*. Journal of Molecular Recognition, 2007. **20**(5): p. 300.
18. He, L., et al., *Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization*. Journal of the American Chemical Society, 2000. **122**(38): p. 9071.
19. Goodrich, T.T., H.J. Lee, and R.M. Corn, *Direct Detection of Genomic DNA by Enzymatically Amplified SPR Imaging Measurements of RNA Microarrays*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(13): p. 4086.
20. Corne, C., et al., *SPR imaging for label-free multiplexed analyses of DNA N-glycosylase interactions with damaged DNA duplexes*. Analyst, 2008. **133**(8): p. 1036.
21. Myszka, D.G., *Improving biosensor analysis*. Journal of Molecular Recognition, 1999. **12**(5): p. 279.
22. Piscevic, D., et al., *Oligonucleotide Hybridization Observed By Surface-Plasmon Optical Techniques*. Applied Surface Science, 1995. **90**(4): p. 425-436.
23. Boozer, C., et al., *Looking towards label-free biomolecular interaction analysis in a high-throughput format: a review of new surface plasmon resonance technologies*. Current Opinion in Biotechnology, 2006. **17**(4): p. 400.
24. Duval, A., et al., *Polarimetric surface plasmon resonance imaging biosensor*. Optics Letters, 2009. **34**(23): p. 3634-3636.

Chapitre 4 : Filaments magnétiques immobilisés sur support

Nous présentons dans cette partie les résultats expérimentaux obtenus pour former des filaments magnétiques sur supports.

Nous exposons d'abord les méthodes de formation et d'adressage des filaments magnétiques sur support de verre. Nous montrons comment la méthodologie a été adaptée aux supports d'or. Deux types de supports d'or ont été testés : des lames d'or homogènes, et des supports mixtes « or + verre » nécessitant une double fonctionnalisation chimique.

1 Formation de filaments magnétiques sur support de verre

Nous décrivons ci-dessous la méthode générale de formation de filaments permanents ancrés sur support de verre, par assemblage de particules magnétiques sous champ magnétique. Nous présentons ensuite une méthode pour localiser sous pointe des spots de filaments.

1.1 Méthodologie générale

Les premiers protocoles et méthodes de formation de filaments sur support ont été développés dans l'équipe lors du stage post-doctoral de Naoufel Haddour. [1]

La méthodologie générale consiste à assembler des particules magnétiques (latex ferromagnétiques comportant des acides carboxyliques en surface, ou « carboxylatex ») sous forme de filament, grâce au champ magnétique d'un aimant placé sous un support (typiquement une lame de verre présentant des acides carboxyliques de surface suite à une étape préalable de silanisation). L'orientation du champ magnétique permet de former des filaments perpendiculaires à la surface du support, et plaqués sur sa face supérieure (Figure IV-1).

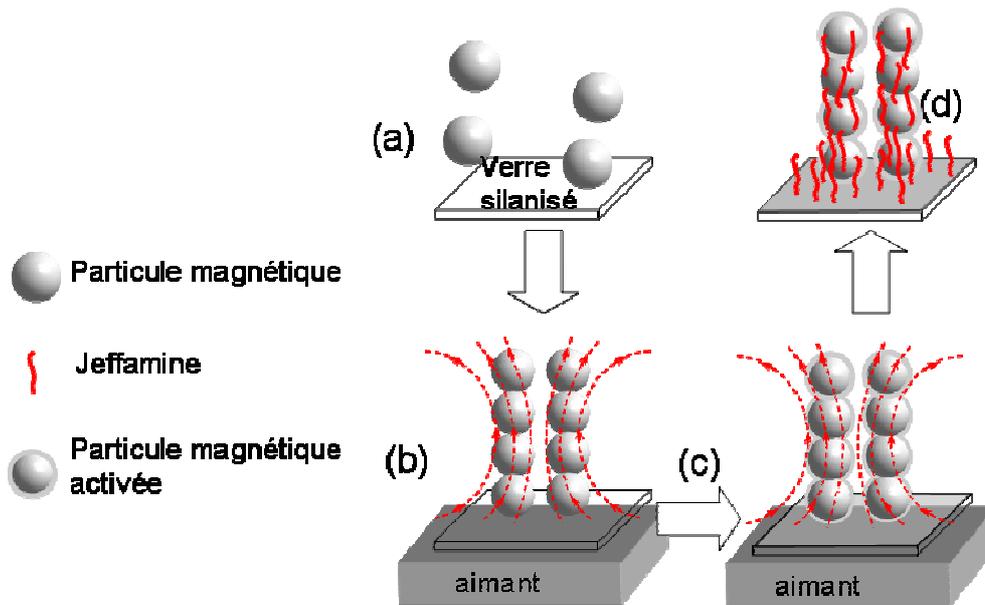


Figure IV-1 : Méthodologie générale de formation de filaments magnétiques sur support : des particules magnétiques en milieu liquide sont placées sur un support solide, typiquement une lame de verre silanisée (a). Sous l'action d'un aimant placé sous la lame, les particules s'assemblent sous forme de filaments verticaux plaqués contre le support horizontal. Les surfaces du verre silanisé et des particules sont activées chimiquement, tandis que le champ magnétique fixe la position des filaments (c). Les surfaces activées réagissent avec des chaînes qui rendent les filaments permanents, et les fixent au support (d).

L'orientation et la position sur le support de chaque filament sont fixées tant que le champ magnétique sous le support est maintenu. Dans ces conditions, l'injection d'une solution de NHS / EDCI dans le milieu liquide permet d'activer les acides carboxyliques des particules et du verre silanisé (Figure IV-1 a, b). L'injection doit être réalisée à faible débit, de manière à ne pas perturber le positionnement des filaments. L'activation sur une nuit à température ambiante permet de former des esters activés hautement réactifs. Une deuxième injection, toujours sous champ magnétique, d'une solution de diamine (typiquement, une Jeffamine Figure IV-1 c), permet de ponter chaque particule avec ses voisines directes, ainsi que l'extrémité inférieure de chaque filament avec le support silanisé (Figure IV-1 d).

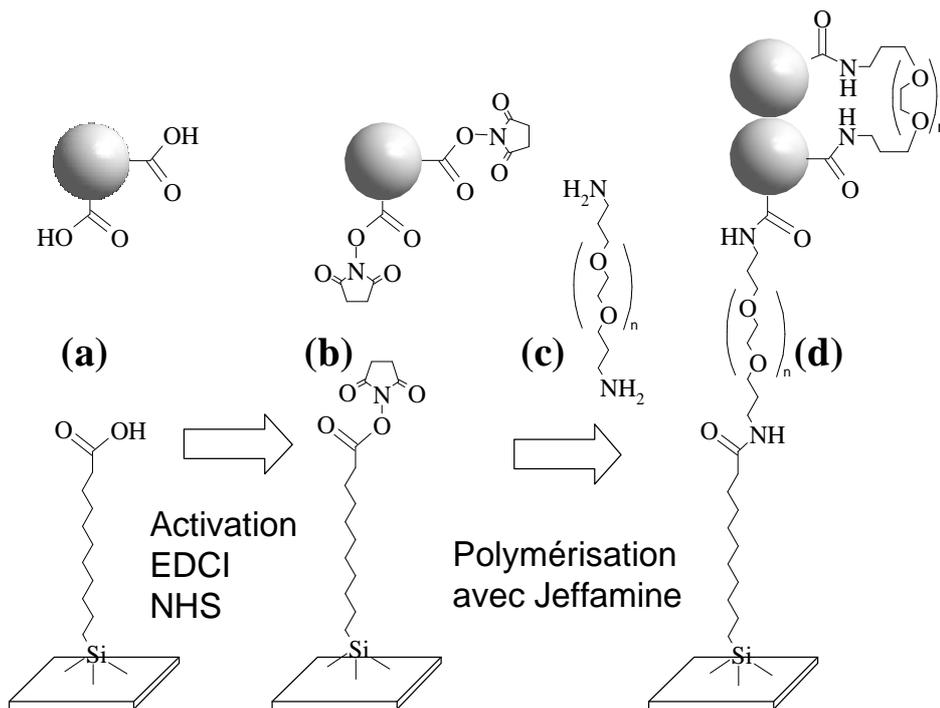


Figure IV-2 : Réactions chimiques pour la formation de filaments permanents greffés sur support. (a) Les particules et le verre silanisé portent des acides carboxyliques COOH en surface. (b) Une étape d'activation NHS/EDCI permet de former des esters activés. (c) Les esters activés de surface réagissent chimiquement avec les amines primaires -NH₂ d'une diamine à longue chaîne (Jeffamine). (d) Chaque extrémité de filament est alors fixé de manière covalente sur la surface, tandis que les particules sont reliées entre elles.

Il était ainsi possible de fabriquer des massifs de filaments magnétiques parallèles, stables, greffés par liaison covalente sur la surface du support

1.2 Méthodes de localisation de filaments magnétiques

La méthodologie générale décrite ci-dessus a été déclinée de différentes manières, afin de tester plusieurs méthodes de localisation de massifs de filaments magnétiques sur support (Figure IV-3).

La méthode la plus simple (Figure IV-3 a) consiste à former des filaments sur une grande surface du verre (format lame de verre) de manière homogène. Pour cela, nous utilisons une chambre fluïdique composée d'un joint en silicone et d'une feuille de plastique percée de 2 trous (typiquement une chambre Coverwell). La dimension de la cellule fluïdique doit être inférieure à la taille de l'aimant imposant le champ magnétique, de manière à éviter

les effets de bord, et à assurer que l'ensemble des lignes de champ soient perpendiculaires à la surface du verre. L'aimant employé est un néodyme de forme parallélépipédique d'environ 4 cm de longueur, 2 cm de largeur, 1 cm de hauteur, et de champ 1 Tesla au contact (0,3 T à 5 cm de l'aimant).

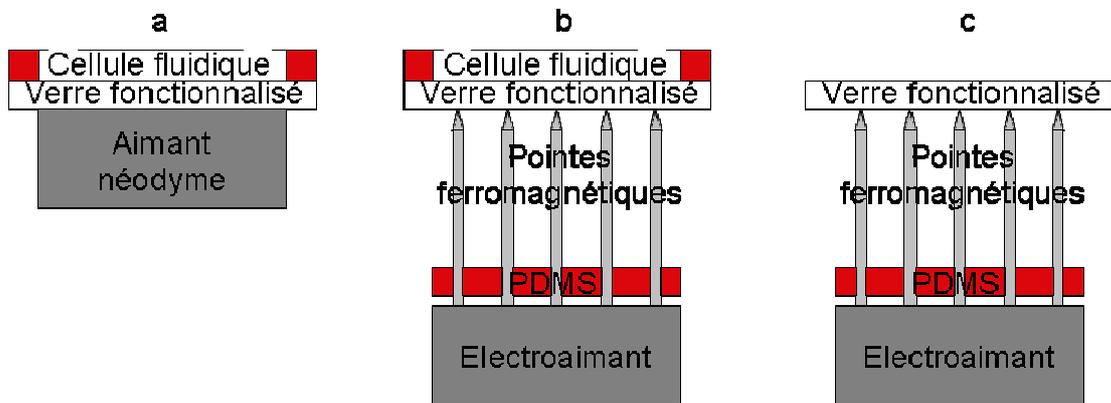


Figure IV-3. Méthodes de localisation de filaments magnétiques sur support. (a) formation de filaments au-dessus de toute la surface d'un aimant néodyme. (b) Localisation de champ magnétique en des points fixés par des aiguilles métalliques, connectées à un électroaimant. (c) Même dispositif que (b), mais sans chambre fluide, pour dépôts à la micropipette.

Une deuxième méthode vise à former des spots de filaments en des points précis du support (Figure IV-3 b et c). A cet effet, nous avons fabriqué un support en PDMS dans lequel nous avons enchâssé une matrice d'aiguilles métalliques magnétisables, d'un diamètre d'environ 1 mm et de 3 cm de longueur. Ces aiguilles sont en contact avec un électroaimant de type « ventouse ». Ce type d'électroaimant magnétise les aiguilles, mais ne produit pas directement de champ magnétique significatif au voisinage de la lame de verre. Dans ces conditions, les seuls champs magnétiques significatifs générés au-dessous de la lame de verre sont émis par les pointes des aiguilles.

Ce système a été employé de deux manières pour localiser des filaments magnétiques au-dessus des pointes.

La première approche consiste à injecter une solution homogène de particules magnétiques dans une chambre fluide (Figure IV-4a). La mise en service de l'électroaimant permet alors de capturer les billes situées au-dessus des pointes, et de les assembler sous forme de filaments. Les autres particules ne sont pas perturbées, et restent

distantes les unes des autres. Si l'on supprime l'action de l'électroaimant, les particules se redispersent dans la solution. Aussi, l'injection dans la cellule de solutions d'activation et de diamine permet de stabiliser les filaments formés au-dessus des aiguilles, et de les ancrer sur la surface. Par cette approche, on obtient sur la surface, des spots de filaments de même composition.

L'autre approche consiste à déposer à la micropipette des gouttes de solution de billes, directement au-dessus des pointes magnétiques (Figure IV-4b), puis à rajouter dans chaque goutte les solutions d'activation et de diamine. L'intérêt de cette dernière méthode est la possibilité de fabriquer des filaments de compositions différentes en déposant des gouttes de solutions différentes. Une difficulté réside dans le fait que les gouttes ne doivent pas se mélanger.

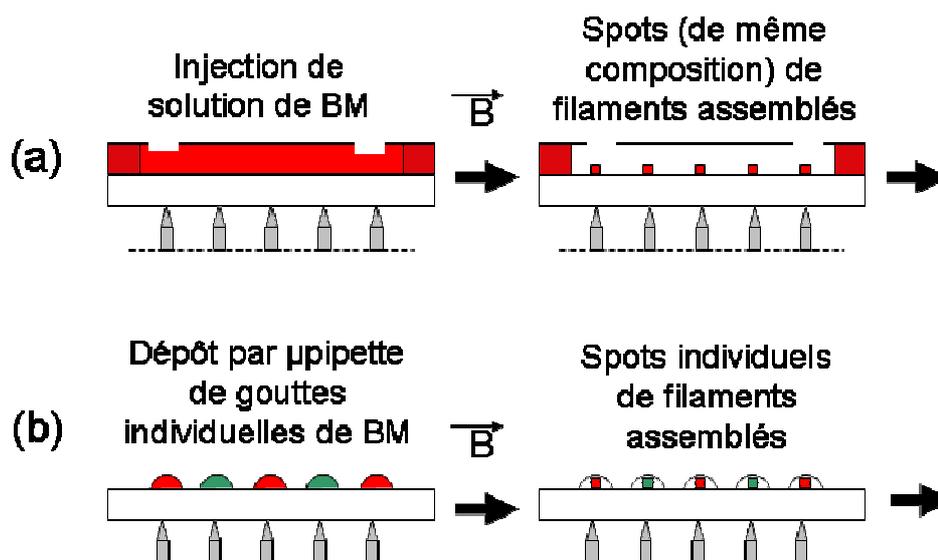


Figure IV-4. Deux approches de concentration de filaments avec aiguilles magnétiques

Dans tous les cas, il est nécessaire d'éviter l'évaporation du solvant, dans la chambre ou pour les gouttes déposées, afin d'empêcher le séchage des filaments. Le système est donc placé dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau. L'utilisation du support d'aiguilles enchassées permet de localiser les spots de filaments de manière reproductible. Soulignons toutefois, qu'il est nécessaire de procéder à de nombreuses injections des solutions d'activation et de diamine.

1.3 Caractérisations des filaments magnétiques sur verre

1.3.1 Stabilité des filaments magnétiques

Quelles que soit la méthode de dépôt employée (aimant néodyme, dépôt sur aiguille), seuls les filaments assemblés en présence de solution d'activation et de diamine restent stables après la suppression du champ magnétique. Nous avons vérifié que les filaments ainsi formés résistent à des lavages sous ultrasons en solution détergente. De plus, ces filaments sont fortement ancrés sur la surface, car ils ne se translatent pas ou ne s'éloignent pas de la surface du verre lorsque par exemple on place un aimant au-dessus de la surface du verre.

Au contraire, les particules des filaments assemblés en l'absence d'activation ou de diamine se dispersent dans la solution (Figure IV-5), et peuvent être déplacées à l'intérieur de la solution, par l'application d'un champ magnétique externe.

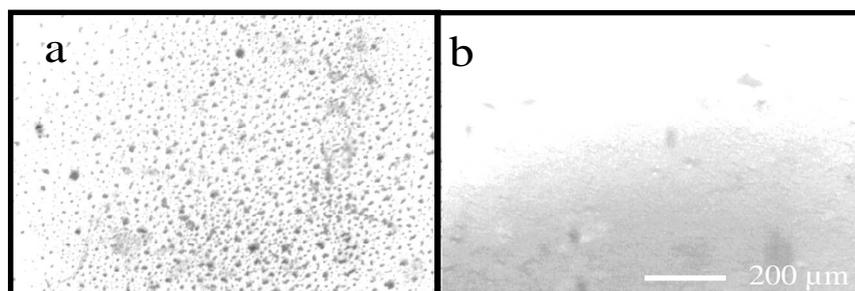


Figure IV-5 : Stabilité des filaments formés. (a) Image en microscopie optique de filaments formés sur support. Chaque point de l'image est un filament vertical observé du dessus. En l'absence de champ magnétique, ces filaments restent stables (b) Les filaments formés sans ajout de solution d'activation, ou de solution de diamine, ne sont pas stables, et disparaissent dès qu'on stoppe le champ magnétique.

Nous considérons donc que les réactions chimiques entre les particules, et entre les particules et la surface silanisée, ont été correctement mises en œuvre (Figure IV-2).

1.3.2 Orientation des filaments magnétiques

Alors que les filaments permanents greffés sur support ne peuvent pas être translétés ou éloignés de la surface, il est possible de modifier leur orientation grâce à un champ magnétique externe (Figure IV-6) Les filaments peuvent être orientés dans toutes les

directions, à l'intérieur d'un angle solide de 2π . En l'absence de champ magnétique externe, les filaments reprennent leur position verticale initiale.

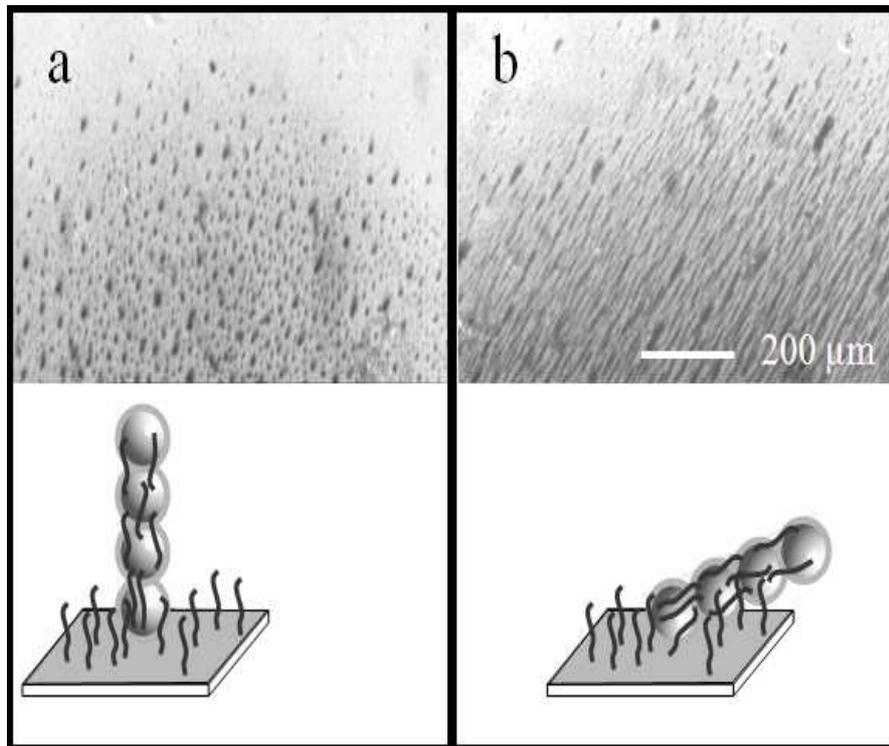


Figure IV-6 : Modification de l'orientation des filaments permanents, sous l'action d'un champ magnétique externe

Une vidéo sur l'orientation des filaments est disponible dans les données additionnelles de l'article Haddour et al [1] à l'adresse suivante :

[.http://www.rsc.org/suppdata/JM/B9/B920460A/B920460A.AVI](http://www.rsc.org/suppdata/JM/B9/B920460A/B920460A.AVI)

1.3.3 Caractéristiques géométriques des filaments formés

La géométrie et le nombre de filaments formés sur support par notre méthode peuvent être ajustés en fonction de la concentration initiale de particules magnétiques dans la solution employée pour former les filaments.

Ainsi, nous avons fabriqué différents échantillons de filaments greffés sur support en faisant varier la concentration en billes magnétiques de la solution injectée dans la cellule. Après formation des filaments, les surfaces sont lavées, puis séchées sous champ magnétique de manière à coucher l'ensemble des filaments horizontalement à la surface du verre. Chaque surface a été photographiée en microscopie optique. Les images ainsi

obtenues ont été segmentées grâce à un programme développé sous Labview IMAQ Vision Builder (National Instrument), de manière à détecter le contour de chaque filament. Les images ont été calibrées géométriquement grâce à une mire de dimension connues. Pour chaque concentration en particules, l'analyse d'images a permis d'extraire l'orientation, la surface, la longueur, la largeur, le rapport d'aspect de chaque filament détecté. Le programme permet également de compter le nombre de filaments présents sur la surface. Les résultats sont compilés dans le tableau IV-1 ci-dessous, sous forme de moyenne et d'écart-types. Des données plus complètes, incluant les photographies segmentées, et les histogrammes détaillés décrivant chaque paramètre, sont disponibles en annexe IV.

Cette approche d'analyse automatique d'image fournit une première manière de caractériser les supports fabriqués. Elle présente toutefois un certain nombre d'inconvénients. Tout d'abord, la qualité des images obtenues n'a pas permis de segmenter l'ensemble des filaments présents sur chaque support. Il a été impossible de définir un seuil général permettant de discriminer tous les filaments du bruit de fond. Une quantité non négligeable de filaments de faible longueur (donc de rapport d'aspect proche de 1) n'ont pas pu être détectés. Ceci limite donc les données statistiques reportées dans le tableau IV-1 qui représentent essentiellement les filaments de taille moyenne et grande.

| Propriétés géométriques des filaments formés | 'Concentration en particules magnétiques de la solution déposée sur support | | | | |
|---|---|-------------|------------|------------|------------|
| | a | b | c | d | e |
| Concentration initiale en billes (10^{-3} M) | 0,16 | 0,42 | 1,6 | 4,2 | 8,3 |
| Orientation moyenne des filaments (°) | 31 | 53 | 57 | 37 | 36. |
| +/- | 37 | 41 | 17 | 11 | 34 |
| Surface moyenne (μm^2) | 84 | 96 | 89 | 130 | 741 |
| +/- | 57 | 70 | 60 | 115 | 988 |
| Longueur moyenne (μm) | 24 | 27 | 21 | 31 | 96 |
| +/- | 12 | 15 | 10 | 19 | 94 |
| Largeur moyenne (μm) | 7.4 | 7.6 | 8.6 | 8.6 | 12.7 |
| +/- | 2.4 | 2.4 | 2.1 | 2.6 | 5.1 |
| Rapport d'aspect moyen des filaments | 3.6 | 4.00 | 2.5 | 3.5 | 6.4 |
| +/- | 2.4 | 2.8 | 1.2 | 1.8 | 4.4 |
| Nombre de filaments détectés | 170 | 340 | 521 | 462 | 135 |

Tableau IV-1. Influence de la concentration en particules magnétiques dans la solution de dépôt, sur les caractéristiques des filaments formés.

1.4 Conclusions

Nous avons décrit la méthodologie générale pour assembler sous champ magnétique des particules magnétiques, les ancrer à la surface d'un support de verre silanisé, et les rendre permanent en les pontant grâce à des chaînes diamines. Les filaments ainsi formés peuvent être orientés par un champ magnétique externe à la surface du support.

Une étude préliminaire a permis de montrer comment la concentration initiale en particules magnétiques influence la géométrie et le nombre de filaments formés. Des études plus poussées, dans le cadre de thèses ultérieures, devront être menées pour étudier plus en détail les mécanismes de formation de ces filaments.

2 Filaments magnétiques sur une surface d'or

Les procédures testées sur support de verre ont été adaptées pour former des filaments magnétiques sur support d'or. Nous montrons ci-dessous comment la méthode a été adaptée pour des lames d'or homogène, puis pour des supports mixtes formés d'une lame de verre comportant des surfaces d'or. Ces travaux ont été réalisés au cours de mon doctorat, en collaboration avec le Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique, et l'Institut d'Electronique Fondamentale (Université Paris-Sud).

2.1 Matériel et réactifs employés

Nous donnons ici, l'ensemble des réactifs employés pour les expériences menées ci-dessous. Le tétrahydrofurane (THF), l'isopropanol, l'acide 11-mercaptoundécanoïque, le PEG-silane ([méthoxy(polyéthylèneoxy)propyl]triméthoxysilane $\text{CH}_3\text{-O-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-O)}_{6-9}\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-Si-(OCH}_3\text{)}_3$), le dichlorométhane, le dichloroéthane, le sodium dodécylsulfate (SDS) le N-hydroxysuccinimide (NHS), le N,N'-diisopropylcarbodiimide (DCI), la Jeffamine ® 600, le 1-[3-(diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide méthodide (EDCI), les microparticules magnétiques (billes Sigma) modifiées par les fonctions carboxyliques (1 μm de diamètre, 20 mg/ml, $5 \cdot 10^8$ particules/mg, $[\text{COOH}] = 5 \mu\text{mol/ml}$ de solution) ont été obtenus chez Sigma-

Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Les nanoparticules magnétiques (billes Ademtech) modifiées par des fonctions carboxyliques (200 nm de diamètre), leur tampon de stockage 10X et leur tampon d'activation 10X proviennent de chez Ademtech (Pessac, France). La composition des tampons n'est pas communiquée par le fournisseur.

Un aimant néodyme (NdFeB) (1 T au contact) a été utilisé pour les séparations magnétiques, l'adressage des filaments et pour l'orientation des filaments lors des mesures par imagerie polarimétrique de résonance de surface (P-SPRI) et lors des observations par microscopie optique.

