

KIM DORÉ

**ÉTUDE D'UN MÉCANISME D'AMPLIFICATION DU
SIGNAL DE FLUORESCENCE PERMETTANT LA
DÉTECTION ULTRASENSIBLE D'ADN**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en chimie
pour l'obtention du grade de Philosophia Doctor (Ph. D.)

DÉPARTEMENT DE CHIMIE

FACULTÉ DE SCIENCES ET GÉNIE

UNIVERSITÉ LAVAL

QUÉBEC

MAI 2007

© Kim Doré, 2007

Résumé

La détection d'acides nucléiques pathogènes afin de faire le diagnostic de maladies infectieuses et ainsi mieux diriger leur traitement est un enjeu très important pour la santé humaine. Aussi, comme les mutations responsables des maladies génétiques sont de mieux en mieux connues, leur détection est maintenant possible. Au cours de ce projet de doctorat, nous avons élaboré une méthode de détection d'acides nucléiques basée sur un polymère cationique soluble dans l'eau capable de traduire la réaction d'hybridation de l'ADN en un signal optique. Nous avons démontré l'applicabilité de cette méthode pour faire la détection par fluorescence d'oligonucléotides d'ADN de différentes longueurs ainsi que d'ARN viral. Avec l'utilisation de conditions expérimentales optimisées et d'un fluorimètre conçu spécialement pour cette application, nous avons pu détecter aussi peu que 220 copies d'ADN. Par la suite, comme l'ADN est présent chez la majorité des organismes vivants sous la forme de double hélice, nous avons élaboré une méthode expérimentale originale permettant la détection directe de cette forme d'ADN.

Par la suite, nous avons modifié notre méthode pour augmenter sa sensibilité en utilisant le transfert énergétique résonnant de fluorescence. Un mécanisme d'amplification du signal de fluorescence a ainsi été découvert par le Dr. Hoang-Anh Ho. Cette méthode que nous avons nommée *superallumage*, nous a permis de faire la détection d'aussi peu que 5 copies d'ADN cible. Avec cette méthode il a été possible de faire la détection d'une seule mutation génétique responsable de la *tyrosinémie héréditaire de type 1* dans des échantillons d'ADN génomique non purifiés. Finalement, nous avons concentré nos efforts sur l'étude du phénomène d'amplification de la fluorescence menant au superallumage. Ainsi, nous avons établi que le superallumage se produit dans des agrégats micellaires ayant la forme d'un bâtonnet mesurant 400 nm de long et contenant entre 4000 et 5000 complexes polymère-sonde d'ADN marquée. Cette structure agrégée maintient les fluorophores donneurs très près des accepteurs de fluorescence, ce qui favorise grandement le processus de transfert énergétique résonnant. De plus, la structure conjuguée du polymère transducteur permet un transport efficace de l'énergie le long de sa chaîne, ce qui accélère le transfert énergétique résonnant.

Abstract

Pathogenic nucleic acid detection, in aiming to diagnose infectious diseases and thus better provide a better treatment for them is a very important goal for human health. Moreover, as more and more links are discovered between hereditary diseases and DNA mutations, their diagnostic based on DNA mutation detection is increasingly important. Throughout this Ph. D. project, we developed a fluorometric method for nucleic acid detection based on a water-soluble cationic polymer able to transduce DNA hybridization. We demonstrated the applicability of this method to detect DNA oligonucleotides of different lengths as well as single stranded RNA extracted from the flu virus. With the use of optimized experimental conditions and a custom-built fluorimeter, we demonstrated the ability to detect as little as 220 target DNA copies in the probed volume. Since DNA is present in its double stranded form in most organisms, we also developed an experimental method allowing double stranded DNA detection with the polymeric transducer.

Futhermore, we modified our DNA detection process by using fluorescence resonance energy transfer. This process, named *fluorescence chain reaction* and discovered by Dr. Hoang-Anh Ho, is based on a fluorescence signal amplification mechanism and allows the detection of as few as 20 copies of target DNA. With this method, it was possible to detect a single base mutation responsible for *type 1 hereditary tyrosinemia* in unpurified genomic DNA extracted from patient blood. Subsequently, we concentrated our efforts on the characterization of this fluorescence signal amplification mechanism. Thus, we established that the *fluorescence chain reaction* happens in rod-like micellar aggregates of 400 nm in length containing between 4000 and 5000 polymer-tagged DNA probe complexes. This aggregated structure maintains the fluorescent donors near the acceptors, thus greatly helping the fluorescence resonance energy transfer mechanism. Moreover, the conjugated structure of the polymeric transducer allows efficient energy transportation along its chain, accelerating the energy transfer mechanism.

Avant-Propos

Cette thèse de doctorat comporte quatre articles scientifiques publiés dans trois revues renommées. Les travaux présentés dans ces articles scientifiques ont été réalisés entièrement lors de mes études de doctorat en chimie effectuées dans le cadre d'une étroite collaboration entre les groupes de recherche des professeurs Denis Boudreau, directeur de cette thèse et Mario Leclerc, co-directeur. Nous allons, dans cette section, spécifier l'apport de travail que j'ai effectué pour chacun de ces articles, au niveau des expériences décrites et de la rédaction des articles.

Tout d'abord, le premier article présenté dans cette thèse (chapitre 3), a été publié en 2004 dans le *Journal of the American Chemical Society* (JACS). Au niveau des expériences, j'ai effectué 50% des expériences présentées dans l'article, l'autre 50% ayant été effectué par Sébastien Dubus, deuxième auteur. Par ailleurs, j'ai élaboré la méthode expérimentale utilisée pour toutes les expériences. J'ai aussi effectué la majeure partie de la rédaction de l'article. Les autres auteurs ont soit supervisé les travaux (Denis Boudreau, Mario Leclerc, et Michel G. Bergeron), soit contribué indirectement par leurs travaux antérieurs (Hoang-Anh Ho, Isabelle Lévesque, Maryse Brunette et Geneviève Corbeil) ou encore effectué la partie biologique des tests de détection (Maurice Boissinot) ou fourni les échantillons cliniques (Guy Boivin).

L'article suivant, présenté au chapitre 4, a été publié dans le même journal en 2005. J'ai effectué 50% des expériences présentées et le Dr. Hoang-Anh Ho, l'autre 50%. L'idée originale du superallumage décrite dans cet article vient du Dr. Hoang-Anh Ho. Par contre, ma contribution à l'impact de cet article n'est pas négligeable car c'est grâce à la méthode expérimentale que j'ai développée que l'on a pu démontrer l'applicabilité du superallumage pour détecter une mutation simple dans de l'ADN génomique humain non purifié. J'ai participé à la rédaction qui a été faite conjointement avec Hoang-Anh Ho et les superviseurs de ces travaux. Les autres auteurs de l'article ont effectué la partie biologique des tests de détection et fourni les échantillons cliniques (Maurice Boissinot et Robert M.

Tanguay) ou ont agi en tant que superviseurs (Denis, Boudreau, Mario Leclerc et Michel G. Bergeron).

Les articles présentés aux chapitres 5 et 6, ont été publiés en 2006 et 2007 dans le *Journal of Fluorescence* et le journal *Langmuir* respectivement. Pour ces publications, j'ai effectué toutes les expériences discutées et rédigé le texte en totalité. Les autres auteurs (Denis Boudreau, Anna M. Ritcey et Mario Leclerc) m'ont habilement guidée à travers ce processus. Aussi, Rodica Naegu-Plesu m'a assistée pour une partie des mesures présentées dans l'article présenté au chapitre 6.

Finalement, il est important de mentionner que comme ce document est une thèse par articles, les méthodes expérimentales que j'ai développées lors de mon doctorat ont dans certains cas été décrites sommairement dans les articles scientifiques inclus dans cette thèse. Conséquemment, la méthode originale permettant la détection d'ADN double brin ainsi que la conception du fluorimètre utilisé pour la plupart des expériences de détection ultrasensible d'ADN, qui découlent directement de mes travaux, sont détaillées au chapitre 2.

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le professeur Denis Boudreau. Merci Denis pour ton ouverture d'esprit, ton enthousiasme scientifique contagieux et ton expérience semblant cumuler plusieurs vies de recherche. La liberté que tu m'as laissée tout au long de mes études m'a donné la chance de me dépasser. Mon cheminement au sein de ton équipe fut ponctué de défis et de réussites qui avec les années m'ont finalement métamorphosée en une véritable chercheuse et tu y es pour beaucoup. Merci aussi d'être un modèle de scientifique passionné et heureux dans le tumulte de la recherche, de la vie de famille et de tes intérêts musicaux, une réelle inspiration pour moi. Avec autant d'ardeur, je souhaite remercier mon co-directeur Mario Leclerc. Merci d'abord pour m'avoir convaincue de faire ce projet de doctorat, que je suis très contente d'avoir mené jusqu'au bout. Merci aussi pour ton énorme bagage de connaissances, ton scepticisme et ton côté visionnaire. Merci finalement à Denis et Mario pour votre constante reconnaissance de mon apport dans ce projet qui maintenant implique beaucoup de gens et a pris une envergure inattendue. J'aimerais adresser aussi un merci spécial à la professeure Anna M. Ritcey, qui m'a beaucoup apporté lors de la rédaction de l'article présenté au chapitre 6 de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié notre collaboration, les choses compliquées le sont beaucoup moins quand c'est vous qui parlez.

La recherche scientifique étant un travail d'équipe, tous les membres des laboratoires Boudreau et Leclerc méritent également mes remerciements. Toutes les personnes impliquées dans ce projet l'on fait avancer à une vitesse fulgurante. J'aimerais remercier spécialement le Dr. Hoang-Anh Ho qui a eu un apport crucial dans ce projet. Sans l'apport de Sébastien Dubus, de Rodica Naegu-Plesu, de Jeff I, de Geneviève Corbeil, de Maryse Brunette et d'Isabelle Lévesque, ce projet ne serait pas ce qu'il est devenu. Le Dr. Maurice Boissinot et Isabelle Charlebois du centre de recherche en infectiologie m'ont beaucoup aidée à comprendre et à apprécier le côté biologique de ce projet, merci beaucoup. Merci aussi à Mathieu, Jeffy, Karine, Benoît, Danny, Isa, Ludo, Olivier et Sébastien (Chapde), collègues de laboratoire et amis grâce à qui ces années se sont agréablement déroulées.

Merci à ma mère, Céline, ma fan no. 1, sur qui je peux toujours compter. Merci aussi à Simon et Paule d'apporter de la fraîcheur dans ma vie. Merci à mes amis, Charlene et Pascal pour votre intensité et votre gentillesse. Vous êtes uniques et m'avez beaucoup aidée à accomplir ce projet de thèse. À Mathieu, le plus beau, le plus fin, bref le meilleur amoureux du monde, merci pour tout le bonheur que tu m'apportes.

Finalement, je dois spécifier que la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans le soutien financier du CRSNG et de la bourse Georges-Élie-Amyot.

À Mathieu...

At higher levels, science and art are the same. There is a point where high science transcends the technologic and enters the poetic; there is a point where high art transcends technique and enters the poetic.

- Tom Robbins

Humanity has advanced, when it has advanced, not because it has been sober, responsible, and cautious, but because it has been playful, rebellious, and immature.

- Tom Robbins

Table des matières

CHAPITRE 1: INTRODUCTION	1
Partie 1.1 La détection de matériel génétique avec la séquence d'acides nucléiques	7
1.1.1 Les qualités recherchées d'un biocapteur.....	8
1.1.2 Revue de littérature sur les différentes méthodes de détection d'ADN récemment élaborées	9
Partie 1.2 Méthode de détection avec le polymère	17
1.2.1 Un polymère conjugué comme biocapteur	17
1.2.2 Principe de détection d'ADN avec le biocapteur polymère	23
1.2.3 Nouvelle stratégie de détection impliquant une amplification du signal de fluorescence	29
1.3 Objectifs spécifiques de la thèse.....	32
1.4 Références.....	34
CHAPITRE 2: MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET INSTRUMENTATION	37
Partie 2.1 Détermination des meilleures conditions expérimentales pour la détection d'ADN	37
2.1.1 Détection d'oligonucléotides d'ADN	37
2.1.2 Détection d'ADN double brin	40
2.1.3 Détection d'ADN avec le superallumage	49
Partie 2.2 Fluorescence	51
2.2.1 Fluorescence en mode statique	51
2.2.2 Fluorescence résolue dans le temps	59
Partie 2.3 Diffusion de la lumière	64
2.3.1 Origine du signal en diffusion de la lumière.....	65
2.3.2 Diffusion statique de la lumière.....	66
2.3.3 Diffusion dynamique de la lumière	67
Partie 2.4 Potentiel zeta	68
CHAPITRE 3: FLUORESCENT POLYMERIC TRANSDUCER FOR THE RAPID, SIMPLE, AND SPECIFIC DETECTION OF NUCLEIC ACIDS AT THE ZEPTOMOLE LEVEL	73
3.1 Résumé.....	73
3.2 Abstract.....	74
3.3 Introduction.....	75
3.4 Results and Discussion	76
3.5 Conclusions.....	84

3.6 Experimental Section.....	85
3.7 References.....	89

CHAPITRE 4: DIRECT MOLECULAR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS BY FLUORESCENCE SIGNAL AMPLIFICATION..... 92

4.1 Résumé.....	92
4.2 Abstract.....	93
4.3 Introduction.....	94
4.4 Results and Discussion	95
4.5 Conclusion	103
4.6 Experimental Section.....	104
4.7 References.....	107
4.8 Supporting information.....	109

CHAPITRE 5: INVESTIGATION OF A FLUORESCENCE SIGNAL AMPLIFICATION MECHANISM USED FOR THE DIRECT MOLECULAR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS..... 114

5.1 Résumé.....	114
5.2 Abstract.....	115
5.3 Introduction.....	116
5.4 Materials and methods.....	119
5.5 Results and Discussion	123
5.6 Conclusion	129
5.7 Acknowledgements.....	129
5.8 References.....	130

CHAPITRE 6: CHARACTERIZATION OF SUPERLIGHTING POLYMER-DNA AGGREGATES: A FLUORESCENCE AND LIGHT SCATTERING STUDY 132

6.1 Résumé.....	132
6.2 Abstract.....	133
6.3 Introduction.....	134
6.4 Materials and Methods.....	136
6.5 Results and Discussion	140
6.6 Conclusions.....	154
6.7 Acknowledgements.....	155
6.8 References.....	156
6.9 Supporting information.....	158

6.9.1 Atomic Force Microscopy (AFM).....	158
CHAPITRE 7: CONCLUSION	159
Partie 7.1 Étude des phénomènes permettant la détection d'ADN	160
7.1.1 Détection d'ADN avec le polymère	160
7.1.2 Détection d'ADN avec le superallumage	161
Partie 7.2 Détection ultrasensible d'ADN.....	166
7.2.1 Détection de plus de 25 000 copies d'acides nucléiques.....	166
7.2.2 Détection de moins de 25 000 copies d'acides nucléiques.....	169
7.2.3 Notes sur la sélectivité des deux méthodes.....	170
7.3 Références.....	172

Liste des tableaux

Tableau 1.1 Comparaison de plusieurs approches (publiées entre 1996 et 2006) visant la détection sensible de matériel génétique	15
Tableau 2.1 Séquences des oligonucléotides modèles utilisés.....	37
Tableau 2.2 Détection de la <i>tyrosinémie</i> héréditaire dans des échantillons sanguins.....	48
Table 5.1 Detection of <i>Candida</i> 20-mer target strand hybridized with labeled or non labeled probe using the polymer as a transducer.....	123
Table 5.2 Results from multiexponential analysis of lifetime measurements.....	128
Table 6.1 Size of labeled and unlabeled duplex aggregates at different temperatures.....	141
Table 6.2 Unlabeled and labeled duplex aggregate size and particle distribution width as a function of concentration (increasing dilution), as determined by dynamic light scattering	145

Liste des figures

CHAPITRE 1

Figure 1.1 Structure de la double hélice d'ADN.....	3
Figure 1.2 Principe de détection d'ADN avec les <i>Molecular Beacons</i>	11
Figure 1.3 Méthode de détection d'ADN amplifiée par l'utilisation d'un brin d'ADN «bar-code».....	12
Figure 1.4 Structure moléculaire du polythiophène.....	18
Figure 1.5 Chromisme démontré par le polymère sous divers stimuli.....	19
Figure 1.6 Formation d'agrégats de type J lorsque le polythiophène est sous la forme plane et solvation de ces agrégats lors du changement de conformation vers la forme non-plane.....	22
Figure 1.7 Principe de détection du polymère transducteur.....	23
Figure 1.8 Spectre d'absorption UV-visible du polythiophène, du duplex et du triplex....	25
Figure 1.9 Coloration des différentes solutions obtenues lors de la détection d'ADN avec le polymère.....	26
Figure 1.10 Détection sélective d'ADN par fluorescence du biocapteur polymère.....	27
Figure 1.11 Nouvelle stratégie de détection impliquant le RET.....	30

CHAPITRE 2

Figure 2.1 Réactions en compétition lors de la détection d'ADN double brin.....	41
Figure 2.2 Température d'appariement d'ADN double brin révélée par le polymère en fonction de la concentration en sel de la solution.....	44
Figure 2.3 Spectres du complexe polymère-sonde dans diverses conditions.....	45
Figure 2.4 Détection d'amplicons à 65°C dans l'eau pure avec une sonde saine.....	47
Figure 2.5 Schéma du montage expérimental.....	54
Figure 2.6 Photographie de la diode bleue tenant lieu de source.....	56
Figure 2.7 Spectre d'émission de la diode bleue et bande passante du filtre interférentiel à l'excitation.....	57
Figure 2.8 Photographie de l'appareil de fluorescence résolue dans le temps <i>Fluorolog Tau 3</i> de Jobin-Yvon.....	61

Figure 2.9 Données obtenues lors de la mesure du temps de vie du triplex non-marqué..63

Figure 2.10 Illustration de la double couche électrique d'une particule chargée négativement et du lieu de mesure du potentiel zeta68

CHAPITRE 3

Figure 3.1 Schematic description of the formation of polythiophene/single-stranded nucleic acid duplex and polythiophene/hybridized nucleic acid triplex.....77

Figure 3.2 Excitation-emission spectrum for the polymer-DNA complex, measured with a commercial spectrofluorimeter78

Figure 3.3 Hybridization kinetics of the perfectly matched target analyte, a two mismatch sequence and a single mismatch sequence79

Figure 3.4 Calibration curves for 20-mer double-stranded DNA targets complexed with the polymer.80

Figure 3.5 A) Calibration curve for a 50-mer oligonucleotide target analyte B) Calibration curve for *Influenza A* viral RNA as detected by the polymer + 32-mer probe complex82

CHAPITRE 4

Figure 4.1 A) Chemical structure of polymer 1 and UV-visible absorption spectra of polymer 1/ X1/ Y1 triplex, polymer 1/[X1+Alexa Fluor (AF) 546] duplex, and polymer 1/X1+AF546/Y1 triplex B) Fluorescence spectra, of polymer 1/ X1/ Y1 triplex, polymer 1/[X1+AF546] duplex; polymer 1/X1+AF546/Y1 triplex96

Figure 4.2 Corrected fluorescence intensity as a function of the number of 20-mer oligonucleotide target copies98

Figure 4.3 Schematic description of the proposed signal amplification detection mechanism based on the conformational change of cationic polythiophene and energy transfer for ultrasensitive, selective, and rapid DNA detection99

Figure 4.4 Corrected fluorescence intensity as a function of the number of genomic DNA copies for the detection of the IVS12 mutation of *hereditary tyrosinemia* 101

Figure 4.5 Corrected fluorescence intensity as a function of the number of 20-mer oligonucleotide target copies 109

Figure 4.6 Corrected fluorescence intensity as a function of the number of 150bp amplicon target copies 111

Figure 4.7 Corrected fluorescence intensity as a function of the number of genomic DNA copies for the detection of the E357X mutation of *hereditary tyrosinemia* 113

CHAPITRE 5

Figure 5.1 Schematic representation of the hybridization transduction mechanism for the non labeled and labeled systems..... 117

Figure 5.2 Fluorescence properties of the amplification system when varying the number of triplex donors..... 125

CHAPITRE 6

Figure 6.1 Fluorescence intensity and static light scattering intensity of the unlabeled system upon detection of perfectly complementary DNA..... 140

Figure 6.2 AF546-CV FRET efficiency versus the CV/AF546 molar ratio; in solution, in duplex aggregates and in 10% hybridized aggregates..... 143

Figure 6.3 Evaluation of critical micellar concentration of labeled duplex aggregates and critical aggregation concentration of unlabeled duplexes..... 144

Figure 6.4 Hybridization of target DNA on micelles viewed by size and Zeta potential measurements..... 147

Figure 6.5 Size of duplex micelles upon the addition of charges either from specific DNA, NaCl or 1-mismatch target DNA..... 148

Figure 6.6 Zeta potential of duplex micelles upon the addition of charges either from specific DNA, NaCl or 1-mismatch target DNA..... 149

Figure 6.7 Debye plot obtained from MALLS measurements for labeled duplex micelles..... 151

Figure 6.8 Proposed physical rod-like model of the labeled aggregates..... 152

Figure 6.9 TEM images of labeled aggregates. A) Duplex aggregates; B) 10% hybridized aggregates..... 153

Figure 6.10 AFM images of labeled duplex aggregates. A) Top view image of several aggregates; B) Surface plot of some micellar rods..... 158

CHAPITRE 7

Figure 7.1 Représentation d'une tranche de bâtonnet micellaire d'une épaisseur d'environ 0,89 nm..... 164

Liste des symboles et acronymes utilisés

A : Unité d'absorbance

Å : Angstrom = 10^{-10} mètre

A^2 : second coefficient du viriel

A_M : Masse molaire moyenne en poids des agrégats (*Weight-averaged aggregate mass*)

a.u. : unités arbitraires (*Arbitrary units*)

AC : Courant alternatif (*alternative current*)

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF546 : Alexafluor 546

AFM : Microscopie à force atomique (*atomic force microscopy*)

ARN : Acide ribonucléique

amol : attomole = 10^{-18} mole

bp : paire de base (*base pair*)

BSA : sérum d'albumine bovine (*bovine serum albumin*)

ca. : Abréviation du latin circa, signifie environ

cac : Concentration d'agrégation critique (*critical aggregation concentration*)

CCD : Détecteur à transfert de charge (*charged-coupled device*)

cmc : Concentration micellaire critique (*critical micellar concentration*)

CNRC : Conseil National de Recherche du Canada

CRI : Centre de recherche en infectiologie du CHUL à Québec

CV: Chromophore acétate de cresyl violet (*Cresyl Violet acetate dye*)

DNA: *Desoxyribonucleic acid* (ADN)

DC: Courant continu (*direct current*)

dn/dc : Variation de l'indice de réfraction avec la concentration (*specific refractive index increment*)

ds-DNA: *double-stranded DNA* (ADN double brin)

fmol ou fM ou fs: femto = 10^{-15} mol = 10^{-15} mol/L ou 10^{-15} seconde

FCR : *Fluorescence chain reaction* (superallumage)