2.2 Fonctionnalisation de surface d'or homogène

Les supports d'or employés sont formés d'une lame de verre (BK7) recouverte d'une couche homogène de 3nm de chrome, elle-même recouverte de 48 nm d'or. (Lame Schott). . Avant chaque fonctionnalisation, l'isopropanol employé pour la fonctionnalisation est dégazé 10 minutes par sonication. Les lames d'or sont lavées pendant 10 min à l'isopropanol dégazé en bain à ultrasons, avant d'être placées pendant 1 heure à température ambiante, dans une solution d'alkylthiol à 10 mM dans de l'isopropanol dégazé. Puis, les lames sont immergées dans une solution d' alkylthiol à 2 mM dans de l'isopropanol dégazé, et laissées à réagir pendant 48 heures à 4°C, sans agitation. Pendant l'étape de fonctionnalisation, l'alkylthiol s'organise sous la forme d'une monocouche auto-assemblée (SAM pour Self assebled monolayer) (Figure IV-7). Les lames sont finalement lavées pendant 30 min sous ultrasons dans de l'isopropanol, rincées à l'eau ultrapure et conservées dans un tube fermé rempli d'eau ultrapure pour leur transport et ceci jusqu'à leur utilisation.

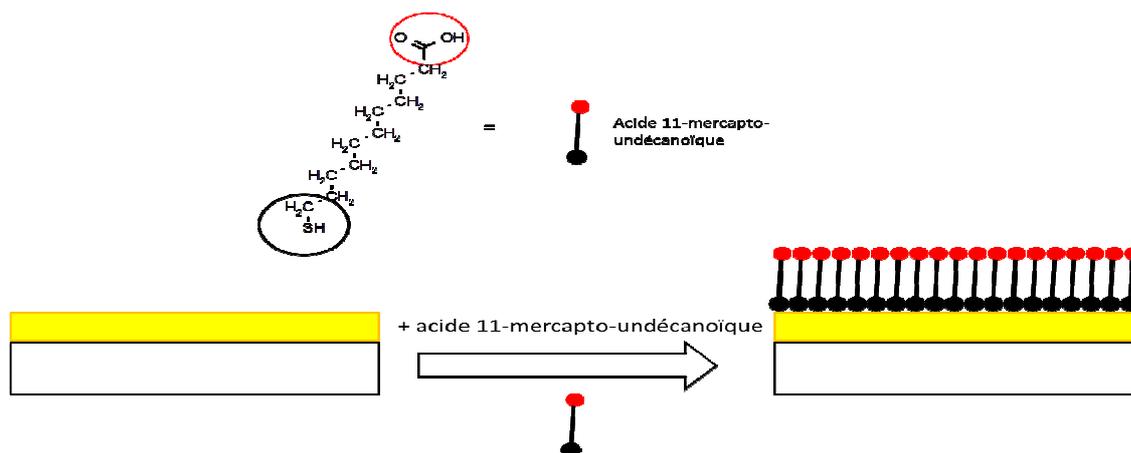


Figure IV-7 : Fonctionnalisation d'une surface d'or homogène par la formation d'une monocouche auto-assemblée (SAM) d'acide 11-mercapto-undécanoïque.

2.3 Formation des filaments sur surface d'or

Deux types de billes magnétiques ont été employés pour élaborer les filaments sur support d'or homogène : des microparticules SIGMA d'une part, des nanoparticules Ademtech d'autre part. Nous décrivons d'abord la préparation des billes SIGMA et Ademtech, avant d'indiquer la méthode commune employée pour former les filaments.

2.3.1 Préparation des billes magnétiques SIGMA

Dans une expérience typique, 2 μl de billes magnétiques SIGMA dans leur tampon de stockage sont transférés dans des tubes eppendorf et suspendus dans 500 μl de SDS 0,1% (m :m). Les particules sont ensuite concentrées pendant 5 minutes contre la paroi du tube grâce à un aimant néodyme, permettant ainsi de pipeter la totalité du surnageant. Les billes sont ensuite resuspendues dans 500 μl de SDS 0,1%. Cette procédure de lavage est répétée deux fois. Après trois lavages, les billes sont suspendues dans 450 μl de SDS 0,1%.

Une solution d'activation est préparée (1 ml de SDS 0,1% + 4 mg EDCI + 4 mg NHS) pour activer les fonctions carboxyliques par la chimie classique NHS/carbodiimide. Pour éviter l'hydrolyse du carbodiimide, la solution d'activation est préparée qu'au moment de son utilisation.

50 μl de solution d'activation est ensuite ajoutée aux 450 μl présents dans le tube puis la suspension de particules est homogénéisée. L'activation est menée pendant 2h à

température ambiante avec une agitation intermittente. Les billes sont ensuite lavées en suivant la même procédure que décrite ci-dessus. Elles sont finalement dispersées dans du SDS_{aq} 0,1%, pour former des solutions de différentes concentrations de billes.

2.3.2 Préparation des billes Ademtech

2 μ l de billes magnétiques Ademtech dans leur tampon de stockage étaient transférés dans des tubes eppendorf et suspendus dans 500 μ l de tampon de stockage 1X fourni avec les billes. Les billes étaient ensuite concentrées pendant 5 minutes sur la paroi du tube par un aimant néodyme, de manière à pouvoir pipeter la totalité du surnageant. Les billes étaient immédiatement resuspendues dans 500 μ l de tampon de stockage 1X. Ce procédé de lavages était réitéré deux fois supplémentaires. Après ces trois lavages, les billes étaient suspendues dans 450 μ l de tampon d'activation 1X. Les acides carboxyliques de surface des billes étaient ensuite activés par une solution d'activation (1 ml de tampon d'activation 1X fourni avec les billes + 4 mg EDCI). 50 μ l de solution d'activation étaient alors ajoutés dans le tube et la suspension était homogénéisée. L'activation était menée pendant 2h à température ambiante. Les billes étaient alors lavées en suivant la même procédure que décrite ci-dessus. Elles étaient finalement dispersées dans du tampon de stockage 1X à différentes concentrations en billes.

2.3.3 Formation des filaments à partir des billes magnétiques activées

Pour chaque expérience, un quart d'une lame d'or fonctionnalisée est déposé sur un système de pointes similaire à celui décrit dans la Figure IV-2b. Pour les expériences menées au LCFIO où nous ne disposons pas d'un système d'électroaimant, nous avons utilisé un aimant de type néodyme à la place. Le montage est placé dans une chambre humide qui permet en maintenant une atmosphère saturée d'éviter l'évaporation du solvant.

Chaque quart de lame ne comporte qu'un unique type de billes (SIGMA ou Ademtech) car les tampons utilisés sont différents. Pour chaque pointe magnétisée, une goutte de 5 μ l de billes SIGMA (ou Ademtech), à une concentration choisie, est déposée

directement sur le support. 1 μ l de Jeffamine 600 à 1% (v : v) dans SDS 0,1% pour les lames avec les billes SIGMA ou 1 μ l de Jeffamine 600 à 1% (v : v) dans du tampon de stockage 1X pour les billes Ademtech . Les zones en dehors des pointes ne comportent pas de billes magnétiques.

Une chambre Coverwell d'un volume total de 65 μ l est ensuite posée sur le support, de manière à couvrir les solutions de billes. Du SDS 0,1% pour les lames comportant les billes SIGMA ou du tampon de stockage Ademtech 1X pour les lames avec les billes Ademtech est ensuite injecté à la micropipette dans la chambre Coverwell, de manière à la remplir sans perturber le positionnement des filaments. La réaction de pontage des particules grâce à la diamine est laissée sur toute la nuit à température ambiante en chambre humide fermée.

Les lames d'or homogènes ont été utilisées pour vérifier que la formation de filaments permanents à partir de billes magnétiques et leur ancrage sur une surface d'or fonctionnalisée étaient possibles.

3 Formation de filaments sur des supports mixtes or/verre

Pour faciliter la localisation des zones de filaments et les zones de référence (sans filament) sur les lames lors des mesures par P-SPRI, on a utilisé des supports mixtes or/verre. Ces supports nécessitent l'utilisation d'une double fonctionnalisation permettant, d'une part, un ancrage de filaments permanents spécifiquement sur les zones d'or et d'autre l'autre, une protection des zones de verres.

Nous présentons tout d'abord les différents supports mixtes utilisés pour les analyses par P-SPRI, puis la méthode générale de double fonctionnalisation ainsi que la formation des filaments permanents.

3.1 Supports

Les deux types de supports mixtes « verre + or » utilisés sont représentés sur la Figure IV-8.

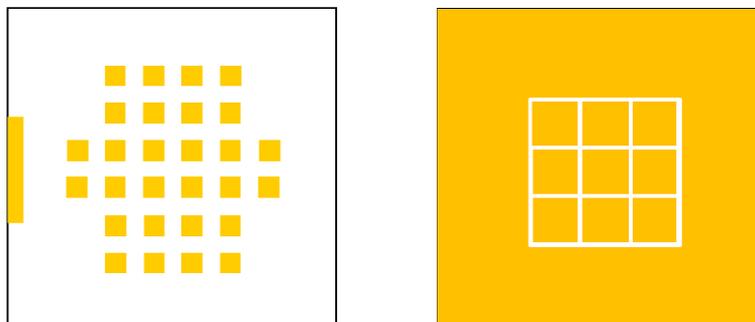


Figure IV-8. Schéma des deux types de lames utilisées pour les supports mixte verre + or. A gauche : lame « IEF » préparée par techniques classiques de microfabrication. Chaque carré fait 1 mm de côté ; à droite lame « LCFIO » préparée par décapage d'or sous pointe polarisée. Chaque carré fait environ 5 mm de côté.

Le premier type de support a été fourni par l'IEF (Orsay) dans le cadre d'une collaboration avec Sylvain Held, Philippe Gogol et Bernard Bartenlian. Chaque support de verre comporte un ensemble de carrés d'or d'1 mm de côté espacés de 0,5 mm. Ces supports ont été obtenus par lithographie UV, dépôt d'or par évaporation thermique et lift-off à la centrale de technologie MINERVE, à partir de lames de verre SF11 polies par l'atelier d'optique de l'Institut d'Optique Graduate School (IOGS). Ces lames seront appelées lames « IEF » dans la suite du manuscrit.

L'autre type de support mixte a été fabriqué au LCFIO (Palaiseau), dans le cadre d'une collaboration avec le groupe MacSyBio dirigé par Michaël Canva.

Des lames Schott constituées d'un dépôt homogène d'or sur verre SF10 ont été modifiées en traçant des motifs par application d'une forte tension entre la surface d'or et une pointe métallique de spotter. Cette différence de potentiel induit un claquage localisé de l'or, permettant ainsi de décapier la couche superficielle de métal. Cette approche a permis de fabriquer un damier d'or défini par des frontières de verre. Ces lames seront appelées lames « LCFIO » dans la suite du mémoire.

Les motifs ont simplifié le repérage des zones de greffage de filaments et la construction de la grille d'analyse pour le banc de P-SPRI.

3.2 Double fonctionnalisation de surface des supports verre/or

Les lames mixtes verre + or ont été fonctionnalisées à l'INL en traitant d'une part les zones d'or par un dépôt d'alkylthiols, et d'autre part les zones de verre par un dépôt de silanes selon le schéma représenté sur la Figure IV-9. Dans une expérience typique, on procède d'abord à la formation d'une couche de thiols sur les lames selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2.1.

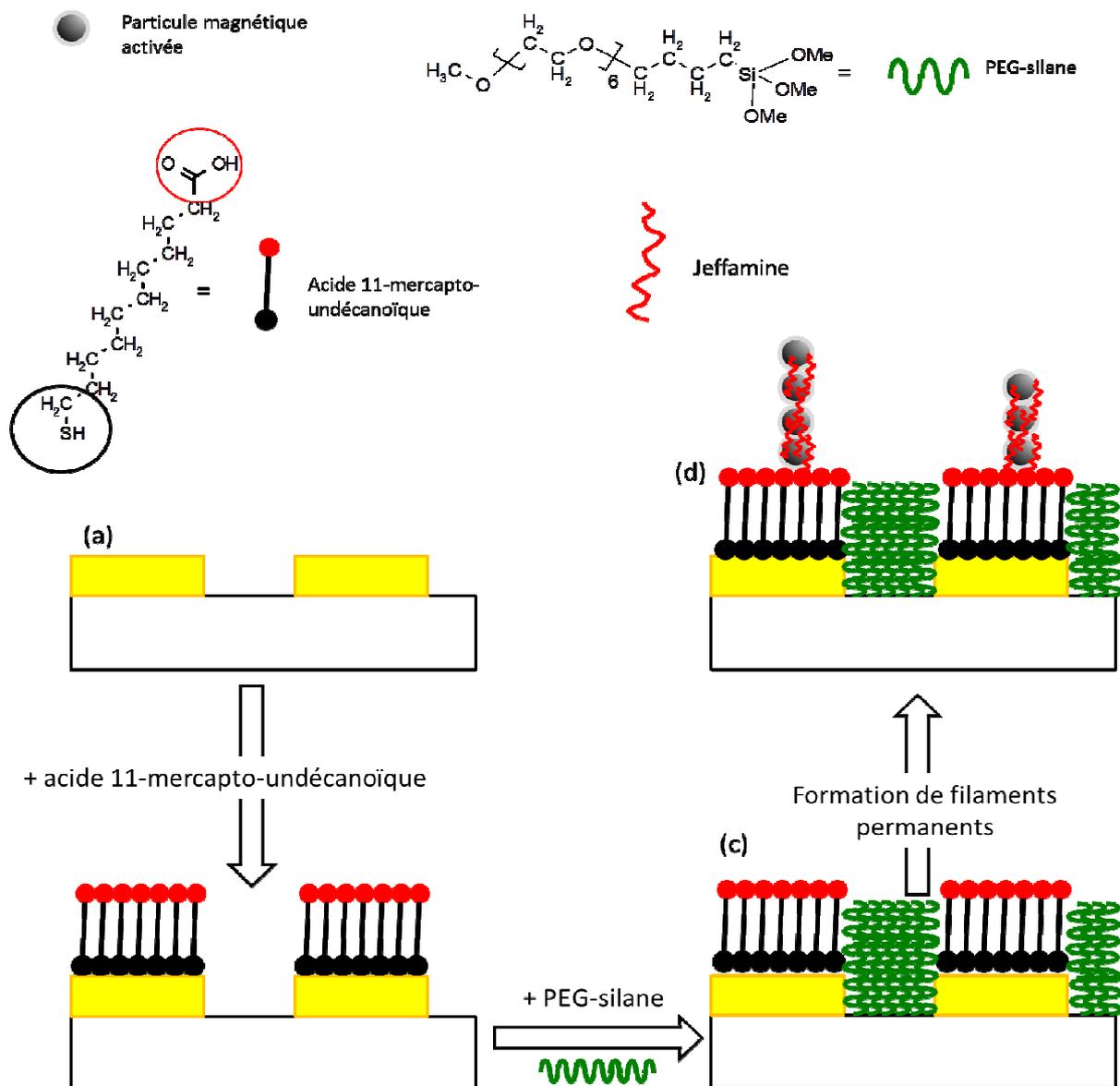


Figure IV-9 : Double fonctionnalisation de surface de supports verre/or. (a) Lame d'or de type IEF. (b) Formation d'une SAM à partir de l'acide 11-mercapto-undécanoïque. Après lavage par l'isopropanol, les alkylthiols présents sur le verre se sont décrochés. (c) Protection du verre par silanisation grâce à un PEG-silane. (d) Formation et ancrage de filaments permanents sur les plots d'or en utilisant les réactions chimiques décrites en Figure IV-1

Comme les alkylthiols ont une affinité beaucoup plus forte pour les métaux et en particulier l'or [2, 3] que pour le verre, on peut par lavage à l'isopropanol les décrocher de cette surface. La deuxième étape consiste alors à silaniser les zones de verre. Pour cela, on les immerge dans une solution de PEG-silane (215 μ l dans 50 ml d'isopropanol) pendant 48 h à température ambiante.

Les lames sont ensuite lavées au dichlorométhane pendant 10 min sous ultrasons, lavées 10 min au SDS 0,1% sous ultrasons, puis rincées à l'eau ultrapure. Les lames sont ensuite stockées dans des boîtes de transport.

Avant leur utilisation, les lames sont activées avec une solution d'activation (125 ml de THF ; 1,5 g de NHS ; 2 ml de DCI) versée dans un flacon Schott de 100 ml, de manière à recouvrir intégralement la surface doublement fonctionnalisée. L'activation est menée sur la nuit à température ambiante sous hotte aspirante. Les lames sont lavées au THF pendant 10 min avec sonication puis, sans séchage lavées au dichloroéthane pendant 10 min avec sonication. Le dichloroéthane est ensuite évaporé à l'air ambiant sous hotte aspirante. Les lames sont conservées à l'abri de la poussière dans des tubes falcons de 50 ml avant leur utilisation.

3.3 Formation des filaments

Les supports « IEF » ou « LCFIO » sont posés directement sur l'aimant néodyme, selon la Fig 2.a. Une goutte de 5 μ l de billes (Sigma ou Ademtech) à la concentration choisie est déposée sur chaque zone d'or à la micropipette. Puis 1 μ l de Jeffamine 600 à 1% (v : v) dans le tampon correspondant aux billes utilisées (SDS 0,1% pour les Sigma et tampon de stockage 1X pour les Ademtech) est ajouté sur chaque carré d'or. Plusieurs zones d'or sont conservées sans billes pour former des zones de référence pour les mesures P-SPRi. On fixe une chambre Coverwell d'un volume de 65 μ l sur le support. La chambre est ensuite remplie de tampon (SDS 0,1% pour les billes Sigma, et tampon de stockage 1X pour les billes Ademtech) à la micropipette, La réaction de pontage des billes se fait sur la nuit à température ambiante, en chambre humide.

Pour vérifier la polymérisation par microscopie optique et afin de distinguer les filaments ancrés à la surface des filaments présents en solution, on effectue un lavage de la lame en aspirant délicatement le tampon avec une micropipette munie d'un embout capillaire par une des entrées de la chambre Coverwell, et en injectant simultanément par l'autre entrée du tampon. Le flux ainsi créé a un faible débit mais permet de remplacer le tampon dans la chambre. Après ce lavage final, on peut observer les lames par microscopie optique.

3.4 Caractérisations par microscopie optique et microscopie électronique

Des caractérisations par microscopie optique ont été effectuées pour contrôler le comportement des filaments et leur ancrage à la surface. Compte tenu de la taille nanométrique des billes Ademtech, une caractérisation par microscopie électronique a été nécessaire pour observer les filaments.

3.4.1 Caractérisation des filaments sur or homogène

L'analyse des zones de dépôt en microscopie optique a confirmé la formation de filaments de billes orientés perpendiculairement à la surface. L'annulation du champ magnétique n'induit aucune dégradation des filaments, ce qui valide la stabilité des filaments grâce aux liaisons formées par la Jeffamine.

Les filaments qui présentent un seul point d'attache sur la surface de l'or peuvent être orientés par un champ magnétique externe, comme l'indique la Figure IV-10. Toutefois, sur les échantillons testés, une grande partie des filaments présentent plusieurs points d'attache sur la surface, ce qui restreint la possibilité de contrôler leur orientation.

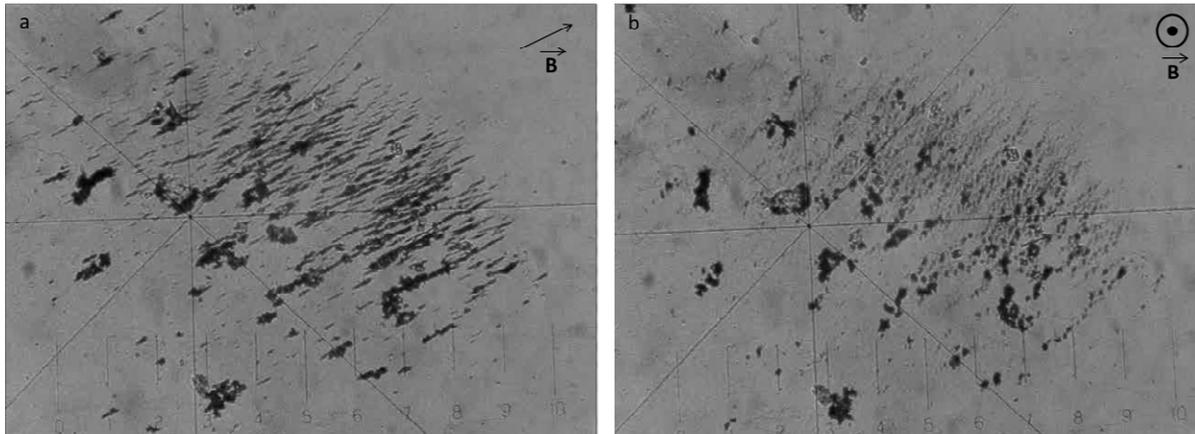


Figure IV-10: Orientations des filaments permanents obtenus à partir de billes SIGMA ($1\ \mu\text{m}$ de diamètre) sur surface d'or homogène. a- Filaments couchés sur la surface d'or. b- Filaments perpendiculaires à la surface..

La formation de filaments sur or avait été menée dans les locaux du LCFIO, pour éviter la difficulté de sécher correctement la surface inférieure des supports (destinée à être placée sur le montage optique de P-SPRI, sur un film d'huile d'indice optique fixée) tout en maintenant humide la face portant les filaments.

Le maintien de l'humidité de la face portant les filaments est important pour la mobilité des filaments, l'évaporation du tampon entraînant une adsorption des filaments sur la surface d'or. Lorsqu'ils sont remis en solution, après ce séchage, la majorité des filaments reste adsorbés sur la surface ou enchevêtrés limitant leur mobilité.

3.4.2 Caractérisation des filaments sur support verre+or

Pour valider l'efficacité de la double fonctionnalisation de la surface, on a placé une lame IEF sur un montage de pointes de manière à ce que des pointes se retrouvent à cheval entre une zone d'or et une zone de verre. On a déposé une goutte de billes à cheval sur le verre et l'or puis polymérisée (Figure IV-11). Une analyse par microscopie optique a été effectuée avant et après le lavage de la lame.

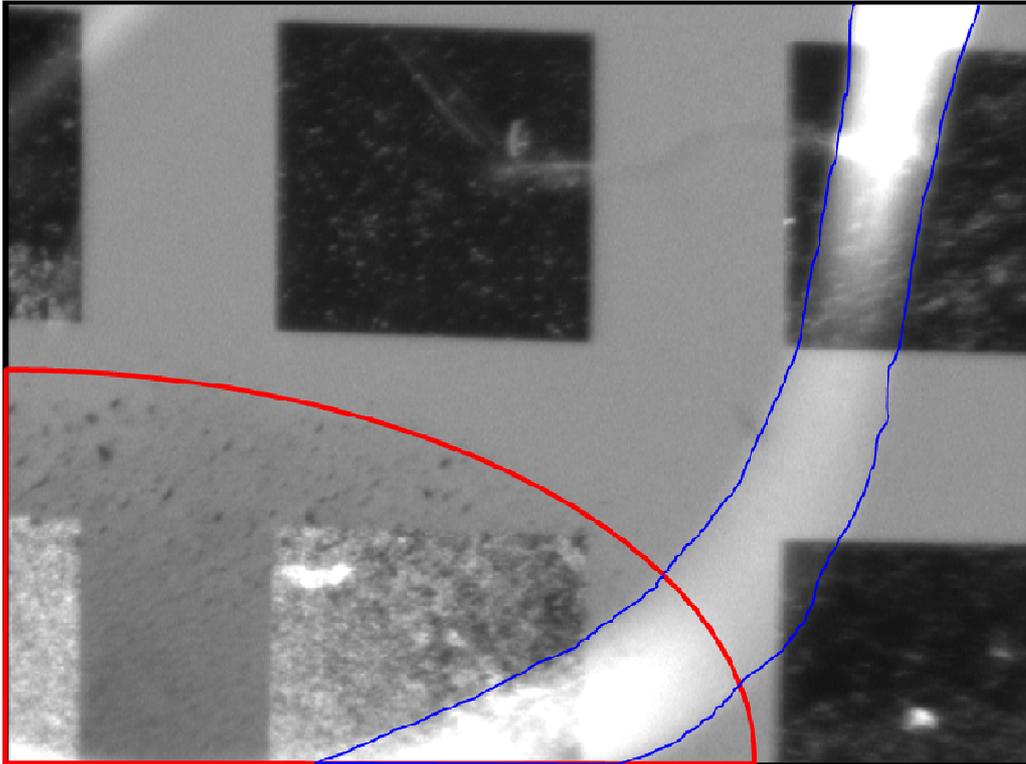


Figure IV-11 : Observation de la zone de dépôt des billes SIGMA sur une lame IEF à la loupe binoculaire. Zone de dépôt cerclée de rouge. Entouré en bleu, reflet d'une goutte d'eau déposée sur la chambre pour éviter l'évaporation du tampon.

L'analyse par microscopie optique d'une zone de greffage avant rinçage de la lame structurée montre la formation de filaments sur les deux surfaces or et verre (Figure IV-11 et IV-12a) Pour éviter l'évaporation du tampon à cause de l'éclairage de la lame lors de l'observation par microscopie, on a déposé sur la chambre Coverwell une goutte d'eau ultrapure qui recouvrait les entrées de la chambre. Les limites de cette goutte sont visibles sur les images.

Après lavage, la même zone observée montre que (Figure IV-12b), les filaments précédemment observés sur les zones de verre ont disparus contrairement à ceux déposés sur les zones d'or qui sont toujours présents.