FRET : Transfert d'énergie résonant par fluorescence (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*), l'acronyme RET a été utilisé la plupart du temps pour décrire ce phénomène

GHz : Gigahertz = 10^9 Hz

HTX-100 : triton X-100 hydrogéné (*hydrogenated triton X-100*)

IR : Infrarouge (*Infrared*)

kcal, kHz ou kV : kilocalorie, kilohertz ou kilovolt = 10^3 cal, 10^3 Hz ou 10^3 V

LED : diode électroluminescente (*Light-Emitting Diode*)

λ : longueur d'onde

M: mole/litre

MHz: Megahertz = 10^6 Hz

mM, mW, mA, mL: milli = 10^{-3} mol/L ou 10^{-3} watt ou 10^{-3} ampère ou 10^{-3} litre

MALLS: diffusion de lumière multi-angles (*multi-angle laser light scattering*)

N/m : Newton par mètre

nm : nanomètre = 10^{-9} mètre

N_{agg} : Nombre d'agrégation (*aggregation number*)

NASBA: Amplification basée sur la séquence d'acides nucléiques (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*)

pg, pM ou ps : picogramme, picomole/L ou picoseconde = 10^{-12} g, 10^{-12} M ou 10^{-12} s

PCR : Réaction d'amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)

PMT : Tube photomultiplicateur (*photomultiplier tube*)

PNA : Dérivé de l'ADN non-chargé (*peptid nucleic acid*)

- QY : Rendement quantique (*quantum yield*)
- R_0 : Distance de Forster, à laquelle le RET est 50% efficace
- R_G : Rayon de giration
- R_H : Rayon hydrodynamique
- RET : Transfert énergétique résonnant (voir FRET)
- RF : Radiofréquences
- RMS : Valeur efficace d'un courant ou d'une tension (*Root Mean Square*)
- RNA : ARN (*ribonucleic acid*)
- RSD : Écart-type relatif (*Relative Standard Deviation*)
- s : seconde
- ss-DNA : ADN simple brin (*single-stranded DNA*)
- SERS : spectroscopie raman assistée par une surface (*Surface-enhanced Raman scattering*)
- SNPs : polymorphismes mononuléotidiques (*single nucleotide polymorphisms*)
- SPR : spectroscopie de résonance de plasmon de surface (*surface plasmon resonance spectroscopy*)
- SRAS : Syndrome respiratoire aigu sévère
- T_m : Température de fusion, ou température de dénaturation (ADN) (*melting temperature*)
- TEM : microscopie électronique à transmission (*transmission electron microscopy*)
- U : Unité d'activité d'une enzyme
- u.a. : unités arbitraires
- μL , μM , μs : microlitre, micromole/L, microseconde = 10^{-6} L, 10^{-6} M, 10^{-6} s
- UV : Ultraviolet
- V : volts
- χ^2 : chi carré, indication de la précision (*chi squared*)
- zM : zeptomole/L = 10^{-21} mole/L
- z : ratio de dissymétrie

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Comme nous allons, tout au long de cette thèse, discuter de détection d'ADN et d'ARN, il semble important de spécifier quelques détails importants sur ces molécules qui ont une influence cruciale sur notre vie. Toutes les formes de vie sur terre utilisent les acides nucléiques pour conserver leurs informations génétiques. À l'exception de quelques virus, la biomolécule utilisée pour le stockage d'informations est l'acide désoxyribonucléique, l'ADN. Cette molécule est remarquablement bien adaptée à cette tâche grâce à sa stabilité et son habilité à encoder de vastes quantités d'informations en utilisant un code simple de quatre lettres. Par exemple, une cellule humaine contient l'information pour la synthèse d'environ 50 000 à 100 000 protéines différentes, le tout tenant dans le noyau cellulaire, mesurant seulement 10 microns de diamètre¹. Malgré son rôle prépondérant dans l'architecture centrale de la vie, l'ADN n'est pas seul à accomplir tout le travail, l'acide ribonucléique (l'ARN) et les protéines jouent des rôles tout aussi importants. La plupart des caractéristiques structurales et biochimiques des cellules proviennent des propriétés des protéines qui les composent; ces propriétés étant déterminées par l'ADN qui commande la synthèse des protéines. Comme l'information ne passe pas directement entre l'ADN et les protéines, l'ARN doit la transporter. La transmission de l'information génétique de l'ADN à l'ARN se nomme transcription et la

séquence d'ARN est ensuite traduite en la séquence protéinique correspondante dans le ribosome.

La capacité qu'ont les acides nucléiques de stocker et de transmettre l'information efficacement provient directement de leur structure chimique. Les acides nucléiques sont des polymères linéaires constitués de nucléotides. Ces derniers sont constitués de trois composantes; un composé phosphate, un sucre de type pentose et une base hétérocyclique azotée. La différence majeure entre l'ADN et l'ARN se situe au niveau du sucre, qui est le D-ribose dans le cas le l'ARN et le 2-désoxy-D-ribose pour l'ADN. Deux classes de bases azotées se retrouvent dans les acides nucléiques, les purines (guanine et adénine) et les pyrimidines (cytosine, thymine et uracile). L'ADN est composé des quatre bases suivantes: adénine (A), thymine (T), cytosine (C) et guanine (G) alors que l'ARN est composé d'adénine (A), d'uracile (U), de cytosine (C) et de guanine (G); la thymine est donc transcrite en uracile dans l'ARN. Les polynucléotides d'ADN sont composés d'une chaîne latérale de phosphate (chargée négativement à pH physiologique) et de sucres (liés entre eux par des liens phosphodiester) sur lesquels sont liées les bases azotées par un lien β -glycosidique. On appelle généralement oligonucléotides les brins d'acides nucléiques de moins de 50 unités, les brins plus longs étant appelés polynucléotides. Lorsqu'il s'agit d'ADN, on appelle ces polymères brins simples d'ADN ou ADN simple brin.

C'est en 1953 que Crick et Watson ont proposé un modèle décrivant la structure tridimensionnelle de l'ADN dans sa forme naturelle. Se basant sur des images de diffraction à rayons-X et sur le fait que l'ADN contenait toujours une quantité égale d'adénine et de thymine de même qu'autant de guanine que de cytosine; ils ont déduit la forme de la double hélice (voir figure 1.1). Cette dernière peut être visualisée comme le résultat de l'enroulement de deux simples hélices ensemble, le contact entre les deux brins étant maintenu par des liens hydrogène entre les extrémités des bases. L'appariement des résidus des purines sur un brin avec les résidus des bases de type pyrimidine sur l'autre brin résulte en deux types de paires de bases: adénine-thymine et guanine-cytosine. Trois liens hydrogène lient la guanine à la cytosine, les liens C-G ou G-C sont donc plus stables que les liens adénine-thymine entre lesquels il y a deux ponts hydrogène. Cette relation entre les bases est appelée complémentarité et est à la base des réactions de reconnaissance lors de la

détection d'ADN. À noter aussi l'orientation antiparallèle des deux brins d'ADN dans la double hélice, les deux brins sont orientés dans les directions opposées; c'est pourquoi les notations 5' et 3' sont indiquées lorsqu'une séquence d'ADN est donnée. Par exemple, la séquence suivante: 5'-ATTGGCCAT-3' sera complémentaire à celle-ci: 3'-TAACCGTA-5'. Cette conformation antiparallèle produit une association stable entre les deux brins qui ont une polarité intrinsèque distincte. L'enroulement des deux brins antiparallèles produit une structure comprenant deux sillons différents entre les chaînes latérales. Un des sillons est plus large (grand sillon, «major groove») que l'autre (petit sillon, «minor groove»); cette différence est due à la géométrie des paires de bases (voir figure 1.1).

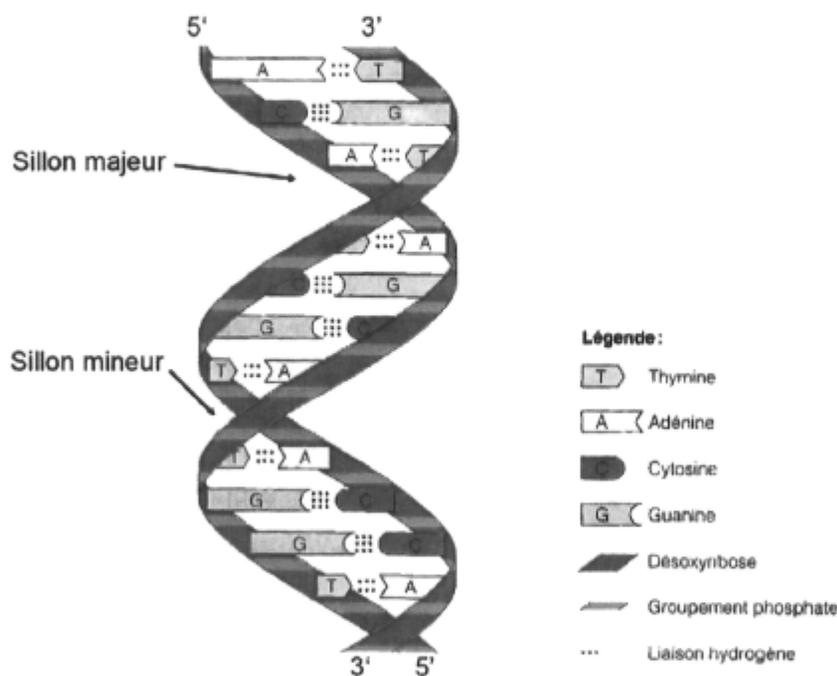


Figure 1.1 Structure de la double hélice d'ADN²

L'ADN double brin est plus stable que l'ADN simple brin, et cela est dû à plusieurs facteurs. La forme hélicoïdale de l'ADN simple ou double brin est due majoritairement aux interactions avec le solvant, l'eau. Les bases azotées hydrophobes se regroupent pour limiter leur contact avec l'eau, ce qui est particulièrement réussi dans le cas de l'ADN double brin où les bases sont entourées des deux côtés par la chaîne phosphate hydrophile. Cette solvation, une combinaison des forces de van der Waals et des forces hydrophobes,

génère entre 4 et 15 kcal.mol⁻¹ d'énergie de stabilisation pour chaque paire de bases adjacente¹. Une stabilisation additionnelle de la double hélice est due au réseau de ponts hydrogène. Typiquement, les ponts hydrogène sont des liens assez faibles (3-7 kcal.mol⁻¹), et ils le sont encore plus dans l'ADN (2-3 kcal.mol⁻¹), cela dû aux contraintes géométriques dans la double hélice¹. De façon cumulative, les ponts hydrogène stabilisent la double hélice. Par contre, comme les ponts hydrogène entre les paires de bases remplacent ceux entre les bases et l'eau dans l'ADN simple brin, ils ne favorisent pas sélectivement la double hélice par rapport à l'ADN simple brin. Mais, contrairement aux forces de solvation, les liens hydrogène sont hautement directionnels et permettent de discriminer l'appariement correct de l'incorrect. Leur directionnalité oriente aussi les bases de façon à limiter leurs contacts avec l'eau. La contribution des ponts hydrogène est donc indirectement vitale pour la stabilité de la double hélice.

Comme la double hélice doit être séparée durant la plupart des processus biologiques dans lesquels l'ADN participe (comme la réplication, la transcription, la réparation et la recombinaison), la réaction d'appariement de l'ADN, l'hybridation, est réversible. Les forces qui tiennent les deux brins ensemble sont adéquates pour lui conférer une certaine stabilité mais sont suffisamment faibles pour permettre leur séparation, la dénaturation. En effet la double hélice est plus stable que les simples brins d'environ 1 kcal par paire de base¹. La force ionique, le pH, la température ainsi que la présence d'agents dénaturants (comme l'éthanol et la formamide) influencent fortement la stabilité de la double hélice. Dans le cadre de ce projet de doctorat, ces paramètres ont du être optimisés pour favoriser la forme simple brin, nécessaire pour la réaction de reconnaissance désirée (voir chapitre 2, partie 1 pour plus de détails). La dénaturation de l'ADN est accompagnée par plusieurs changements physiques comme: une augmentation de la densité, une réduction de la viscosité, un changement des propriétés de rotation optique et d'absorption de la lumière UV¹. Ces changements de l'absorption dans l'UV sont très utilisés pour suivre la dénaturation de l'ADN dont les bases absorbent fortement à 260 nm. L'absorbance des bases individuelles est supérieure de 40% à celle des bases regroupées dans la double hélice, cette réduction du coefficient d'extinction molaire pour les bases agrégées est appelée hypochromicité¹. Lorsqu'une double hélice est dénaturée par chauffage, si on suit l'absorbance à 260 nm, on observe une transition pendant laquelle elle

augmente. La température à mi-transition est caractéristique de la séquence d'ADN et de sa longueur, elle est nommée température de fusion (T_m).

L'autoassociation de brins d'ADN complémentaires est à la base d'une technique nommée hybridation. Cela consiste à former artificiellement une double hélice entre deux brins d'ADN complémentaires. Toutes les réactions de reconnaissance qui permettent de détecter une séquence spécifique d'ADN découlent de cette technique. En biologie moléculaire moderne, on utilise ces réactions pour plusieurs applications comme: déterminer si une certaine séquence est présente à plus d'un endroit dans un certain organisme, démontrer un lien génétique ou évolutionniste entre deux organismes, ou encore déterminer si une séquence d'ADN est présente dans un échantillon¹. Comme nous allons nous concentrer lors de ce projet de doctorat à la détection d'ADN pathogène, cette dernière application nous intéresse particulièrement. Lors d'une expérience d'hybridation typique, on place l'échantillon d'ADN (qui doit être dénaturé si c'est de l'ADN double brin) en présence d'un brin d'oligonucléotide de 12 à 30 unités appelé la sonde, la plupart du temps marquée d'un fluorophore pour faciliter la détection du double brin formé par cette réaction d'hybridation (ou de reconnaissance). La longueur de la séquence sonde est un compromis entre la sélectivité et la sensibilité aux faux positifs du test. Si la sonde est relativement courte, il est possible que cette même séquence sonde se retrouve dans le génome d'un autre organisme ou à un autre endroit dans le génome du même organisme. Par contre si cette sonde s'apparie avec un brin d'ADN qui n'est pas parfaitement complémentaire, la double hélice formée sera déstabilisée plus facilement par ces défauts dans la séquence et ne restera pas formée. Dans le cas contraire où la sonde est plus longue, la séquence risque moins de se retrouver dans un autre génome, mais elle sera moins déstabilisée par des défauts dans la double hélice formée, cela pouvant conduire à des faux positifs. Il existe des banques de données (comme GenBank) où il est possible de rechercher une séquence spécifique dans un organisme donné, chez l'homme par exemple, pour voir si elle se retrouve à plusieurs endroits et les possibilités d'appariement avec des défauts dans la séquence. On appelle polymorphisme mononucléotidique (*single nucleotide polymorphism*, SNP, en anglais) lorsqu'il y a un seul défaut dans le génome qui diffère d'un individu à un autre ou entre les deux chromosomes d'un individu. Ces mutations sont des mutations simples qui peuvent provenir soit des deux parents (les deux brins d'ADN comprennent

alors le défaut et l'ADN de l'enfant est appelé homozygote) ou d'un seul (l'ADN est dit hétérozygote). Les polymorphismes mononucléotidiques comptent pour 90% de toutes les variations génétiques humaines³. Ils affectent la façon dont chaque individu développe des maladies, répond aux pathogènes, aux médicaments, aux drogues. Ils sont donc à l'origine de la plupart des maladies génétiques, c'est pourquoi leur détection, même si elle est difficile, est très importante. Dans le cas de l'ADN génomique humain, la quantité de matériel génétique par volume de sang est relativement élevée et constante ($\sim 10^7$ copies par mL⁴). Par contre, lorsqu'on veut faire la détection d'ADN pathogène, viral ou bactérien, cet ADN n'est habituellement pas présent en grande quantité. Aussi, lorsqu'on veut analyser la séquence et la fonction d'une région d'ADN en particulier, on a besoin de grandes quantités de cet ADN. La production rapide de grandes quantités d'une séquence spécifique d'ADN a été rendue possible avec l'avènement de la réaction PCR (pour *polymerase chain reaction*). Cette méthode d'amplification d'ADN a été inventée il y a à peine 20 ans (en 1986 par Kary Mullis⁵) et est toujours en développement. La réaction PCR nécessite deux oligonucléotides complémentaires à l'ADN à amplifier dans une région d'intérêt. Ces oligomères servent de point d'ancrage (on les appelle *primers*) pour l'enzyme ADN polymérase qui synthétise alors les nucléotides complémentaires aux bases de l'ADN cible. La solution est ensuite chauffée de façon à dénaturer l'ADN double brin nouvellement synthétisé qui est alors refroidi et amplifié de nouveau par la polymérase. De cette façon, après quelques dizaines de cycles, chaque molécule d'ADN peut être amplifiée environ un million de fois¹. Le produit de la réaction PCR est donc de l'ADN double brin qu'on appelle souvent amplicon.

Lors de ce projet de doctorat, nous avons aussi travaillé avec de l'ARN de type messager et viral. L'ARN est la plupart du temps de forme simple brin, mais possède des structures secondaires et même tertiaires. Pour s'assurer que les échantillons d'ARN soient sous la forme simple brin pour leur détection, nous avons effectué un chauffage de ceux-ci, de façon à dénaturer les structures secondaires ou tertiaires. Par ailleurs, comme l'ARN est moins stable chimiquement que l'ADN (les enzymes qui le dégradent sont aussi plus résistantes) nous avons dû porter une attention particulière au mode opératoire et aux réactifs utilisés.

Partie 1.1 La détection de matériel génétique avec la séquence d'acides nucléiques

La détection de matériel génétique est un domaine en pleine effervescence. Il y a présentement au sein de la communauté scientifique mondiale un réel besoin d'outils diagnostics simples, spécifiques et sensibles. En effet, la reconnaissance de séquences d'acides nucléiques est d'une grande importance pour faire le diagnostic rapide d'infections virales ou bactériennes, pour procéder à l'identification de mutations génétiques et pour des applications en chimie judiciaire, par exemple pour confirmer la culpabilité d'un meurtrier.

De plus, le récent travail de séquençage complet du génome humain a permis de découvrir le lien entre certaines mutations génétiques et des maladies ainsi que de comprendre davantage le rôle central de l'ADN dans le corps humain. Cette gigantesque molécule commande la synthèse de milliers de protéines différentes qui, elles, jouent un rôle direct dans notre organisme. La découverte de la fonction précise de chacune de ces protéines et de la séquence d'ADN responsable de sa production est présentement un enjeu scientifique d'importance, nous sommes maintenant dans l'ère de la protéomique.

La reconnaissance de séquences d'ADN par les réactions d'hybridation (formation de la double hélice) est bien connue, de même que les réactions correspondantes entre l'ADN et l'ARN ou encore entre l'ADN et certaines protéines. En effet, ces réactions d'hybridation sont reconnues comme étant l'un des processus de reconnaissance moléculaire les plus sélectifs existant⁶. Afin d'utiliser ce dernier à des fins de détection, il faut disposer d'un élément transducteur, c'est-à-dire un biocapteur qui signalera si oui ou non la réaction d'hybridation ou de reconnaissance a eu lieu. La détection de matériel génétique avec la séquence d'acides nucléiques repose donc sur ce principe, c'est-à-dire la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN correspondant au pathogène recherché suivie d'une transduction de cette hybridation par le biocapteur. Par ailleurs, d'autres méthodes utilisées en biochimie et en microbiologie détectent la présence d'acides nucléiques sans spécificité sur la séquence. Par exemple la mesure de la densité optique à 260 nm permet de doser l'ADN total (le nombre de nucléotides) en solution, les agents

intercalants permettent aussi le dosage de l'ADN en produisant un signal luminescent en présence de ce dernier. Au cours de cette thèse, nous allons donc plutôt nous concentrer sur les méthodes de détection utilisant la séquence d'acides nucléiques de façon à détecter un analyte en particulier.

1.1.1 Les qualités recherchées d'un biocapteur

Premièrement, le biocapteur devant signaler l'hybridation d'ADN cible avec la sonde ne doit pas interférer dans ces réactions biologiques sélectives. De plus, il devrait pouvoir produire un signal mesurable en présence de la plus petite quantité d'ADN possible. Ce besoin de sensibilité est réel, surtout si on pense aux maladies infectieuses. Être en mesure de signaler la présence d'un pathogène au tout début d'une infection virale ou bactérienne peut permettre de sauver des vies, tout comme dans le contexte de la menace du bioterrorisme ou d'épidémies sérieuses comme le syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS).

Il existe des moyens utilisés par les biochimistes, comme les cultures bactériennes ou la réaction PCR, qui permettent d'augmenter le nombre de copies de brins d'ADN, mais ce sont des procédés longs, coûteux et fastidieux. Le biocapteur idéal permettrait la détection d'ADN à des niveaux de sensibilité tels que l'amplification de l'ADN cible ne serait plus requise. De cette façon, le coût et la durée du diagnostic seraient grandement réduits. Pertinemment, la détection efficace et abordable d'agents infectieux est considérée par l'Organisation Mondiale de la Santé comme étant le développement biotechnologique le plus important pour améliorer la santé dans les pays en développement⁷. Le nombre d'étapes de préparation de l'échantillon et de fabrication du procédé de transduction doit donc être réduit au maximum de façon à diminuer le coût et le temps nécessaires au diagnostic.

Un autre aspect important est la spécificité du biocapteur. Le changement d'un seul nucléotide dans le brin d'ADN peut signifier la différence entre la présence d'une bactérie pathogène et d'une autre totalement inoffensive ou bien entre un génome sain et celui d'une

personne souffrant d'une maladie génétique grave. Les réactions d'hybridation sont spécifiques, c'est à dire qu'une double hélice parfaite sera plus stable qu'une double hélice comprenant des défauts. Ainsi, le biocapteur idéal devrait être capable de produire un signal différent selon la stabilité relative de la double hélice formée.

Aussi, comme mentionné plus haut, le matériel génétique à détecter peut se présenter sous diverses formes, selon que l'on travaille avec des bactéries (le plus souvent de l'ADN), des mutations génétiques (ADN), des virus (ARN ou ADN) ou encore des protéines. Le biocapteur idéal devrait être capable d'une certaine polyvalence, c'est-à-dire de pouvoir reconnaître aussi bien de l'ADN simple ou double brin de différentes longueurs, de l'ARN ou encore des protéines.

Les quatre qualités d'un biocapteur idéal sont donc la sensibilité, la simplicité, la sélectivité et la polyvalence. Ces aspects sont discutés d'un point de vue microbiologique dans une revue de littérature récente consacrée à l'avancement des méthodes de diagnostic moléculaire en vue de guider l'usage intelligent d'antimicrobiens⁸. Ce même article traite aussi de la caractéristique d'ubiquité qui signifie de pouvoir détecter avec une seule sonde toutes les formes d'une même maladie. Les virus et les bactéries évoluent beaucoup d'année en année (le virus de la grippe, l'*Influenza*, par exemple subit plusieurs mutations au cours de l'hiver) et on doit déterminer une partie de leur génome qui leur soit spécifique, mais qui reste inchangé par les mutations. Cet aspect est aussi important dans l'élaboration du meilleur biocapteur possible, mais le travail pour atteindre l'ubiquité est strictement d'ordre biologique, c'est pourquoi nous n'en discuterons pas davantage au cours de cette thèse.

1.1.2 Revue de littérature sur les différentes méthodes de détection d'ADN récemment élaborées

La course au meilleur biocapteur est lancée depuis quelques années et des groupes de recherche à travers le monde concentrent leurs énergies à cette quête. Nous avons effectué une revue non exhaustive de la littérature des dix dernières années sur le sujet. Comme critères de recherche, nous avons premièrement visé les méthodes visant une

détection sensible d'ADN. Ensuite, nous avons cherché à présenter les approches les plus utilisées tout en voulant souligner l'étonnante diversité des biocapteurs développés, une attention particulière étant accordée aux biocapteurs polymères. Les méthodes considérées sont comparées sous la forme d'un tableau (tableau 1.1, page 15) en termes de limite de détection, de la possibilité de détecter une seule mutation, du nombre de types d'échantillons différents analysés et de la simplicité de la méthode (échelle relative). Ce tableau n'est certes pas exhaustif, mais donne une bonne idée de l'étendue des recherches effectuées et des méthodes utilisées, toutes plus ingénieuses les unes que les autres.

1.1.2.1 Méthodes utilisant une amplification du signal ou du nombre de copies d'ADN cible

Lorsqu'on veut faire la détection ultrasensible d'ADN, deux stratégies s'offrent à nous ; soit on amplifie le nombre de copies d'ADN cible ou encore on trouve le moyen d'obtenir un signal mesurable avec très peu d'ADN cible. Cette première stratégie comporte les avantages et les inconvénients de la réaction PCR sur laquelle elle est basée ; elle permet d'obtenir de très bonnes limites de détection (on amplifie l'ADN cible jusqu'à ce qu'on puisse le détecter) mais est complexe et sensible à la contamination. Alors que certains chercheurs⁹⁻¹¹ utilisent la réaction PCR classique, d'autres utilisent de nouvelles méthodes d'amplification^{12,13}. Il ne suffit pas d'amplifier l'ADN, il faut également le détecter. Pour ce faire, plusieurs groupes de recherche utilisent le concept de « *Molecular Beacon* », une technologie couramment utilisée pour suivre la progression de la réaction PCR et dont on voit à la figure 1.2 un schéma de principe. Dans la méthode originale¹⁴ comprenant la sonde sous forme de boucle, un fluorophore est attaché à une extrémité de cette sonde et un extincteur de fluorescence est attaché à l'autre extrémité (voir figure 1.2). La fluorescence est alors observée seulement lorsque ces deux extrémités sont éloignées, donc après l'ouverture de la boucle lors de l'hybridation. Dubertret *et al.*¹⁵ ont remplacé l'extincteur de fluorescence par une nanoparticule d'or, tandis que le groupe de Belgrader⁹ utilise les *Molecular Beacons* dans un système PCR pour obtenir des limites de détection impressionnantes (3 copies). Les *Molecular Beacons* peuvent aussi être utilisés pour remplacer une sonde linéaire, et ainsi augmenter la sélectivité du biocapteur⁶. La réaction

PCR amplifiant sélectivement l'ADN désiré, certains groupes de recherche tels que Koh *et al*¹¹, utilisent une méthode de détection non spécifique (un agent intercalant), alors que d'autres s'assurent de la spécificité de leur méthode en ajoutant une réaction de reconnaissance supplémentaire à leur méthode de détection^{10,12}.

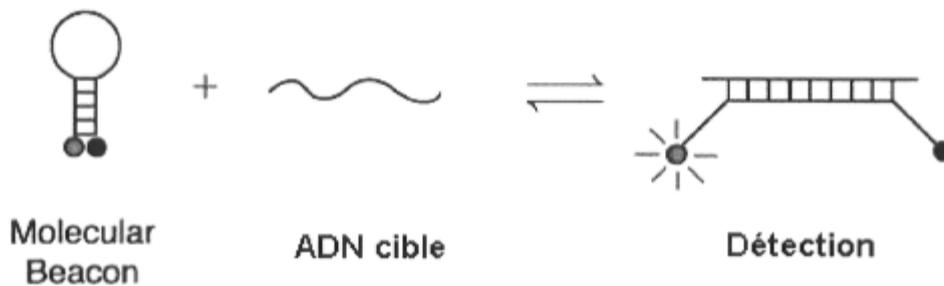


Figure 1.2 Principe de détection d'ADN avec les *Molecular Beacons*

Certains chercheurs ont réussi à utiliser des enzymes pour amplifier la réponse de leur biocapteur lors de la détection d'ADN^{16,17}. Le principe est assez simple : lorsque l'évènement de détection se produit, l'enzyme utilisée est activée et peut donc transformer tout le substrat ajouté à l'échantillon. La détection du produit formé en grande quantité, que se soit par fluorescence¹⁶ ou électrochimie¹⁷, est ainsi grandement facilitée. De façon analogue, le groupe de Mirkin¹⁸ a développé une méthode où l'on détecte aussi un produit autre que l'ADN cible, présent en grande quantité mais seulement si l'ADN cible l'est aussi. On voit à la figure 1.3 un schéma de principe de cette méthode assez complexe mais très ingénieuse. D'autres chercheurs¹⁹ ont utilisé une stratégie différente pour amplifier leur signal de fluorescence, en utilisant un liposome (une vésicule de phospholipides) chargé de plusieurs centaines de fluorophores. Cette méthode utilise une sonde d'ADN liée à ce liposome et une sonde de capture liée à une bille magnétique. Lorsque l'ARN cible est présent, il y a hybridation avec les sondes et on détecte un signal de fluorescence provenant du liposome qui est trois ordres de grandeur plus grand que si on détectait un seul fluorophore¹⁹.

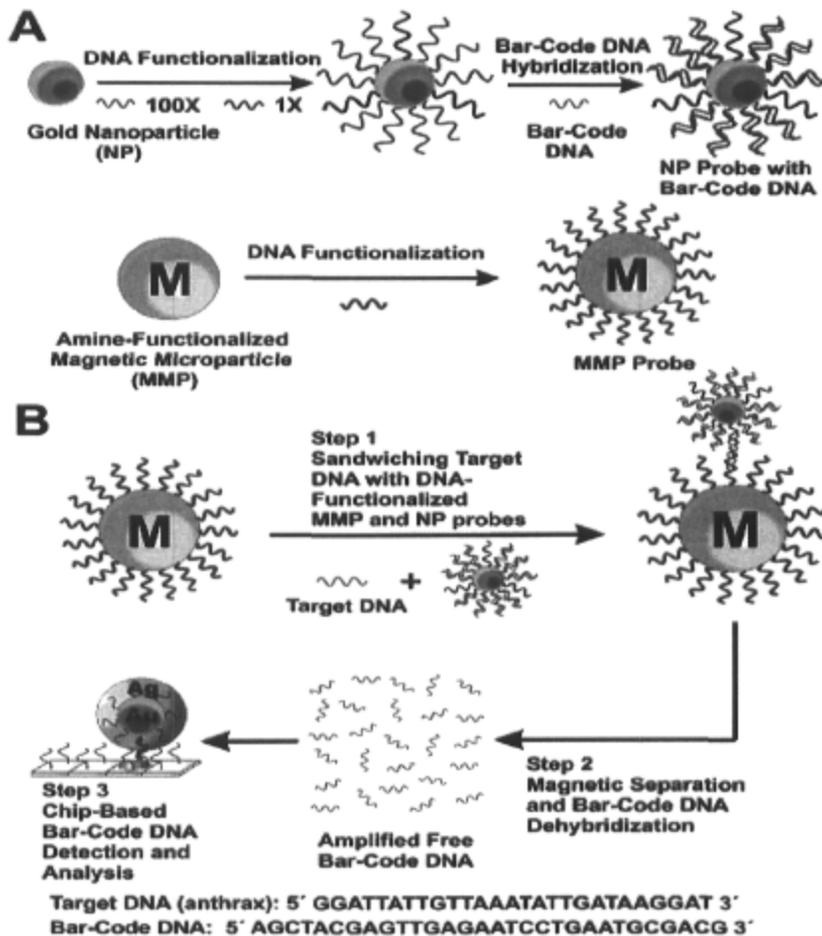


Figure 1.3 Méthode de détection d'ADN amplifiée par l'utilisation d'un brin d'ADN «bar-code»¹⁸

Une autre technique pour amplifier le signal de fluorescence consiste à utiliser un polymère fluorescent ou conducteur comme transducteur, les chromophores dans la chaîne polymère s'additionnant pour augmenter le signal de fluorescence. Cette approche est très bien décrite par le Pr. Swager dans un article où il appelle ce type de senseurs des fils électriques moléculaires ou «molecular wire»²⁰. Les senseurs basés sur de tels polymères conducteurs transportent l'énergie le long de leur chaîne, voient leur réponse amplifiée et leur sensibilité de détection décuplée. Dans cet ordre d'idées, Gaylord, Heeger et Bazan²¹ ont proposé une méthode très intéressante utilisant un polymère soluble dans l'eau comme biocapteur. La détection est faite par fluorescence suite à un transfert d'énergie résonnant

(*resonant energy transfer*, RET); le polymère agit comme donneur de photons, alors qu'une sonde marquée agit comme accepteur spécifique pour produire un signal de fluorescence en cas d'hybridation avec l'ADN cible. Cette approche très ingénieuse a cependant comme désavantage de nécessiter le marquage de la sonde d'ADN avec un chromophore. L'équipe du Professeur Xia²² a développé un polymère semblable qui est sensible lui aux différentes conformations géométriques de l'ADN. Une autre approche utilisant un polymère a été développée par l'équipe du Professeur He²³. Cette méthode très intéressante utilise la réaction de polymérisation pour amplifier l'évènement de détection. Les sondes d'ADN sont d'abord greffées sur une surface, ensuite l'ADN cible sur lequel est greffé un initiateur de polymérisation est ajouté et il y a hybridation de l'ADN. Subséquemment, le poly(hydroxyéthyl) méthacrylate est formé par polymérisation radicalaire par transfert d'atome, ce qui opacifie la région de la surface où il y a eu hybridation d'ADN. Une deuxième étape de polymérisation a mené à la formation d'un polymère branché qui était encore plus visible sur les surfaces.

À l'instar des travaux de Gaylord *et al*²¹, notre approche pour faire la détection ultrasensible d'ADN est aussi basée sur un polymère fluorescent cationique et soluble dans l'eau. Les trois dernières entrées de la section c du tableau 1.1 proviennent de trois publications traitant de l'utilisation de ce biocapteur polymérique (on trouve une description complète de ce biocapteur à la section 1.2). La première entrée, citant une publication de 2002, et donc avant l'initiation de ce projet de doctorat, est une preuve de concept de la détection d'ADN par ce polymère fluorescent²⁴. La deuxième décrit une amélioration importante de la limite de détection obtenue grâce aux travaux d'optimisation des conditions expérimentales effectués au cours de ce doctorat et avec l'aide d'un fluorimètre conçu spécialement pour notre biocapteur (cette publication se retrouve en entier au chapitre 3). Finalement, la dernière entrée du tableau cite une publication dans laquelle nous montrons un mécanisme d'amplification de la fluorescence du transducteur polymère qui nous a permis d'abaisser encore notre limite de détection (cette publication se retrouve en entier au chapitre 4).

1.1.2.2 Différentes méthodes de détection et de transduction de l'hybridation de l'ADN

La détection se fait le plus souvent par fluorescence^{6,9,11,15,16,19,21,24-26}, ou encore par électrochimie^{12,13,17,27}, ces deux techniques de détection étant caractérisées par leur faibles limites de détection. La spectroscopie de résonance de plasmon de surface (SPR)²⁸, la microscopie²⁹ ou encore la colorimétrie^{23,30} sont des techniques de détection également employées.

Pour ce qui est du transducteur, soit l'espèce qui produit un signal lorsqu'il y a hybridation de l'ADN, il y a aussi plusieurs variations. Très souvent, on a recourt à des nanoparticules dont le rôle est de capturer les séquences d'ADN cibles^{6,10,13,15,18,19,27,30} ou encore de produire elles-mêmes le signal confirmant la présence de l'ADN cible^{15,27,30}. La chimie des surfaces est également très sollicitée, les méthodes de détection électrochimique utilisant souvent le greffage d'ADN sur une électrode^{17,27}, alors que la spectroscopie SPR implique l'utilisation de surfaces particulières²⁸. Les techniques qui utilisent la fluorescence comme moyen de détection requièrent souvent le marquage de l'ADN avec une molécule luminescente^{6,9,10,12,15,21}. Ce marquage implique une réaction chimique sur l'ADN, ce qui ajoute une étape supplémentaire à la méthode de détection. Aussi, certaines méthodes incluent des réactions biochimiques comme l'utilisation d'une enzyme^{16,17} ou du lien biotine-streptavidine^{6,13,16,19}. Comme nous le verrons plus loin, notre méthode de détection avec le polymère transducteur est plus simple que les autres méthodes évoquées ci-dessus. Les limites de détection obtenues de même que la spécificité et la polyvalence de notre biocapteur le situent à une place enviable dans le tableau 1.1 de même que parmi la plupart des biocapteurs développés au cours des dernières années.

Tableau 1.1 Comparaison de plusieurs approches (publiées entre 1996 et 2006) visant la détection sensible de matériel génétique

Méthode utilisée	Limite de détection	Sélectivité (mutations simples)	Polyvalence (nombre d'échantillons différents)	Complexité relative*	Référence
a) Méthodes utilisant une amplification de l'ADN cible					
PCR, <i>Molecular Beacons</i> , RET, microfluidique	3 copies	non	1 (<i>Bacillus anthracis</i>)	7	9
Amplification NASBA**, billes magnétiques, détection électrochimique	1 CFU (<i>colony forming unit</i>)	non	6 sondes d'ADN (espèces <i>Candida</i>), cibles d'ARN	9	13
Amplification d'ADN branché, marquage des sondes, détection opto-électrochimique	1000 molécules	non***	1 (ADN plasmide de <i>Yersinia pestis</i>)	10	12
PCR, électrophorèse, détection par fluorescence (intercalant), microfluidique	6 copies	non	2 (amplicons <i>E. Coli</i> , <i>Salmonella</i>)	6	11
PCR, particules magnétiques, détection par fluorescence	2 copies	non	1 (virus de l'hépatite C)	7	10
b) Méthodes basées sur l'utilisation de micro ou nanoparticules					
<i>Molecular Beacons</i> avec nanoparticule d'or greffée	10 fmol, 100 pM	non	1 (24-mer)	5	16
Amplification par ADN <i>bar-code</i> , nano et microparticules, détection par SERS (voir liste des acronymes, p.xvi)	500 zM, 10 molécules	oui	1 (27-mer provenant de <i>Bacillus anthracis</i>)	10	18
Liposome, billes magnétiques, détection par fluorescence, microfluidique	10 amol/L (10 pmol/L)	non	1 (2 sondes d'ADN pour une cible d'ARN)	6	19
Nanoparticules avec sondes d'ADN, agrégation, détection colorimétrique	10 fmol	oui	2 (30-mer, et plus longs)	2	30
<i>Molecular Beacons</i> sur nanoparticules magnétiques, détection par fluorescence	10 ⁻¹⁵ M	oui	3 (2 15-mer, ARNm)	8	6
Nanoparticules d'or, détection électrochimique	1 fM	oui	1 (27-mer)	9	27

c) Méthodes basées sur l'utilisation de polymères					
Biocapteur polymère soluble dans l'eau, RET sonde PNA (<i>peptid nucleic acid</i> , ADN neutre) marquée, détection par fluorescence	10 pM	non	1 (15-mer, sondes PNA)	4	21
Sonde d'ADN sur une surface, initiateur de polymérisation sur ADN cible, la polymérisation suit l'hybridation, détection par colorimétrie	1 fmol	oui	1 (30-mer)	3	23
Complexes entre un polythiophène et l'ADN, détection par fluorescence	3×10^6 copies	oui	1 (20-mer)	1	24
Complexes entre un polythiophène et l'ADN, détection par fluorescence	220 molécules, $0,36 \times 10^{-21}$ mol, $2,4 \times 10^{-18}$ M	oui	3 (sonde 20-mer ; cibles 20-mer, 50-mer et ARN)	1	25
Sondes d'ADN marquées avec un fluorophore qui accepte la fluorescence du transducteur polythiophène.	5 molécules, 3 zM	oui	3 (sonde 20-mer, cible 20-mer ; sondes 15-mer, cible : ADN génomique sain ou muté)	2	26
d) Autres méthodes					
L'hybridation de l'ADN cible déclenche la production de substrat par l'enzyme, détection par fluorescence	67 pM	oui	1 (16-mer)	4	15
Polymère redox, enzyme et glucose produisent le signal électrochimique	1,4 fmol, 2 nM	non	1 (20-mer)	9	17
Hybridation sur surface d'or, visualisation par AFM	50 molécules	non	1 (100-mer)	3	29
Sondes d'ADN sur surfaces d'or, détection faite par spectroscopie de résonance de plasmon de surface en régime dynamique (<i>flow-injection surface plasmon resonance (FI-SPR)</i>)	54 fM, 5,4 amol	oui	2 (sonde 30-mer, cible 47-mer et <i>A. thaliana</i> ARNm)	5	28

* Échelle relative, 1 étant la méthode la plus simple et 10 celle la plus complexe.

**Amplification basée sur la séquence d'acides nucléiques (*Nucleic Acid Sequence Based Amplification*, NASBA).

***L'utilisation de 8 sondes de capture spécifiques à la séquence cible et de 22 sondes d'amplification assure la spécificité du test.

Partie 1.2 Méthode de détection avec le polymère

1.2.1 Un polymère conjugué comme biocapteur

Les polymères conjugués, ou polymères conducteurs, représentent une classe à part parmi les polymères de synthèse. Leur découverte relativement récente (1977³¹) a valu aux chercheurs responsables le prix Nobel de chimie en 2000. Ces dernières années, le développement des polymères conducteurs a connu un essor important puisque ces matériaux combinent à la fois les excellentes propriétés électriques et optiques des composés inorganiques ou des métaux en plus des propriétés généralement associées aux polymères telles qu'une grande souplesse synthétique, une faible densité et une mise en œuvre aisée. Ces polymères possèdent tous une caractéristique structurale commune, soit la présence d'un système π -conjugué le long de la chaîne principale. C'est cette particularité qui confère à ces polymères de bonnes propriétés optiques et électriques, puisque le motif de répétition, qui est généralement aromatique, permet un bon recouvrement des orbitales π entre les motifs successifs. Les propriétés intéressantes de ces polymères π -conjugués sont mises à profit dans de nombreux dispositifs comme, par exemple, les cellules photovoltaïques, les revêtements antistatiques, les transistors organiques à effet de champ ou encore, dans notre cas, les biocapteurs. Dans les polymères conducteurs, le phénomène de conduction le plus efficace est de type électronique. Comme la forme neutre des polymères aromatiques est pratiquement isolante, il faut introduire des défauts électroniques directement dans le système π -conjugué de la chaîne principale du matériau pour le rendre conducteur. Ces défauts de charges sont habituellement introduits par des processus d'oxydoréduction qu'on appelle communément dopage. En plus d'augmenter la conductivité électrique d'un matériau conjugué, le dopage modifie également ses propriétés optiques. Ces dernières sont modifiées par l'apparition de nouvelles transitions électroniques permises de moindre énergie. Lorsque le taux de dopage est important, l'intensité de ces nouvelles transitions augmente, ce qui entraîne un changement de coloration du matériau. Aussi, la présence de groupements ioniques de même que la présence de groupements latéraux flexibles; augmente considérablement la solubilité des

polymères conjugués dans les solvants polaires comme l'eau. Ces groupements latéraux confèrent parfois au polymère conjugué la propriété de changer de couleur s'il est mis en présence de certains stimuli. Ce phénomène se nomme chromisme et peut être de différentes formes selon le type de stimulus causant le changement de couleur, notamment, le solvatochromisme, le photochromisme, l'ionochromisme, le piézo-chromisme, le thermo-chromisme et le chromisme d'affinité biologique (biochromisme) ou chimique³². Puisque notre polymère biocapteur possède cette particularité du chromisme, nous décrivons donc les propriétés causant le changement de coloration en prenant notre transducteur polymère en exemple. Par ailleurs, il est intéressant de mentionner ici l'avantage du nombre d'unités de répétition, inhérent à la nature polymérique des transducteurs polymères. Chaque unité de répétition produisant autant de signal qu'un chromophore isolé, les chromophores regroupés dans la chaîne polymère agissent conjointement pour amplifier la réponse au stimulus ayant provoqué le changement de couleur. Nous avons vu à la section précédente que cette stratégie d'amplification a été utilisée par plusieurs groupes de recherche incluant le nôtre.

Le polymère conjugué utilisé dans le cadre de ce projet est le poly[bromure de 1H-imidazolium, 1-méthyl-3-[2-[(4-méthyl-3-thiényle)oxy]éthyle], appartenant à la classe des poly(3-alkoxy-4-méthylthiophènes). Il a été conçu et synthétisé par Hoang-Anh Ho, assistant de recherche du Professeur Mario Leclerc, au cours de l'année 2000. La conception était basée sur des travaux antérieurs portant sur des dérivés de polythiophène affinitéchromes et de sels d'imidazolium³³. La figure 1.4 montre la structure de ce polymère.

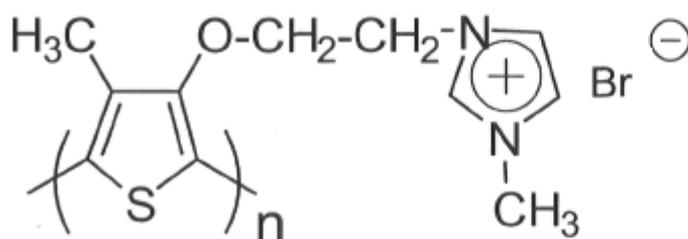


Figure 1.4 Structure moléculaire du polythiophène

Plusieurs années de recherche sur les polymères de ce type ont donc mené l'équipe du Professeur Leclerc à cette structure. Les substituants ont été choisis en fonction des propriétés optiques qu'ils confèrent au polymère. Le groupement méthyle et le groupement alkoxy-imidazole permettent le meilleur changement de couleur qui accompagne les différentes conformations que peut adopter la chaîne principale du polymère lorsque celui-ci se retrouve en présence d'ADN. De plus, ce groupement alkoxy-imidazole chargé positivement permet au polymère d'être soluble dans l'eau, caractéristique essentielle pour travailler avec l'ADN et les molécules biologiques en général. Des polymères analogues arborant différents substituants ont par la suite été synthétisés puis testés dans le laboratoire du Pr. Leclerc pour voir s'ils interagissaient aussi avec l'ADN. Ces autres essais se sont avérés infructueux dans le sens que le polythiophène de départ a toujours donné, jusqu'à maintenant, les meilleurs résultats. Les structures conformationnelles que peut prendre le polymère sont illustrées à la figure 1.5.