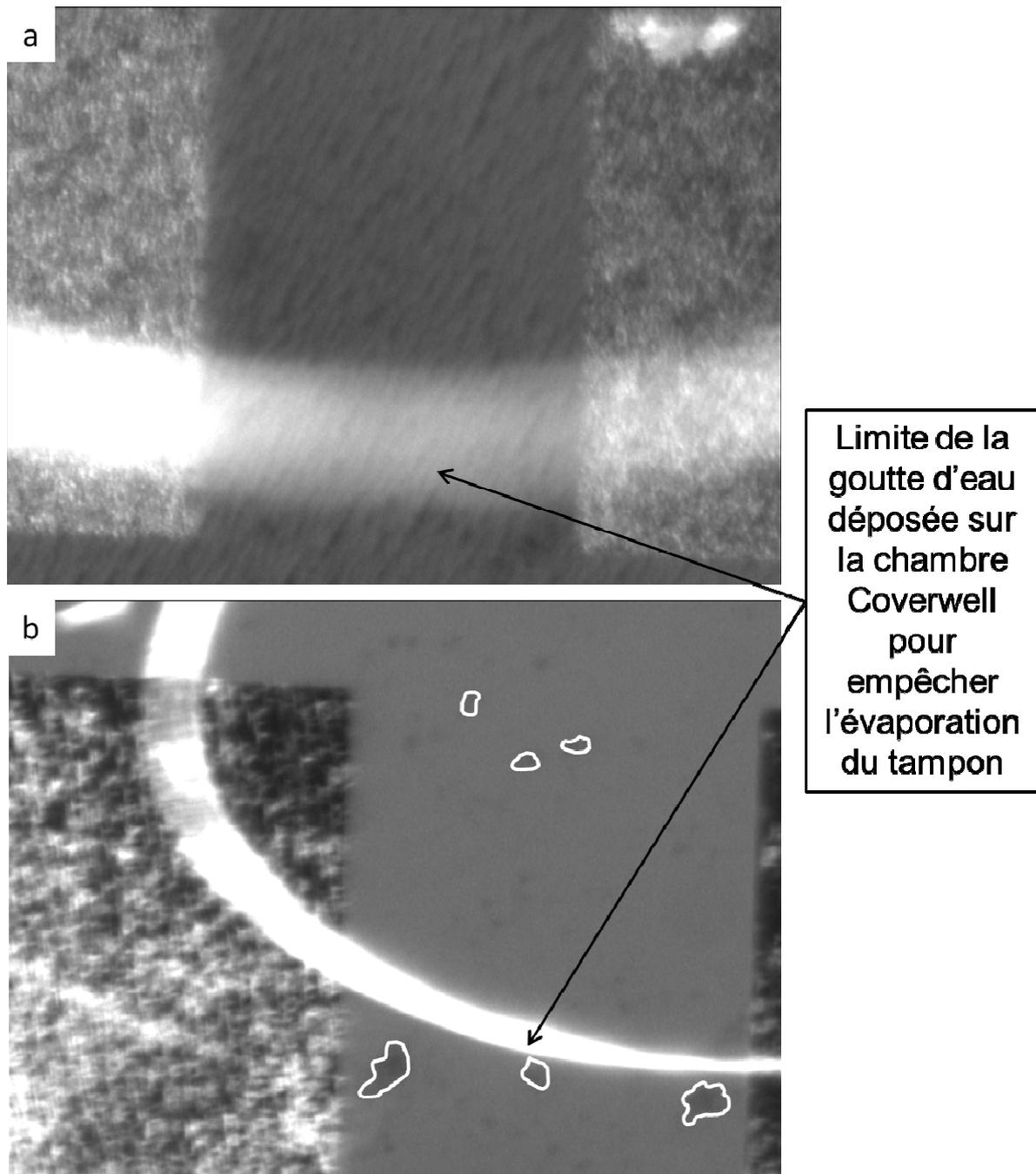


Figure IV-12 : Filaments formés sur lame IEF à partir de billes SIGMA, observation à la loupe binoculaire. (a) Lame avant lavage, des filaments sont observables au-dessus des zones verre et au-dessus des zones d'or. (b) Lame après lavage, des filaments sont toujours observables sur les zones d'or mais plus sur la zone de verre observée. Sur l'image b on a délimité en blanc des poussières présentes sur l'objectif de la loupe binoculaire.

Ceci montre bien que les filaments sur or ont pu être greffés via les diamines aux acides 11-mercapto-undécanoïques de la surface tandis que les filaments au-dessus du verre n'ont pas pu former de liaisons covalentes avec les polyéthylènes glycols de la surface du verre. Les surfaces de PEG étant terminées par une fonction éther, fonction chimique peu réactive et ne pouvant pas réagir avec les amines, sont ainsi protégées. Les filaments

formés en solution au-dessus du verre n'ont pas pu s'ancrer de manière permanente à la surface et ont donc été lavés.

A l'échelle des observations en microscopie optique, la double fonctionnalisation alkylthiol sur or/ silanes sur verre semble permettre de limiter fortement l'adsorption non spécifique des filaments sur les zones de verre, et d'ancrer des filaments sur l'or.

3.4.3 Géométrie et comportement des filaments

L'observation des filaments permanents fabriqués à partir des billes SIGMA par microscopie optique a permis de conclure à la mobilité des filaments (Figure IV-10). Grâce à la double fonctionnalisation des lames mixte verre/or, on peut imposer la localisation des filaments. Nous pouvons ainsi fabriquer des puces portant des filaments pour une détection sur verre (puce à ADN classique par exemple) ou sur or (puce SPR).

A partir de l'observation et de l'analyse des images obtenues par microscopie, nous avons recherché des indications sur la géométrie et le comportement des filaments.

La Figure IV-10 montre que les filaments fabriqués à partir de billes SIGMA s'orientent en fonction du champ magnétique appliqué. On peut aussi observer que comme pour les filaments fabriqués sur une surface de verre, sur surface d'or les filaments ne sont pas homogènes dans leur aspect. La forme des filaments est variée, certains ont même un aspect branché (Figure IV-13). Ces différentes formes sont peut-être dues à la polymérisation de plusieurs billes en parallèle, à la formation de deux ou plusieurs filaments qui sont suffisamment proches pour s'attirer mutuellement et être pontés par la Jeffamine pendant la phase de polymérisation. Les filaments branchés sont peut-être obtenus lorsque les filaments comportent un point d'ancrage à la surface par une de leur extrémité et un second point d'ancrage dans leur chaîne ou lorsque la chaîne comporte un défaut (deux billes pontées côte à côte sur un même filament formant alors deux branches distinctes).

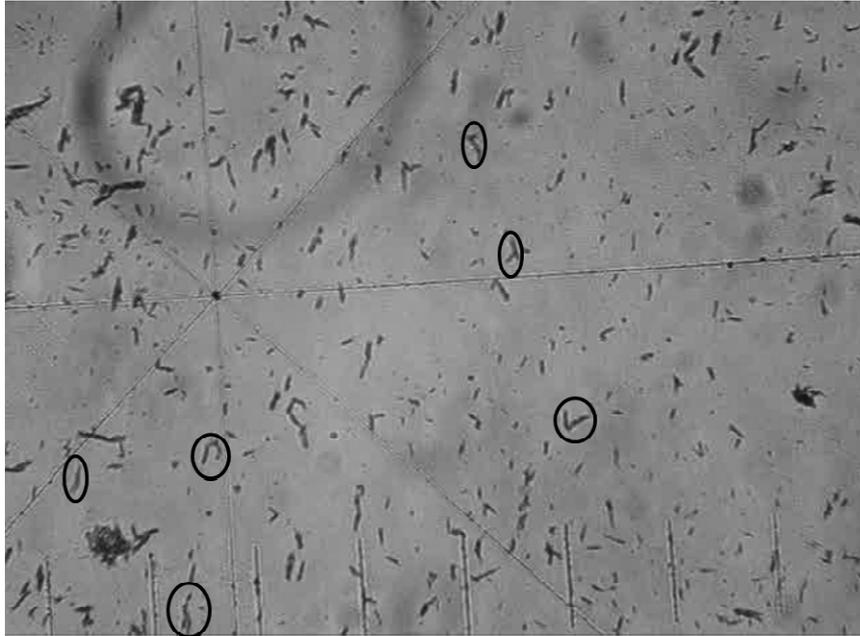


Figure IV-13 : Image des filaments obtenus à partir des billes de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre par microscopie optique sans champ magnétique après lavage de la lame. Les filaments cerclés de noir paraissent avoir un squelette branché.

Les filaments obtenus à partir des billes Ademtech de 200 nm ne sont pas observables par microscopie optique à cause du diamètre du matériel de base. Pour contourner cette difficulté, les lames dont les filaments ont été fabriqués à partir de billes Ademtech sont observées par microscopie à balayage électronique (MEB) après leurs analyses sur le banc de P-SPRI. Les lames sont mises à sécher à l'air libre sous l'influence du champ magnétique produit par un aimant néodyme (1 T au contact) qui permet de couler sur la surface de la lame les filaments en les orientant dans la direction des lignes de champ puis observer par MEB (Figure IV-14). Le spot observé par MEB étant légèrement excentré par rapport à l'axe de l'aimant lors du séchage, les filaments forment alors un angle avec le champ magnétique indiqué sur les images.

On observe que les billes peuvent polymériser sous plusieurs formes : des filaments plus ou moins épais comportant des défauts mais aussi de grands groupes compacts. On remarque aussi que l'aire occupée par les billes ne représente qu'une faible partie de l'image et que la majorité de cette aire est constituée des groupes compacts et pas par les filaments.

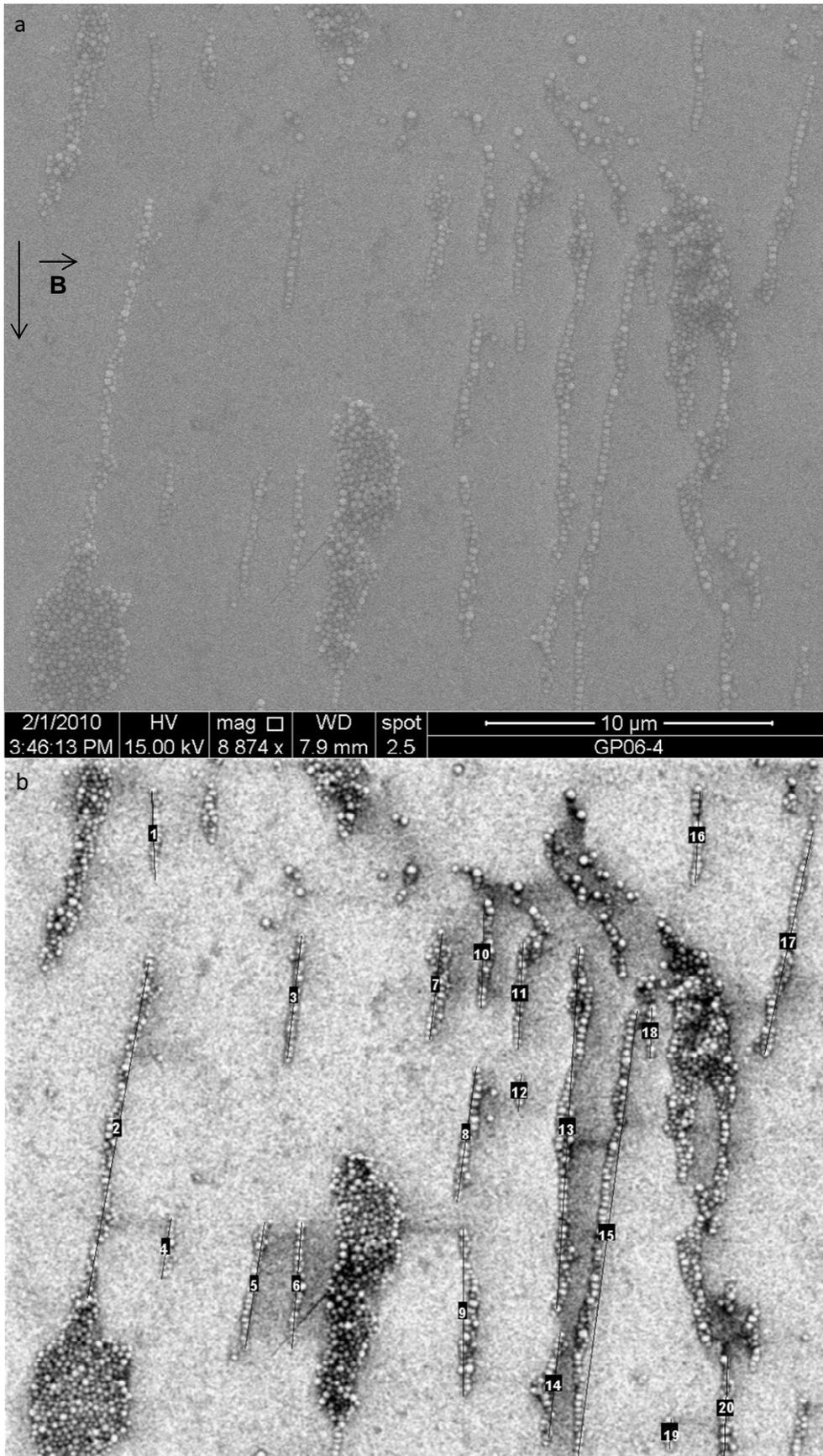


Figure IV-14 : Images MEB de filaments formés de billes de 200 nm de diamètre immobilisés sur une lame « LCFIO ». a- Image brute. b- Image retravaillée par Image J.

L'aire occupée par les billes calculée à partir de l'image segmentée par le logiciel **Image J** est de 5% de l'aire totale de l'image. Cette faible densité doit pouvoir s'expliquer par la méthode de fabrication des filaments. En effet, lors de la fabrication des filaments les billes s'alignent en suivant les lignes de champ. La réaction de pontage utilise les billes autour du filament en formation pour continuer sa croissance. Ceci entraîne un appauvrissement en billes à proximité de ce dernier. Puisque le milieu n'est pas agité durant la fabrication des filaments, la croissance n'est pas alimentée. La quantité de billes à proximité du filament n'est pas renouvelée ce qui arrête la polymérisation. De plus, des filaments sont formés en solution et la plupart ne sont pas immobilisés sur la surface du fait de leur éloignement de la lame. Le lavage comme le montre les images de la Figure IV-12 permet de retirer tous les filaments non immobilisés sur la lame qu'ils soient au-dessus d'une surface d'or ou une surface de verre.

Notre stratégie de formation peut expliquer aussi pourquoi la longueur des filaments observés ne dépasse guère 5 μm à part pour quelques exceptions (Figure IV-15).

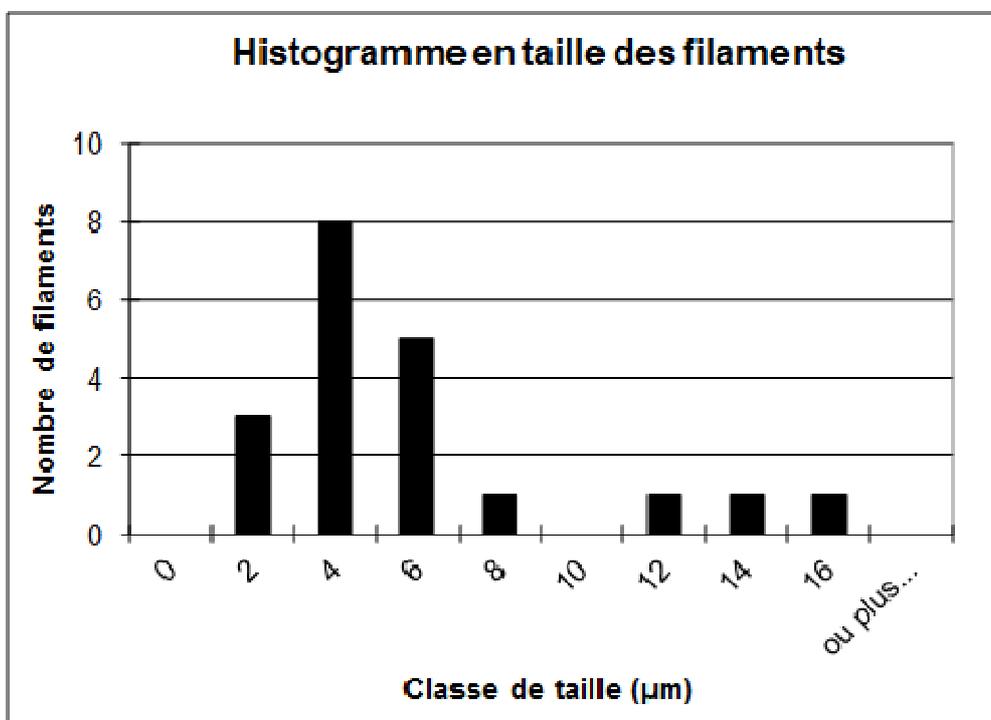


Figure IV-15 : Histogramme en taille des filaments sélectionnés sur l'image b de la Figure IV-14

Les filaments les plus longs sont aussi ceux qui semblent avoir un ancrage à la surface formé de nombreuses billes. Cette base est peut-être un filament qui s'est effondré

sous son propre poids lorsque les forces de gravité sont devenues plus importantes que les forces magnétiques. On observe aussi que les longueurs des filaments calculées grâce au logiciel **Image J** ne sont pas des multiples de 0,2 μm . Cette différence est due au coefficient de variation de taille des billes (CV max = 20%) ainsi qu'à la fine gangue de Jeffamine s'est formée autour et entre les billes durant la polymérisation qui est visible sur la Figure IV-16

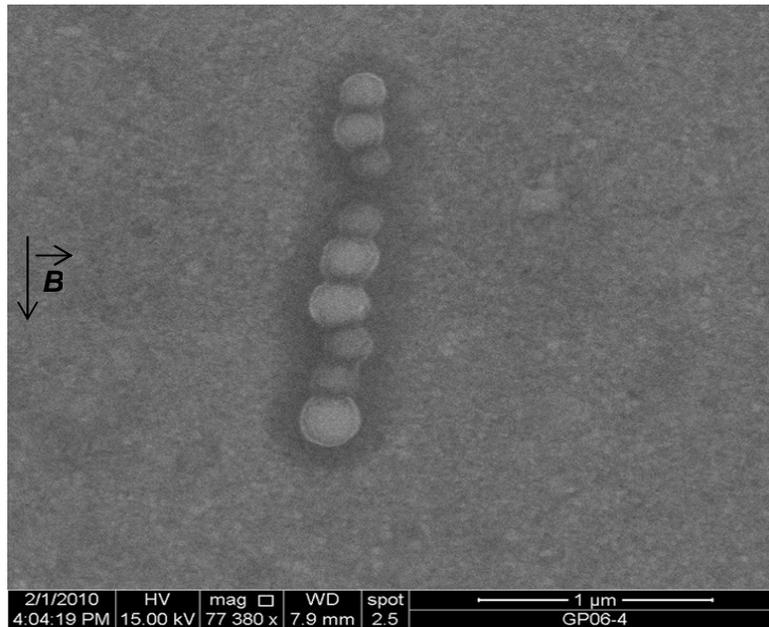


Figure IV-16 : Image brute par MEB d'un filament isolé. On distingue la gangue formée par la Jeffamine autour des billes magnétiques ainsi que la Jeffamine polymérisée reliant les billes entre elles.

La caractérisation des lames par MEB a permis de vérifier que la polymérisation des billes de diamètre 200 nm a bien été effectuée. La caractérisation dynamique par microscopie optique des lames a permis de vérifier que les propriétés d'orientation des filaments en fonction des lignes de champ que l'on cherche à exploiter sont bien présentes et peuvent être utilisées pour des mesures d'anisotropie par P-SPRI.

4 Références bibliographiques

1. Haddour, N., et al., *Use of magnetic field for addressing, grafting onto support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection*. Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(38): p. 8266.
2. Wink, T., et al., *Self-assembled Monolayers for Biosensors*. The Analyst, 1997: p. 43R-50R.
3. Nickless, G., *Inorganic sulphur chemistry*. 1968: Elsevier.

Chapitre 5 : Exemples d'utilisation de filaments magnétiques

Nous présentons dans cette partie deux applications que nous avons faites des filaments permanents.

La première exploite la mobilité des filaments pour faire des mesures d'anisotropie optique par imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface. Cette expérience a pour objectif de valider que le banc P-SPRI conçu et fabriqué par l'équipe MacSyBio du LCFIO est sensible à l'anisotropie des objets à l'échelle nanométrique.

La seconde application porte sur la biodétection. L'enjeu est d'augmenter l'amplitude des signaux de reconnaissance lors de la détection de la fluorescence d'interactions biomoléculaires. Pour cela, nous avons immobilisés sur une puce à ADN des filaments fonctionnalisés pour la reconnaissance du gène HPA-1.

1 Mesures d'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface sur filaments

La fabrication des filaments magnétiques a servi d'expérience de validation pour un banc de P-SPRI monté au LCFIO dans le cadre de la thèse d'Aurélien Duval (1) soutenue en juillet 2009). L'expérience a consisté à mesurer de manière dynamique les différences de réflectivité (ΔR) entre les deux bras orthogonaux du banc en fonction de l'orientation de nos filaments induite par un champ magnétique.

1.1 Le dispositif expérimental

Dans cette partie, nous ne développerons pas ici les préparatifs relatifs au banc P-SPRI qui sont rapportés par Aurélien Duval dans le cadre de ses travaux de doctorat (1). Nous présentons uniquement les éléments nécessaires pour la compréhension de l'expérience.

1.1.1 Le positionnement de l'aimant

Pour effectuer des mesures d'anisotropie par P-SPRI, nous avons déterminé les positions d'un aimant néodyme de 1T pour avoir la plus grande différence de réflectivité. Ces positions sont les positions nommées pos1 pour laquelle l'aimant est dans l'axe de la caméra 1 et pos2 où l'aimant est dans l'axe de la caméra 2 soit à 90° de l'axe 1. La position pos0 est à un angle de 45° par rapport aux deux axes ainsi la différence de réflectivité entre les deux axes due aux filaments est théoriquement nulle. Les positions de l'aimant, l'échantillon, les systèmes optiques et le châssis sont représentés sur la Figure V-1.

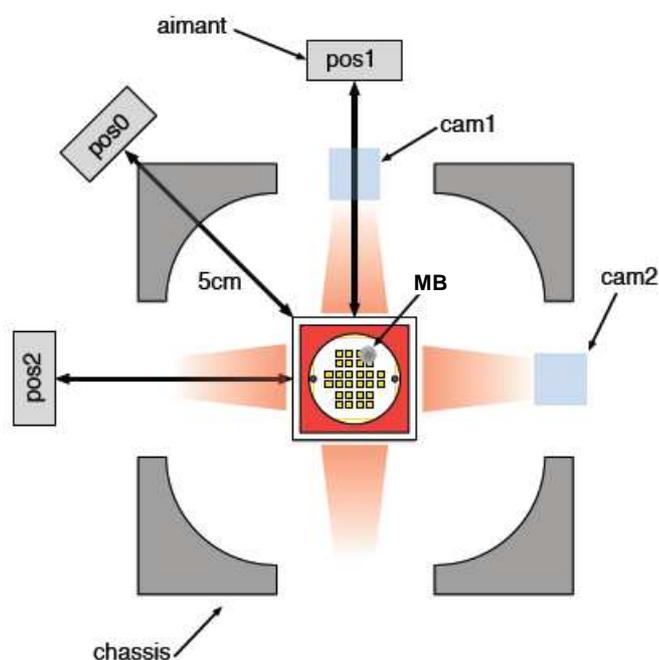


Figure V-1: Représentation schématique des positions de l'aimant autour du banc de P-SPRI. MB représente la position du site de greffage des billes magnétiques. Cam1 et cam2 représentent le positionnement des caméras le long des axes 1 et 2 respectivement. Le châssis métallique est représenté en gris autour de l'échantillon.

Le châssis a posé des problèmes pour obtenir une aimantation suffisante permettant de changer l'orientation des filaments. En effet, on peut voir sur le schéma que la position pos0 est en face d'une pièce métallique du châssis ce qui nous oblige à conserver une distance de 5 cm entre l'aimant et les bords de la pyramide. Cette distance était celle qui nous permettait de rapprocher au maximum l'aimant de l'échantillon sans le toucher ou sans perturber les éléments optiques (pyramide, lentilles, caméra). Cependant, à

cause de la décroissance rapide du champ en fonction de la distance, le champ magnétique disponible au niveau de l'échantillon n'est plus que de 0,3 T. De plus, le champ peut être perturbé par la présence du châssis métallique du banc et sa force peut être aussi diminuée si le moyen trouvé ne permet pas un positionnement précis avec une bonne répétabilité des distances tout en évitant au maximum les vibrations qui seraient transmises aux optiques provoquant des signaux parasites.

Les positions ont été fixées grâce à un dispositif « trait-point-plan » à la base d'un bras mécanique maintenant l'aimant, assurant la répétabilité des distances et permettant d'avoir une force du champ magnétique identique au niveau de l'échantillon pour chaque position de l'aimant. Ce bras mécanique a été aussi positionné quelques centimètres en dessous de la surface de l'échantillon, cette position permettant de plaquer les filaments sur la surface de la lame et d'augmenter le signal.

Pour voir les effets de l'aimant dans diverses positions et diverses orientations sur les filaments et ainsi sur les mesures d'anisotropie, on a effectué plusieurs fois la séquence suivante de positionnement de l'aimant dans le temps : pos0-pos1-pos2 en laissant l'aimant 3 min dans chacune des positions pour avoir une accumulation suffisante d'images. Cette séquence est reproduite pour chacune des orientations de l'aimant a1, a2 et a3 comme illustrées sur la Figure V-2. Les meilleurs résultats sont obtenus pour l'orientation a1 et sont présentés par la suite.



Figure V-2 : Orientations a1 (a), a2 (b) et a3 (c) de l'aimant maintenu par le bras mécanique. Les pôles nord et sud sont situés sur les grandes faces de l'aimant.

1.1.2 Le système de cuve

Le système de cuve coverwell utilisé pour la polymérisation des filaments est certes très pratique pour maintenir les filaments en solution et contrôler leur mobilité mais a posé des problèmes pour les mesures sur le banc.

Le banc est équipé d'une cuve de fluide qui une fois fermée permet de maintenir la lame dans le bon positionnement par rapport aux faisceaux et exerce une pression sur la lame et l'huile d'indice nécessaire pour compenser les différences d'indices optiques entre la pyramide et le verre de la lame. On peut penser que remplacer la cuve coverwell par la cuve fluide est aisé mais le simple fait de retirer la cuve coverwell dispersait le tampon qu'elle contenait sur la totalité de la lame puisque celui-ci n'était plus maintenu et entraînait un séchage très rapide des filaments du fait du faible volume de tampon à évaporer. Or le séchage des filaments entraîne une perte totale de leur mobilité puisqu'ils s'adsorbent sur la surface d'or. La chimie a empêché l'utilisation de la partie haute du banc ce qui fait que le système était beaucoup plus sensible aux vibrations.

1.1.3 La grille de points pour les mesures

Pour pouvoir effectuer des mesures de différence de réflectivité, la première étape a consisté à positionner une grille de points sur une image de référence obtenue après balayage angulaire.