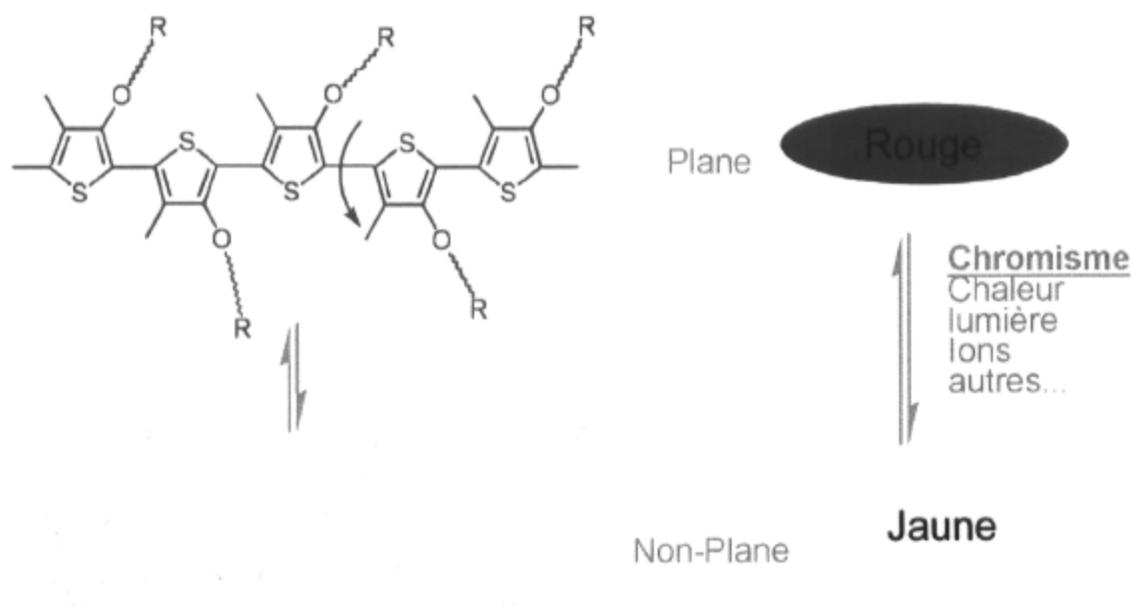


Figure 1.5 Chromisme démontré par le polymère sous divers stimuli

Lorsque le polymère est seul en solution, dans un bon solvant comme l'eau pure, ses chaînes latérales sont mobiles et ont donc tendance à adopter la conformation qui demande le moins d'énergie, soit la pelote statistique. Cette conformation, nommée ici non-plane, possède une chaîne principale où les cycles thiophène sont orientés de façon anti-parallèle l'un par rapport à l'autre. Dans cette conformation non-plane, les cycles thiophène ne sont pas tous dans le même plan et le recouvrement des orbitales π est faible. La délocalisation des électrons ne peut donc pas se faire sur une grande distance, ce qui augmente l'énergie de la transition π - π^* (ou la largeur de la bande interdite du polymère) et donne au polymère sa coloration jaune. Ensuite, sous l'effet d'un stimulus, soit la chaleur (thermochromisme), le changement de polarité du solvant (solvatochromisme), l'ajout de certains ions dans la solution (ionochromisme) ou encore l'affinité du polymère pour une molécule biologique (biochromisme), un changement de conformation de la chaîne principale provoquera un changement de couleur. Un tel changement optique est dû à la rotation des liaisons simples C-C entre les cycles thiophènes, qui s'alignent tous dans le même plan pour adopter la conformation plane. Cette orientation des cycles maximise le recouvrement des orbitales π , ce qui favorise la délocalisation des électrons qui peut alors se faire sur plusieurs cycles. Cela a pour effet d'abaisser l'énergie de la transition π - π^* et ainsi donner la couleur rouge à la solution.

La transition entre les deux conformations se fait graduellement, l'encombrement stérique entre les groupements latéraux du polymère ralentissant légèrement le processus³⁴. On croit d'ailleurs que ce désordre dans les chaînes latérales joue un rôle important dans la transition, la rotation de la première unité de répétition induisant une torsion dans la chaîne principale, les unités suivantes poursuivant le mouvement comme un effet domino³⁴. Selon un modèle théorique³², pour qu'un polymère puisse montrer des propriétés de chromisme, il doit d'abord pouvoir adopter une conformation plane à l'état solide. Puis, suite à des stimuli, comme par exemple une augmentation de la température, un certain désordre est créé grâce au mouvement des groupements latéraux, ce qui augmente la distance interchaîne et permet ainsi certains mouvements de rotation le long de la chaîne principale du polymère³². Ces changements conformationnels donnant lieu au changement de couleur seraient donc dus à un équilibre entre les interactions répulsives intrachânes créées par l'encombrement

stérique des groupements latéraux et les interactions attractives interchaînes³². Ce modèle semble très bien décrire les changements conformationnels observés chez notre polymère transducteur. En plus des changements conformationnels dus à l'encombrement stérique des groupements latéraux, les interactions intermoléculaires jouent également un rôle important au niveau du chromisme. Ce phénomène, qu'on appelle couplage excitonique, est dû à l'agrégation des chaînes polymères et peut être de deux types. Un premier type d'agrégats, dit de type J, peut se former suite à un arrangement intermoléculaire tête-queue³² comme on voit à la figure 1.6. Lorsque de tels agrégats sont formés, le maximum d'absorption UV-visible du matériau se déplace vers les plus faibles énergies³². Des agrégats de type J seraient donc formés lorsque le transducteur polymère est dans sa conformation plane. Dans notre cas, l'effet cumulatif de la diminution de la longueur de conjugaison et de la formation d'agrégats de type J, tous deux dus au changement de conformation de la forme tordue à la forme plane, est un déplacement vers le rouge observé sur le spectre UV-visible qui est présenté à la figure 1.8. Un deuxième type de couplage excitonique est dû à la formation d'agrégats de type H, ou arrangements parallèles, dans lesquels les chaînes polymères sont orientées l'une à la suite de l'autre³². Lorsque des agrégats de type H sont formés, le spectre UV-visible se déplace plutôt vers les longueurs d'onde plus énergétiques³², ce qui n'est pas notre cas.

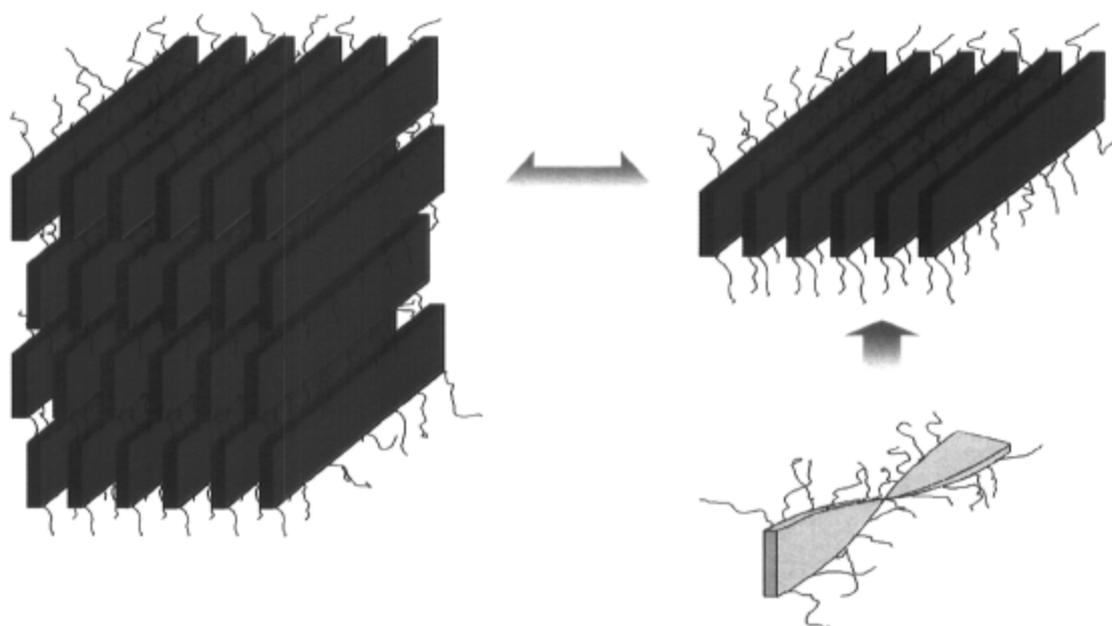


Figure 1.6 Formation d'agrégats de type J lorsque le polythiophène est sous la forme plane et solvation de ces agrégats lors du changement de conformation vers la forme non-plane³²

Dans le cas spécifique de la détection d'ADN par notre polythiophène transducteur, lorsqu'un brin d'ADN sonde est introduit dans la solution de polymère, il y a formation d'un complexe appelé duplex, ce qui entraîne un aplanissement de la chaîne principale. Cette conformation plane donne une coloration rouge violacée à la solution. Par la suite, si le complexe polymère-sonde est introduit dans un échantillon où le brin complémentaire au brin sonde est présent, il y a formation du triplex au sein duquel le polymère a une conformation non-planaire, et un changement de coloration du rouge au jaune est alors remarqué. Ces deux conformations se distinguent par leur couleur, mais aussi par une différence au niveau de la fluorescence émise. La conformation plane associée au duplex est très peu fluorescente, tandis que la forme non-plane (tordue) reliée au polymère seul ainsi qu'au triplex est fluorescente. Ces changements de coloration et d'intensité de fluorescence selon l'espèce formée avec notre polymère transducteur sont des avantages certains pour faire la détection d'ADN.

1.2.2 Principe de détection d'ADN avec le biocapteur polymère

Le principe de détection utilisé repose sur un polythiophène cationique qui permet de traduire en un signal optique (colorimétrie et fluorescence) l'hybridation entre un brin d'ADN sonde et un brin d'oligonucléotides complémentaire en solution. La figure suivante illustre le processus.

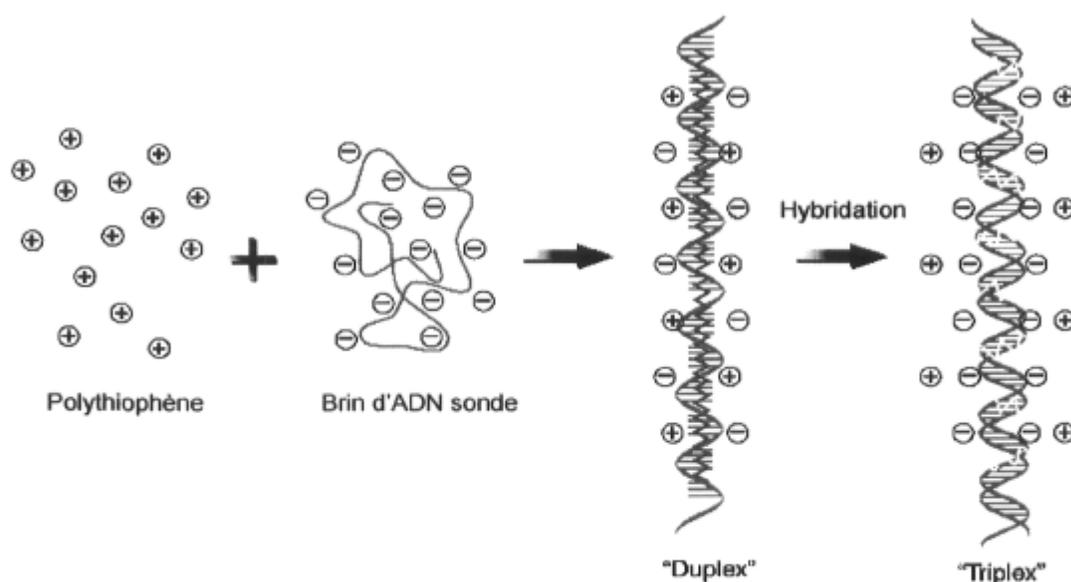


Figure 1.7 Principe de détection du polymère transducteur²⁴

Lorsqu'un brin d'ADN choisi comme brin sonde est introduit dans une solution contenant le polymère, il y a formation d'une structure appelée duplex (ou simplement complexe polymère-sonde). Le duplex est formé par affinité de charges entre le polymère chargé positivement (une charge positive par unité de répétition) et le brin d'ADN chargé négativement (une charge négative par nucléotide). Par la suite, si le duplex est introduit dans un milieu où le brin complémentaire est présent, l'hybridation aura lieu. Lors de celle-ci, le polymère s'enroule autour de la double hélice d'ADN; la structure hélicoïdale du polymère en présence d'ADN double brin a d'ailleurs été prouvée par des mesures de dichroïsme circulaire²⁴. Cette structure ainsi constituée est nommée triplex et est fluorescente. Cette augmentation drastique de la fluorescence qui est remarquée lors du

passage de la forme duplex à la forme triplex est à la base de notre méthode de détection d'ADN par fluorescence.

Il est important de mentionner les différences de solubilité entre les différents complexes. En effet, lors de la formation du duplex, il y a neutralisation des charges pour résulter en un complexe stoechiométriquement neutre. Or, il est connu que les complexes stoechiométriques de polyélectrolytes deviennent insolubles dans le milieu où ils se trouvent, même si les deux macromolécules qui les composent y sont solubles individuellement³⁵. Ainsi, après quelques heures, une solution concentrée de duplex va précipiter; le complexe rouge sera déposé au fond du récipient et le surnageant deviendra incolore. Dans les solutions diluées de duplex, on suppose plutôt que des agrégats plus ou moins gros de duplex se dispersent en solution (figure 1.6) sans toutefois précipiter. Ces agrégats devraient se dissoudre complètement lors de la formation du triplex, un complexe non-stoechiométrique qui est parfaitement soluble dans l'eau.

Les figures suivantes illustrent les changements de couleur observés lors de la détection d'ADN, la figure 1.8 montrant les courbes d'absorption UV-visible des différents complexes et la figure 1.9, la couleur des différentes solutions. Lors de ces expériences, nous avons utilisé des oligonucléotides modèles, des séquences complémentaires de 20 unités de long (ADN sonde et cible) appartenant aux génomes des bactéries à levures *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* (pour les séquences et plus d'informations voir section 2.1.1).

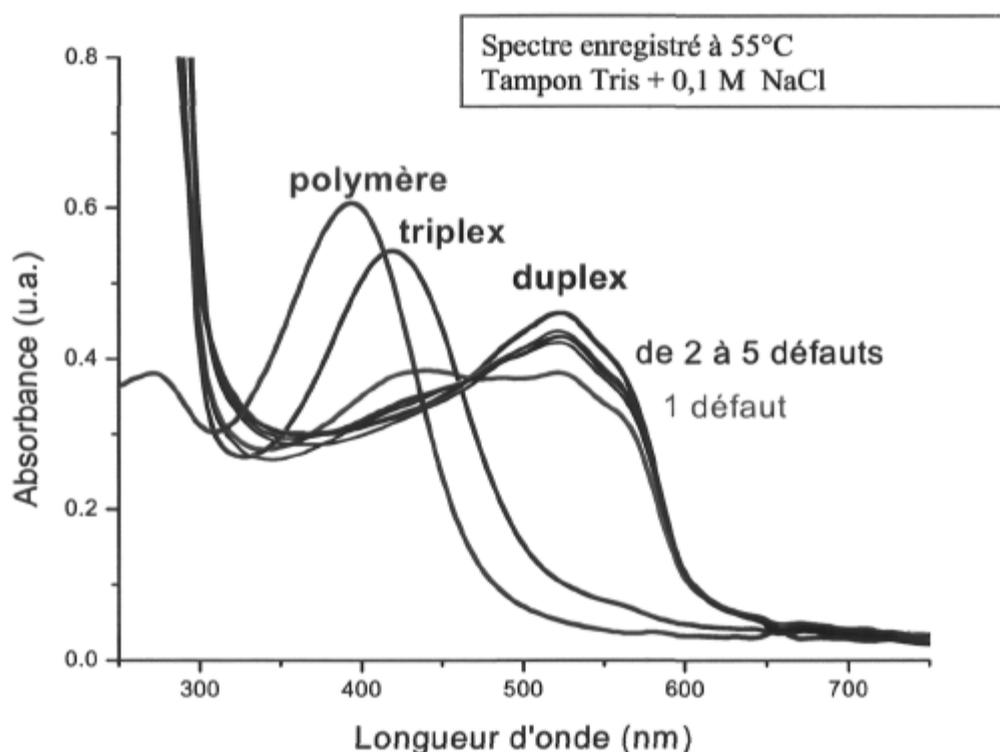


Figure 1.8 Spectre d'absorption UV-visible du polythiophène, du duplex et du triplex³³

On remarque que le polymère seul a une absorbance maximale à 398 nm, alors qu'un déplacement bathochromique ($\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$) est observé lors de la formation du duplex. Par la suite, lorsqu'il y a hybridation de l'ADN pour former le triplex, on observe un basculement du spectre vers le bleu ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$) et la solution redevient jaune. Il est important de mentionner que même si le polymère et le triplex sont tous les deux de coloration jaune, leurs spectres d'absorption sont différents, et il est donc impossible qu'un relargage du polymère donne lieu à la coloration du triplex. Les résultats obtenus en dichroïsme circulaire²⁴ apportent une preuve supplémentaire à cette affirmation. On remarque aussi un point isobestique entre les courbes du duplex et du triplex comprenant des défauts, le basculement du spectre n'étant complet que lorsque la séquence est parfaitement complémentaire. La présence de ce point isobestique indique qu'il n'y a que deux conformations possibles de la chaîne principale du polymère biocapteur, les formes plane et non-plane. Sur la figure 1.9, on remarque que la coloration de la solution du triplex

comprenant deux défauts est pratiquement inchangée par rapport au duplex, alors que celle du triplex 1 défaut est légèrement orangée.

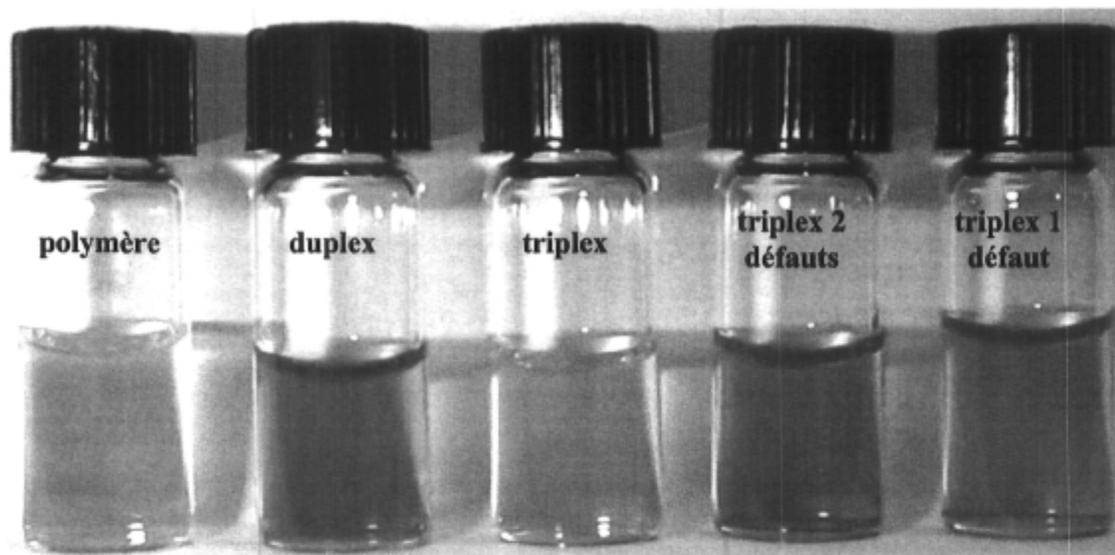


Figure 1.9 Coloration des différentes solutions obtenues lors de la détection d'ADN avec le polymère²⁴

Même si la colorimétrie montre une preuve directe et très convaincante de la détection sélective d'ADN par notre biocapteur polymère, il ne s'agit pas d'une méthode de détection suffisamment sensible pour les applications visées. C'est pourquoi nous n'en discuterons pas davantage dans cette thèse et allons plutôt nous concentrer sur la fluorescence, une méthode de détection intrinsèquement très sensible³⁶. Comme le triplex possède une absorbance maximale à 425 nm (figure 1.8), cette longueur d'onde a été utilisée pour l'excitation des différentes espèces, dont on voit le spectre de fluorescence à la figure 1.10.

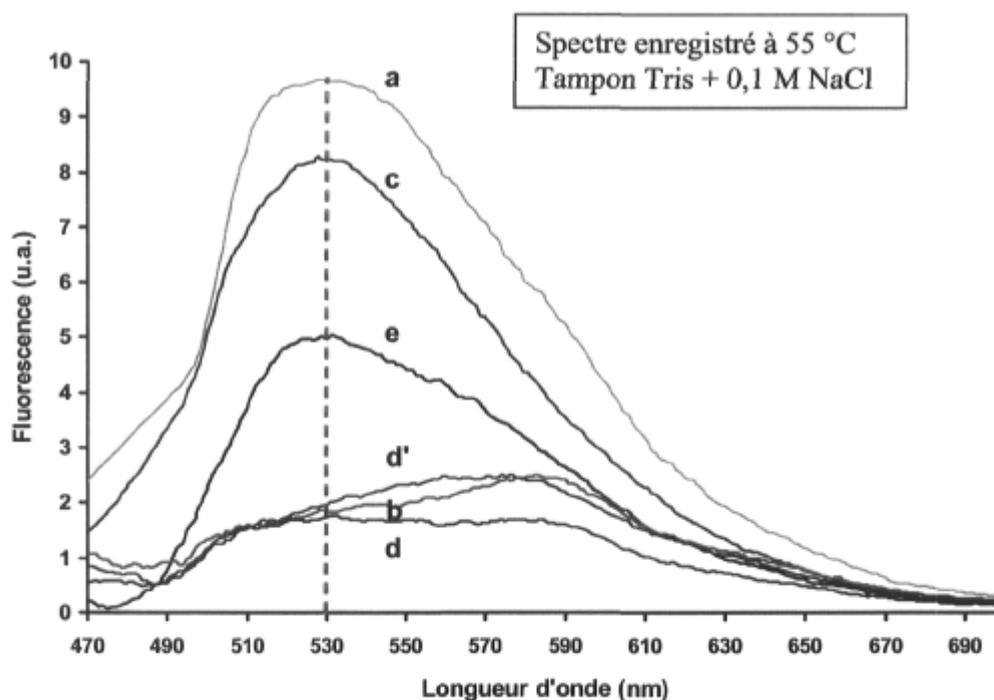


Figure 1.10 Détection sélective d'ADN par fluorescence du biocapteur polymère

On voit en *a* la fluorescence du polymère seul en solution. Lorsque le duplex est formé, on observe une diminution importante de la fluorescence ainsi qu'un déplacement du pic de fluorescence vers le rouge, comme le montre la courbe *b*. Alors que le déplacement du pic de fluorescence est directement lié au changement de conformation de la chaîne polymère, l'extinction de l'intensité de fluorescence serait plutôt due à la formation d'agrégats dans la structure duplex (figure 1.6), dans lesquels il y a de l'extinction de fluorescence entre les chaînes. Si le brin cible parfaitement complémentaire à la sonde est introduit dans la solution de duplex, il y aura formation du triplex accompagnée d'une augmentation drastique du signal de fluorescence (courbe *c*). Dans cette structure triplex, la solubilisation des agrégats diminue considérablement l'extinction de la fluorescence entre les chaînes, ce qui augmente l'intensité du signal de fluorescence. De plus, le changement de conformation de la chaîne principale pour la forme non-plane augmente la largeur de la bande interdite du polymère et résulte en un déplacement du pic de fluorescence vers le bleu. L'intensité de fluorescence maximale du polymère et du triplex se situe à 530 nm.