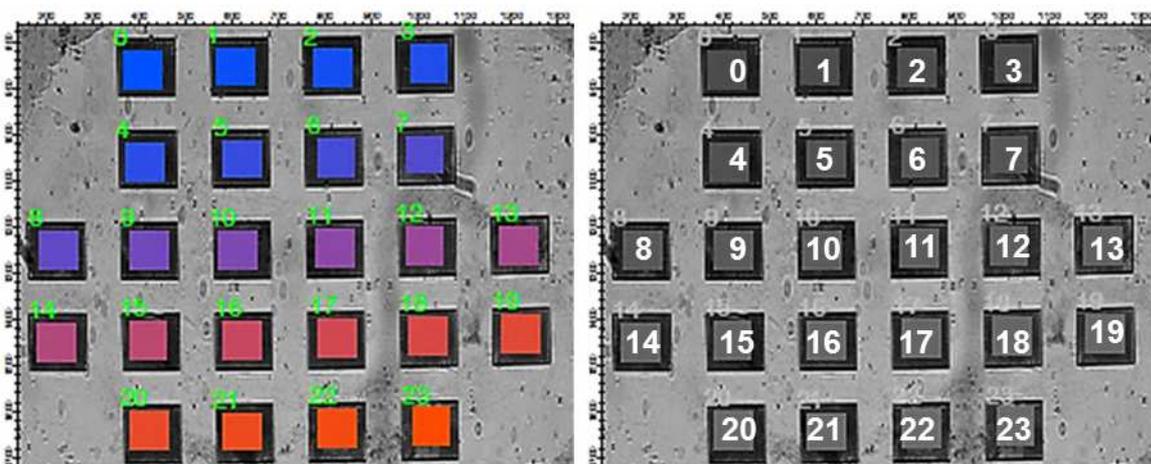


Figure V-3 : Position de la grille de points sur la lame IEF utilisée pour l'expérience

La Figure V-3 indique le positionnement des points sur la lamelle. Afin de s'affranchir du bruit, particulièrement important du fait des vibrations, un moyennage spatial de 80×80 pixels (soit environ $0,6 \times 0,6$ mm) est utilisé. Grâce à l'observation de la lame IEF par microscopie optique, on s'aperçoit après rinçage que les filaments sont regroupés en majorité sur un seul carré : le carré 23. Il est donc possible de considérer que les carrés les plus éloignés de celui-ci ne comportent pas de filaments (loin de la zone de dépôt des billes) et peuvent donc servir de référence pour les mesures d'anisotropie. Le signal du point 0 de la grille sera utilisé comme référence et sera soustrait aux signaux obtenus pour tous les autres points de la grille.

1.1.4 La séquence de positionnement utilisée

Nous nous plaçons tout d'abord en position *pos0* de l'aimant, soit à 45° entre l'axe 1 et l'axe 2, où nous prenons une référence temporelle. Nous déplaçons ensuite l'aimant en *pos1* soit 0° par rapport à l'axe 1, puis *pos2* soit 90° par rapport à l'axe 1. Comme le positionnement du bras sur les bases "trait-point-plan" est manuel, et que cela entraîne des vibrations, nous conservons une marge de transition (représentée par la lettre "T" sur les chronogrammes de la Figure V-4) à chaque passage d'une position à l'autre. Cette transition est de 4 images, soit environ 30 secondes. Le chronogramme (bas de la Figure V-4) illustre les orientations des filaments observées lors de l'exécution d'une séquence identique sous microscope optique.

Malgré les problèmes rencontrés, il est possible d'effectuer des mesures qualitatives et au vu des imprécisions apportées par l'aimant ces mesures sont suffisantes pour valider notre expérience.

1.2 Résultats

Pour indiquer le niveau de signal de la référence et de ses voisins, nous avons indiqué sur la Figure V-4 par un trait bleu, le signal du point 1, normalisé par rapport à la référence. De la même manière, nous avons matérialisé le signal normalisé du point 23 par

un trait rouge. Les niveaux de signaux durant cette expérience étant très faibles (de l'ordre de 0,1 % pour un bruit d'environ 0,01%), nous avons finalement procédé à un lissage par la méthode des moindres carrés à pondération locale (ou méthode de LOWESS pour Locally-Weighted Least Squares), avec une fenêtre glissante de 16 points. Les résultats lissés sont indiqués sur la figure par un trait plus épais.

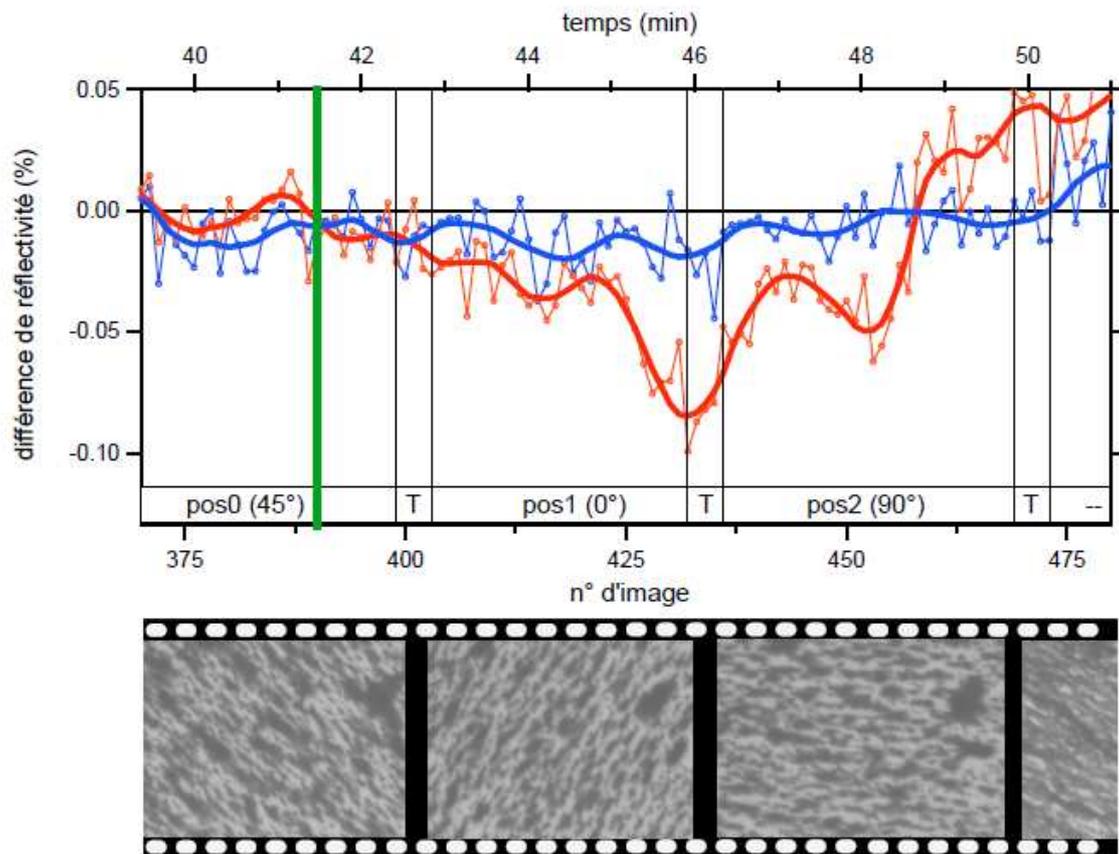


Figure V-4 : (haut) Mesure de l'anisotropie de filaments par P-SPRI pour l'orientation a_1 de l'aimant. La ligne verte indique la référence temporelle des mesures. La courbe bleue correspond au point 1 (sans filaments), la courbe rouge au point 23 (contenant les filaments). Les courbes épaisses sont un lissage LOWESS 16 points des données brutes (marqueurs). (bas) Chronogramme des images observées au microscope correspondantes.

En observant les résultats obtenus par le banc de P-SPRI pour cette expérience sur les filaments constitués de billes SIGMA on peut dire qu'il existe un signal anisotrope à l'endroit où les filaments sont immobilisés sur la surface. On a observé une brusque variation du signal sur le plot 23 après déplacement de l'aimant, passant d'environ $\Delta R = -0,01\%$ à 45° par rapport à l'axe 1 à environ $\Delta R = -0,08\%$ à 0° par rapport à l'axe 1. Le phénomène se reproduit dans l'autre sens entre 0° et 90° de $\Delta R = -0,08\%$ à $\Delta R = -0,04\%$.

Pour les autres orientations de l'aimant, des phénomènes similaires apparaissent, mais de manière moins nette. Néanmoins, il était toujours possible de corrélérer une variation du signal brusque sur le point 23 avec un déplacement de l'aimant.

L'intensité des signaux obtenus est cependant faible. Cela peut être dû à deux phénomènes : soit les plasmons ne pénètrent que sur une faible profondeur le milieu constitué de la SAM et des billes, soit la densité de filaments est trop faible pour obtenir un signal plus important. Si la faible variation des signaux provient de la taille des billes, le contraste d'indice sera plus grand avec des billes de diamètre plus petit.

Aussi, une expérience similaire a été effectuée avec des filaments constitués de billes Ademtech de 200 nm de diamètre. La seule autre différence réside dans le fait que les filaments ont été polymérisés sur une lame « LCFIO ». Les procédés de fabrication des filaments et les analyses sur le banc de P-SPRI ont été effectués dans les mêmes conditions que précédemment. Malheureusement, les résultats obtenus n'étaient pas exploitables. Les observations au MEB faites après les analyses par P-SPRI, laisse penser que la faiblesse des signaux est due à la très faible densité des filaments immobilisés sur la surface. Nous avons vu que seulement 5% de la surface contenait des filaments.

L'utilisation de filaments constitués de billes de 1 μm et orienté par l'application d'un champ magnétique a permis de montrer que le banc peut détecter un signal anisotrope proche de la surface, cependant, l'intensité de ce signal est dépendant dans notre cas de la densité de matériel à la surface. Pour une application à la biologie, il faudra veiller à ce que la densité de biomolécules soit suffisante pour détecter par exemple l'augmentation de la quantité de matériel lors d'une biorecognition ou bien les changements de conformation de protéines.

2 Hybridation sur filaments et détection par fluorescence

Nous avons aussi testé l'utilisation des filaments pour procéder à des reconnaissances biomoléculaires. Nous avons choisi d'utiliser les oligonucléotides

représentant l'allèle a du gène HPA-1 pour vérifier la capacité des filaments à être fonctionnalisés par des biomolécules sans que celles-ci perdent leur activité biologique.

Notre stratégie a consisté à greffer des oligonucléotides sur des billes magnétiques en utilisant les protocoles de biofonctionnalisation des billes (magnétiques ou non) développés pour les analyses par biocode barre (Figure V-5a). Une caractérisation par HPLC a montré que la moitié des sites carboxyliques sert à l'immobilisation des oligonucléotides. Pour la formation des filaments et leur immobilisation sur une lame de verre, la Jeffamine a donc la possibilité de ponter les billes entre elles avec la moitié restante des sites carboxyliques (Figure V-5b).

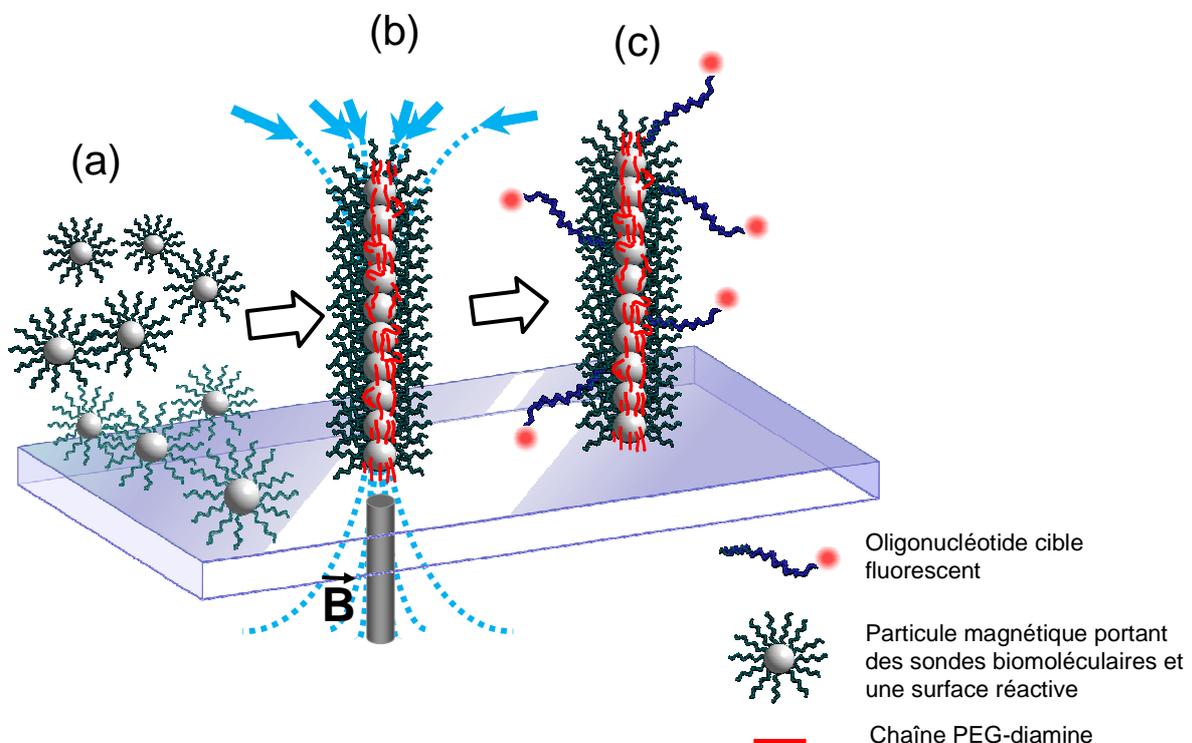


Figure V-5 : Utilisation des filaments magnétiques pour la biorecognition. (a) Particules magnétiques biofonctionnalisées par des oligonucléotides. (b) Formation de spots de filaments permanents en suivant la méthodologie générale. (c) Hybridation des oligonucléotides sondes fluorescents sur les filaments permanents. Les puces ADN ainsi formées sont analysées grâce à un scanner de fluorescence.

Sur une lame de verre, nous avons disposé des spots de filaments permanents biofonctionnalisés et des spots fonctionnalisés avec la sonde HPA-1 (sonde AL-HPA1aAS18-Cy3). Nous avons comparé la fluorescence obtenue après hybridation avec des cibles marquées par Cy5 et complémentaires aux sondes fixées sur les filaments

permanents ou immobilisées sur le verre pour les mêmes concentrations (Figure V-6). Les images de fluorescence ont été obtenues grâce un scanner Axon Genepix 4100A.

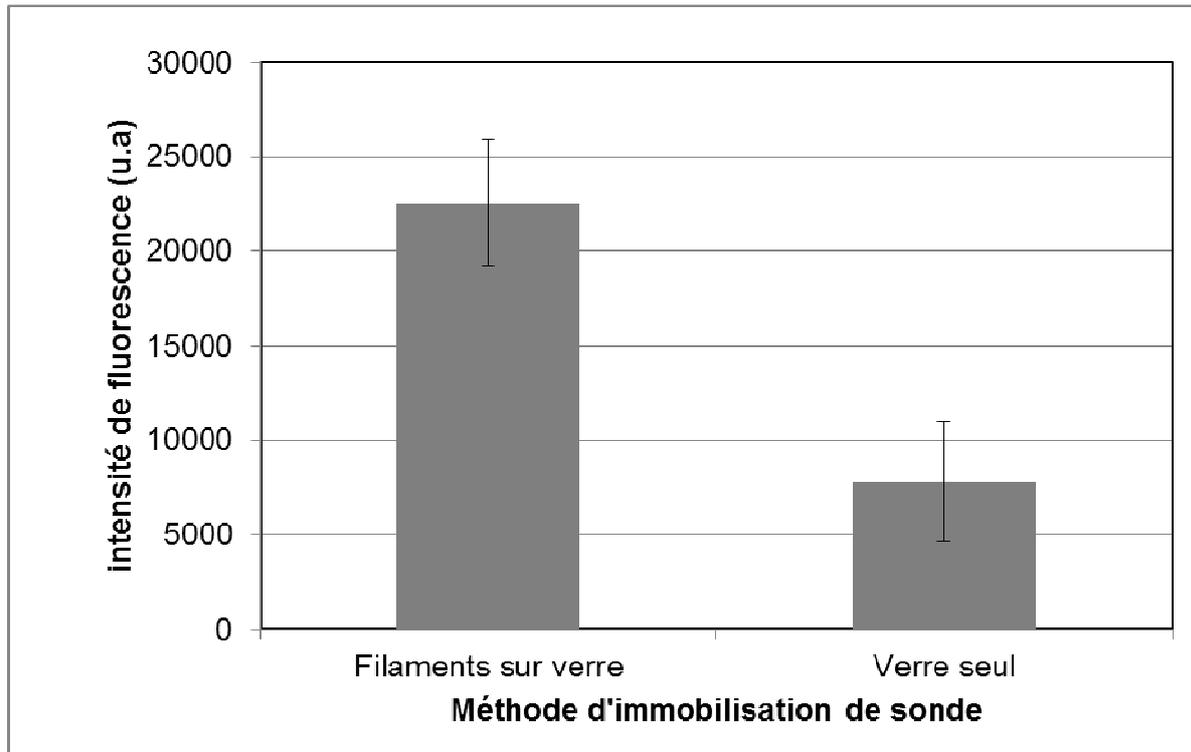


Figure V-6 : Comparaison de l'intensité de fluorescence des séquences complémentaires Cy5-ODN après leur hybridation avec les ODN greffés sur les filaments permanents (à gauche) et leur hybridation avec les mêmes ODN greffés sur du verre seul (droite). Les moyennes ont été faites sur 4 plots

On a observé que la fluorescence émise par les spots où les ODN cibles sont hybridés sur des filaments fonctionnalisés est trois fois plus importante que la fluorescence émise par les ODN cibles hybridés sur des ODN sondes directement immobilisés sur le verre seul. La différence d'émission de fluorescence est attribuée à la différence de la surface de l'hybridation. En effet, le nombre d'ODN immobilisés sur les filaments permanents doit être plus important car la présence des filaments augmente la surface spécifique des spots. Nous avons aussi déterminé que la fluorescence d'une cible mésappariée d'une seule base lors de la reconnaissance sur les filaments immobilisés sur verre (sonde HPA-1a et cible HPA-1b) est deux fois moins importante que la fluorescence lorsque les sondes et les cibles sont complémentaires. Nous avons donc une certaine spécificité de la reconnaissance lors de l'hybridation sur filaments permanents.

Le scanner analyse la fluorescence à son plan focal qui se situe sur la surface de la lame de verre. L'utilisation d'un détecteur avec un système optique « moins focal » devrait augmenter le signal de fluorescence détecté.

Les filaments magnétiques permanents peuvent améliorer les systèmes de puces (à ADN, à protéines ou à sucres) en augmentant leur surface spécifique. On peut aussi envisager de se servir de leur mobilité pour capturer un plus grand nombre de cibles en utilisant intelligemment un champ magnétique pour orienter le filament dans l'espace.

3 Conclusions

Nous avons développé une méthode simple pour fabriquer des filaments magnétiques permanents et les immobiliser sur une surface. Ces filaments ancrés sur une surface pour une extrémité sont orientables dans la direction d'un champ magnétique. L'utilisation d'un système de pointes et d'une double fonctionnalisation (pour des supports mixte verre/or) permet la localisation de spots de filaments sur des zones d'intérêt comme des plots d'or. Nous avons déterminé la géométrie des filaments grâce à des caractérisations par microscopie optique et électronique.

L'utilisation des filaments pour la validation du banc de P-SPRI n'est pas entièrement satisfaisante. En effet, le signal obtenu pour des filaments fabriqués avec des billes de grand diamètre (1 μm) est proche du bruit de fond. Le changement de la taille des billes afin d'avoir des objets montrant une plus grande anisotropie n'a pas permis d'améliorer les signaux. Ceci est probablement dû à la faible densité de surface des filaments. Il faudra donc envisager de travailler à des concentrations beaucoup plus importantes.

L'utilisation des filaments pour la reconnaissance de biomolécules est plus encourageante. Nous avons montré que l'hybridation de cibles fluorescentes à partir de filaments biofonctionnalisés permet d'augmenter significativement le signal de fluorescence comparé au signal obtenu sur les plots « classiques ». Nous avons également montré que sur les filaments magnétiques, la reconnaissance est bien spécifique. Il est possible

d'améliorer facilement le dispositif en utilisant un champ magnétique permettant aux filaments de se mouvoir en solution pour capturer plus de cibles.

4 Références bibliographiques

- (1) Duval, A. (2009), Thèse de l'université Paris Sud. Institut d'Optique Graduate School.

Conclusion générale

Ce mémoire exploite la biofonctionnalisation, la caractérisation et la mise en œuvre de particules magnétiques pour leur utilisation avec des biocapteurs en utilisant les savoir-faire de notre équipe et les faisant évoluer.

Dans un chapitre introductif, nous avons présenté la composition, la structure et leurs propriétés magnétiques des particules magnétiques. Nous avons aussi présenté brièvement dans ce chapitre les utilisations actuelles des particules magnétiques. Ce travail de thèse se découpe en deux axes distincts :

A- L'utilisation des particules magnétiques pour la capture et la concentration de cibles biologiques dans une analyse par biocode barre à l'aide d'un nouveau biocapteur à onde évanescente.

B- La fabrication de filaments magnétiques permanents orientables et ancrés à une surface.

Nous avons consacré la partie A du mémoire au développement d'une analyse par biocode barre pour le génotypage plaquettaire couplée à une détection sur un biocapteur à ondes évanescentes. L'ensemble des protocoles a été validé en s'appuyant sur un modèle biologique, le système biallélique HPA-1. Ce travail de thèse présente, dans un premier temps, l'efficacité de la biofonctionnalisation des différents éléments de l'analyse déterminée par diverses méthodes.

Nous avons aussi étudié les paramètres influençant l'analyse. Nous avons pu déterminer que les tubes utilisés pour l'analyse doivent être bloqués et que les meilleures performances sont obtenus pour un rapport entre les billes magnétiques et les billes de latex de 1/30 et pour un rapport [cBCB]/[capture] de 2000.

Une fois les paramètres fixés, nous avons étudié deux stratégies analytiques différentes : i) la détection se fait grâce à une reconnaissance des biocodes barres par hybridation à leur complémentaire au fond de la barrette d'analyse et ii) la détection se fait par interaction neutravidine/biotine au fond de la barrette d'analyse. Les meilleures

performances de détection sont obtenues pour l'approche neutravidine/biotine qui est aussi plus simple à mettre en œuvre.

Nous avons procédé à des analyses par biocode barre couplé à la détection par le biocapteur à onde évanescente pour le typage du gène HPA-1 en employant des cibles synthétiques. Ces essais nous ont permis de montrer que nous pouvons détecter une concentration de 2 fM de cibles synthétiques ce qui correspond pour notre volume d'analyse à $6 \cdot 10^5$ oligonucléotides cibles. Nous avons aussi montré que nous pouvons à cette concentration discriminer les allèles a et b du gène. Ces allèles ne diffèrent que d'une seule base azotée. Grâce à cette limite de détection, nous pouvons procéder, théoriquement, à un génotypage plaquettaire sans PCR (Polymerase Chain Reaction). Il sera nécessaire de poursuivre les tests en utilisant de l'ADN génomique natif et améliorer le temps total d'analyse.

Nous avons consacré la partie B du manuscrit à la fabrication de filaments permanents greffés sur une surface et orientables.

Nous avons développé une méthode simple de fabrication et d'adressage de filaments sur une surface de verre. Nous avons montré que notre méthodologie peut être adaptée à une surface d'or et des supports mixtes verre/or. Les filaments ont été caractérisés par microscopie optique et par microscopie électronique à balayage. Nous avons aussi pu observer que les filaments fabriqués sont immobilisés à la surface et que leur partie supérieure et orientable en solution sous l'effet d'un champ magnétique.

Nous avons fabriqué une puce de P-SPRI (Polarimetric Surface plasmon resonance imaging) sur laquelle on a greffé des filaments qui sont orientables grâce à un champ magnétique extérieur pour tester un système d'imagerie par résonance de plasmon de surface sensible à l'anisotropie créé par l'équipe MacSyBio du Laboratoire Charles Fabry – Institut d'Optique. Nous avons montré que l'anisotropie peut être détectée mais que le signal est très faible. Il faudra poursuivre les expériences en améliorant la densité de surface du greffage pour augmenter le signal de réponse.

Nous avons aussi fabriqué une puce à ADN sur support de verre comportant des filaments permanents fonctionnalisés pour la détection du gène HPA-1. La présence des filaments sur cette puce à ADN permet multiplier par trois le signal de fluorescence d'une puce ADN classique grâce à l'augmentation de la surface spécifique. Nous envisageons d'utiliser un champ magnétique pour permettre aux filaments de se mouvoir en solution afin d'optimiser la capture de cibles.

Annexes

Annexe I
Liste des maladies, le type de maladie, l'incidence ou la prévalence de ces maladies liées à des désordres plaquettaires.

| Maladie | | Type de maladie | Incidence (cas par an) | Prévalence estimée | |
|--|--------------------|-----------------------|---|--|-------------------------|
| Nom générique du groupe | Maladies du groupe | | | Prévalence du groupe | Prévalence individuelle |
| Thrombocytopénie néonatale allo-immune (NAIT) | | Allo-immune | 1-2 bébés sur 1000 | | |
| Purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT) ou syndrome de Moschcowitz | | Allo-immune | | 24,6/100 000 | |
| Etat réfractaire aux transfusions plaquettaires (PR) | | Allo-immune | 20-60 % des patients recevant de multiples transfusions | | |
| Purpura post transfusionnel (PTP) | | Allo-immune | 1 pour 200 000 transfusions | | |
| Thrombocytopénie induite par héparine | | Allo-immune | 5% des patients traités par héparine | | |
| Purpura thrombocytopénique idiopathique (PTI) | forme aiguë | Autoimmune | | 25/100 000 | 80-90% des cas |
| | forme chronique | | | | 10-15% des cas |
| Thrombocytose essentielle[13] | | | 2-3 cas sur 100 000 personnes | | |
| Syndrome de Bernard-Soulier | | Autosomique récessive | | 100 cas décrits | |
| Maladie de von Willebrand | Type 1 | Autosomique dominante | | 12,5/100 000 soit 1% de la population mondiale | 50 à 75 % des cas |
| | Type 2 | Autosomique dominante | | | 20 à 45 % des cas |
| | Type 3 | Autosomique récessive | | | < 5 % des cas |
| Thrombasthénie de Glazmann[11] | | Autosomique récessive | | Rare | |
| Thrombocytopénie amégacaryocytaire congénitale (Amégacaryocytose) | | Autosomique récessive | | NA | |
| Syndrome de Wiskott-Aldrich | | Récessive liée à l'X | 1 naissance sur 200 000 | 0,15 / 100 000 | |
| Syndrome TAR (Thrombopénie avec aplasie radiale) | | Autosomique récessive | 1 naissance sur 100 000 | | |
| Syndrome ATRUS | | Autosomique dominante | | < 20 cas publiés | |
| Syndrome de Hermansky-Pudlak | | Autosomique récessive | | 0,15/100 000 | |
| Syndrome des plaquettes grises | | Autosomique récessive | | 20 cas décrits | |

| Maladie | | Type de maladie | Incidence (cas par an) | Prévalence estimée | |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|
| Nom générique du groupe | Maladies du groupe | | | Prévalence du groupe | Prévalence individuelle |
| Syndrome de Scott | | Autosomique récessive | | Très rare | |
| Syndrome MYH9[14] | Anomalie de May-Hegglin | Autosomique dominante | | 1-9/1 000 000 | |
| | Syndrome d'Epstein | | | | < 100 familles décrites |
| | Syndrome de Fechtner | | | | |
| | Syndrome de Sebastian | | | | < 1/1 000 000 |

Annexe II

Protocoles d'une analyse par biocodes barres couplée à une détection par Evareader.