Toutefois, la fluorescence du triplex n'est jamais aussi intense que celle du polymère seul. Cela pourrait être dû à la présence d'unités duplex qui absorbent spécifiquement la fluorescence émise par le triplex. Ou encore, il se peut que les contraintes structurales imposées au polymère par la double hélice d'ADN diminuent ses degrés de liberté ce qui diminuerait sa fluorescence. On voit la fluorescence d'un triplex ayant 2 défauts à la courbe *d* tandis que la fluorescence du triplex ayant 1 seul défaut est illustrée par la courbe *e*. Les quantités de brins ajoutées pour former les complexes sont telles que la proportion *polymère : sonde : cible* soit de 1 : 1 : 1 en équivalents de charge. Conséquemment, le polymère seul devrait idéalement être entièrement consommé lors de la formation du duplex, et ce dernier devrait servir en totalité à former le triplex. Les triplex de la figure 1.8 ont été préparés selon cette proportion, sauf pour la courbe *d'* pour laquelle 100 équivalents de brin cible comprenant deux défauts ont été ajoutés au duplex pour donner une proportion 1 : 1 : 100. Cette courbe prouve l'étonnante sélectivité du biocapteur polymère, un aussi grand excès de brin cible comprenant 2 défauts n'augmentant presque pas la fluorescence du duplex. La figure 1.10 démontre bien la capacité de la fluorescence comme technique analytique pour détecter de façon spécifique l'ADN avec le transducteur polythiophène.

Finalement, on constate que la méthode développée est excessivement simple, aucune réaction chimique ou biochimique n'est impliquée, on ne fait que former des complexes qui existent grâce à des interactions hydrogène ou électrostatiques. Aussi, on remarque que la longueur d'onde d'excitation du triplex (425 nm) est relativement loin de sa longueur d'onde d'émission (530 nm). Ce grand déplacement de Stokes (*Stoke's shift*) est un avantage certain pour faire la détection ultrasensible d'ADN parce qu'en faisant la détection de la fluorescence à 530 nm, on se trouve suffisamment loin de la source pour qu'elle ne cause pas ou très peu d'interférences spectrales. De plus, il est important de mentionner un autre avantage de la détection par fluorescence par notre transducteur polymère, une augmentation importante du signal est observée lors de l'évènement de détection. Cela constitue un avantage de taille par rapport à d'autres techniques qui observent une diminution de signal lors de la détection. Par exemple, l'extinction de fluorescence peut être due à la présence d'interférents non reliés à l'évènement de reconnaissance et est donc généralement moins sélective.

1.2.3 Nouvelle stratégie de détection impliquant une amplification du signal de fluorescence

Comme la sensibilité de détection obtenue avec le transducteur polymère (voir tableau 1.1) n'est pas suffisante pour pouvoir remplacer les méthodes utilisant une amplification de l'ADN cible, nous avons voulu améliorer la sensibilité de notre méthode de détection avec le polymère transducteur. Comme le triplex est peu fluorescent, le rendement quantique de fluorescence du polymère étant de 3%²³, le Dr. Hoang-Anh Ho a pensé utiliser le transfert d'énergie résonnant (ou RET pour *resonance energy transfer*) pour augmenter indirectement sa fluorescence. Le transfert énergétique résonnant est une technique qui consiste à exciter un fluorophore qu'on appelle accepteur avec la fluorescence émise par un autre fluorophore appelé donneur. Pour que le transfert d'énergie soit possible, la longueur d'onde d'émission du fluorophore donneur doit être très près de la longueur d'onde d'excitation de l'accepteur et les donneurs et accepteurs doivent être à proximité l'un de l'autre. Des détails théoriques supplémentaires sur le RET sont donnés au chapitre 5. Un fluorophore qui possède un rendement quantique de 100% et qui peut être efficacement excité par le triplex a donc été trouvé (l'alexafleur 546 ou AF546)³⁷. Les sondes d'ADN que nous avons utilisées pour faire la détection du brin cible sont donc marquées avec ce fluorophore. Pour parvenir à détecter l'ADN désiré avec cette nouvelle stratégie, nous devons d'abord former le complexe polymère-sonde et, lorsque l'ADN cible est ajouté, le triplex se forme comme auparavant mais la fluorescence émise par le triplex est absorbée par l'AF546 qui émet alors un signal de fluorescence à 572 nm (voir figures 1.11 et 4.1). Le rendement quantique de fluorescence de l'AF546 étant 30 fois supérieur à celui du triplex, le signal de fluorescence devrait être beaucoup plus intense. Aussi, comme l'émission de l'AF546 est à une longueur d'onde plus élevée que celle du triplex, on s'éloigne de la longueur d'onde d'excitation, ce qui devrait diminuer le bruit de fond dû à la source d'excitation.

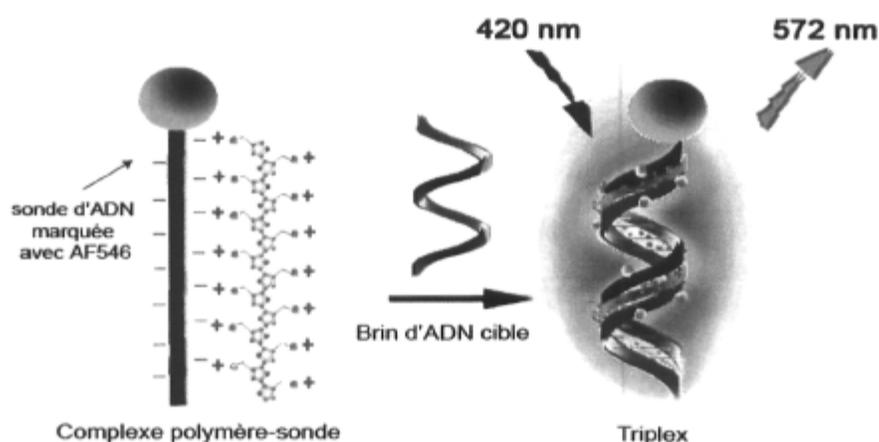


Figure 1.11 Nouvelle stratégie de détection impliquant le RET

Or, un phénomène très intéressant a été observé par le Dr. Hoang-Anh Ho lors des premiers tests avec cette approche, lorsqu'un large excès de duplex marqué est placé en solution et qu'ensuite une infime quantité de brin d'ADN complémentaire est ajoutée, le signal de fluorescence observé est anormalement élevé pour le nombre de copies d'ADN cible présentes. En effet, en optimisant le rapport du nombre de duplex marqués sur le nombre de copies à détecter, nous avons obtenu une sensibilité de détection décuplée. Ainsi, en plaçant en solution un milliard d'équivalents de duplex marqués pour chaque copie d'ADN cible, nous avons obtenu une limite de détection de 5 molécules dans le volume total de l'échantillon (3 mL), ce qui équivaut à une concentration de 3 zM (chapitre 4). Ce phénomène a été nommé *superallumage* et «*fluorescence chain reaction*» en anglais pour faire référence au terme PCR. Nous avons aussi démontré l'applicabilité de cette méthode pour faire la détection d'une seule mutation dans de l'ADN génomique humain non-purifié.

Si on compare la sensibilité de détection, la pente de la courbe d'étalonnage, des deux approches (sondes non-marquées vs sondes marquées) pour l'oligonucléotide modèle Y1 (voir section 2.1.1 pour la séquence) obtenue dans les meilleures conditions expérimentales pour les deux techniques, on obtient un facteur d'amplification de 4000 avec les sondes marquées (chapitre 5). Cette étonnante amplification ne peut pas s'expliquer seulement par l'augmentation du rendement quantique de fluorescence de l'AF546 par

rapport au polymère; de cette façon, le facteur maximal d'amplification serait de 30. Nous avons formulé deux hypothèses qui pourraient expliquer l'amplification de signal observée. Premièrement, la grande quantité de duplex présente en solution formerait des agrégats qui restent formés lors de la détection d'ADN. Dans ces agrégats, le transfert d'énergie entre le triplex et les fluorophores accepteurs serait facilité, le RET étant grandement dépendant de la distance qui sépare le donneur de l'accepteur. Deuxièmement, ce transfert d'énergie devrait se faire de façon à permettre l'excitation d'un grand nombre de fluorophores accepteurs avec un seul polymère donneur.

Pertinemment, le transfert énergétique se déroulant dans les architectures supramoléculaires comme nos agrégats semble se distinguer à plusieurs égards du transfert énergétique en solution entre deux molécules indépendantes. La proximité des chromophores et leur orientation au sein d'un complexe supramoléculaire semblent favoriser grandement les mécanismes de transfert énergétique, et les architectures des unités responsables de la photosynthèse en sont un bon exemple. Pertinemment, les mécanismes de transfert d'excitation dans des organismes photosynthétiques parmi les plus simples, les bactéries pourpres, ont été récemment décrits par un groupe de physiciens³⁸. Ces bactéries ont acquis au fil de leur évolution un système de collecte de lumière possédant une hiérarchie énergétique prononcée. Cette hiérarchie est composée d'un système d'états excités qui transportent l'excitation électronique des complexes de collecte de lumière extérieurs (light-harvesting complexes, LH-II) de la périphérie jusqu'au centre de réaction (entouré de LH-I). Les complexes de collecte de lumière sont composés de bactériochlorophylles et de caroténoïdes assemblés selon une structure annulaire très organisée qui réunit ces complexes (3 LH-II et un LH-I) autour du centre de réaction qui reçoit alors la lumière. L'énergie lumineuse étant réunie au même point, le centre de réaction, la photosynthèse proprement dite peut ensuite se produire. Cette configuration annulaire permet un transfert ultrarapide (subpicoseconde) et ultraefficace (>95%)³⁸ de l'excitation lumineuse du soleil au centre de réaction photosynthétique. De façon similaire, l'organisation des complexes polymère-sonde marquée au sein d'agrégats se formant spontanément en solution pourrait également permettre un transfert énergétique ultrarapide et efficace. Ces aspects seront discutés aux chapitres 5 et 6.

1.3 Objectifs spécifiques de la thèse

Nous avons vu à la section 1.1.1 que les quatre qualités d'un biocapteur idéal sont la sensibilité, la simplicité, la sélectivité et la polyvalence. L'objectif principal de ce projet de doctorat était de rapprocher le biocapteur polythiophène développé au laboratoire Leclerc le plus possible d'un biocapteur idéal en utilisant ses propriétés de fluorescence.

L'aspect très important de la sélectivité du biocapteur a été étudié en analysant des échantillons comprenant un ou plusieurs défauts dans leur séquence (voir chapitres 3 et 4). Tout d'abord, puisque la sensibilité de détection est un facteur essentiel, nous avons amélioré la limite de détection déterminée par spectrophotométrie UV-visible (10^{13} copies à 10^6 copies d'oligonucléotides d'ADN²⁴), avec un spectrofluorimètre commercial. Cette sensibilité de détection n'étant toujours pas suffisante, nous avons construit un fluorimètre prototype entièrement dédié à cette application (section 2.2.1.1). Nous avons aussi changé le milieu d'hybridation pour remplacer la solution tampon par un surfactant, le triton X-100 hydrogéné (voir section 2.1.1).

Pour vérifier la polyvalence du biocapteur développé, nous avons remplacé l'ADN cible par un brin de 50-mers plus long que la sonde de capture (voir chapitre 3). L'ARN étant de nature similaire à l'ADN, nous avons également fait une étude avec de l'ARN viral provenant du virus de la grippe, l'*Influenza*. Auparavant, le biocapteur polymérique développé était plus efficace avec de l'ADN (ou ARN) simple brin, il était important de pouvoir travailler directement avec de l'ADN double brin, l'ADN étant sous cette forme chez la plupart des organismes. Nous avons développé une méthode originale pour nous permettre de détecter directement l'ADN double brin sans interférences liées à la réhybridation de la double hélice (section 2.1.2). Nous avons ensuite appliqué cette méthode à la détection d'ADN humain comprenant ou non les mutations génétiques responsables de la *tyrosinémie* héréditaire (voir section 2.1.2 et chapitre 4).

Un deuxième objectif de ce projet de doctorat, après avoir atteint une limite de détection très compétitive pour l'ADN et étudié la sélectivité et la polyvalence du biocapteur, était d'expliquer le mécanisme d'amplification de signal de fluorescence menant

au superallumage. Dans cette optique, nous avons formulé les hypothèses qui ont été mentionnées dans la section précédente et effectué par la suite les travaux nécessaires pour y répondre. Au chapitre 5, une étude des propriétés de fluorescence des complexes ainsi que du transfert énergétique se déroulant dans ces derniers est présentée alors que nous avons étudié, au chapitre 6, l'autoassemblage des complexes en des agrégats supramoléculaires par diffusion de lumière, fluorescence et microscopie.

1.4 Références

- (1) Delvin, T. M. *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations (5th Edition)*; 5th ed.; John Wiley and Sons: New York, 2001.
- (2) Tortora, G. J., Fuke, B. R., Case, C. L. *Introduction à la microbiologie*; Éditions du renouveau pédagogique (ERPI), 2003.
- (3) Wikipedia, the free encyclopedia www.wikipedia.org
- (4) Greenfield, L, White, T. J., Ed.; ASM Press, 1993, p 664.
- (5) Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **1986**, *51*, 263-273.
- (6) Zhao, X.; Tapeç-Dytioco, R.; Wang, K.; Tan, W. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3476-3483.
- (7) Daar, A. S.; Thorsteinsdottir, H.; Martin, D. K.; Smith, A. C.; Nast, S.; Singer, P. A. *Nature Genetics* **2002**, *32*, 229-232.
- (8) Boissinot, M.; Bergeron, M. G. *Current Opinion in Microbiology* **2002**, *5*, 478-482.
- (9) Belgrader, P.; Elkin, C. J.; Brown, S. B.; Nasarabadi, S. N.; Langlois, R. G.; Milanovich, F. P.; Colston, B. W., Jr.; Marshall, G. D. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3446-3450.
- (10) Fuentes, M.; Mateo, C.; Rodriguez, A.; Casqueiro, M.; Tercero, J. C.; Riese, H. H.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J. M. *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *21*, 1574-1580.
- (11) Koh, C. G.; Tan, W.; Zhao, M.-q.; Ricco, A. J.; Fan, Z. H. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 4591-4598.
- (12) Iqbal, S. S.; Chambers, J. P.; Brubaker, R. R.; Goode, M. T.; Valdes, J. J. *Molecular and Cellular Probes* **1999**, *13*, 315-320.
- (13) Loeffler, J.; Dorn, C.; Hebart, H.; Cox, P.; Magga, S.; Einsele, H. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **2003**, *45*, 217-220.
- (14) Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.

- (15) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 365-370.
- (16) Saghatelian, A.; Guckian, K. M.; Thayer, D. A.; Ghadiri, M. R. *J Am Chem Soc* **2003**, *125*, 344-345.
- (17) Kavanagh, P.; Leech, D. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 2710-2716.
- (18) Nam, J.-M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
- (19) Kwakye, S.; Baeumner, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, 1062-1068.
- (20) Swager, T. M. *Abstracts of Papers, 220th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, August 20-24, 2000*.
- (21) Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10954-10957.
- (22) Lv, W.; Li, N.; Li, Y.; Li, Y.; Xia, A. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 10281-10287.
- (23) Lou, X.; Lewis Matthew, S.; Gorman Christopher, B.; He, L. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 4698-4705.
- (24) Ho, H. A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Dore, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angew Chem Int Edit* **2002**, *41*, 1548-1551.
- (25) Dore, K.; Dubus, S.; Ho, H. A.; Levesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M. G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.
- (26) Ho, H. A.; Dore, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Tanguay, R. M.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12673-12676.
- (27) Tsai, C.-Y.; Chang, T.-L.; Chen, C.-C.; Ko, F.-H.; Chen, P.-H. *Microelectronic Engineering* **2005**, *78-79*, 546-555.
- (28) Song, F.; Zhou, F.; Wang, J.; Tao, N.; Lin, J.; Vellanoweth, R. L.; Morquecho, Y.; Wheeler-Laidman, J. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, e72/71-e72/11.
- (29) Liu, M.; Liu, G.-Y. *Langmuir* **2005**, *21*, 1972-1978.

- (30) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078-1081.
- (31) Shirakawa, H.; Louis, E. J.; MacDiarmid, A. G.; Chiang, C. K.; Heeger, A. J. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1977**, 578-580.
- (32) Bouchard, J. Thèse de doctorat *Chimie*; Université Laval: Québec, 2005, p 200.
- (33) Corbeil, G. Mémoire de maîtrise en *Chimie*; Université Laval: Québec, 2003, p 89.
- (34) Arshady, R. *Desk Reference of Functional Polymers*; Oxford University Press, 1997.
- (35) Izumrudov, V. A.; Zhiryakova, M. V. *Macromolecular Chemistry and Physics* **1999**, *200*, 2533-2540.
- (36) Skoog, D. A., Fuke, J. H., Nieman T. A. *Principles of Instrumental Analysis*; 5th ed.; Thomson Brooks/Cole, 1997.
- (37) Panchuk-Voloshinaa, N., Hauglanda, R. P., Bishop-Stewart, J., Bhalgata, M. K., Millarda, P. J., Maoa, F., Leunga, W.-Y.; Hauglanda, R. P. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **1999**, Vol 47, 1179-1188.
- (38) Hu, X.; Damjanovic, A.; Ritz, T.; Schulten, K. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, *95*, 5935-5941.

CHAPITRE 2

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET INSTRUMENTATION

Partie 2.1 Détermination des meilleures conditions expérimentales pour la détection d'ADN

2.1.1 Détection d'oligonucléotides d'ADN

Lorsque nous avons débuté ces travaux, le but premier était de faire la détection par fluorescence de séquences modèles d'oligonucléotides d'ADN et de trouver les meilleures conditions expérimentales possibles pour ce faire. On retrouve ces séquences modèles au tableau 2.1. Il est important de mentionner que le polymère biocapteur a été synthétisé et purifié selon la méthodologie présentée à la section 3.6.1.

Tableau 2.1 Séquences des oligonucléotides modèles utilisés

Nom	Séquence d'oligonucléotides	Levure
Sonde X1	5'-CATGATTGAACCATCCACCA-3'	<i>Candida albicans</i>
Cible Y1	3'-GTACTAACTTGGTAGGTGGT-5'	<i>Candida albicans</i>
Cible Y2	3'-GTACTAACTT <u>CG</u> AAGGTTGGT-5'	<i>Candida dubliniensis</i>
Cible Y3	3'-GTACTAACTT <u>CG</u> TAGGTTGGT-5'	-
Cible X2-L	5'-GGAATGGTGACAACATGATTGAAGCTTCCACCAACTGTCC ATGGTACAAG-3'	-

La sonde X1 est parfaitement complémentaire à la séquence cible Y1, ces séquences provenant d'une région conservée du génome de la levure *Candida albicans*. La séquence cible Y2 n'est pas parfaitement complémentaire à la sonde, elle possède deux défauts dans sa séquence (bases soulignées). Cette séquence provient du génome d'une autre levure: *Candida dubliniensis*. La cible Y3 possède un seul défaut par rapport à la sonde, la séquence par contre ne correspond à aucune espèce particulière, mais est très utile pour tester la spécificité de notre biocapteur. La cible X2-L de 50 unités de long a été utilisée (avec la cible Y1 en tant que sonde) pour vérifier que notre biocapteur pouvait détecter l'hybridation d'une cible plus longue que la sonde (chapitre 3). Les levures *Candida albicans* et *Candida dubliniensis* sont responsables d'infections génitales de type vaginite, la levure *Candida dubliniensis* causant des infections beaucoup plus sérieuses¹. Pouvoir faire la distinction entre ces deux pathogènes était donc intéressant pour nos collègues biologistes du CRI (*Centre de recherche en infectiologie* situé au Centre hospitalier de l'Université Laval). Ces séquences modèles ont été utilisées pour la plupart des expériences présentées aux chapitres 3 et 4 et aussi pour quelques expériences présentées au chapitre 5.

Nous avons d'abord fait des études pour trouver les conditions expérimentales favorisant la détection efficace de ces séquences modèles. Au cours de ces travaux nous avons fait l'essai de divers sels et solvants utilisés habituellement dans les réactions d'hybridation de l'ADN. Entre autres, nous avons essayé les solutions tampon de type Tris-HCl ou Tris-EDTA (tampon pH 7-8, contenant 10 mM de Tris). Nous avons aussi essayé plusieurs sels comme les chlorures de sodium, de calcium et de magnésium. Nous avons déterminé que pour les expériences en fluorescence, le meilleur milieu était une solution aqueuse de NaCl 0,1 M dans le tampon Tris². Aussi, comme la température influence beaucoup la stabilité de la double hélice d'ADN, nous avons voulu savoir comment elle influençait la stabilité des complexes formés avec le polymère. Nous avons alors déterminé par fluorescence le domaine de température pour lequel le duplex et le triplex étaient stables. Les valeurs trouvées recourent celles déterminées par UV-Visible³, c'est à dire de 20°C à 60°C pour le duplex et de 45°C à 80°C pour le triplex, toujours avec les séquences modèles et dans 0,1 M NaCl. Il est intéressant de souligner qu'habituellement, les doubles hélices d'ADN formées d'oligonucléotides de 20 unités ont une température de fusion

autour entre 60°C et 75°C⁴, ce qui est inférieur d'environ 10°C à la température de fusion de la double hélice d'ADN liée au polymère ($\approx 80^\circ\text{C}$). Ce dernier a donc un effet stabilisateur sur la double hélice. Les forces électrostatiques, qui peuvent être presque aussi fortes qu'un lien covalent, liant le polymère à l'ADN sont sans aucun doute responsables de cette stabilisation. Nous discuterons de ce rôle stabilisateur de notre biocapteur plus en profondeur dans la section 2.1.2.