Matériels

Tous les produits suivants proviennent de chez *Sigma-Aldrich* (Saint Quentin Fallavier, France) :

- PBS 1X (0.01 M phosphate buffered saline, [NaCl] = 0.138 M, [KCl] = 0.0027 M, pH 7.4), SSC 20X (0.3 M sodium citrate, pH 7.0, [NaCl] = 3 M), N-hydroxysuccinimide (NHS), 1-[3-(Dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide methiodide (EDCI), l'Albumine de sérum bovin (BSA), Tween 20, l'hydrogénocarbonate de sodium, le carbonate de sodium, les particules magnétiques (MB) de 1 μm de diamètre en quantité de 20 mg/ml avec $5 \cdot 10^8$ particules/mg, modifiées par des fonctions carboxyliques ([COOH] = 5 $\mu\text{mol/ml}$ de solution), les billes de latex (LB) de 900 nm de diamètre (30 % de contenu solide, $7.5 \cdot 10^{11}$ particules/ml) modifiées par les fonctions carboxyliques.

Tous les tampons ont été préparés à partir d'eau ultra pure (18.2 M Ω), purifiée par le système Purelab ultra. Un aimant néodyme (NdFeB, 1 T au contact) est utilisé pour les séparations magnétiques. Le tampon PBS 1X est utilisée à un pH de 7,4 pour l'ensemble des protocoles sauf si indication contraire.

Tous les oligonucléotides synthétiques ont été obtenus chez *Eurogentec* (Belgique). Les séquences présentées dans le tableau ci-dessous correspondent au système biallélique HPA-1.

| Nom | Séquences des oligonucléotides (5' -> 3') |
|--|--|
| Oligonucléotide sonde allèle HPA-1a (sonde «a»)* | CGAGGTGAGCCC <u>A</u> AGAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Oligonucléotide sonde allèle HPA-1b (sonde «b»)* | CGAGGTGAGCCC <u>G</u> AGAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| AL-HPA1aAS18-Cy3 | Cy3-AGCCC <u>A</u> AGAGGCAGGGCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Oligonucléotide de capture (capture) | GGGGCACAGTTATCCTTCAGCAGATTCTCCT-C ₆ -NH ₂ |
| Sonde biotinylée | ATGCCCTCTTTGATATT-biotine |
| Complémentaire du biocode barre pour l'expérience ODN-ODN (cBBC+2T) | ATGCCCTCTTTGATATT-C ₆ -NH ₂ |
| Biocode barre pour l'expérience ODN-ODN (BBC) | Cy5-TATCAAAGAGGGCAT |
| Complémentaire du biocode barre pour les expériences ODN-biotine / neutravidine (cBBC+15T) | ATGCCCTCTTTGATATTTTTTTTTTTTTTTTTT-C ₆ -NH ₂ |
| Biocode barre marqué Cy5 et biotinylé pour (biot-BBC) | Cy5(biotine)-AAAAAAAAAAAAAAAAATATCAAAGAGGGCAT |
| Oligonucléotide cible allèle HPA-1a (cible «a»)* | GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>T</u> GGGCTCACCTCGCTGT GACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA |
| Oligonucléotide cible allèle HPA-1b (cible «b»)* | GGGCTCCTGTCTTACAGGCCCTGCCTC <u>C</u> GGGCTCACCTCGCTGT GACCTGAAGGAGAATCTGCTGAAGGATAACTGTGCCCCA |

* Les SPN sont soulignés dans les séquences d'ADN.

Tableau AII-1 : Séquences des acides nucléiques utilisés pour les analyses par biocode barre.

Protocoles

Cette partie décrit les protocoles de préparation des différents éléments nécessaires à une analyse par biocode barre ainsi que le protocole de l'analyse

Préparation des Evachips

Evachip pour l'analyse ODN-biotine / neutravidine: Evachips ODN-biotine / neutravidine

On prépare une solution de tampon de blocage composé de BSA à 4% en masse et de Tween 20 à 0,25 % dans du PBS 1X (pH 7,4), une solution de saccharose à 1% dans du PBS 1X (pH 7,4) et une solution de neutravidine de 10 mg/ml dans un tampon hydrogénocarbonate de sodium (0,1 mol/l ; pH=9,13) dont le pH est ajusté à 9,3 par addition de carbonate de sodium (0,1 mol/l ; pH=10,98).

On laisse incuber, une nuit à température ambiante et en atmosphère saturée, 50 µl de la solution de neutravidine dans chacun des puits des barrettes. Les barrettes sont ensuite rincées avec du PBS 1X puis séchées. On ajoute ensuite 80 µl de tampon de blocage par puits qu'on laisse incuber pendant 1 heure à température ambiante. Les barrettes sont rincées deux fois avec du PBS 1X, puis deux fois avec la solution de saccharose et enfin séchées. L'extérieur des barrettes est finalement nettoyé avec de l'eau ultrapure et séchée avec du papier optique pour éviter les traces, de laisser des fibres ou de rayer la surface de la partie formant le prisme.

Evachip pour l'analyse ODN-ODN : Evachips ODN/ODN

On prépare une solution de BSA à 4% en masse dans du PBS 1X (pH 7,4) et une solution de sondes biotinylées à une concentration de 50 nM dans du PBS 1X (pH 7,4).

On dépose 25 µl de sondes biotinylées dans chacun des puits d'une partie des barrettes préalablement préparées (Evachips ODN-biotine / neutravidine). On laisse incuber 45 min à température ambiante et en atmosphère saturée. On aspire l'excès de sondes biotinylées. Puis, on dépose 30 µl de la solution de BSA à 4% en masse dans chaque puits que l'on laisse incuber pendant 30 min. On aspire la solution de BSA et on effectue ensuite 3

lavages des puits avec 40 µl de PBS 1X suivis de 3 lavages avec 40 µl d'eau ultrapure. On retire l'eau résiduelle en tapotant les barrettes au-dessus d'un papier absorbant et on les laisse sécher à température ambiante.

Préparation des tubes eppendorfs

Etant donné que l'on travaille avec de très faibles concentrations de matériels, il est important de limiter l'adsorption non spécifique des oligonucléotides et des particules sur les parois des tubes de stockage ou d'analyse. Aussi, on prépare autant de tubes eppendorfs de 1,5 ml que nécessaires pour une analyse. Les tubes sont remplis d'une solution de BSA à 4% dans du PBS 1X (pH 7,4). On laisse incuber les tubes pendant 2h dans une étuve à 37°C. Ils sont par la suite vidés et séchés. Les tubes ainsi préparés sont dit bloqués par la BSA qui limite les phénomènes d'adsorption.

Préparation des billes magnétiques (étape 1)

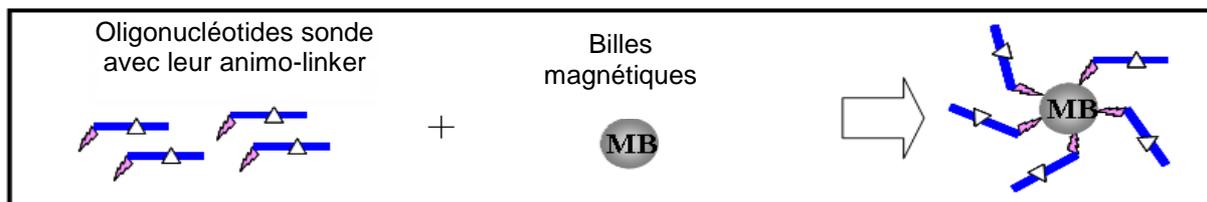
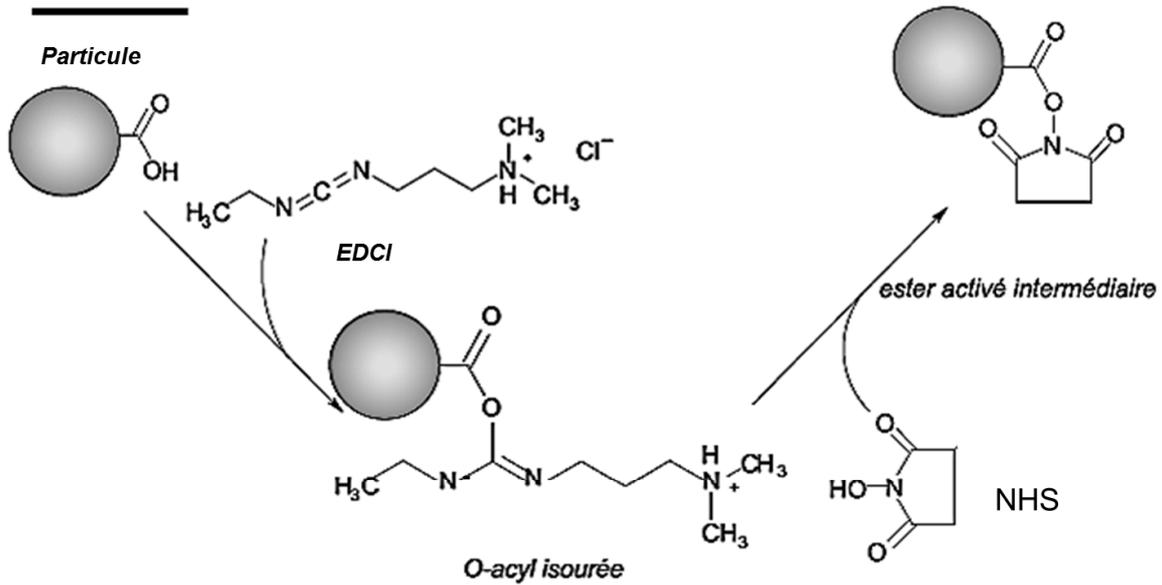


Figure All-1 : Schéma de greffage des particules magnétiques.

10 µl de billes magnétiques dans leur tampon de stockage sont transférées dans des tubes eppendorfs et suspendues dans 490 µl d'eau ultrapure. On utilise ensuite un aimant néodyme pour procéder à une séparation magnétique. L'aimant attire les particules permettant ainsi de pipeter la totalité du surnageant. On suspend les billes dans 500 µl d'eau ultrapure. Ce procédé de lavage est appliqué 3 fois successivement puis les billes sont suspendues dans 450 µl de PBS 1X.

On prépare une solution d'activation (1 ml de PBS 1X + 4 mg EDCI + 4 mg NHS) pour activer les fonctions carboxyliques par la chimie classique NHS/carbodiimide [1]. Dû à la réactivité du carbodiimide avec l'eau, il est d'usage de préparer cette solution juste avant de s'en servir.

Activation :



Couplage :

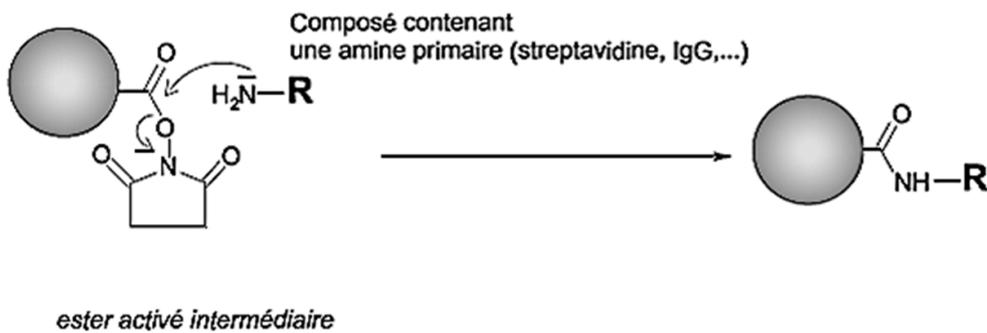


Figure All-2 : Réaction chimique de greffage. Dans la première étape dite d'activation, l'EDCI réagit avec la fonction carboxylique pour former de l'O-acyl isourée très réactif qui réagit par la suite avec le NHS pour former une fonction ester activé intermédiaire. Dans la seconde étape dite de couplage, l'ester activé réagit avec l'amine primaire portée par l'amino-linker présent à l'extrémité 3' de(s) oligonucléotide(s) utilisé(s) pour le type de bille fonctionnalisée (capture, cBCB + 2T ; cBCB + 15T, sonde « a », sonde « b »). (D'après Swingle et al. [1])

On ajoute 50 μl de solution d'activation dans chacun des tubes et les billes sont incubées sous agitation à 550 rpm pendant 2h à 25°C dans un thermomixer. Une fois l'activation terminée, les billes sont lavées en suivant la même procédure que décrite ci-dessus en remplaçant l'eau par du PBS 1X.

Les particules magnétiques après le troisième lavage au PBS 1X sont suspendues dans 450 μl de PBS 1X. On ajoute dans chacun des tubes 50 μl d'une solution à 25 μM dans du PBS 1X les oligonucléotides sonde « a » ou sonde « b » suivant l'analyse que l'on veut faire. On obtient ainsi une concentration finale pour le greffage de sondes spécifiques de 2,5

μM . Notons que ces oligonucléotides portent un aminolinker qui permet un greffage covalent à la surface des billes via les fonctions acides carboxyliques activées. L'incubation des billes s'effectue dans un thermomixer sur la nuit (15 h) à 25°C et sous agitation constante (550 rpm). Les billes magnétiques ainsi greffées sont lavées avec du SSC 5X en suivant la procédure décrite ci-dessus et sont finalement suspendues dans $450\ \mu\text{l}$ de SSC 5X en attendant d'être utilisées pour une analyse par biocode barre. Les particules peuvent être conservées pendant 1 mois à température ambiante.

Préparation des billes non magnétiques(étape 2)

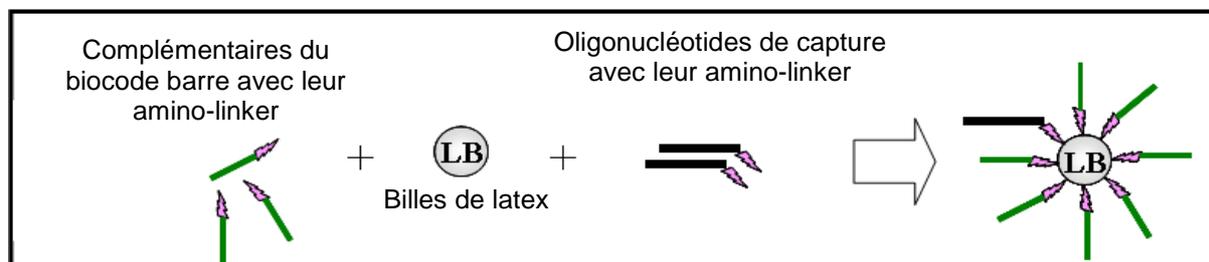


Figure AII-3 : Schéma de greffage des particules de latex non magnétiques.

$10\ \mu\text{l}$ de billes de latex dans leur tampon de stockage sont transférés dans des tubes eppendorfs et suspendues dans $490\ \mu\text{l}$ d'eau ultrapure. On centrifuge les tubes pendant 10 min à 14000 rpm permettant de récupérer le surnageant en le pipetant dans sa totalité précautionneusement pour ne pas resuspendre les billes. On suspend les billes dans $500\ \mu\text{l}$ d'eau ultrapure. Ce procédé de lavage est appliqué trois fois successivement. puis les billes sont suspendues dans $450\ \mu\text{l}$ de PBS 1X.

On prépare la même solution d'activation que pour les billes magnétiques à savoir 4 mg de NHS + 4 mg de EDCI dans 1 ml de PBS 1X en respectant les précautions données dans la section précédente.

On ajoute $50\ \mu\text{l}$ de solution d'activation dans chacun des tubes et les billes sont incubées sous agitation à 550 rpm pendant 2h à 25°C dans un thermomixer. Une fois l'activation terminée, les billes sont lavées en suivant la même procédure que décrite ci-dessus en remplaçant l'eau par du PBS 1X.

Les billes de latex après le troisième lavage au PBS 1X sont suspendues dans 400µl de PBS 1X. On ajoute dans chacun des tubes 50 µl d'une solution PBS 1X contenant les séquences complémentaires du biocode barre à 25 µM) et 50 µl d'une solution PBS 1X contenant les oligonucléotides de capture à **une concentration dépendante du rapport [capture]/[complémentaire du biocode barre]**. Les différents rapports [capture]/[complémentaire du biocode barre] étudiés qui seront décrits et étudiés dans le chapitre 2. La séquence des complémentaires des biocodes barres utilisés dépendra du type d'interaction entre les biocodes barres et les Evachips. Si les Evachips utilisent une reconnaissance biotine/avidine (**Evachips ODN-biotine/neutravidine**), les billes de latex sont fonctionnalisées avec le **complémentaire du biocode barre cBBC+15T**. Si les Evachips utilisent une reconnaissance ODN/ODN (**Evachips ODN/ODN**), les billes de latex sont fonctionnalisées avec le **complémentaire du biocode barre cBBC+2T**. L'incubation des billes s'effectue dans un thermomixer sur la nuit (15 h) à 25°C et sous agitation constante (550 rpm). Les billes de latex ainsi greffées sont lavées dans SSC 5X en suivant la procédure décrite ci-dessus et sont finalement suspendues dans 500 µl de SSC 5X pour être analysées par le spectrophotomètre UV-Visible SAFAS.

Une fois que les spectres d'absorption des billes sont effectués, on calcule leur concentration à l'aide d'une courbe d'étalonnage. On centrifuge les tubes pendant 10 min à 14000 rpm et on supprime le surnageant. On suspend ensuite les billes dans suffisamment de SSC 5X pour que l'on obtienne dans un volume de 200 µl de tampon un nombre de particules de latex satisfaisant le rapport : nombre de billes magnétiques / nombre de billes de latex = 1/30.

Formation des sandwiches (étape 3)

Les 450 µl de billes magnétiques sont introduits dans un nouveau tube eppendorf bloqué. On ajoute 50 µl de la cible d'intérêt pour notre analyse. On laisse les sondes portées par les billes magnétiques et les cibles s'hybrider dans un thermomixer pendant 2 h à 66°C sous agitation. Cette première partie du sandwich formé est lavée trois fois avec du SSC 5X

en suivant le protocole de lavage des billes magnétiques. On suspend les demi-sandwichs dans 300 µl de SSC 5X.

On ajoute alors 200 µl de billes de latex (MB/LB = 1/30) et on laisse hybrider les demi-sandwichs avec les oligonucléotides de capture portés par les particules de latex dans un thermomixer pendant 2 h à 66°C sous agitation. Les sandwichs ainsi formés sont lavés trois fois avec du SSC 5X en suivant le protocole de lavage des particules magnétiques. On suspend les sandwichs dans 450 µl de SSC 5X.

Analyse par biocode barre et Evareader (étapes 4 et 5):

Analyse par biocode barre et Evachip ODN-ODN

On ajoute 50 µl d'une solution de 2,5 µM de biocodes barres (BBC) aux sandwichs et on hybride les cBBC+2T portés par les billes de latex avec les biocodes barres dans un thermomixer pendant 30 min à 25°C sous agitation. Les sandwichs sont lavés en suivant le protocole concernant les billes magnétiques une première fois dans SSC 5X, les deuxième et troisième fois dans SSC 2X et la quatrième fois dans SSC 0,2X.

On procède à la dénaturation des biocodes barres. On place les tubes eppendorfs dans un thermomixer à 90°C pendant 5 min en vortexant chacun des tubes toutes les minutes. On centrifuge ensuite les tubes pendant 10 min à 14000 rpm. On pipette le surnageant et on transfère celui-ci dans un nouveau tube eppendorf bloqué et enveloppé dans du papier aluminium pour éviter le photobleaching des fluorophores.

30 µl de chacun des surnageants récupérés sont pipetés et placés dans les puits voisins d'une plaque à 384 puits. 25 µl sont alors pipetés dans la plaque à puits grâce à une pipette multicanaux et transférés dans la barrette d'analyse ODN qui est aussitôt introduite dans l'Evareader pour y être analysée.

Analyse par biocode barre et Evachip ODN-biotine / neutravidine

On ajoute 50 µl d'une solution de 2,5 µM de biocodes barres (biot-BBC) aux sandwichs et on hybride les cBBC+15T portés par les billes de latex avec les biocodes

barres dans un thermomixer pendant 30 min à 50°C sous agitation. Les sandwiches sont lavés en suivant le protocole concernant les billes magnétiques une première fois avec du SSC 5X, les deuxième et troisième fois du SSC 2X et pour la quatrième fois du SSC 0,2X.

On procède à la dénaturation des biocodes barres. On place les tubes eppendorfs dans un thermomixer à 90°C pendant 5 min en vortexant chacun des tubes toutes les minutes. On centrifuge ensuite les tubes pendant 10 min à 14000 rpm. On pipette le surnageant et on le transfère dans un nouveau tube eppendorf bloqué et enveloppé dans du papier aluminium pour éviter le photobleaching des fluorophores.

30 µl de chacun des surnageants récupérés sont pipetés et placés dans les puits voisins d'une plaque à 384 puits. 25 µl sont alors pipetés dans la plaque à puits grâce à une pipette multicanaux et transférés dans la barrette d'analyse neutravidine qui est aussitôt introduite dans l'Evareader pour y être analysée.

Référence Bibliographique

1. Swingle, D.M., J.V. Staros, and R.W. Wright, *Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions*. Anal. Biochem, 1986. **156**: p. 220–222.

Annexe III

Méthodes de caractérisation

Spectroscopie UV-Visible

Principe de fonctionnement

La spectroscopie UV-visible est une technique mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine des ultraviolets (200 nm – 400 nm) et du visible (380 nm à 780 nm).

Un monochromateur permet de sélectionner la longueur d'onde du faisceau de photons incident. Celui-ci traverse la cuve contenant l'échantillon où une partie de son intensité est absorbée. L'intensité lumineuse résiduelle est réfléchiée vers une cellule photoélectrique. Le courant fourni par la cellule est proportionnel à l'absorbance.

Le spectrophotomètre mesure donc l'intensité lumineuse passant à travers l'échantillon (I) et la compare à l'intensité lumineuse émise par la source (I_0). L'absorbance de l'échantillon est définie par la loi de Beer-Lambert pour une longueur d'onde λ donnée :

$$A_\lambda = -\log(I/I_0)$$

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda CL$$

Avec A_λ l'absorbance ; ϵ_λ le coefficient d'extinction molaire en $\text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$; C la concentration en mol.l^{-1} et l la longueur du trajet optique dans l'échantillon en cm.

L'absorbance et le coefficient d'extinction molaire sont dépendants de la longueur d'onde.

En faisant un balayage du spectre électromagnétique à différentes longueurs d'onde, on obtient un spectre d'absorbance en fonction de la longueur d'onde (Figure AIII-1).

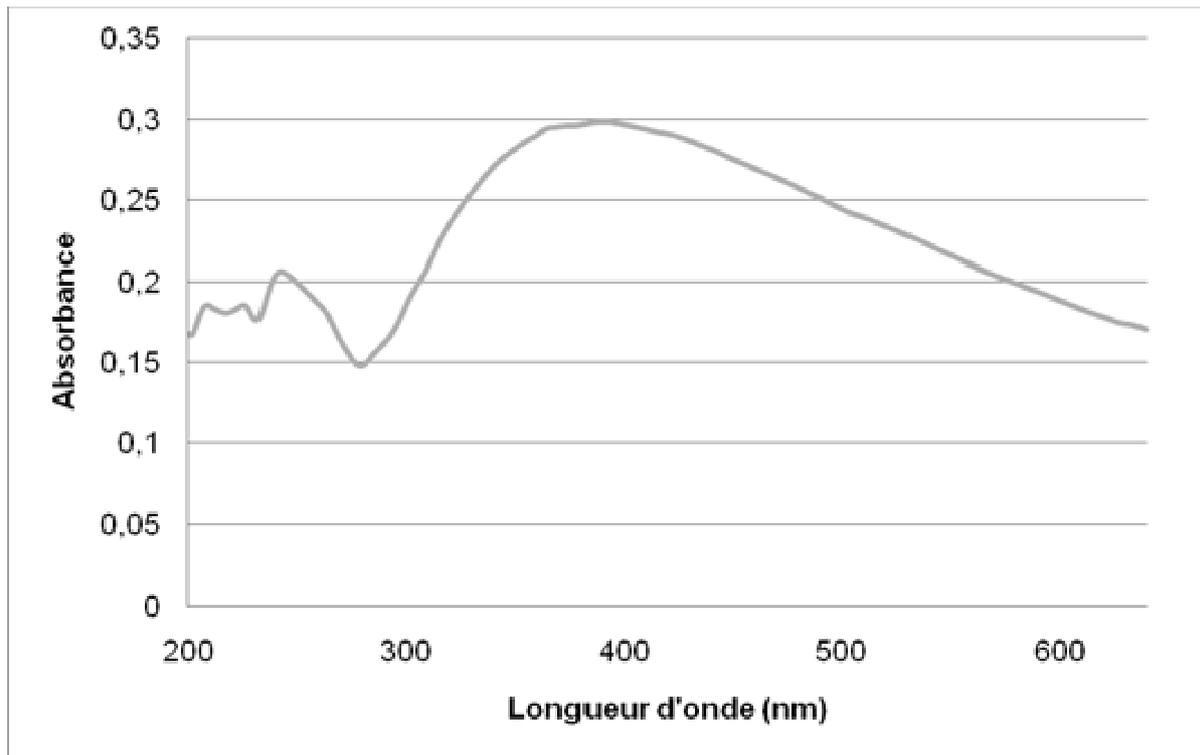


Figure AIII-1 Spectre d'absorbance des billes de latex en fonction de la longueur d'onde

Ces spectres nous permettent à partir d'une courbe d'étalonnage effectuée à la longueur d'onde λ_{max} d'ajuster la concentration des particules pour se placer dans les mêmes conditions d'analyse et pouvoir ainsi comparer les différents résultats obtenus

Appareillage

La caractérisation de la biofonctionnalisation des particules non magnétiques et la détermination des concentrations en particules non magnétiques ont été effectuées par analyse des spectres d'absorption des particules obtenus à l'aide du spectrophotomètre SAFAS UV mc2[®] (Monaco) et de son logiciel d'exploitation SP 2000.

Ce spectrophotomètre a pour source une lampe tungstène (360 nm - 1050 nm) et une lampe deutérium (190 nm - 360 nm). Les mesures ont été effectuées dans une micro-cuve d'une contenance maximale de 5 μ l et dont le trajet optique est de 0,2 mm (Figure AIII-2)



Figure AIII-2 : A gauche : Photo du spectromètre SAFAS (ouvert). En haut à droite : Photo de la microcuve fermée. En bas à droite : Photo de la microcuve ouverte.

HPLC/UV-Visible

Principe de fonctionnement

La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est une technique analytique de séparation permettant d'identifier, de quantifier et purifier les composés d'un mélange.

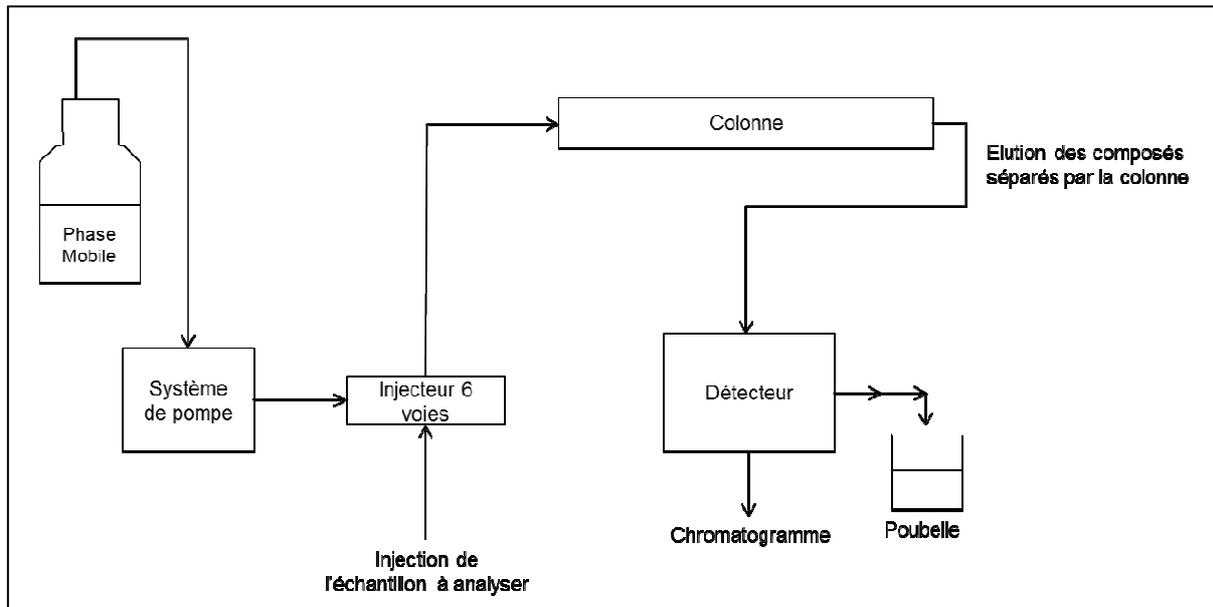


Figure AIII-3 : Schéma d'une chaîne d'HPLC

Grâce à un système de pompes, un liquide (appelé phase mobile) se déplace à l'intérieur du montage chromatographique. Un petit volume de l'échantillon à analyser est introduit dans le flux de la phase mobile à l'aide d'un injecteur. Les analytes traversent ensuite la colonne où ils sont ralentis par leurs interactions physico-chimiques avec la phase stationnaire. Ce ralentissement dépend de la nature des analytes, de la phase mobile et de la phase stationnaire. Ainsi les analytes peuvent être séparés et détectés. Cette détection permet de tracer un chromatogramme en temps réel. (Figure AIII-4).

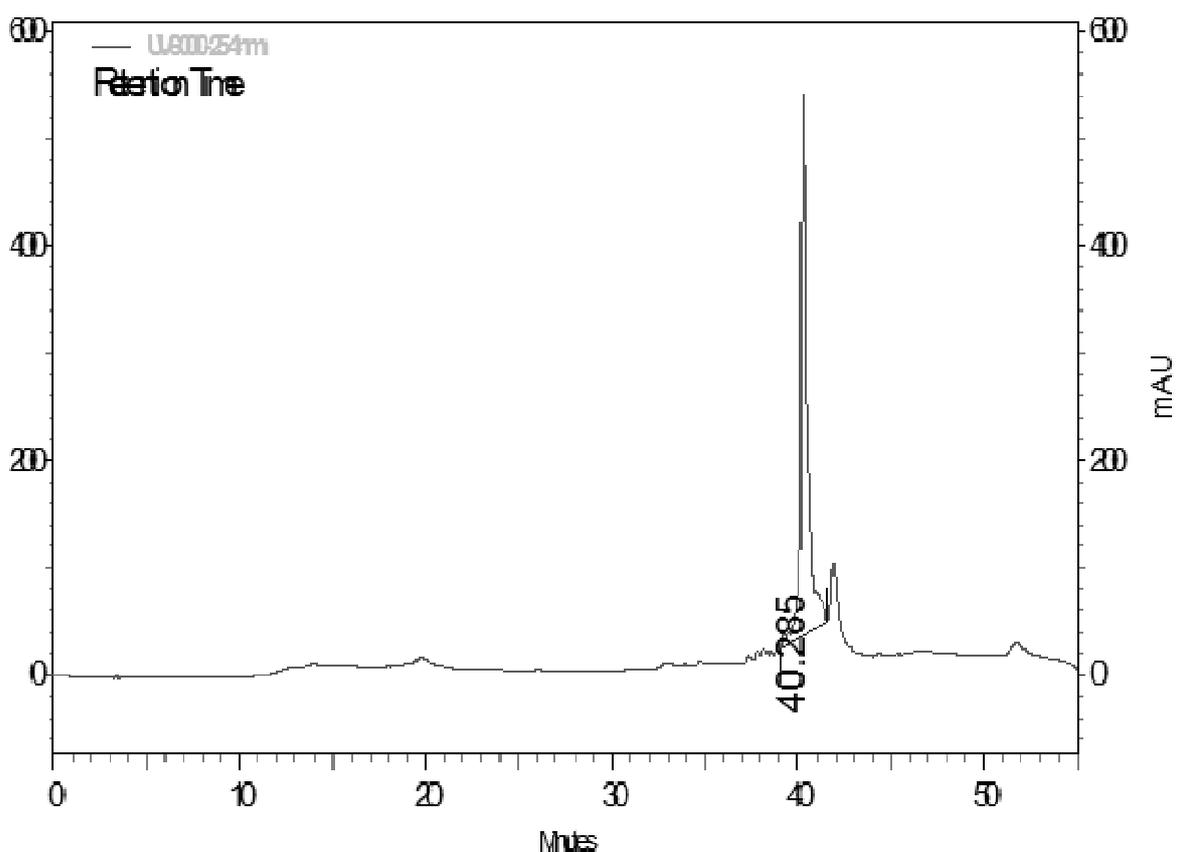


Figure AIII-4: Chromatogramme de l'éluion d'une solution d'oligonucléotides marqués Cy3 (AL-HPA1aAS18-Cy3)

Le temps que met un analyte à être élué (à sortir de la colonne) est appelé temps de rétention. Ce temps de rétention est représenté par un pic sur le chromatogramme et est caractéristique du composant. De plus, l'aire sous le pic chromatographique est proportionnelle à la quantité d'analyte. Ainsi, à partir d'une courbe de calibration, il est possible d'effectuer des dosages sur les analytes d'intérêt.

Appareillage

La caractérisation de la biofonctionnalisation des particules magnétiques a été effectuée sur une chaîne HPLC (pour High performance liquid chromatography) *Thermo Finnigan* sur laquelle était montée une colonne de type Hypersil-C18 fournie par *Agilent Technologies* (Massy, France) dont les caractéristiques sont données dans le tableau ci-après.

| Paramètres | Caractéristiques |
|-----------------------------|---|
| Longueur de la colonne | 250 mm |
| Diamètre de la colonne | 4,6 mm |
| Type de phase stationnaire | Billes de silice greffées par des chaînes linéaires d'octadécylsilane |
| Dimension des billes | 5 µm de diamètre |
| Taille des pores des billes | 300 Å |

Tableau AIII-1 : Caractéristiques de la colonne du montage HPLC/UV-Visible

La technique utilisée est la chromatographie à polarité de phase inversée puisque la phase stationnaire est apolaire et la phase mobile est polaire et est composée d'un mélange de tampon acétate de triéthylammonium (TEEA ; 50 mM) et d'acétonitrile.

L'élution a été faite à un débit de 0,5 ml/min avec le gradient d'élution par palier pour l'acétonitrile (0-5 min : 3-5% ; 5-6,5 min : 5-30 % ; 6,5-15 min : 30-57,5% 15-26 min : 57,5-100%) grâce à une pompe P1000 Gradient Pump.

La détection de la sonde en sortie de colonne est réalisée par une mesure d'absorbance UV-visible avec un spectromètre UV6000LP. Nous avons choisi 260 nm comme longueur d'onde pour cette détection afin d'utiliser ce protocole pour différents types de séquences oligonucléotides. L'acquisition des données a été faite par le logiciel Chromquest.

Microscopie optique

La microscopie optique permet d'observer des objets de quelques micromètres. Nous avons utilisé deux instruments de microscopie optiques pour observer le comportement des filaments permanents formés par des billes de 1 µm de diamètre sous l'effet d'un champ magnétique.

Le microscope optique

Le microscope optique est un instrument d'optique muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de séparer les détails de cette image afin qu'il soit observable par l'œil humain. Le microscope optique se base sur un système de lentilles optiques pour obtenir une image agrandie de l'échantillon à observer (Figure AIII-5).

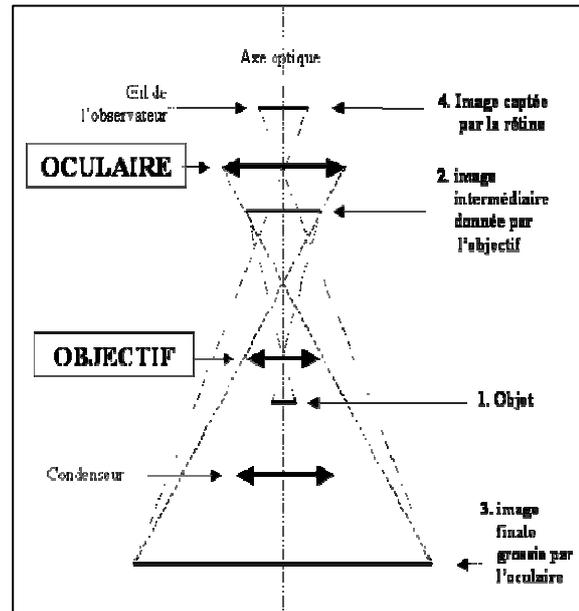
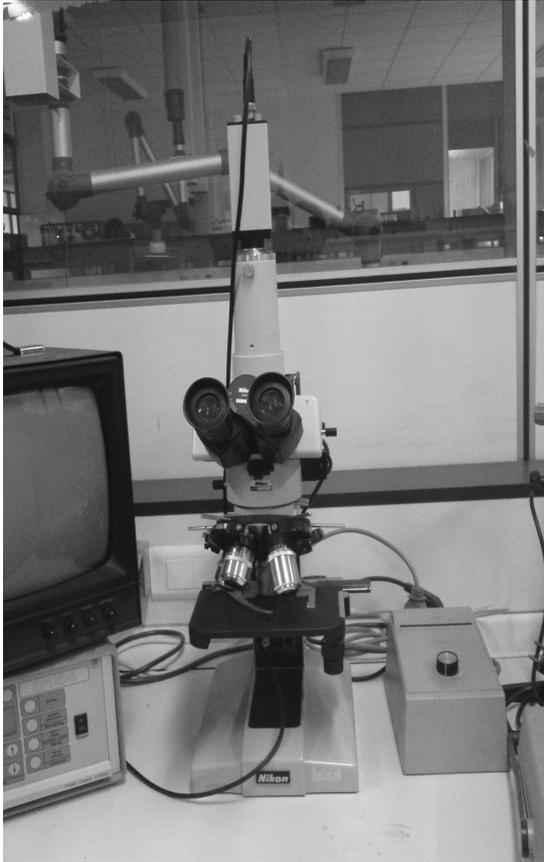


Figure AIII-5 : Photo du microscope optique à tête binoculaire et principe de fonctionnement d'un microscope optique.

L'objet à observer est placé devant la première lentille appelée objectif. Si l'objet est au-delà de la distance focale, cela forme une image réelle inversée et de taille différente ; l'image est plus grande que l'objet si celui-ci est situé à une distance inférieure au double de la distance focale de l'objectif. La deuxième lentille est l'oculaire : elle est positionnée de sorte que l'image soit dans son plan focal. Ainsi, l'œil observe une image « à l'infini ».

La technique de microscopie utilisée pour l'observation de nos lames est la microscopie en réflexion. L'échantillon est illuminé du même côté que l'observateur. La lumière produite par la source passe une première fois par l'objectif, arrive sur l'échantillon, est réfléchi et repasse par l'objectif pour observation ce qui nécessite plusieurs jeux de miroirs ou prismes.

Le microscope utilisé est un Nikon à tête binoculaire (Figure AIII-5). Il ne faut pas le confondre avec la loupe binoculaire qui nous a aussi servi à observer nos échantillons.

La loupe binoculaire.

L'instrument d'optique appelé couramment « loupe binoculaire » est en réalité un stéréomicroscope qui fournit une image tridimensionnelle de faible grossissement (Figure AIII-6). C'est un appareil destiné en priorité à l'observation à faible grossissement avec un éclairage par-dessus. Il permet surtout la perception stéréoscopique, en relief, de petits sujets.



Figure AIII-6 : Photo d'une loupe binoculaire

Un stéréomicroscope se compose en fait de deux microscopes accolés pour fournir deux images de l'objet, une pour chaque œil. Chaque image est redressée par un dispositif particulier qui n'existe pas dans un microscope classique. Cela permet une vision en relief de l'objet.

La loupe binoculaire utilisée a un pouvoir grossissant de x2

Les microscopes optiques n'ont pas un pouvoir de résolution suffisant pour observer les filaments formés par les billes de 200 nm de diamètre. Nous avons donc utilisé un microscope à balayage électronique (MEB).

Microscopie électronique à balayage

Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompes à vide et l'échantillon doit être conducteur.

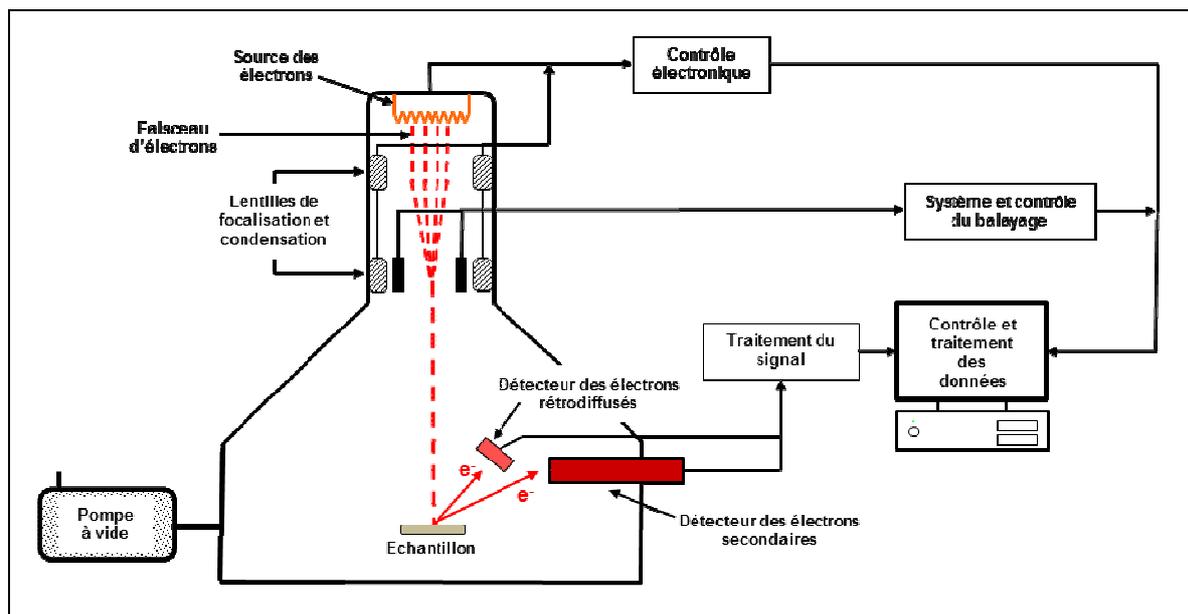


Figure AIII-7 : Schéma d'un microscope électronique à balayage

Une sonde électronique fine (faisceau électronique) est produite par le canon à électrons qui joue le rôle d'une source réduite par des lentilles électroniques qui jouent le même rôle vis-à-vis du faisceau d'électrons que des lentilles conventionnelles, photoniques dans un microscope optique. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage du même type que celui de la télévision. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayage forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique.

Le faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui

sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

Annexe IV

Analyse des images de filaments sur verre

Procédure pour une analyse semi-automatique des images de filaments

1. Elimination manuelle des défauts non significatifs prévenant une analyse correcte des images (bulles, polluants)
2. Algorithme semi automatique pour l'analyse d'image. Cet algorithme nécessite la détermination manuelle d'un seuil permettant de distinguer les filaments de l'image de fond. Il faut aussi inclure une calibration spatiale en utilisant une référence géométrique. Les axes X et Y sont équivalents pour cette calibration spatiale. Les filaments retenus et analysés par l'algorithme sont indiqués par un détourage blanc. Les autres filaments ne sont pas pris en compte dans l'analyse quantitative. Les filaments rejetés correspondent aux items les plus petits.

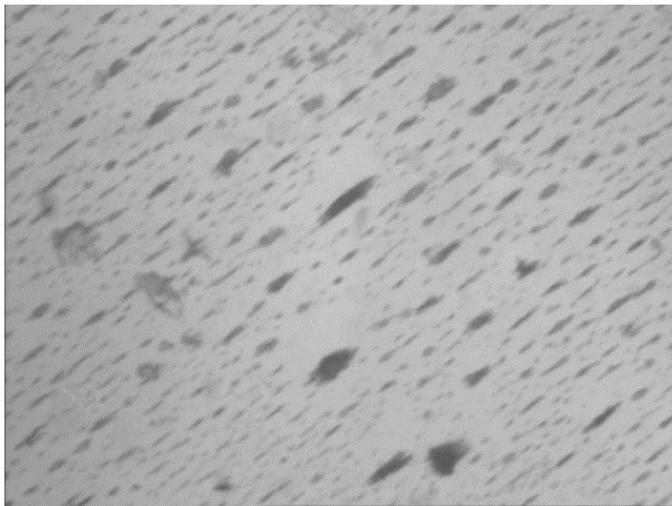


Image brute

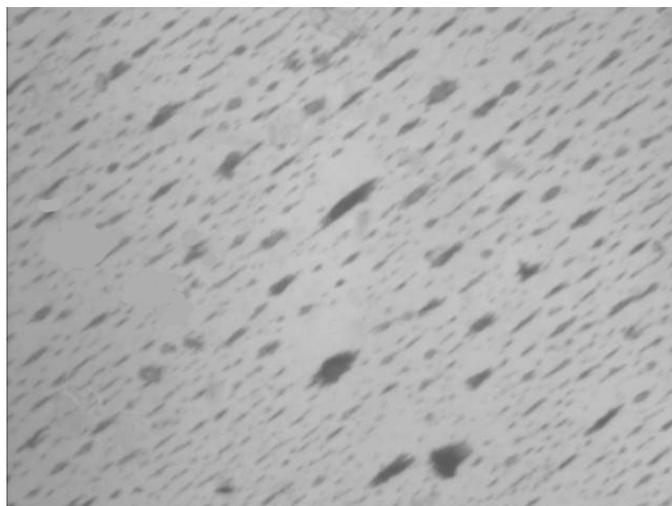


Image après élimination manuelle des défauts non significatifs

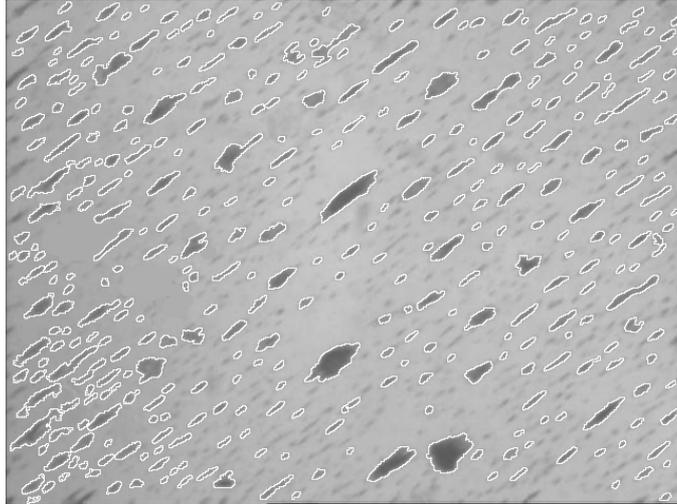
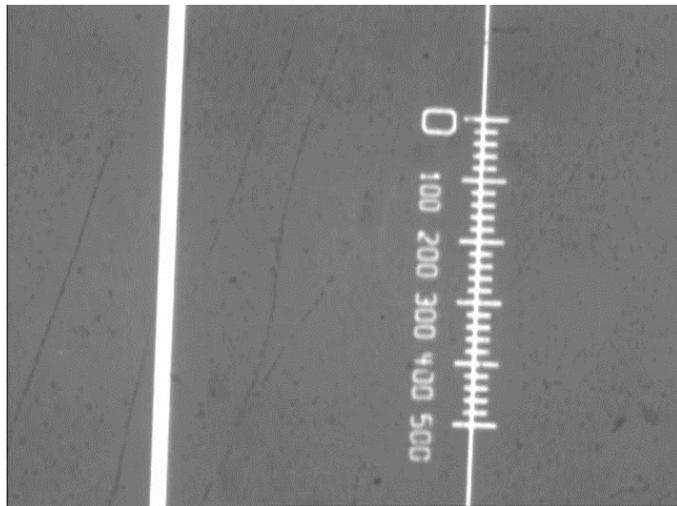


Image segmentée montrant les filaments pris en compte



Etablissement d'une échelle (microns)

3) Extraction des caractéristiques de formes.

| Object # | Equivalent Ellipse Major Axis | Equivalent Ellipse Minor Axis | Equivalent Rect Long Side | Equivalent Rect Short Side | Equivalent Rect Diagonal | Area | Orientation | Ratio of Equivalent Ellipse Axes | Ratio of Equivalent Rect Sides | Elongation Factor | Compactness Factor |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|------|-------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------|--------------------|
| 1 | 20.30544 | 7.39911 | 17.10633 | 6.89803 | 18.02776 | 118 | 53.17421 | 2.74431 | 2.47989 | 3.5873 | 0.4958 |
| 2 | 11.62862 | 3.83222 | 10.15177 | 3.44768 | 10.44031 | 35 | 48.11362 | 3.03444 | 2.94453 | 4.02778 | 0.4321 |
| 3 | 7.2671 | 4.90576 | 4.86938 | 4.86938 | 5.65685 | 28 | 45.56987 | 1.48134 | 1 | 3.03571 | 0.57143 |
| 4 | 7.11369 | 4.6536 | 4.72091 | 4.72091 | 5.65685 | 26 | 8.95415 | 1.52864 | 1 | 2.42857 | 0.65 |
| 5 | 5.12564 | 5.12564 | 3.89016 | 3.89016 | 4.24264 | 22 | 38.79128 | 1 | 1 | 2.26087 | 0.61111 |
| 6 | 7.41422 | 3.60632 | 4.57882 | 4.57882 | 5.65685 | 21 | 31.47974 | 2.0559 | 1 | 2.90476 | 0.7 |
| 7 | 6.92856 | 3.12403 | 5.12426 | 3.31755 | 5.83095 | 17 | 29.35348 | 2.21783 | 1.54459 | 3.41176 | 0.48571 |
| 8 | 7.51294 | 3.7284 | 4.65792 | 4.65792 | 5.65685 | 22 | 55.38802 | 2.01506 | 1 | 2.82609 | 0.52381 |
| 9 | 15.40491 | 5.95091 | 12.65211 | 5.69075 | 13 | 72 | 51.85697 | 2.58866 | 2.2328 | 3.19178 | 0.5035 |
| 10 | 11.29346 | 5.1861 | 8.17933 | 5.62393 | 9.43398 | 46 | 35.14326 | 2.17764 | 1.45438 | 2.40385 | 0.52273 |
| 11 | 20.01276 | 7.95267 | 16.2063 | 7.71305 | 17.46425 | 125 | 57.54591 | 2.51648 | 2.10115 | 2.99231 | 0.52521 |
| 12 | 10.20616 | 2.8693 | 9.30347 | 2.4722 | 9.21954 | 23 | 63.91788 | 3.55703 | 3.76324 | 2.66667 | 0.41071 |
| 13 | 15.05557 | 4.39761 | 13.5969 | 3.8244 | 13.34166 | 52 | 152.99705 | 3.42358 | 3.5553 | 2.06061 | 0.57778 |
| 14 | 50.09174 | 2.87225 | 53.62198 | 2.10734 | 53.03772 | 113 | 59.5404 | 17.43989 | 25.44528 | 2.21088 | 0.23395 |
| 15 | 13.68447 | 5.39647 | 11.12559 | 5.21321 | 12.08305 | 58 | 42.7619 | 2.53582 | 2.13412 | 3.48276 | 0.43939 |
| 16 | 11.8565 | 6.0137 | 7.38318 | 7.38318 | 9.89949 | 56 | 36.82094 | 1.97158 | 1 | 2.92857 | 0.62222 |
| 17 | 14.06588 | 6.06482 | 10.82332 | 6.19034 | 11.6619 | 67 | 36.85977 | 2.31926 | 1.74842 | 2.92958 | 0.50758 |
| 18 | 12.29756 | 3.83083 | 10.91749 | 3.38906 | 10.44031 | 37 | 31.26674 | 3.21016 | 3.2214 | 4.5 | 0.38542 |
| 19 | 11.81613 | 3.98691 | 10.23706 | 3.61432 | 10.44031 | 37 | 65.36035 | 2.96373 | 2.83236 | 3.47619 | 0.56061 |
| 20 | 10.57455 | 4.69583 | 7.9388 | 4.91258 | 8.06226 | 39 | 43.93789 | 2.2519 | 1.61601 | 3.17073 | 0.54167 |
| 21 | 8.18299 | 3.7343 | 5.97185 | 4.01886 | 6.40312 | 24 | 41.27772 | 2.1913 | 1.48596 | 2.74074 | 0.57143 |
| 22 | 10.66199 | 4.41849 | 8.43009 | 4.38904 | 8.94427 | 37 | 47.87146 | 2.41304 | 1.92072 | 3.02222 | 0.52857 |
| 23 | 14.82597 | 4.29395 | 13.41791 | 3.72636 | 13.34166 | 50 | 3.64036 | 3.45276 | 3.60081 | 2.08571 | 0.50505 |
| 24 | 20.2152 | 3.08623 | 20.29979 | 2.41382 | 20.09975 | 49 | 108.43992 | 6.55013 | 8.40982 | 2.58537 | 0.35 |
| 25 | 15.52663 | 2.70612 | 15.35684 | 2.14888 | 15.13275 | 33 | 40.35317 | 5.7376 | 7.14644 | 5.54545 | 0.25 |