Par ailleurs, nous avons pris connaissance de publications décrivant la forte influence des surfactants sur les propriétés luminescentes des polymères conjugués solubles dans l'eau^{5,6}. Cet effet est relié selon Chen⁵ *et al* à une augmentation du coefficient d'extinction molaire et du rendement quantique de fluorescence due à l'éloignement des molécules d'eau interfaciales et à la formation de chaînes polymères plus étendues. C'est pourquoi nous avons fait des recherches sur le sujet et essayé d'incorporer quelques surfactants non-ioniques couramment utilisés (Tween 20, Tween 80, Triton X-100 hydrogéné ou non, Triton X-405 hydrogéné, Brij 56, Brij 58, Brij 35, Brij 30, Span 20 et Span 80; tous achetés chez Sigma-Aldrich) dans les solutions où nous détectons l'ADN. Certains surfactants inhibaient l'hybridation de l'ADN (Brij 30, Span 80, Tween 80), d'autres n'avaient aucun effet notable (Triton X-405 hydrogéné, Brij 56, Brij 58, Brij 35), alors que d'autres augmentaient le contraste entre le duplex et le triplex mais généraient un bruit de fond trop élevé (Tween 20, Triton X-100). Par contre, nous avons observé que la présence de 0,3 mM de Triton X-100 hydrogéné (HTX-100) augmentait la fluorescence du polymère complexé avec l'ADN, et ce lorsque la concentration en polymère était très faible. C'est pourquoi nous avons alors changé notre mode opératoire pour ajouter ce surfactant aux solutions. En effet, nous avons évalué que l'ajout de HTX-100 à nos solutions améliorait nos limites de détection pour l'ADN d'un facteur 10⁷. L'effet du surfactant pourrait aussi être au niveau d'une meilleure solubilisation des unités de duplex agrégées les unes sur les autres. Le fait d'être entourés de surfactant pourrait réduire le nombre d'unités dans les agrégats, ce qui rendrait le duplex plus disponible pour l'hybridation avec l'ADN cible. Nous avons donc déterminé que ce milieu d'hybridation (0,1 M NaCl, 0,3 mM HTX-100) conférait la meilleure sensibilité et sélectivité possibles pour faire la détection d'ADN ou d'ARN simple brin⁷.

2.1.2 Détection d'ADN double brin

La détection directe d'ADN double brin est un défi beaucoup plus grand que la détection d'ADN simple brin. Dans le cas de la détection d'ADN double brin, la réaction d'hybridation entre la sonde et la cible est en compétition avec la réaction de réhybridation de l'ADN double brin⁸⁻¹⁰. Conséquemment, la plupart des méthodes ultrasensibles de détection d'ADN, qu'elles soient disponibles commercialement ou en développement, reposent sur la disponibilité de la séquence cible sous la forme simple brin¹¹⁻¹⁷. Comme l'ADN humain et bactérien est naturellement sous la forme double brin, ce serait avantageux de pouvoir le détecter ainsi, sans avoir à amplifier et/ou purifier l'ADN cible. En contrepartie, notre biocapteur est aussi mieux adapté à la détection d'ADN simple brin. Il a été observé² que la présence d'ADN double brin dans l'échantillon pourrait conduire à des faux positifs, cela du à l'affinité supérieure du polymère pour les double hélices par rapport à l'ADN simple brin. Même si le problème pourrait être réglé en isolant la séquence cible de son brin complémentaire par PCR asymétrique, chromatographie ou une capture à l'aide de billes magnétiques⁸⁻¹⁰; ces techniques d'isolation de la séquence cible peuvent donner de faibles rendements d'ADN et augmentent considérablement le temps et la complexité du test. La figure 2.1 illustre les réactions en compétition lorsqu'on veut détecter de l'ADN double brin. En présence d'ADN double brin, le complexe polymère-sonde a donc tendance à se séparer et le polymère à s'enrouler autour de la double hélice (dessin du bas). La réaction désirée, la réaction de reconnaissance, se trouve en haut de la figure.

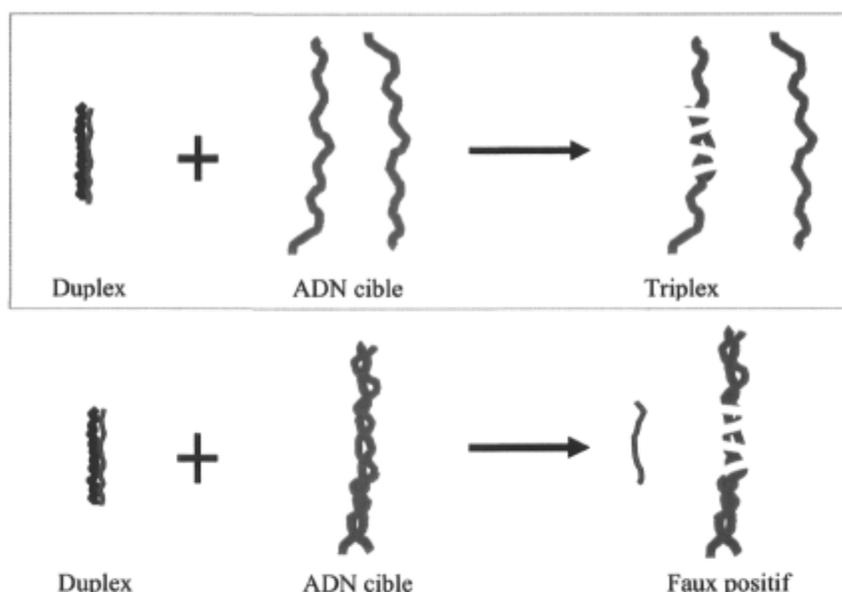


Figure 2.1 Réactions en compétition lors de la détection d'ADN double brin

Il est tout de même possible de faire la détection d'ADN double brin avec notre biocapteur avec les conditions expérimentales déterminées pour l'ADN simple brin (0,1 M NaCl et 0,3 mM HTX-100). Par contre, la sensibilité de détection est de beaucoup inférieure à celle de l'ADN simple brin, 10^{12} copies d'ADN double brin sont détectables alors qu'il est possible de détecter aussi peu que 220 copies d'ADN simple brin avec la même technique⁷. Nous pensons que cette sensibilité inférieure peut être expliquée par les réactions de compétitions décrites par la figure 2.1. Le polymère, polycationique, a une affinité supérieure pour les doubles hélices d'ADN, ce qui est majoritairement dû à la densité de charge supérieure de l'ADN double brin comparée à l'ADN simple brin. Nous pensons que cet aspect facilite l'hybridation pour la réaction de reconnaissance. La formation du triplex est alors aidée par trois processus; l'augmentation de la stabilité de l'ADN par la formation de la double hélice, l'effet écran local des charges positives du polymère qui facilite l'hybridation ainsi que l'affinité supérieure du polymère pour les doubles hélices. Conséquemment, à concentration élevée, le signal de la réaction de reconnaissance est supérieur au signal du faux positif; à basse concentration, la réaction

résultant d'un faux positif est préférée. À faible concentration, la réaction de réhybridation est plus facile; il y a du sel en solution donc le polymère n'a pas à jouer ce rôle et le brin d'ADN complémentaire se trouve nécessairement plus près du brin d'ADN cible que la sonde. La distinction entre le signal produit par l'ADN double brin complémentaire à la sonde et n'importe quel ADN double brin est donc difficile.

Par ailleurs, nous avons trouvé une nouvelle procédure expérimentale, en utilisant notre transducteur polymère cationique, qui nous affranchit totalement des interférences dues à la réhybridation de l'ADN double brin. Le principe fondamental de cette méthode réside dans l'habileté du transducteur polymère de permettre l'hybridation de l'ADN dans l'eau pure à haute température, des conditions qui normalement empêchent toute réaction d'hybridation. On remarque que pour que la réaction de reconnaissance (dessin du haut, figure 2.1) soit favorisée, l'ADN double brin doit être dénaturé. Comme les interactions entre le polymère et l'ADN sont de type électrostatique et surtout parce que la température et la force ionique sont deux paramètres qui influencent énormément la réaction d'hybridation, il a été possible de trouver des nouvelles conditions expérimentales favorisant sélectivement cette réaction de reconnaissance, où l'ADN double brin est maintenu sous la forme de deux simples brins. En faisant écran entre les deux brins d'ADN qui portent une charge négative par unité de répétition, la présence de cations (Na^+ , K^+ , provenant des sels dissous en solution) permet l'appariement des deux brins d'ADN, l'hybridation. Donc le sel favorise l'hybridation avec la sonde mais aussi bien la réhybridation de l'ADN analyte sous forme double brin. L'eau pure est donc un mauvais milieu pour l'hybridation d'ADN.

De façon similaire, les températures élevées déstabilisent les doubles hélices d'ADN. Conséquemment, la température d'appariement de l'ADN, qui est la température à laquelle l'ADN se réhybride, décroît proportionnellement avec la concentration en sel. Nous voulions savoir quelle concentration en sel nous permettrait de maintenir d'ADN double brin dénaturé. Dans ce dessein, nous avons utilisé le transducteur polymère pour suivre la réaction d'appariement de l'ADN (figure 2.2). Un excès de polymère (5×10^{13} copies) a été mélangé à des amplicons sauvages (4×10^{11} copies, amplicons générés à partir

de la séquence non-mutée de la *tyrosinémie* héréditaire, voir chapitre 4) dans 2,5 mL de solutions aqueuses contenant 0,2, 0,04 et 0,004 M de NaCl (les mesures avec une concentration inférieure en sel ne donnant pas un contraste suffisant sur le signal de fluorescence). L'intensité de fluorescence du complexe formé d'ADN double brin et du polymère a donc été utilisée pour suivre la température d'appariement de l'ADN. Premièrement, la température a été maintenue à 95°C pendant 10 minutes pour assurer une dénaturation complète de l'ADN double brin. Ensuite, la fluorescence a été enregistrée pendant que la température descendait lentement (3°C/min) jusqu'à 30°C. Une augmentation drastique de la fluorescence était alors observée lorsque l'ADN se réhybridait. La température d'appariement a été définie comme la température à mi-transition. En ce qui concerne l'incertitude associée à la détermination de ces températures d'appariement, les biologistes du CRI nous ont affirmé qu'une incertitude estimée de $\pm 2^\circ\text{C}$ était réaliste (voir figure 2.2.). Finalement les températures d'appariement ainsi déterminées ont été tracées en graphique en fonction de la concentration en sel, en utilisant Microcal Origin 6.0 TM pour obtenir une corrélation linéaire (coefficient $R^2 = 0,99321$) entre les données de température avec une échelle logarithmique pour l'axe des concentrations. Il est important de noter qu'il s'agit de la première démonstration de l'usage du polymère pour suivre la température d'appariement de l'ADN, ce dernier pourrait donc être un outil utile pour la recherche en biotechnologie. Nous avons au départ essayé d'utiliser les marqueurs habituellement utilisés en biologie pour suivre cette réaction, mais aucun ne donnait de signal si la concentration en sel descendait sous 0,1 M NaCl. Cela constitue une autre preuve que l'hybridation de l'ADN est possible dans l'eau pure seulement si un sel local comme notre transducteur polymère est présent pour assister l'hybridation.

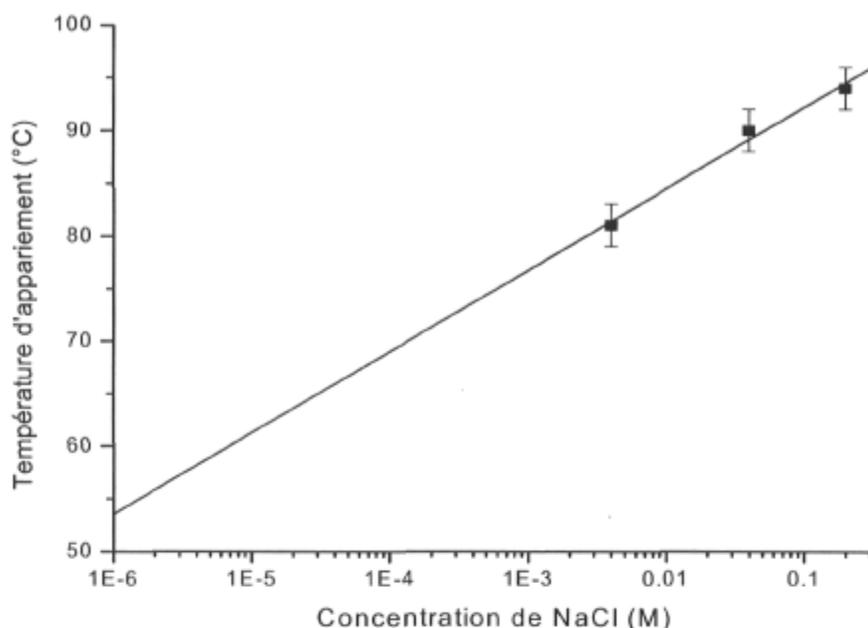


Figure 2.2 Température d'appariement d'ADN double brin révélée par le polymère en fonction de la concentration en sel de la solution

Comme on voit à la figure 2.2, l'extrapolation de la courbe de la température d'appariement à une concentration en sel minimale (10^{-6} M) indique que l'ADN double brin dénaturé va se réhybrider à toute température inférieure à 54°C . Cela veut dire qu'à une température égale ou supérieure à 54°C , l'ADN double brin dénaturé va rester sous la forme de simple brin dans une solution de salinité très faible. Aussi, on peut assumer qu'une température de 65°C sera suffisante pour maintenir la dénaturation d'à peu près tous les types d'ADN double brin.

L'importance de la force ionique est donc cruciale pour la réaction d'hybridation, elle l'est tout autant pour la stabilité du complexe polymère-sonde. Comme on voit à la figure 2.1, la détection spécifique d'ADN est possible seulement si le complexe polymère-sonde reste intact. Des études antérieures ont montré que le duplex était déstabilisé à des températures dépassant 60°C dans des solutions contenant $0,1$ M NaCl³. Nous avons étudié l'effet de la température sur la stabilité du duplex, cette fois en considérant aussi l'effet du sel (figure 2.3). Pour faire cette expérience, nous avons mélangé en quantité

stœchiométriques (en équivalents de charges) le polymère et la sonde d'ADN de 15 unités (sonde spécifique à la tyrosinémie héréditaire, voir chapitre 4) pour obtenir une concentration de $2,4 \times 10^{11}$ copies/ μL de duplex. Ensuite, 100 μL de cette solution a été placé dans une cellule de quartz (Starna) avec 2,5 mL d'eau Nanopure. Les spectres ont été pris avec un spectrofluorimètre Cary Eclipse de Varian avec les configurations suivantes: fentes de 10 nm, voltage appliqué au détecteur de 1000 V, vitesse de balayage 200 nm/min et temps d'intégration de 1 s.

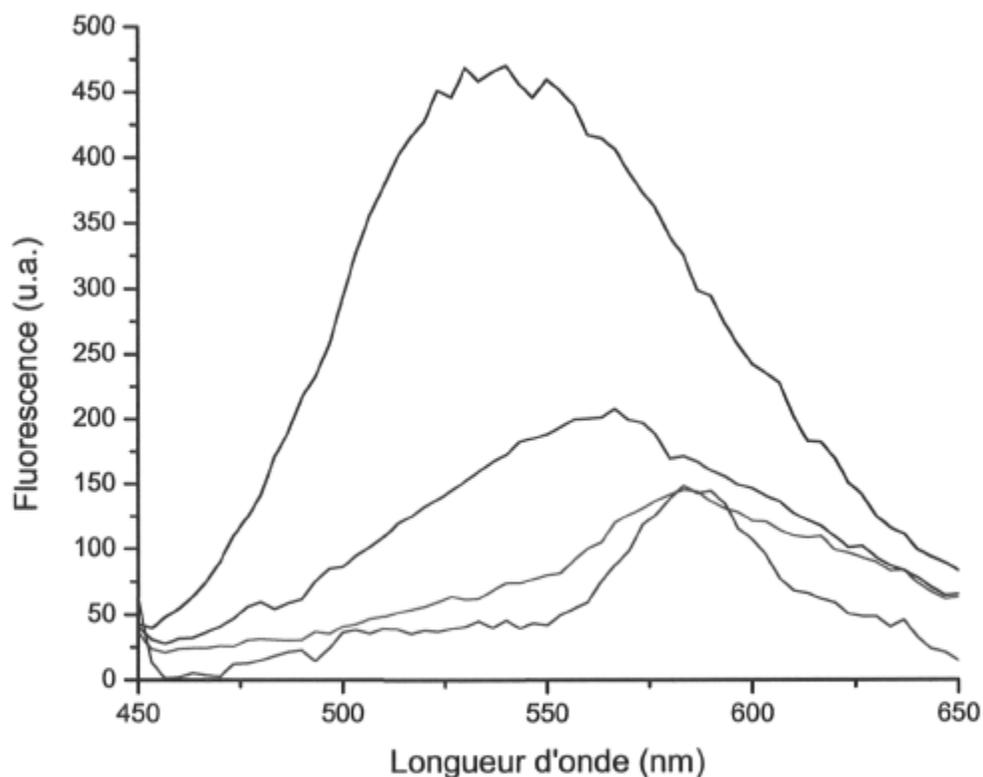


Figure 2.3 Spectres du complexe polymère-sonde dans diverses conditions. En mauve, le spectre du duplex dans l'eau à 40°C, en rouge, le même complexe chauffé à 65°C, en bleu, le duplex dans 10^{-5} M NaCl à 65°C et en noir, le duplex dans 0,2 M NaCl à 65°C, spectre identique à celui du polymère seul

Comme on voit à la figure 2.3 (courbe rouge), nous avons découvert que dans l'eau pure, le duplex était stable à une température aussi haute que 65°C. Cette stabilité

thermique est une conséquence de la force combinée des 15 liens électrostatiques entre le polymère et la sonde ainsi que de l'absence de cations compétitifs en solution. Ceci étant démontré par la courbe bleue de la figure 2.3 où l'on voit qu'une trace de sel (10^{-5} M) suffit à déstabiliser le complexe à cette température relativement élevée. En présence d'encore plus de cations compétitifs, le duplex se sépare complètement et le polymère est libéré en solution (courbe noire figure 2.3). Cela suggère encore une fois que notre transducteur polymère cationique peut agir comme un sel en solution et fournir l'effet d'écran des cations aqueux nécessaire à l'hybridation, induisant alors l'hybridation de l'ADN cible seulement près du polymère, donc l'hybridation avec la sonde. En travaillant dans l'eau pure à 65°C, on limite la réaction de réhybridation pour ne favoriser l'hybridation d'ADN qui est localisée seulement où se trouve le polymère chargé; la réaction de reconnaissance.

Nous nous sommes assurés de la dénaturation de l'ADN double brin à des températures supérieures à 54°C dans des solutions de très basse salinité et de la stabilité du duplex dans l'eau pure à 65°C, nous pouvons donc maintenant détecter de l'ADN double brin sans aucun effet dû à la présence d'ADN double brin non spécifique. De façon à démontrer la validité de cette approche, nous avons fait la détection de polymorphismes mononucléotidiques dans de l'ADN génomique humain. La maladie génétique ciblée est la *tyrosinémie* héréditaire, une maladie très sérieuse dont l'incidence au Québec est assez élevée¹⁸. On voit à la figure 2.4 une courbe d'étalonnage représentant la détection d'amplicons mutés ou sains. La sonde d'ADN de 15 unités utilisée est complémentaire à l'ADN sain. Le mode opératoire pour obtenir cette courbe d'étalonnage est le même que celui décrit à la section 3.6.2, excepté bien sur la température de 65°C et l'eau pure comme milieu de détection. Les amplicons ont aussi été dénaturés pendant 10 minutes à 100°C avant d'être ajoutés dans la cellule de fluorescence.

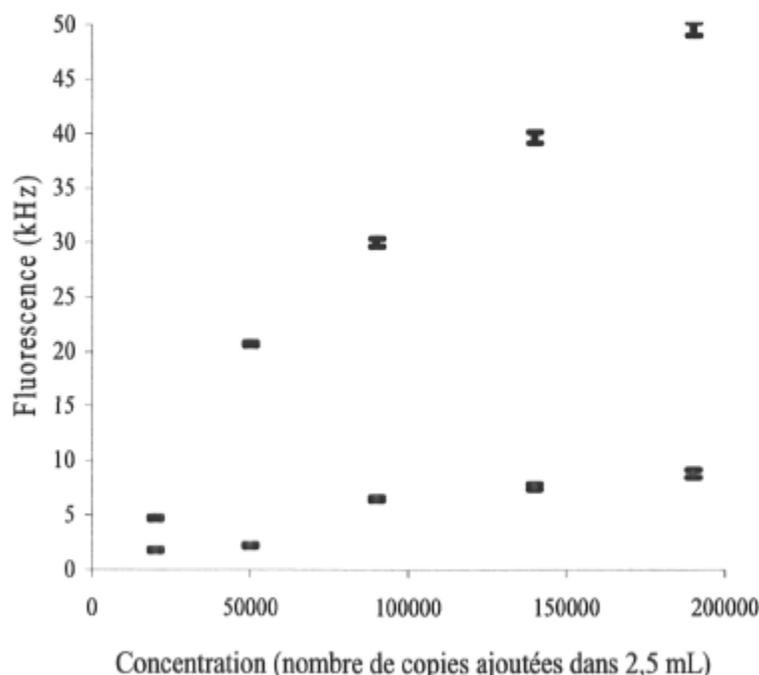


Figure 2.4 Détection d'amplicons à 65°C dans l'eau pure avec une sonde saine. En bleu, détection d'amplicons sains, en rouge, amplicons mutés

On remarque à la figure 2.4 qu'on peut facilement distinguer les amplicons mutés des amplicons sains, cela représente la détection d'un polymorphisme mononucléotidique dans de l'ADN double brin de 132 paires de bases. L'axe des x est gradué en nombre de copies ajoutées au volume total de réaction, comme cela est prévu dans un test réel. On peut voir que les ajouts varient entre 2×10^4 copies à 2×10^5 copies, donc la quantité d'ADN génomique présent dans 1 mL de sang ($\approx 10^7$ copies¹⁹) sera facilement détectable avec notre technique.

Pour prouver hors de tout doute l'applicabilité de notre biocapteur pour la détection de mélanges complexes d'ADN double brin, nous avons testé l'ADN extrait de trois volontaires humains sains pour la *tyrosinémie* héréditaire. L'ADN a été extrait selon un protocole d'extraction établi¹⁹ et la procédure expérimentale utilisée est la même que pour la figure 2.4. Les résultats sont montrés au tableau 2.1, on remarque que le signal obtenu avec la sonde complémentaire (saine) est supérieur au signal obtenu avec la sonde

comprenant 1 seul défaut dans sa séquence (mutée) d'environ 27 kHz pour les trois échantillons. Cela démontre l'applicabilité de notre nouvelle méthode expérimentale pour détecter sélectivement un brin d'ADN cible lorsque le génome humain entier est présent. Nous avons aussi testé de l'ADN extrait par différentes méthodes pour voir si elles étaient compatibles avec notre méthode de détection avec le polymère. Nous avons ainsi testé l'ADN extrait avec les troussees commerciales des compagnies Promega™, Quiagen™ et MagaZorb™. De ces troussees commerciales, seule celle produite par Promega™ a permis une détection sélective de l'ADN génomique. Il est possible que les autres méthodes d'extraction donnent de l'ADN contenant des impuretés (comme des sels) qui interfèrent avec la détection sélective avec le polymère qui doit s'effectuer dans un milieu contenant aucun ou très peu de sels en solution.