Exemple de tableau contenant les caractéristiques de forme pour chaque filament isolé et segmenté

Analyse quantitative de l'image des filaments préparés avec une concentration de particules $a=1,6 \cdot 10^{-4} M$
 Nombre de filaments segmentés = 219

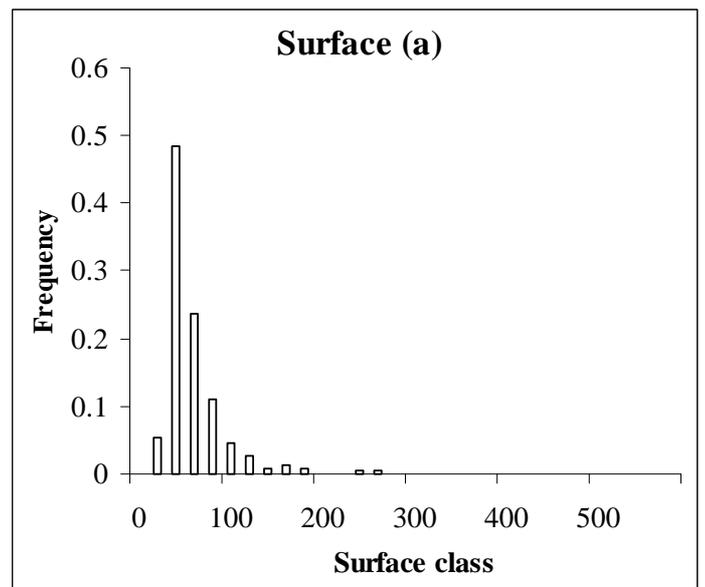
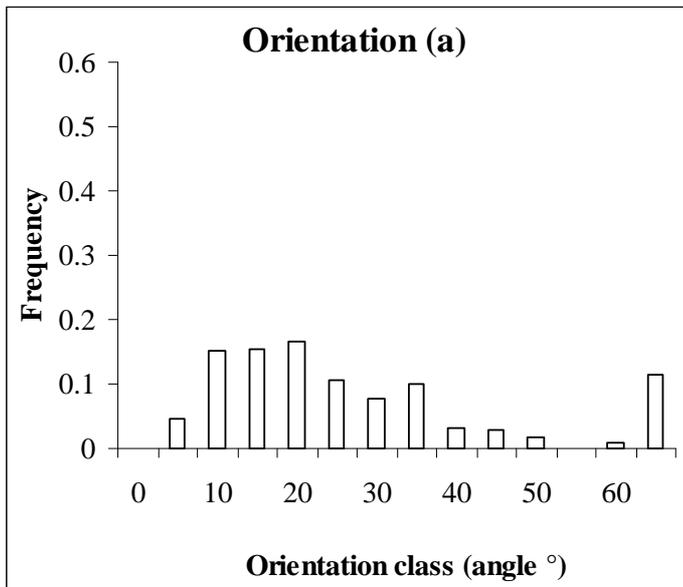
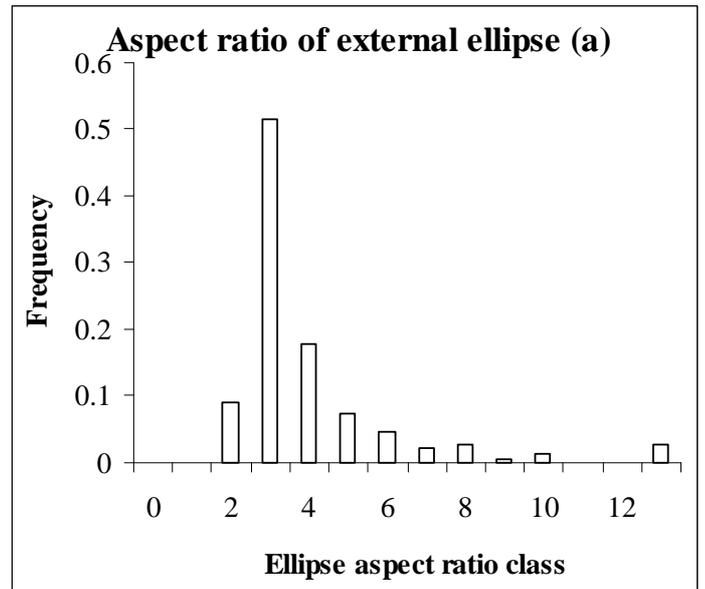
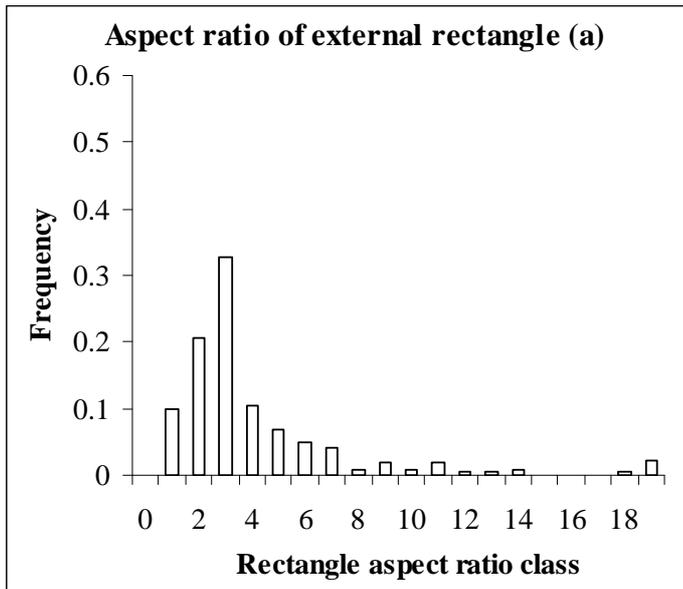
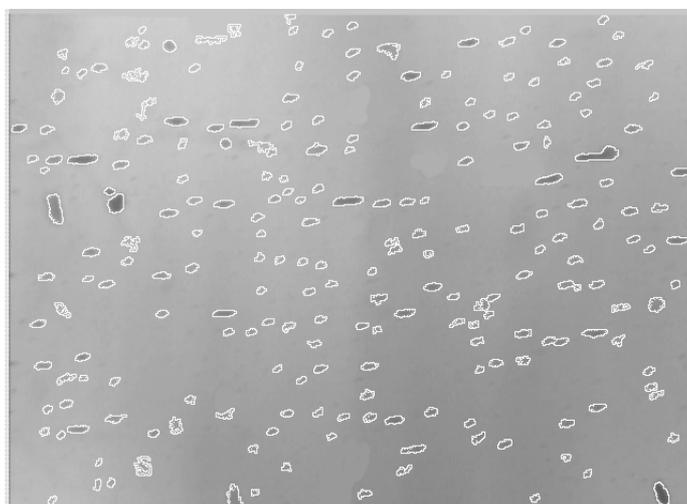


Image de filaments formés à une concentration de particules $a = 1,6 E -4 M$



Analyse quantitative de l'image des filaments préparés avec une concentration de particules $b=4,15 \cdot 10^{-4} M$

Nombre de filaments segmentés = 330

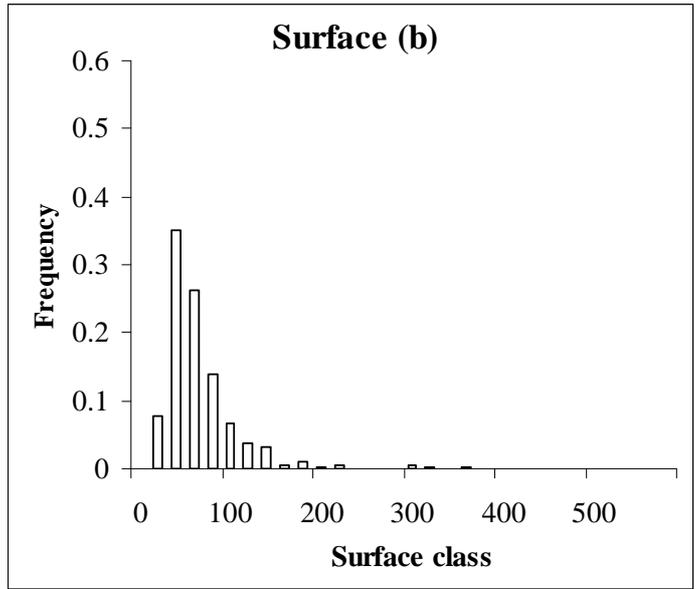
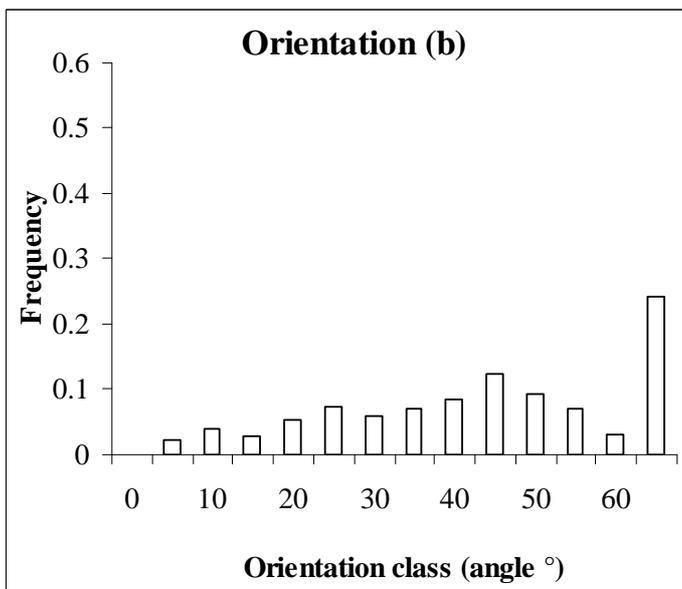
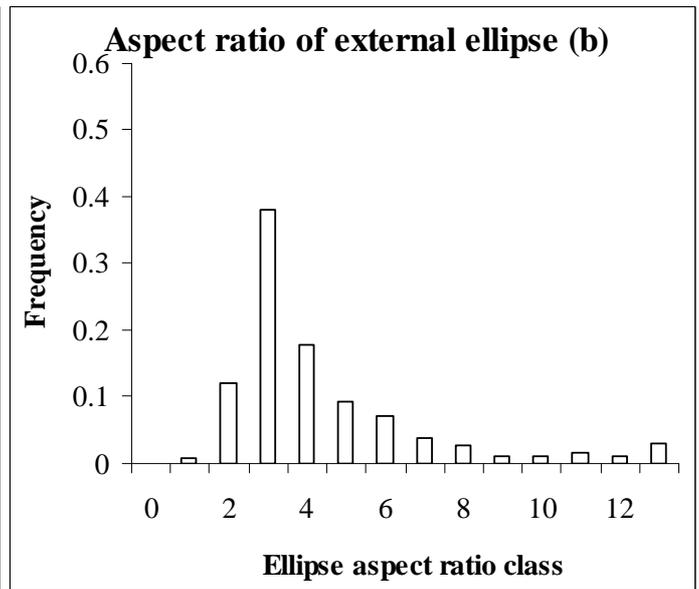
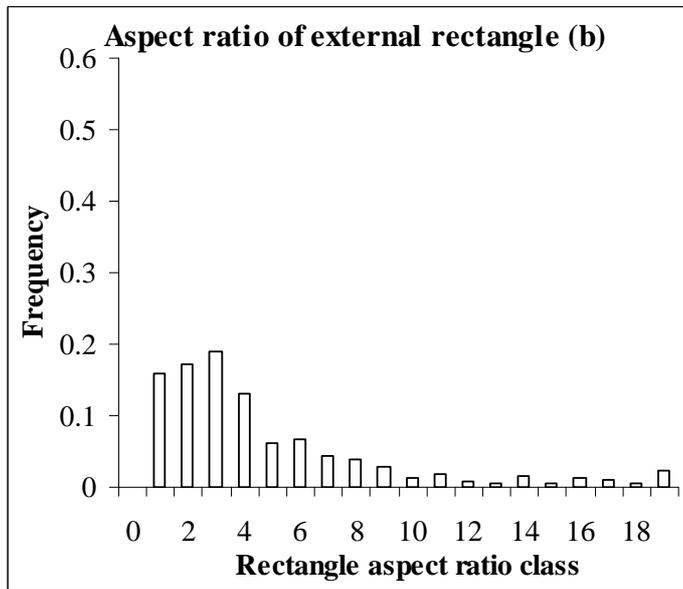
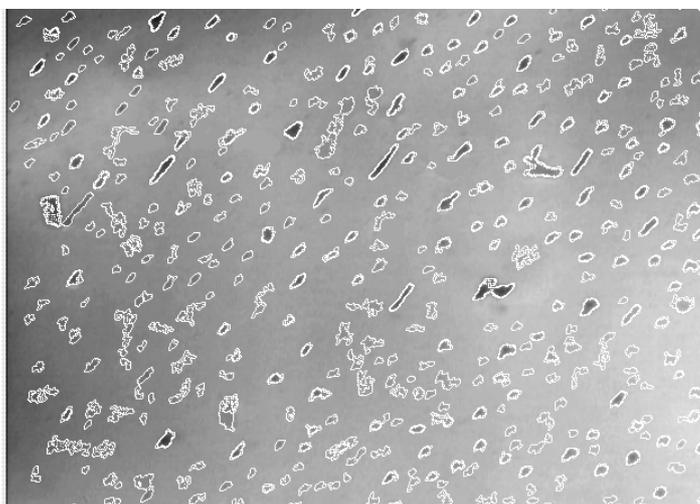


Image de filaments formés à une concentration de particules $b = 4,15 E-4 M$



Analyse quantitative de l'image des filaments préparés avec une concentration de particules $c=1,6 \cdot 10^{-3} M$

Nombre de filaments segmentés = 521

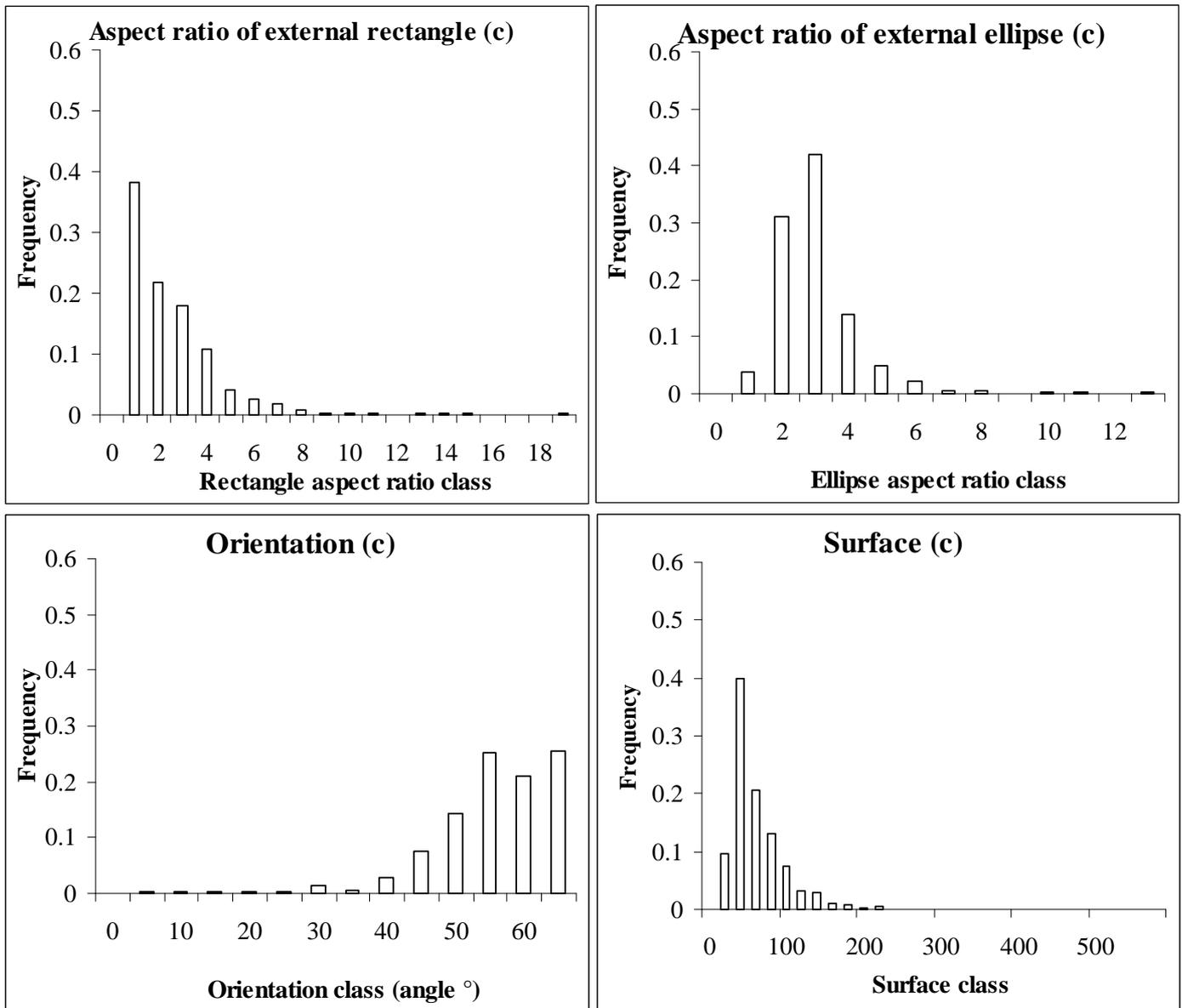
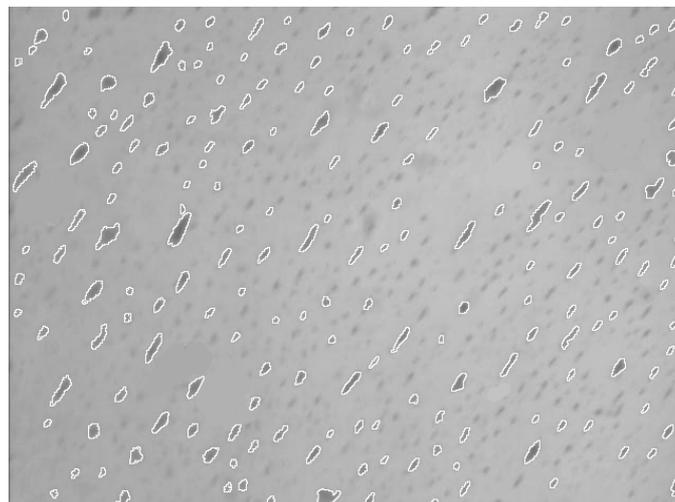


Image de filaments formés à une concentration de particules $c = 1,6 E-3 M$.

Les filaments pris en compte par l'algorithme de segmentation sont entourés pour un contour blanc



Analyse quantitative de l'image des filaments préparés avec une concentration de particules $d=4,15 \cdot 10^{-3} M$
 Nombre de filaments segmentés = 462

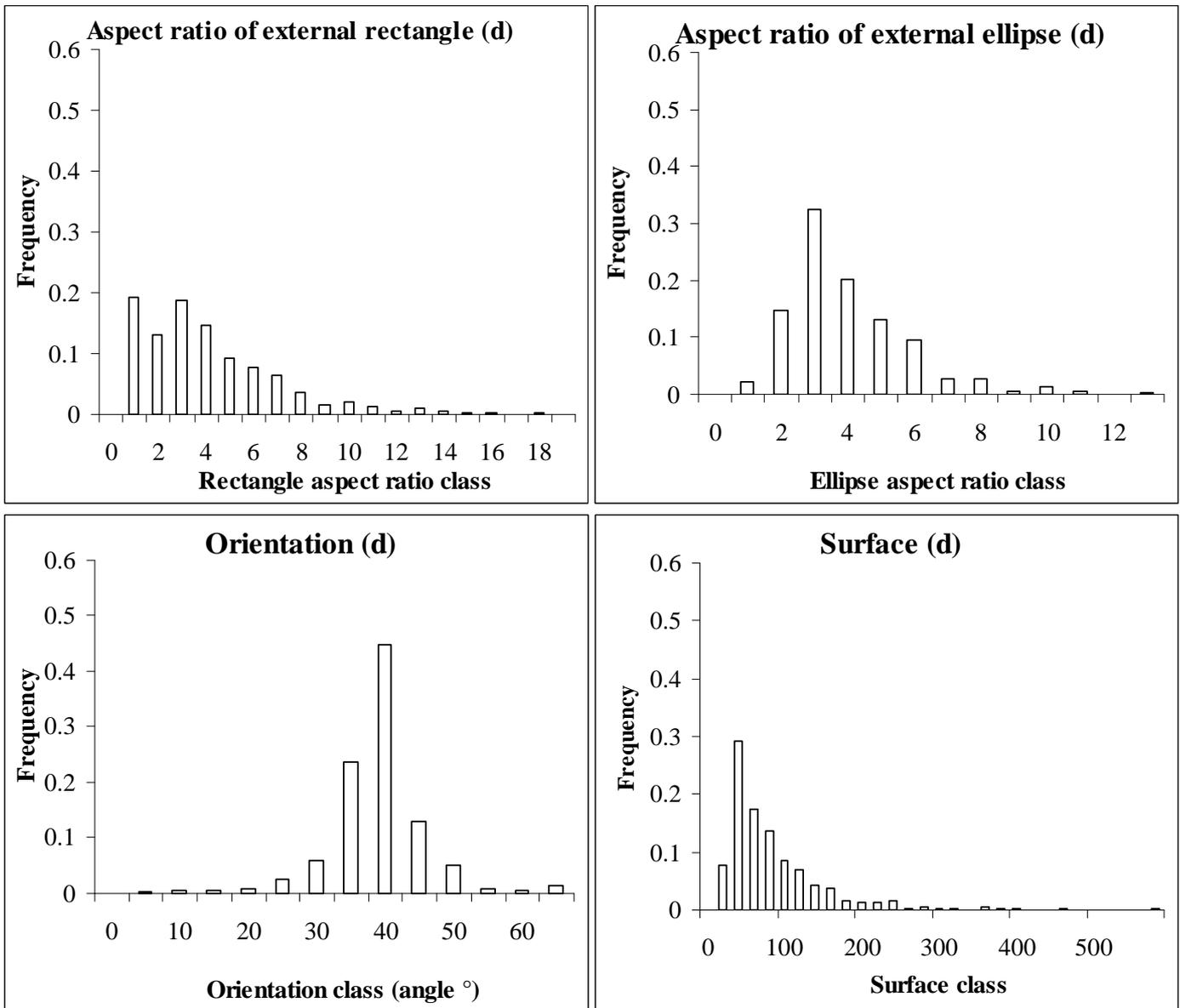
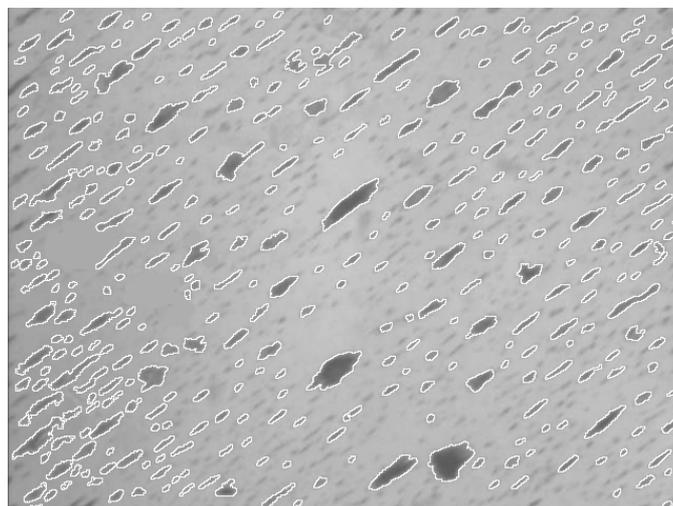


Image de filaments formés à une concentration de particules $d = 4,15 E-3M$.

Les filaments pris en compte par l'algorithme de segmentation sont entourés pour un contour blanc



Analyse quantitative de l'image des filaments préparés avec une concentration de particules $e=8,3 \cdot 10^{-3} M$
 Nombre de filaments segmentés = 135

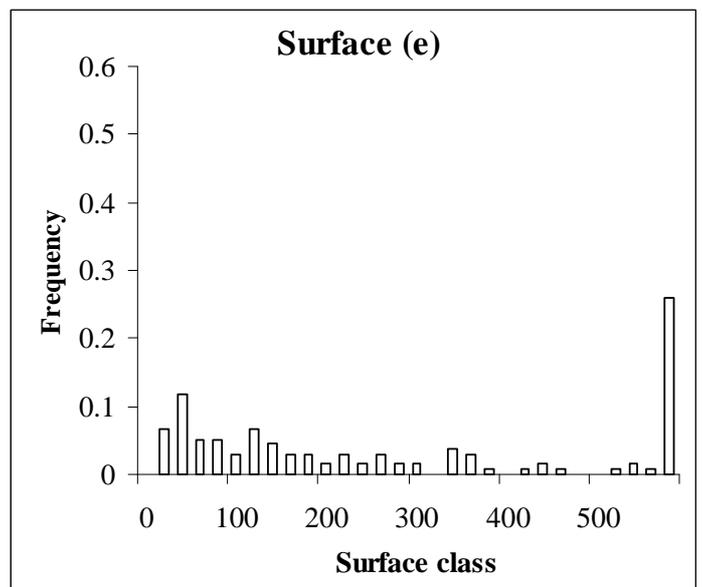
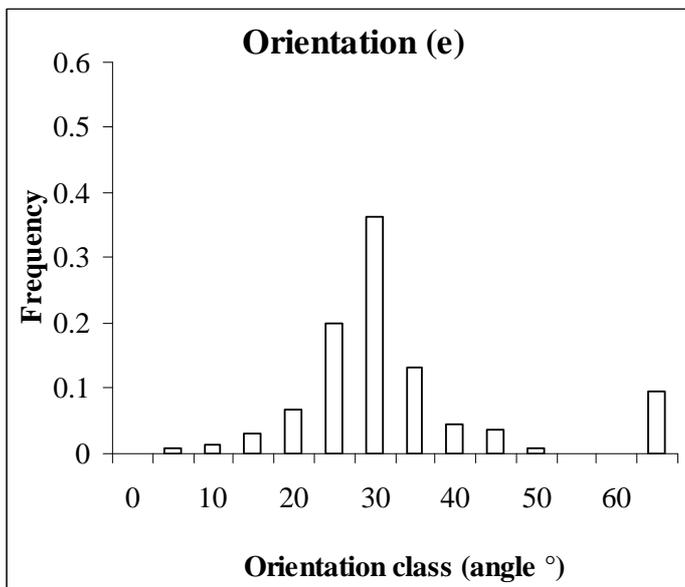
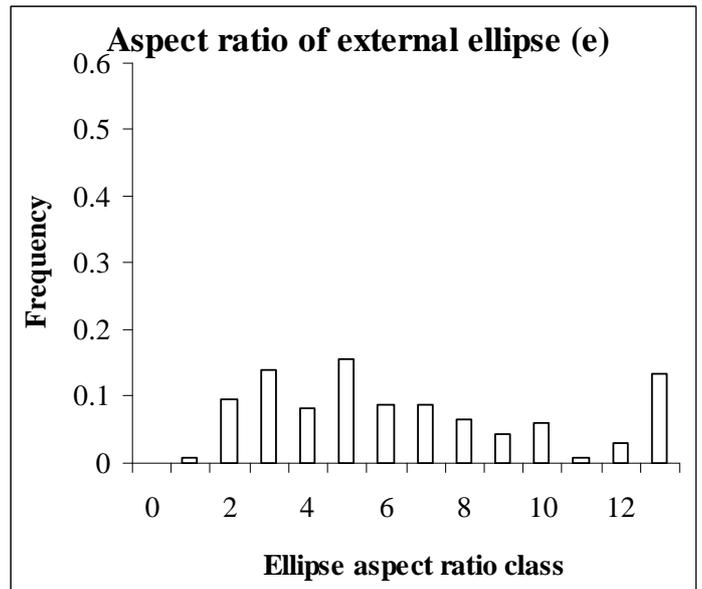
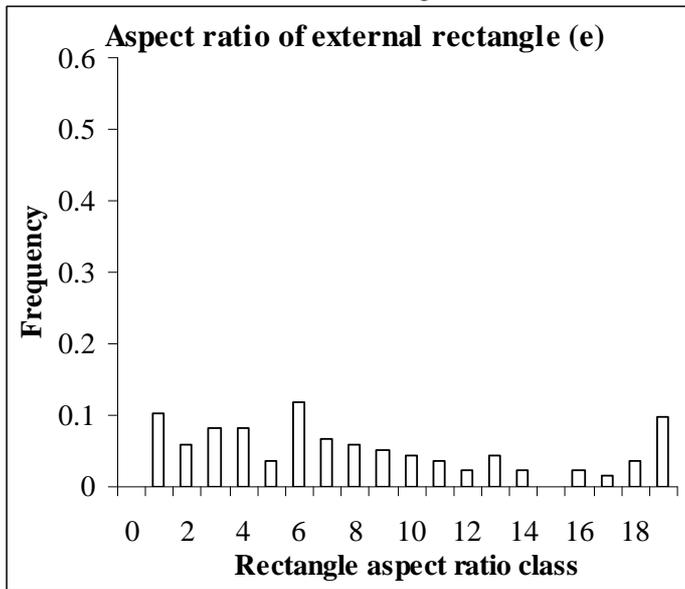
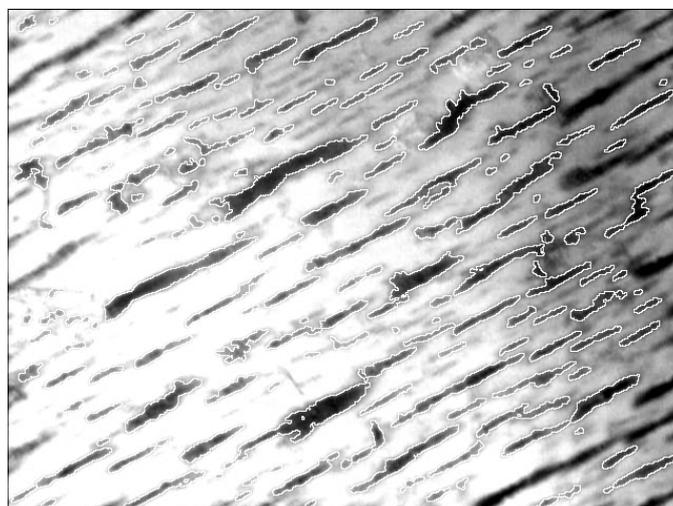


Image de filaments formés à une concentration de particules $e = 8,3 E-3 M$.

Les filaments pris en compte par l'algorithme de segmentation sont entourés pour un contour blanc



Curriculum vitae

Formation

2007-2011 : Ecole Centrale de Lyon

Thèse de chimie et nanotechnologies/ Monitorat dans l'équipe Chimie

2005-2007 : Université d'Evry Val d'Essonne

Master Recherche : Physique Chimie et Applications au vivant. Spécialité Chimie et Applications au vivant, mention très bien, major de promotion.

2004-2005 : Université d'Evry Val d'Essonne

Licence de chimie, mention assez bien.

2001-2004 : Université d'Evry Val d'Essonne

DEUG Science de la Matière option chimie.

2001 : Académie de Versailles

Bac Scientifique option mathématiques.

Activités de recherche

2007-2011 : Thèse de chimie et nanotechnologies

Institut des Nanotechnologies de Lyon, site Ecole Centrale de Lyon, Equipe nanotechnologies et santé

2007 : Stage de validation de Master 2 de 5 mois

Laboratoire "Structure et reconnaissance des biomolécules", Université d'Evry Val d'Essonne

Analyse par RMN de la structure et du repliement d'un fragment peptidique de c-Myb.

2006 : Stage de validation de Master 1 de 3 mois

Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, Ecole Supérieure de Physique et Chimie Industrielles, Paris :

Développement d'une méthode d'analyse de pesticides par couplage de la chromatographie en phase liquide avec la spectrométrie de masse.

Activités d'enseignement

Travaux pratiques : Matière-Photons :

- Spectroscopie UV-Visible : dosage et suivi de cinétique de réaction
- Mesure de surface spécifique (technique BET)
- Chromatographie en phase gazeuse/Chromatographie en phase liquide

Travaux dirigés : Chimie-Matière

- Thermodynamique statistique.
- Centrale nucléaire : fonctionnement et thermodynamique macroscopique.
- Réactions d'oxydoréduction.

Liste des publications

1. N. Haddour, Y. Chevolut, M. Trévisan, E. Souteyrand et J-P. Cloarec
Use of magnetic field for addressing, grafting on support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection.
Journal of Materials Chemistry, 2010. **20**(38): p. 8266
2. M. Trévisan, M. Schawaller, G. Quapil, E. Souteyrand, Y. Mérieux, J-P. Cloarec
Evanescent wave fluorescence biosensor combined with DNA bio-barcode assay for platelet genotyping
Biosensors and Bioelectronics, 2010, **26**(4) : p. 1631-1637

Communications scientifiques

Communication orale

1. M. Trévisan, C. Mansfield, N. Haddour, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux et E. Souteyrand
Développement d'une analyse par biocodes barres et biocapteur à ondes évanescentes pour le génotypage plaquettaire
Journées Nationales du Réseau Doctoral de Microélectronique 2009, 18-20 mai 2009; Université Claude Bernard Lyon I, Lyon, France
2. M. Trévisan, M.Schawaller, E. Souteyrand, Y. Mérieux, J-P. Cloarec
Manipulation et modification de nanoparticules pour des outils d'analyse moléculaire
Journées des doctorants de l'INL, 23 juin 2009; INSA de Lyon, Lyon, France
3. M. Trévisan, M.Schawaller, E. Souteyrand, Y. Mérieux, J-P. Cloarec
Combining evanescent wave fluorescence biosensor and particle based bioassay for a fast and sensitive in vitro blood genotyping.
Photonics4Life : Scientific Meeting, 29 novembre– 1^{er} décembre 2010, LCFIO, Palaiseau, France

Conférence invité

1. M. Trévisan, E. Souteyrand, J-P. Cloarec et Y. Mérieux
Génotypage plaquettaire : vers l'analyse par biocodes barres et biocapteur à ondes évanescentes

Colloque Analyse de traces et d'ultra-traces : Enjeux et perspectives-Société de BioChromatographie et Nanoséparation (SBCN), 4 juin 2009; Conservatoire national des arts et métiers, Paris, France.

Posters

1. M. Trévisan, C. Mansfield, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, I. Vial and E. Souteyrand
Bio-barcode assays for platelet typing
Nanolium workshop, 17-21 mars 2008; Ecole de Physique des Houches, France
2. M. Trévisan, C. Mansfield, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, I. Vial and E. Souteyrand
The use of nanoparticles in developing a bio-barcode assay for platelet genotyping
1^{ère} conférence Transalp'nano, 27-29 octobre 2008, Lyon, France
3. M. Trévisan, C. Mansfield, N. Haddour, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux et E. Souteyrand
Génotypage plaquettaire : développement d'une analyse par biocodes barres et biocapteur à ondes évanescentes.
2^{ème} Colloque du Laboratoire International Associé en Nanotechnologies et Nanosystèmes, 1-3 juillet 2009; Anse, France
4. M. Trévisan, C. Mansfield, N. Haddour, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux et E. Souteyrand
Platelet genotyping : Development of assay using bio-bar codes and evanescent wave biosensor
5. A. Duval, M. Trévisan, A. Laisné, D. Pompon, J-P. Cloarec, Y. Chevlot, E. Souteyrand and M. Canva
Polarimetric Surface Plasmon Resonance imaging biosensor system
Se connecter au nanomonde : Colloque des XXII^{ème} entretiens Jacques Cartier, 30 novembre -1^{er} décembre 2009, Ecole Centrale de Lyon, Ecully, France
6. M. Trévisan, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux et E. Souteyrand
Génotypage plaquettaire à l'aide de biocodes barres et biocapteur à ondes évanescentes
7. A. Duval, M. Trévisan, A. Laisné, D. Pompon, J-P. Cloarec, Y. Chevlot, E. Souteyrand and M. Canva
Polarimetric Surface Plasmon Resonance imaging biosensor system
Ecole d'hiver : Fonctionnalisation de surface et méthodes de détection pour les biocapteurs, 7-12 février 2010; Ecole de Physique des Houches, France
8. M. Trévisan, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux and E. Souteyrand
Platelet genotyping based on DNA biobarcode assay
20th anniversary World Congress on Biosensors, Biosensors 2010, 26-28 mai 2010; Glasgow, Ecosse

9. M. Trévisan, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux and E. Souteyrand
Platelet genotyping based on DNA biobarcode assay
3^{ème} Colloque du Laboratoire International Associé en Nanotechnologies et Nanosystèmes, 12 au 16 juillet 2010 ; Sacacomie - Sherbrooke, Québec, Canada
10. M. Trévisan, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux and E. Souteyrand
Ultra sensitive detection of DNA with magnetic particles and evanescent wave biosensor
SBCN 2010 : 12th International Symposium on Biochromatography, 19-22 octobre 2010, Ecole Centrale de Lyon, Ecully, France.
11. M. Trévisan, A. Duval, J. Moreau, B. Bartenlian, M. Canva, Y. Chevolot, J-P. Cloarec, E. Souteyrand
Assembling, locating, grafting and actuating permanent magnetic filaments for validation of Polarimetric Surface Plasmon Resonance Imaging biosensors
12. M. Trévisan, M. Schawaller, J-P. Cloarec, Y. Mérieux, E. Souteyrand
DNA bio-bar code assay combined with evanescent wave fluorescence biosensor for platelet genotyping
Ecole thématique CNRS : Nano-Objets aux Interfaces (NOIS 2011), 16-20 mai 2011, Anglet, France
13. M. Trévisan, A. Duval, J. Moreau, B. Bartenlian, M. Canva, Y. Chevolot, J-P. Cloarec, E. Souteyrand
Assembling, locating, grafting and actuating permanent magnetic filaments for validation of Polarimetric Surface Plasmon Resonance Imaging biosensors (accepté)
Congrès Euroensors XXV, 4-7 Septembre 2011, Athènes Grèce

Résumé

La manipulation de micro et nanoparticules magnétiques et leurs applications dans les domaines de la biologie, la biodétection et du diagnostic a continuellement gagné en intérêt ces dernières années. Ce travail de thèse explore l'utilisation des propriétés magnétiques des particules en suivant deux axes distincts.

Dans un premier axe, nous avons utilisé des particules magnétiques dans une analyse par biocode barre pour la capture et la concentration de cibles biologiques. La détection a été effectuée à l'aide d'un nouveau biocapteur à onde évanescente. Le but était de pouvoir procéder à un génotypage plaquettaire sans utiliser la « Polymérase Chain Reaction » (PCR), en collaboration avec l'Etablissement Français du Sang Rhône-Alpes. Nous nous sommes servis du système biallélique HPA-1 comme preuve de concept, en utilisant des cibles de type oligonucléotide synthétique pour valider nos protocoles d'analyse. Nous avons réussi à détecter une concentration de 2 fmol/l de cibles non marquées. Notre test permet de discriminer les deux allèles du gène HPA-1, qui ne diffèrent que d'un nucléotide. Notre approche par biocode barre permet d'abaisser le seuil inférieur de détection de notre biocapteur d'un facteur 125 000. Nous avons pu détecter 6.10^5 copies de cible synthétique, sans passer par une amplification PCR. La prochaine étape consistera à adapter le test pour analyser des échantillons biologiques réels.

Dans un deuxième axe, nous avons exploré l'assemblage de particules magnétiques sous champ magnétique, de manière à fabriquer des filaments permanents ancrés sur une surface et orientables. Les filaments ont pu être greffés sur des supports homogènes de verre, d'or et sur des supports mixte verre/or fonctionnalisés de manière orthogonale. Les filaments ont pu être localisés dans des zones précises du support, soit en employant des pointes concentrant le champ magnétique localement (spots de 500 μm), soit en jouant sur la fonctionnalisation sélective sur support mixte (carrés d'or de 1 mm de côté). Typiquement l'assemblage de particules de 200 nm de diamètre a permis d'obtenir des filaments de 5 μm de longueur pour 200 à 400 nm de largeur. Les conditions de formation des filaments restent toutefois à améliorer.

Les filaments magnétiques permanents ont été employés pour deux applications. Tout d'abord nous avons employé les filaments magnétiques orientables pour valider un banc d'imagerie polarimétrique par résonance de plasmon de surface (P-SPRI) développé par le LCFIO (Palaiseau). Les premières mesures tendent à montrer que l'anisotropie des filaments peut être détectée par le banc de P-SPRI, il est toutefois nécessaire de poursuivre les travaux pour mieux valider ces résultats. Deuxièmement nous avons employé des filaments magnétiques biofonctionnalisés avec des oligonucléotides sondes, pour procéder à un génotypage plaquettaire. Dans des conditions de mesure non optimisées, l'hybridation d'oligonucléotides cibles fluorescents sur les filaments ancrés sur support permet de multiplier par trois le signal de fluorescence par rapport à une hybridation sur surface plane, grâce à une augmentation de la surface spécifique du support.

Mots-clés : Particules magnétiques, génotypage plaquettaire, biocode barre, filaments magnétiques, biofonctionnalisation, biocapteur à ondes évanescentes, fluorescence, SPRI.

Abstract

Manipulation and utilization of magnetic nano/microparticles have raised some interest in the field of biology, biodetection and diagnostics during the last few years. This work explores the uses of magnetic properties of particles in two different axes.

In a first part, we used magnetic particles in a bio-barcode assay for the capture and biological target concentration steps. The detection was done using a new evanescent wave biosensor. The aim was to perform a platelet genotyping without polymerase chain reaction (PCR) with the collaboration of the French national blood service (EFS). We used the biallelic system HPA-1 as proof-of-concept, using synthetic oligonucleotides as target in order to validate our protocols. The assay allows to specifically detect single nucleotide polymorphism for HPA-1 gene with a detection of 2 fmol/l of label-free target synthetic oligonucleotides. Our bio-barcode assay allows to lower the inferior limit of detection of our biosensor by a factor of 125 000. We can detect 6.10^5 copies of synthetic target without using a PCR amplification step. The next step will be to adapt our assay to analyze real biological samples.

In a second part, we explored the assemblage of magnetic particles with a magnetic field to create permanent filaments anchored on a surface and that can be actuated. The filaments could be grafted on homogeneous glass or gold supports and also on mixed glass/gold supports with orthogonal functionalization. Filaments could be localized on precise support zones using either metallic tips concentrating locally the magnetic field (500 μm spots) or selective functionalization on mixed supports (1 mm gold squares). Assembling 200 nm diameter particles allowed to typically obtain filaments 5 μm long and 200 - 400 nm wide. The filament formation conditions could still be improved.

Permanent magnetic filaments were used for two applications. Firstly, we used magnetic filaments which can be actuated to validate a polarimetric surface resonance imaging biosensor (P-SPRI) developed by the LCFIO (Palaiseau). First measurements tend to show that the anisotropy can be detected by the P-SPRI biosensor. It is necessary to continue this work to better validate the results already obtained. Secondly, we used magnetic filaments biofunctionalized by oligonucleotide probes to type platelets. In non-optimized measurement conditions, the hybridization of fluorescent target oligonucleotides on filaments anchored on a surface allows to multiply by 3 the fluorescence signal compared to hybridization on plane surface by increasing the support specific surface.

Keywords : Magnetic particles, platelet genotyping, bio-barcode assay, magnetic filaments, bio-functionalization, evanescent wave biosensor, fluorescence, SPRI



Liste des personnes Habilitées à Diriger des Recherches en poste à l'Ecole Centrale de Lyon

| Nom-Prénom | Corps grade | Laboratoire ou à défaut département ECL | Etablissement |
|--------------------------|------------------------|---|---------------|
| AURIOL Philippe | professeur | AMPERE | ECL |
| BEROUAL Abderrahmane | professeur | AMPERE | ECL |
| BURET François | professeur | AMPERE | ECL |
| JAFFREZIC-RENAULT Nicole | directeur de recherche | AMPERE | CNRS/ECL |
| KRÄHENBÜHL Laurent | directeur de recherche | AMPERE | CNRS/ECL |
| MARTELET Claude | professeur | AMPERE | ECL |
| NICOLAS Alain | professeur | AMPERE | ECL |
| NICOLAS Laurent | directeur de recherche | AMPERE | CNRS/ECL |
| SCORLETTI Gérard | professeur | AMPERE | ECL |
| SIMONET Pascal | chargé de recherche | AMPERE | CNRS/ECL |
| THOMAS Gérard | professeur | AMPERE | ECL |
| VOLLAIRE Christian | professeur | AMPERE | ECL |

Nbre Ampère 12

| | | | |
|------------------|-----------------------|---------|-----|
| HELLOUIN Yves | maître de conférences | DER EEA | ECL |
| LE HELLEY Michel | professeur | DER EEA | ECL |

Nbre DER EEA 2

| | | | |
|-------------------|--------------------|----------|-----|
| GUIRALDENQ Pierre | professeur émérite | DER STMS | ECL |
| VINCENT Léo | professeur | DER STMS | ECL |

Nbre DER STMS 2

| | | | |
|----------------------|-----------------------|-----|-----|
| LOHEAC Jean-Pierre | maître de conférences | ICJ | ECL |
| MAITRE Jean-François | professeur émérite | ICJ | ECL |
| MARION Martine | professeur | ICJ | ECL |
| MIRONESCU Elisabeth | professeur | ICJ | ECL |
| MOUSSAOUI Mohand | professeur | ICJ | ECL |
| MUSY François | maître de conférences | ICJ | ECL |
| ZINE Abdel-Malek | maître de conférences | ICJ | ECL |

Nbre ICJ 7

| | | | |
|----------------|------------|------|-----|
| DAVID Bertrand | professeur | ICTT | ECL |
|----------------|------------|------|-----|

Nbre ICTT 1

| | | | |
|-----------------------|------------------------|-----|----------|
| CALLARD Anne-Ségolène | maître de conférences | INL | ECL |
| CLOAREC Jean-Pierre | maître de conférences | INL | ECL |
| GAFFIOT Frédéric | professeur | INL | ECL |
| GAGNAIRE Alain | maître de conférences | INL | ECL |
| GARRIGUES Michel | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| GENDRY Michel | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| GRENET Geneviève | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| HOLLINGER Guy | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |

| | | | |
|------------------------|------------------------|-----|----------|
| JOSEPH Jacques | professeur | INL | ECL |
| KRAWCZYK Stanislas | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| LETARTRE Xavier | chargé de recherche | INL | CNRS/ECL |
| MARTIN Jean-René | professeur émérite | INL | ECL |
| O'CONNOR Ian | professeur | INL | ECL |
| PHANER-GOUTORBE Magali | professeur | INL | ECL |
| ROBACH Yves | professeur | INL | ECL |
| SAINT-GIRONS Guillaume | chargé de recherche | INL | CNRS/ECL |
| SEASSAL Christian | chargé de recherche | INL | CNRS/ECL |
| SOUTEYRAND Eliane | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| TARDY Jacques | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |
| VIKTOROVITCH Pierre | directeur de recherche | INL | CNRS/ECL |

Nbre INL 20

| | | | |
|-------------|------------|-------|-----|
| CHEN Liming | professeur | LIRIS | ECL |
|-------------|------------|-------|-----|

Nbre LIRIS 1

| | | | |
|------------------------|------------------------|------|----------|
| BAILLY Christophe | professeur | LMFA | ECL |
| BERTOGLIO Jean-Pierre | directeur de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| BLANC-BENON Philippe | directeur de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| BOGEY Christophe | chargé de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| CAMBON Claude | directeur de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| CARRIERE Philippe | chargé de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| CHAMPOUSSIN J-Claude | professeur émérite | LMFA | ECL |
| COMTE-BELLOT geneviève | professeur émérite | LMFA | ECL |
| FERRAND Pascal | directeur de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| GALLAND Marie-Annick | professeur | LMFA | ECL |
| GODEFERD Fabien | chargé de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| GOROKHOVSKI Mikhail | professeur | LMFA | ECL |
| HENRY Daniel | directeur de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| JEANDEL Denis | professeur | LMFA | ECL |
| JUVE Daniel | professeur | LMFA | ECL |
| LE RIBAUT Catherine | chargée de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| LEBOEUF Francis | professeur | LMFA | ECL |
| PERKINS Richard | professeur | LMFA | ECL |
| ROGER Michel | professeur | LMFA | ECL |
| SCOTT Julian | professeur | LMFA | ECL |
| SHAO Liang | chargé de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| SIMOENS Serge | chargé de recherche | LMFA | CNRS/ECL |
| TREBINJAC Isabelle | maître de conférences | LMFA | ECL |

Nbre LMFA 23

| | | | |
|--------------------|------------------------|------|----------|
| BENAYOUN Stéphane | professeur | LTDS | ECL |
| CAMBOU Bernard | professeur | LTDS | ECL |
| COQUILLET Bernard | maître de conférences | LTDS | ECL |
| DANESCU Alexandre | maître de conférences | LTDS | ECL |
| FOUVRY Siegfried | chargé de recherche | LTDS | CNRS/ECL |
| GEORGES Jean-Marie | professeur émérite | LTDS | ECL |
| GUERRET Chrystelle | chargé de recherche | LTDS | CNRS/ECL |
| HERTZ Dominique | past | LTDS | ECL |
| ICHCHOU Mohamed | professeur | LTDS | ECL |
| JEZEQUEL Louis | professeur | LTDS | ECL |
| JUVE Denyse | ingénieur de recherche | LTDS | ECL |
| KAPSA Philippe | directeur de recherche | LTDS | CNRS/ECL |
| LE BOT Alain | chargé de recherche | LTDS | CNRS/ECL |

| | | | |
|----------------------|------------------------|------|----------|
| LOUBET Jean-Luc | directeur de recherche | LTDS | CNRS/ECL |
| MARTIN Jean-Michel | professeur | LTDS | ECL |
| MATHIA Thomas | directeur de recherche | LTDS | CNRS/ECL |
| MAZUYER Denis | professeur | LTDS | ECL |
| PERRET-LIAUDET Joël | maître de conférences | LTDS | ECL |
| SALVIA Michelle | maître de conférences | LTDS | ECL |
| SIDOROFF François | professeur | LTDS | ECL |
| SINOUE Jean-Jacques | maître de conférences | LTDS | ECL |
| STREMSDOERFER Guy | professeur | LTDS | ECL |
| THOUVEREZ Fabrice | professeur | LTDS | ECL |
| TREHEUX Daniel | professeur | LTDS | ECL |
| VANNES André-Bernard | professeur émérite | LTDS | ECL |
| VINCENS Eric | maître de conférences | LTDS | ECL |

Nbre LTDS 26

Total HdR ECL

91

AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande des Directeurs de Thèse

Madame E. SOUTEYRAND – Monsieur J-P. CLOAREC

et les rapports de

Monsieur P-Y. RENARD
Professeur - Université de Rouen - IRCOF - Laboratoire de chimie bioorganique UMR 6014 CNRS
Rue Tesnière - 76130 MONT-SAINT-AIGNAN

Et de

Madame A. CUPO
Professeur - Polytech'Nice-Sophia - Département de Génie Biologique - 1645 Route des Lucioles
06410 BIOT

Mademoiselle TREVISAN Marie

est autorisé à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE ET AUTOMATIQUE

Fait à Ecully, le 17 mars 2011

P/Le Directeur de l'E.C.L.
La Directrice des Etudes