Tableau 2.2 Détection de la *tyrosinémie* héréditaire dans des échantillons sanguins

Échantillon	Hybridation avec sonde saine	Hybridation avec sonde mutée	Différence de signal
	Signal de fluorescence corrigé (triplex – duplex) kHz		
1	38,3 ± 0,4	12,2 ± 0,9	26 ± 1
2	60,0 ± 0,5	25,8 ± 0,9	34 ± 1
3	18,8 ± 0,2	-1,1 ± 0,1	19,9 ± 0,3

Nous avons donc développé une méthode qui nous permet de faire la détection directe de l'ADN double brin, ce qui était impossible avant à des niveaux convenables de sensibilité cela dû au problème des faux positifs. Cette nouvelle méthode permet de maintenir la dénaturation de l'ADN double brin tout en permettant l'hybridation d'ADN seulement à proximité du transducteur polymère qui assume alors un double rôle; celui du sel en faisant écran entre les charges négatives de l'ADN et celui de traduire l'évènement de reconnaissance en devenant fluorescent pendant l'hybridation de l'ADN cible avec la sonde. Nous voulions d'ailleurs breveter cette méthode, ce double rôle que peut jouer le polymère, mais malheureusement pour nous, une équipe a breveté une méthode semblable tout juste avant nous²⁰. Finalement, la sensibilité de détection de cette nouvelle approche

permettrait de faire au moins 500 tests avec le matériel génétique extrait d'un millilitre de sang, ce qui pourrait mener au développement d'un test de dépistage multiparamétrique pour les maladies héréditaires qui pourrait ultimement remplacer le séquençage complet du génome qui est utilisé habituellement pour cette application. De plus, comme cette nouvelle approche permet d'induire l'hybridation d'ADN sans aucun sel en solution, elle pourrait être très utile pour caractériser les interactions entre l'ADN et d'autres macromolécules (comme les protéines) et ainsi distinguer les interactions hydrophobes des interactions électrostatiques.

2.1.3 Détection d'ADN avec le superallumage

Les conditions expérimentales pour faire la détection d'oligonucléotides ainsi que pour faire la détection d'ADN double brin ont dues être adaptées à la nouvelle stratégie de détection impliquant le superallumage (voir chapitre 4). La modification majeure se situe dans la proportion en solution des différents complexes. Pour faire la détection d'ADN avec le polymère seul, on s'assurait que la proportion de brin complémentaire ajouté soit égale au nombre de sondes d'ADN, aussi égale au nombre d'unités de répétition du polymère divisé par le nombre bases de la sonde. De cette façon, les charges étaient parfaitement neutralisées dans le duplex; puis un excès de charges négatives provenant du brin d'ADN complémentaire venaient aider à solubiliser la forme triplex. Lorsqu'on construisait une courbe d'étalonnage, pour faire chaque point on ajoutait d'abord la quantité manquante de duplex, puis, après stabilisation, on ajoutait la quantité de brin complémentaire à détecter. Avec notre nouvelle stratégie de détection, un excès important de duplex marqué doit être présent en solution pour observer l'amplification du signal de fluorescence (phénomène de superallumage). Nous avons donc déterminé qu'une proportion d'un milliard de duplex par copie d'ADN à détecter menait aux meilleures efficacités de détection²¹. Lorsqu'on construit une courbe d'étalonnage, l'excès de duplex est si important qu'il est inutile d'ajouter des molécules de duplex entre les ajouts de brins complémentaires à détecter, la procédure est donc simplifiée.

Le phénomène d'amplification est basé sur un transfert énergétique dans des agrégats tubulaires de duplex qui ont la faculté de devenir fluorescents lorsque peu de triplexes sont formés au sein du dit agrégat. Le maintien d'un état agrégé est donc crucial pour obtenir la sensibilité de détection apportée par l'amplification de la fluorescence. C'est pourquoi l'utilisation d'un surfactant n'est pas appropriée. De plus, nous avons observé par diffusion statique de la lumière que la présence de 0,1 M NaCl résultait d'une agrégation très importante des duplex marqués. Cette agrégation ne menant pas à la formation des micelles tubulaires, il n'est donc pas souhaitable d'ajouter du NaCl aux solutions. Nous avons déterminé que le meilleur solvant pour faire la détection d'ADN simple ou double brin avec le superallumage est l'eau pure stérile. La température choisie pour l'hybridation d'oligonucléotides est 55°C et celle pour la détection d'ADN double brin est 65°C, il n'y a donc pas de changement de température par rapport à la méthode de détection avec le polymère.

Partie 2.2 Fluorescence

La fluorescence est la technique que nous avons le plus utilisée, étudiée et approfondie au cours de ces études de doctorat. Autant que pour faire la détection ultrasensible d'ADN, la fluorescence nous a permis de caractériser notre biocapteur polymère et les phénomènes se produisant lors du processus de détection.

2.2.1 Fluorescence en mode statique

Au tout début du projet, nous avons d'abord travaillé sur quelques aspects théoriques de la fluorescence pour mieux comprendre leurs implications sur la détection d'ADN avec notre biocapteur polymère. Premièrement, certains sels contenant des atomes relativement lourds comme les chlorures peuvent avoir un effet d'extinction de la fluorescence en favorisant un croisement intersystème ce qui change le spin de l'état excité diminuant ainsi le nombre de molécules pouvant émettre de la fluorescence²². En regardant la fluorescence du polymère seul en présence d'une concentration croissante d'ions chlorures, nous avons observé une diminution de 40% du signal de fluorescence lorsque la concentration en ions chlorures atteint 0,5 M. Nous avons fait la même expérience avec des ions nitrates et observé aucune diminution du signal de fluorescence. Nous avons donc conclu que l'extinction de fluorescence avec les ions chlorures était observable avec le biocapteur polymère et que l'effet n'était plus perceptible avec un sel ne contenant pas d'atomes lourds. Comme l'hybridation de l'ADN se fait habituellement en présence de NaCl, nous avons voulu voir si l'effet d'extinction de fluorescence des ions chlorures avait un impact sur la fluorescence des espèces duplex et triplex. Nous avons observé que la fluorescence du duplex et du triplex augmentait pour une concentration d'ions chlorures allant de 0,001 à 0,06 M (correspondant à 0,002 à 0,1 M NaCl) puis diminuait de façon importante pour une concentration d'ions chlorures de 0,13 M (0,2 M NaCl). Nous pensons que l'augmentation de la fluorescence du duplex en présence de NaCl est due à l'augmentation de sa stabilité et de sa solubilité en solution saline en raison de sa nature de

complexe polyélectrolyte neutre. Pour le triplex, l'augmentation de fluorescence peut s'expliquer par une meilleure hybridation de l'ADN. On observe aussi que l'extinction de fluorescence par les ions chlorures a lieu si la concentration en chlorures est supérieure à 0,06 M. La concentration en NaCl a donc été fixée à 0,1 M pour la détection d'ADN avec le polymère seul (sans sonde marquée) de façon à favoriser la formation des complexes tout en diminuant l'impact de l'extinction de la fluorescence par les ions chlorures.

Nous avons aussi caractérisé la photostabilité des espèces étudiées pour savoir si elles étaient sensibles à la photodégradation. Nous avons d'abord comparé l'intensité de fluorescence du polymère, du duplex et du triplex avec le spectrofluorimètre SLM-Aminco série II sur une période de 10 minutes. Pour le polymère seul, l'intensité de fluorescence diminue considérablement, elle chute d'environ 85% de sa valeur initiale en 10 minutes. Pour le duplex et le triplex, une baisse d'intensité de seulement $\approx 15\%$ est observée. En diminuant l'intensité de la lumière excitatrice avec des filtres neutres, nous avons pu réduire la photodégradation du polymère. Ainsi, avec des filtres neutres laissant passer 32%, 20% et 10% de la lumière excitatrice, l'effet de la photodégradation est de moins en moins visible pour être inexistant avec le filtre 10%. Compte tenu de ces résultats montrant que les espèces étudiées sont sensibles à la photodégradation, nous avons, lors des expériences de détection d'ADN, minimisé le temps d'exposition à la lumière excitatrice. Plus tard dans le projet nous avons fait une expérience similaire pour comparer la photostabilité du triplex marqué à celle du triplex non-marqué (chapitre 5). Nous avons alors démontré que l'encapsulation des molécules fluorescentes à l'intérieur des agrégats de forme bâtonnet protégeait ces dernières de la photodégradation.

Le rendement quantique de fluorescence, qui représente le pourcentage de fluorophores excités qui émettent de la fluorescence, est une caractéristique importante des fluorophores. On retrouve au chapitre 5 la méthodologie utilisée pour déterminer le rendement quantique de fluorescence des espèces étudiées. Nous avons déterminé que le rendement quantique du polymère qui initialement était de 3% pouvait être augmenté lorsque ce dernier se retrouvait au sein des agrégats de triplexes marqués pour atteindre près de 100% lorsqu'il y a au moins 100 équivalents de duplex pour chaque triplex (voir

chapitre 5). Le transfert énergétique résonnant joue aussi un rôle très important dans l'amplification de signal observée avec les sondes marquées. Pour mieux caractériser le mécanisme de transfert énergétique, nous avons mesuré l'efficacité du RET dans nos agrégats en fonction du nombre de triplexes formés. La description et les résultats de ces études se trouvent au chapitre 5, on trouve aussi à la section 2.2.2 une description des études faites en fluorescence résolue dans le temps. Les études de caractérisation du polymère et de ses complexes ont été majoritairement réalisées avec deux spectrofluorimètres commerciaux (SLM-Aminco série 2 et Varian Cary-Eclipse); les paramètres spécifiques de ces appareils étant donnés lorsque nécessaires dans les sections expérimentales des articles présentés aux chapitres 3 à 6. Par contre, les expériences de détection d'ADN ont presque toutes été effectuées avec un fluorimètre développé dans notre laboratoire spécifiquement pour cette application, cet appareil est décrit à la section suivante.

2.2.1.1 Le fluorimètre

De façon à détecter le plus efficacement possible la fluorescence émise par le triplex, un fluorimètre a été développé lors du premier été de stage en 2001. Nous nous sommes basés sur les indications du livre d'analyse instrumentale d'Ingle and Crouch²³ de façon à construire un appareil permettant d'obtenir le meilleur rapport signal sur bruit sur nos mesures de fluorescence ainsi que sur un prototype similaire particulièrement performant²⁴. La figure suivante illustre la disposition de la source ainsi que des composantes optiques dans le fluorimètre.

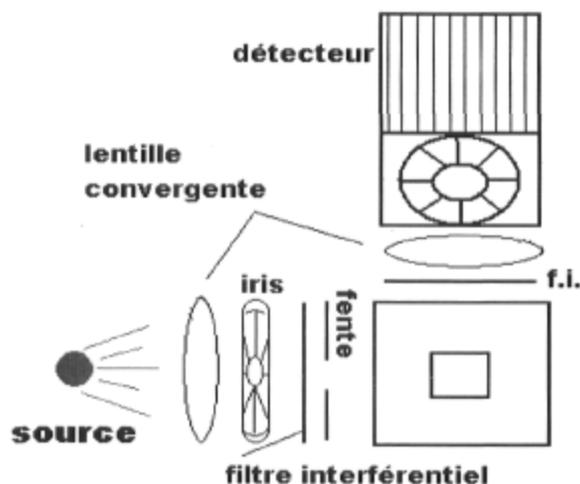


Figure 2.5 Schéma du montage expérimental²⁵

Le détecteur est placé à angle droit par rapport à l'axe optique de la source, une diode bleue. Une lentille convergente placée juste devant la diode (LUXEON modèle L2POP005) permet de récolter le plus possible la lumière et de la focaliser au centre de l'axe optique. La lumière traverse ensuite un iris qui permet de mieux la collimer, l'ouverture optimale de cet iris ayant été déterminée par Maryse Brunette²⁵. Un filtre interférentiel de 425 nm (CVI Laser Corporation) laisse seulement passer la lumière ayant cette longueur d'onde, nécessaire à l'excitation du triplex. Tout au bout du tube optique se trouve une fente, dont la largeur et la hauteur ont été optimisées de façon à maximiser le rapport signal sur bruit par Maryse Brunette²⁵. La mince fente de lumière bleue atteint alors l'échantillon en solution placé dans la cuvette. La fluorescence émise par celui-ci est récoltée à 90° en passant d'abord par un filtre interférentiel de 530 nm ou 575 nm (Corion XM530 et XM575 respectivement), une lentille convergente (CVI Laser Corporation) permet ensuite d'augmenter l'angle de collecte de la fluorescence qui frappe alors la photocathode du détecteur, où chaque photon émis sera compté. De chaque photon s'ensuit une rafale de $10^5 - 10^6$ électrons qui eux peuvent être détectés individuellement à l'anode en tant qu'impulsion. Chaque impulsion est alors comptée durant un intervalle de temps donné (qui peut être choisi), et le signal de fluorescence correspondant est traduit en unité de fréquence.

Comme la diode émet une certaine quantité de chaleur lors de son fonctionnement, un dissipateur de chaleur a été placé à l'arrière, une accumulation de chaleur étant susceptible d'altérer le spectre de luminosité de la source. De plus, un module de translation linéaire permet d'ajuster, latéralement et verticalement, la position de l'axe optique d'excitation par rapport à l'échantillon se trouvant dans le porte-cuvette. Ce dernier, de taille standard, se situe alors au centre de la chambre noire. Un serpentin creusé à l'intérieur du porte-cuvette permet aussi la circulation d'eau, en le reliant à un bain thermostaté (Fisher Scientific 1006 P), il est possible d'effectuer les expériences de fluorescence à la température désirée. Les solutions d'échantillons étaient placées dans des cuvettes en quartz (Starna Cells) parcours optique de 10 mm (format standard). Nous avons déterminé, en imageant la lumière excitatrice à l'intérieur du porte-cuvette, le volume maximal de solution pouvant être excité par la diode bleue. Ce volume, 150 μL , est utilisé (chapitre 3) pour calculer le nombre de copies de triplex responsables du signal de fluorescence.

Nous avons donc développé une plateforme de détection qui est particulièrement simple et performante. Elle a été utilisée pour presque toutes les expériences où l'on fait la détection ultrasensible d'ADN (voir chapitres 3 et 4). Nous utilisons un design optique non dispersif, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont sélectionnées par des filtres, ce qui augmente de beaucoup l'efficacité de la collecte de lumière. Cette caractéristique, combinée avec l'efficacité de la source et du détecteur, nous permet de mesurer des niveaux de fluorescence très faibles et d'obtenir une erreur relative sur le signal de 0,004%. Il est intéressant de mentionner qu'un deuxième prototype de fluorimètre, dont le design est semblable au premier a été développé récemment (été 2005) par Ludovic Live dans notre laboratoire. Nous avons ajouté un système de collecte de la lumière à deux lentilles pour augmenter la proportion de fluorescence pouvant être détectée par le détecteur, remplacé dans ce deuxième prototype par une diode avalanche. Ce détecteur étant moins performant que le compteur de photons utilisé dans le premier prototype, c'est toujours ce dernier qui est utilisé pour la détection ultrasensible d'ADN.

2.2.1.1.1 Composantes optiques

L'histoire des diodes électroluminescentes bleues est très récente, la première diode d'un bleu intense faite de nitrure de gallium (GaN) ayant été réalisée avec succès pour la première fois par la compagnie *Nichia Chemical of Japan* en 1994. Une diode laser faite de nitrure d'indium-gallium (InGaN) émettant une lumière dans la région violette-bleue du spectre a également été conçue par cette même compagnie. La source d'excitation dans le fluorimètre développé est un tout récent prototype de diode bleue de la compagnie Lumileds (Lumileds Lighting, LLC) dont on voit une photographie à la figure suivante.

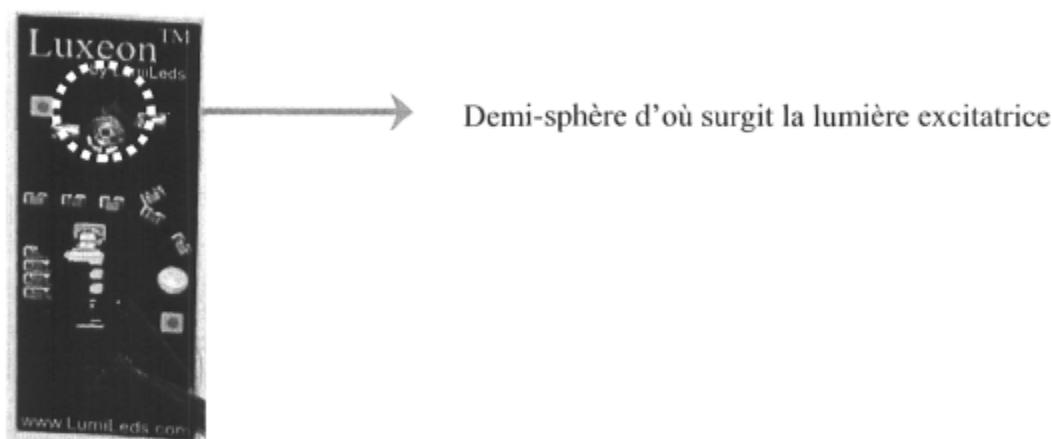


Figure 2.6 Photographie de la diode bleue tenant lieu de source²⁵

Cette diode bleue est en fait composée de 9 diodes, ce qui la rend particulièrement puissante. Nous avons mesuré une puissance émise de 140 mW pour un courant appliqué de 200 mA⁷, c'est ainsi que la diode se retrouve alimentée dans le fluorimètre. De plus, la diode bleue est étonnamment stable et devrait avoir un temps de vie autour de 10 000 heures. La diode bleue présente un maximum d'émission à 425 nm, ce qui convient parfaitement à l'excitation du triplex (voir figure 3.2) ainsi qu'une largeur spectrale de 16 nm. La figure 2.7 montre l'émission de la source prise avec un spectrofluorimètre (SLM-Aminco série II) ainsi que l'absorption du filtre interférentiel 425 nm (CVI Laser Corporation), enregistré à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Hewlett-Packard modèle HP-8452).

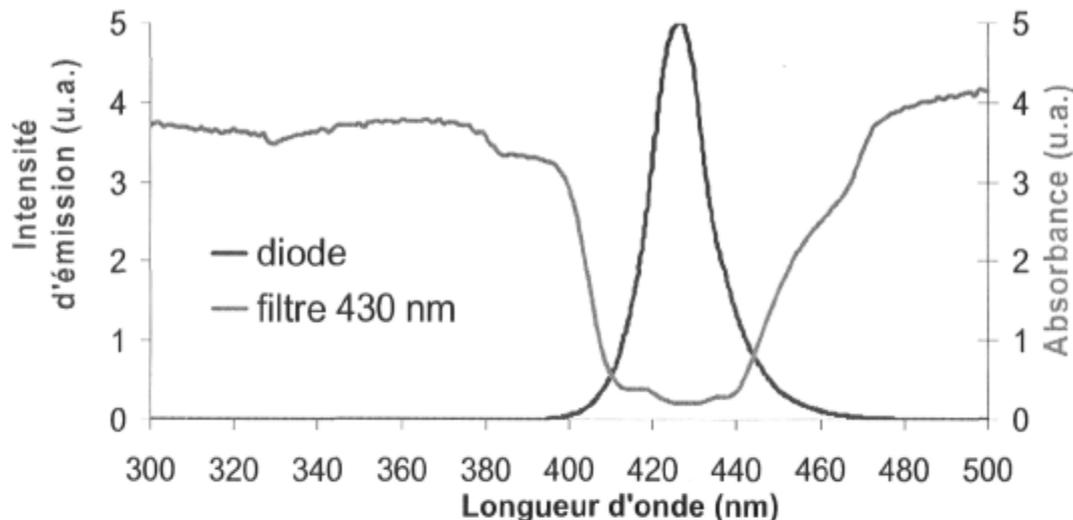


Figure 2.7 Spectre d'émission de la diode bleue et bande passante du filtre interférentiel à l'excitation²⁵

On remarque que le filtre interférentiel rejette efficacement les longueurs d'ondes inférieures à 410 nm et supérieures à 445 nm. La bande passante (15 nm selon le fabricant) devrait être suffisamment large pour exciter efficacement l'analyte d'intérêt ainsi que suffisamment étroite pour s'affranchir efficacement des interférences que pourrait causer la lumière ayant ces longueurs d'onde non nécessaires à l'excitation du triplex. Les longueurs d'ondes émises inférieures à 410 nm étant susceptibles d'exciter un grand nombre de composés, de même que la longue queue d'émission de la diode pour les longueurs d'onde supérieures à 450 nm. La contribution de la diffusion de la radiation d'excitation par les composantes optiques, par la cuvette employée ainsi que par la solution d'échantillon a été donc grandement réduite grâce à l'utilisation d'un filtre interférentiel à l'excitation et à l'émission. Les filtres interférentiels choisis préviennent aussi l'entrée d'une partie de la lumière parasite (lumière ambiante) dans le détecteur. Le filtre interférentiel d'émission, placé devant le détecteur, a une bande passante de 30 nm centrée à 530 nm (pour la détection du triplex) ou 575 nm (pour la détection du triplex marqué). À l'extérieur de leur bande passante, ces deux filtres possèdent une densité optique particulièrement élevée (6 selon le fabricant), ce qui diminue considérablement le bruit de fond et nous assure que le

signal détecté provient bien de la fluorescence de nos analytes. Juste devant la source, une lentille convergente, spécialement faite par le fabricant (LUXEON modèle L2POP005) pour collimer le plus possible l'émission divergente de ce type de diode, a été placée. L'infiltration de lumière parasite a également été restreinte en calfeutrants les interfaces entre les pièces au moyen de colle résineuse noire totalement opaque et en plaçant une boîte en plastique noire autour de l'axe optique d'excitation. Aussi, un collecteur de faisceau (Newport) destiné à arrêter un rayonnement laser de haute puissance, a été placé dans la paroi faisant face au tube optique. Finalement, des heurtoirs peints en noir ont aussi été placés aux quatre coins du porte-cuvette.

2.2.1.1.2 Composantes électroniques

La diode est alimentée par une source de courant (ILX Lightwave LDX-3620) générant un niveau de bruit très faible. Cette source de courant permet le fonctionnement de la diode sous un courant des plus stables. Ce faible niveau de bruit est possible grâce à l'utilisation de deux piles de 12 V DC installées dans la source de courant et reliées à la sortie du circuit, où est branchée la diode. Le courant alternatif fournit l'alimentation aux piles, qui elles produisent le courant direct requis pour les mesures. Deux plages de courant d'alimentation de la source peuvent être utilisées, de 10 à 200 mA et de 10 à 500 mA; dépendamment du courant choisi pour faire les mesures. Pour la bande de fréquences allant de 5 à 10 MHz et un courant de sortie situé dans la gamme de 0 à 200 mA (celle utilisée), le niveau de bruit RMS est de 850 nA ou moins lorsque seules les piles sont en fonction, tandis que lorsque la ligne AC est employée, ce niveau de bruit passe à 3 μ A (ou moins). Néanmoins, pour un courant appliqué sur la diode de 200 mA, 3 μ A de bruit RMS représente un niveau de bruit de 0,0015 %. Ce qui résulte en un bruit relatif sur le signal de fond (lorsque la diode est ouverte mais qu'il n'y a pas d'échantillon) de 0,0004%.

Le système de détection employé dans le fluorimètre est un tube photomultiplicateur opéré en mode comptage de photon. Le compteur de photons (Hamamatsu H7421-40) comprend un tube photomultiplicateur ultra-sensible auquel un élément thermoélectrique de

refroidissement (un Peltier) est annexé. Ce modèle de compteur de photons offre une bonne réponse spectrale pour des longueurs d'onde d'émission comprises entre 300 et 720 nm. La réponse spectrale optimale se manifeste par un plateau pour des longueurs d'onde allant de 500 à 650 nm (taux de comptage d'environ 10^6 coups/s.pW), faisant de ce compteur de photon le détecteur idéal pour le fluorimètre. Un élément Peltier interne est placé dans le système de détection afin de maintenir une température constante (25 °C), réduisant par le fait même le bruit thermique et rendant le rapport signal sur bruit encore meilleur. Un module de dissipation de chaleur muni d'un ventilateur est aussi installé sur le compteur de photon, de manière à prévenir l'accumulation de chaleur et de la dissiper efficacement. Une thermistance y est intégrée dans le but de pouvoir faire un suivi de la température d'opération du détecteur. Le train d'impulsions produit par le détecteur est enregistré par un compteur d'impulsions (Fluke 1953A à l'origine, remplacé par Agilent 53131A), et les données sont traitées à l'aide de différents logiciels (Microsoft® Excel et Microcal Origin™). L'intervalle de temps à utiliser peut être choisi parmi des temps d'intégration du signal allant de 0,1 ms à 10 s; nous avons choisit 10 s comme temps d'intégration pour toutes les mesures effectuées avec cet appareil.

2.2.2 Fluorescence résolue dans le temps

Le temps de vie de fluorescence est une caractéristique importante des fluorophores, reliée entre autres au rendement quantique de fluorescence et à la photostabilité du fluorophore étudié. Le temps de vie de fluorescence peut aussi nous renseigner sur l'environnement chimique immédiat du fluorophore étudié (pH, viscosité, polarité...). La mesure du temps de vie de fluorescence peut faciliter la distinction d'un fluorophore particulier d'interférents émettant à la même longueur d'onde mais ayant un temps de vie différent. De plus, la fluorescence résolue dans le temps permet d'étudier les processus dynamiques comme le transfert énergétique résonnant (RET). La variation du temps de vie du donneur lors de l'ajout de l'accepteur est une indication de l'efficacité du transfert énergétique et permet de calculer plusieurs paramètres importants comme la distance de Förster par exemple. Pour obtenir toutes ces informations intéressantes sur les complexes

étudiés, nous avons donc voulu faire des expériences de fluorescence résolue dans le temps. Un appareil permettant de faire de telles mesures n'étant pas disponible à l'Université Laval, nous avons dû aller au CNRC à Ottawa au laboratoire du Pr. Benoît Simard (un collaborateur du Pr. Denis Boudreau) pour utiliser l'appareil *Fluorolog Tau 3* de Jobin-Yvon. On retrouve dans l'article présenté au chapitre 5 les résultats obtenus lors de cette étude.

2.2.2.1 Caractéristiques de l'appareil *Fluorolog Tau 3* de Jobin-Yvon

Le *Fluorolog Tau 3* de Jobin-Yvon est un appareil permettant de mesurer la fluorescence et le temps de vie de fluorescence d'échantillons solides (déposés sur une lame de microscope) ou liquides. C'est un appareil qui fonctionne en domaine fréquence pour déterminer le temps de vie des espèces étudiées. L'intensité de la source d'excitation, une lampe au xénon de 450 W, peut être modulée très rapidement avec une cellule de Pockell. La lumière excitatrice étant modulée, la fluorescence le sera aussi mais avec un certain retard de phase qui est caractéristique du temps de vie du fluorophore étudié. La lampe au xénon émettant de 180 nm à 2400 nm, le domaine spectral pour l'excitation est assez large. La détection se fait avec un PMT ou encore une caméra CCD (sensible jusqu'au proche IR). On voit à la figure 2.8 une photographie de l'appareil.

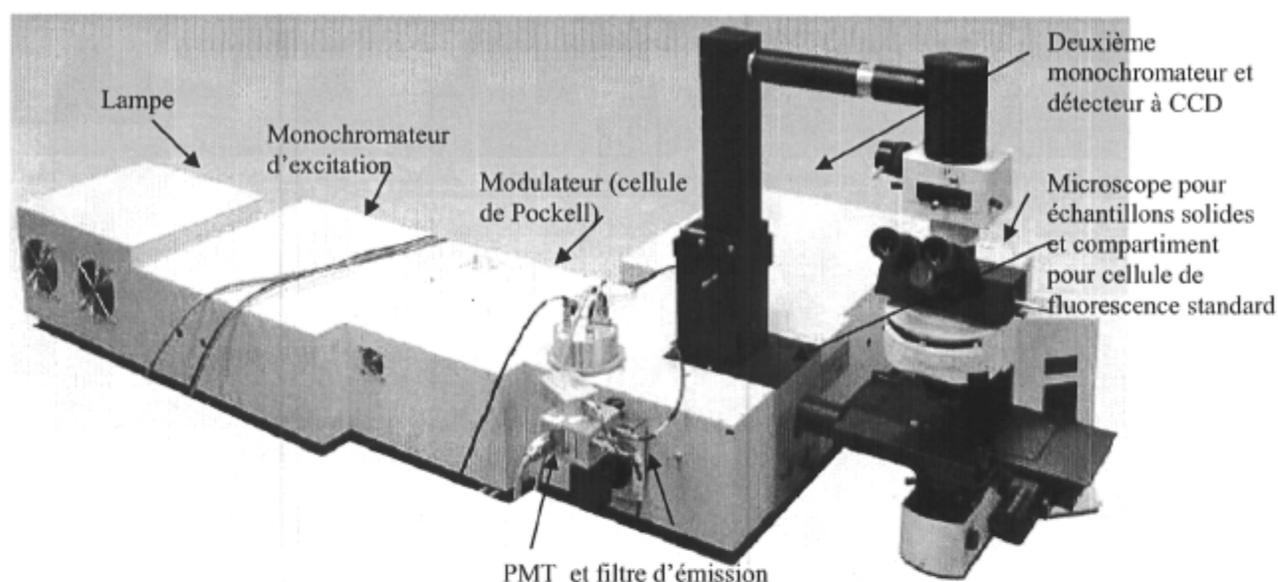


Figure 2.8 Photographie de l'appareil de fluorescence résolue dans le temps *Fluorolog Tau 3* de Jobin-Yvon

Le faisceau d'excitation passe donc premièrement dans le monochromateur, puis dans le modulateur dans laquelle se trouve la cellule de Pockell (qu'on peut enlever de l'axe d'excitation en tournant une roulette lorsqu'on fait des mesures en mode statique) pour arriver à l'échantillon qui se trouve soit dans une cellule standard de fluorescence ou sur une lamelle de microscope. La détection peut se faire des deux côtés, si on utilise le PMT comme détecteur ou la caméra CCD; il y a donc deux monochromateurs d'émission. Sur la photographie, un seul monochromateur est visible (vers la caméra CCD), du côté du PMT on a utilisé un filtre pour sélectionner les longueurs d'ondes d'émissions désirées. Des amplificateurs RF à hautes fréquences (un pour moduler le gain du PMT et l'autre pour la caméra CCD) ainsi que l'électronique de détection permettent de prendre des données de phase et de démodulation en fonction de fréquences de modulation allant de 5 à environ 300 MHz.

Pour prendre des mesures de temps de vie avec cet appareil, on doit utiliser un standard de temps de vie connu. En effet, chaque mesure de phase et de modulation pour

notre échantillon est comparée à celle obtenue avec le standard. Le standard doit être excité avec la même longueur d'onde que l'échantillon conséquemment, le standard le plus utile est le LUDOX®, un colloïde de silice qui ne fait que diffuser la lumière, son temps de vie est donc de 0 ns. Malheureusement, on ne peut pas l'utiliser sans le monochromateur d'émission parce que le filtre qui sera utilisé pour sélectionner la longueur d'onde d'émission rejettera la longueur d'onde d'excitation. Ainsi, pour l'échantillon et le standard, on doit obtenir des signaux AC et DC autour de 1 V (des valeurs entre 0,4 et 4 V sont acceptables); la modulation doit elle se situer aussi autour de 1 (la modulation est en fait un facteur de démodulation de la lumière excitatrice par l'échantillon et est calculée en faisant le rapport des signaux AC/DC). Pour ajuster ces signaux, il faut jouer sur plusieurs paramètres comme les fentes, l'iris, le voltage haute tension appliqué sur les PMT de référence, de l'échantillon et de la cellule de Pockell. Les signaux de l'échantillon de temps de vie inconnu sont d'abord ajustés, ensuite la concentration du standard est ajustée pour obtenir des signaux AC et DC semblables à ceux de l'inconnu (le rapport des deux signaux DC doit être supérieur à 0,9). Quand tous les signaux sont ajustés, la mesure de temps de vie peut être lancée (cela prend de 5 à 50 minutes dépendamment du nombre de moyennes et du temps d'intégration choisis). Finalement les données sont traitées avec un autre logiciel (*Model*). On obtient alors un graphique comme celui présenté à la figure 2.9 où l'on voit la phase et la modulation en fonction de la fréquence de modulation pour le triplex non-marqué (la donnée présentée à la ligne 2 du tableau 5.2 vient de ce graphique). Le temps de vie de l'échantillon est calculé avec les données de ce graphique, le paramètre *chi squared* indique à quel point le temps de vie calculé est représentatif des données mesurées, il doit être idéalement inférieur à 2 mais des valeurs inférieures à 10 sont acceptables. On peut aussi choisir le nombre de composantes de temps de vie différents pour l'analyse des résultats, si le *chi squared* diminue d'un facteur 2 en augmentant le nombre de composantes à deux par exemple, on est certains à 99% qu'il y a effectivement deux composantes.

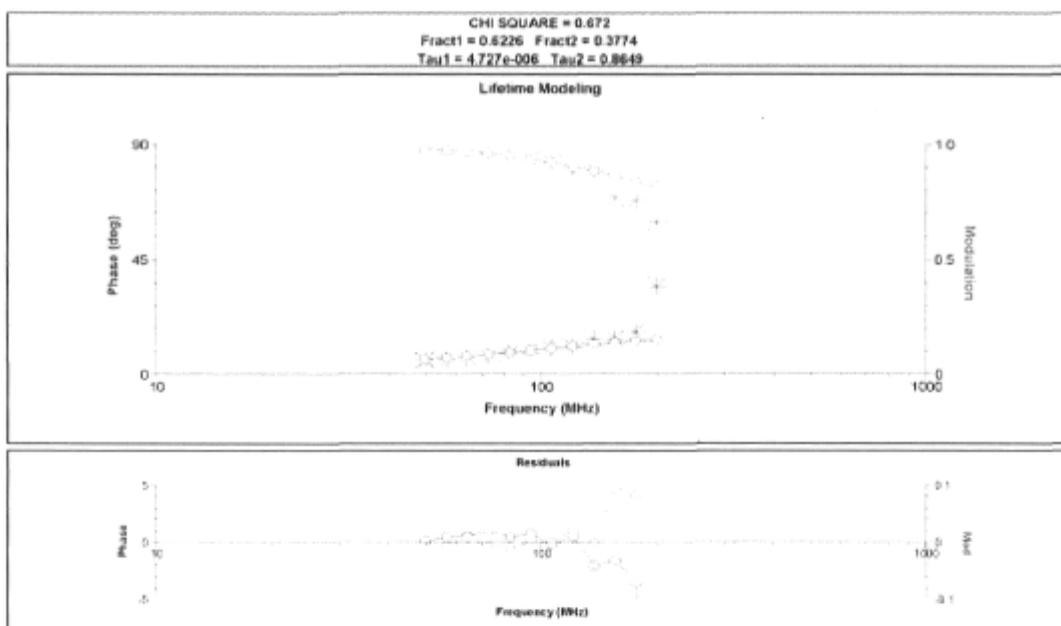


Figure 2.9 Données obtenues lors de la mesure du temps de vie du triplex non-marqué

Le fabricant de l'appareil certifie que l'étendue des fréquences de modulation possible (5-300 MHz) permet une résolution temporelle allant de 10 ps à 10 μ s. Par contre, Lakowicz spécifie dans «Principles of Fluorescence Spectroscopy» (p. 144) que pour des temps de vie inférieurs à 100 ps, des fréquences de modulation de l'ordre de 2 GHz sont requises. Aussi, lorsqu'on fait des acquisitions avec le *Fluorolog Tau 3* avec des fréquences de modulation supérieures à 200 MHz, les données sont moins bonnes, l'incertitude sur les points est assez importante. Un autre point important est que pour des temps de vie courts, de l'ordre de la centaine de picosecondes, la sensibilité semble chuter. En effet, pour le stryryl 7, un standard de temps de vie court (248 ps) l'intensité des signaux AC et DC est très faible, et ce même pour des solutions très concentrées ($A \approx 1$) qui donnent de très beaux spectres de fluorescence. Pour ce type d'échantillons, il est préférable de retirer le monochromateur d'émission et d'utiliser un filtre. Pour faire des mesures de temps de vie courts, il est donc nécessaire d'utiliser des solutions assez concentrées. L'absorbance de solutions donnant des signaux raisonnables est généralement autour de 1. Il est à noter que pour les mesures avec le microscope, l'intensité de fluorescence qui se rend au PMT est plus faible qu'en utilisant des solutions; il est donc presque certain que le monochromateur d'émission devra être retiré.

Partie 2.3 Diffusion de la lumière

La diffusion de la lumière est une technique d'analyse de plus en plus utilisée pour déterminer la taille de particules en solution. Cela est très utile pour une multitude d'applications dans les domaines de la nanotechnologie ou des sciences alimentaires par exemple. On s'intéresse alors à la taille des nanoparticules synthétisées ou des micelles constituant le lait, qui est une information cruciale pour caractériser ces systèmes. De plus, on obtient des informations directes concernant la taille des particules en solution quand elles sont justement en solution. C'est une technique alternative à la caractérisation par microscopie électronique à balayage ou à transmission qui est beaucoup plus coûteuse et plus restreinte en termes de types d'échantillons.

La technique de la diffusion de la lumière est basée sur la déviation de la lumière incidente par les particules, c'est cette lumière déviée qui est ensuite analysée. Le niveau de diffusion dépend de plusieurs facteurs comme la longueur d'onde, la densité de particules et de molécules, et l'épaisseur de l'échantillon que le rayonnement doit franchir. La lumière sera diffusée si elle passe dans un milieu polarisable ou qui a une constante diélectrique différente de l'unité. Il y a deux types de diffusion de lumière, la diffusion statique et la diffusion dynamique de la lumière. Ces deux techniques utilisent une source laser (le plus souvent un laser hélium : néon émettant à 633 nm), une lumière incidente de faible divergence est essentielle car il est important de séparer la lumière incidente de celle qui est diffusée par notre échantillon. En diffusion statique de la lumière, on mesure simplement l'intensité diffusée à différents angles. En diffusion dynamique de la lumière, on va analyser la lumière diffusée en fonction du temps pour déterminer la taille de particules généralement beaucoup plus petites que la longueur d'onde utilisée pour l'analyse. Avantageusement, les appareils de diffusion dynamique de la lumière permettent de déterminer la taille de particules en suspension d'à peu près n'importe quelle taille.

2.3.1 Origine du signal en diffusion de la lumière

On sait depuis longtemps déjà que les solutions, les gaz, et même les solides ne sont pas statiques, à une température supérieure au zéro absolu, il y a du mouvement dans la matière qu'on appelle mouvement Brownien. Ce type de mouvement est associé à l'énergie thermique des molécules. En plus de la température, il y a divers phénomènes qui font bouger les particules en solution; un champ électrique, une force externe ou encore la diffusion. Le mot diffusion, en plus de décrire un phénomène optique (diffusion de la lumière) est aussi relié au mouvement des molécules ou particules. La définition qu'on peut trouver dans le Petit Robert quant à ce sens du mot est la suivante : phénomène par lequel les diverses parties d'un fluide deviennent homogènes, la diffusion est en fait une expression physique et mathématique de la notion intuitive selon laquelle les irrégularités d'une distribution ont tendance à disparaître. L'équation Stokes-Einstein²⁶ décrit la relation entre le coefficient de diffusion (D) et le rayon hydrodynamique des particules (R_h).

$$D = \frac{kT}{6 \pi \eta R_h} \quad (k \text{ étant la constante de Boltzmann, } T \text{ la température, } \eta \text{ la viscosité)}$$

L'équation ne fait pas intervenir la charge de l'entité qui bouge, elle est donc valide pour les molécules neutres autant que pour celles qui sont chargées. Aussi, selon cette équation, les grosses particules ont un coefficient de diffusion inférieur aux petites particules, c'est-à-dire que les petites particules bougent plus rapidement que les grosses particules, ce qui est logique. On a donc une relation entre la taille des particules et un paramètre mesurable par diffusion de lumière. De plus, il est important de préciser que comme c'est le rayon hydrodynamique qui est mesuré; les particules sont considérées sphériques et ce rayon peut différer du vrai rayon des particules, car il est affecté par les molécules d'eau liées aux particules. Le signal en diffusion de lumière est donc dû effectivement au mouvement des particules; ce mouvement qui lui est dû aux inhomogénéités dans la solution (variations locales de la densité ou de la concentration) produites par les forces thermales²³. Cela veut dire qu'il y a en solution des éléments de volume avec plus de particules et d'autres avec moins. Chaque élément de volume qui

diffère du milieu homogène peut alors agir momentanément comme un centre local de diffusion à cause d'un changement d'indice de réfraction. C'est grâce à ce signal qu'on peut caractériser des liquides ou des solutions homogènes dans lesquels les molécules ou particules sont de très petites tailles.

2.3.2 Diffusion statique de la lumière

Le type d'expérience le plus simple qu'on peut faire en diffusion de lumière est de mesurer simplement l'intensité diffusée à différents angles. La diffusion statique de la lumière (ou diffusion classique) est surtout utilisée pour déterminer la masse molaire de polymères et est le plus souvent couplée à la chromatographie d'exclusion stérique. Pour que les mesures de masse molaire soient justes, il faut d'abord effectuer une calibration très rigoureuse et surtout que la taille des particules étudiées ne change pas avec la concentration. La variation de l'indice de réfraction avec la concentration (dn/dc) doit être connue précisément car cette valeur est à la puissance deux dans le calcul de détermination de la masse molaire. L'avantage majeur de la diffusion statique de la lumière est que la plupart des appareils possèdent un détecteur multi-angles. La mesure de la diffusion à plusieurs angles permet de mesurer le ratio de dissymétrie (rapport des intensités diffusées à deux angles complémentaires, par exemple $45^\circ/135^\circ$), ce qui peut donner une idée de la forme des particules. Aussi, pour des particules de taille supérieure à un dixième de la longueur d'onde incidente (dans notre cas: $633 \text{ nm} / 10 = 63 \text{ nm}$), l'erreur sur la masse molaire est trop grande lorsque mesurée avec un seul angle de diffusion. La diffusion statique de la lumière avec détecteur multi-angles permet donc d'obtenir une bonne précision sur la masse molaire de particules de taille supérieure à $\approx 60 \text{ nm}$.

C'est la technique que nous avons utilisée pour déterminer la masse molaire de nos agrégats, leur rayon de giration, leur second coefficient du viriel (A^2) et leur ratio de dissymétrie. La diffusion statique de la lumière a aussi été utilisée pour étudier la formation des complexes non-marqués. L'appareil utilisé pour ces mesures est un photomètre laser

DAWN modèle DSP. On retrouve les détails expérimentaux et les résultats des analyses effectuées en diffusion statique de la lumière au chapitre 6.

2.3.3 Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est basée sur la mesure du coefficient de diffusion en fonction du temps, en utilisant la relation Stokes-Einstein, le rayon hydrodynamique des particules peut être déterminé. Cette technique est aussi appelée spectroscopie de corrélation de photon (photon correlation spectroscopy) ou diffusion de lumière quasi-élastique (quasielastic light scattering). Un des principaux avantages de la diffusion dynamique de la lumière est qu'on obtient des mesures absolues, en effet cette technique est calibrée automatiquement. La calibration est en fait déterminée par la longueur d'onde du laser utilisée, la période d'une horloge contrôlée par un cristal, l'angle d'observation, et les paramètres physiques du solvant (viscosité et indice de réfraction); tous ces paramètres étant bien connus. De plus, le coefficient de diffusion qu'on mesure est inafecté par la composition des particules ou leur concentration, si toutefois la suspension est assez diluée pour pouvoir négliger les interactions entre les particules.

Nous avons utilisé la diffusion dynamique de la lumière pour étudier le comportement du complexe polymère-sonde avec sonde marquée ou non marquée en fonction de la température. Nous avons aussi observé comment variait la taille du complexe polymère-sonde marquée lors de l'hybridation avec un brin parfaitement complémentaire à la sonde et avec un brin d'ADN comprenant un seul défaut dans sa séquence. Nous avons comparé ces résultats à une autre expérience où nous avons ajouté la même quantité de charges négatives mais provenant du chlorure de sodium. Ces expériences nous ont permis de caractériser les agrégats de complexes polymères-sonde marquée et de mieux comprendre les processus impliqués lors de la détection d'ADN. Toutes les expériences de diffusion dynamique de la lumière ont été faites avec un Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) de Malvern™. Les détails expérimentaux et les résultats de ces analyses se trouvent au chapitre 6.

Partie 2.4 Potentiel zeta

Autour de chaque particule en solution, il se trouve ce qu'on appelle la double couche électrique. La première couche, la plus près de la particule, est constituée d'ions très liés. À la figure 2.10, on voit un exemple de la double couche électrique d'une particule de charge négative. Pour cette particule avec une charge nette de surface négative, la couche interne est composée d'ions positifs. La deuxième couche, nommée couche externe, est composée d'ions positifs et négatifs moins liés à la particule. Après la couche externe, il existe une barrière de glissement, une barrière après laquelle la particule agit comme une entité indépendante. Les ions situés à l'intérieur de la barrière vont bouger avec la particule et ceux se trouvant à l'extérieur de cette barrière de glissement resteront sur place. Le potentiel à cette barrière est nommé potentiel zeta. Le potentiel zeta nous renseigne sur la stabilité des colloïdes, plus il est important, positif ou négatif, plus les forces d'attraction sont faibles par rapport aux forces de répulsion. Le potentiel zeta est aussi utilisé pour déterminer la mobilité électrophorétique et pour donner une idée de la quantité relative de charges par particule. Il est fortement influencé par le pH, la force ionique et les changements de la concentration d'un additif comme un surfactant par exemple.

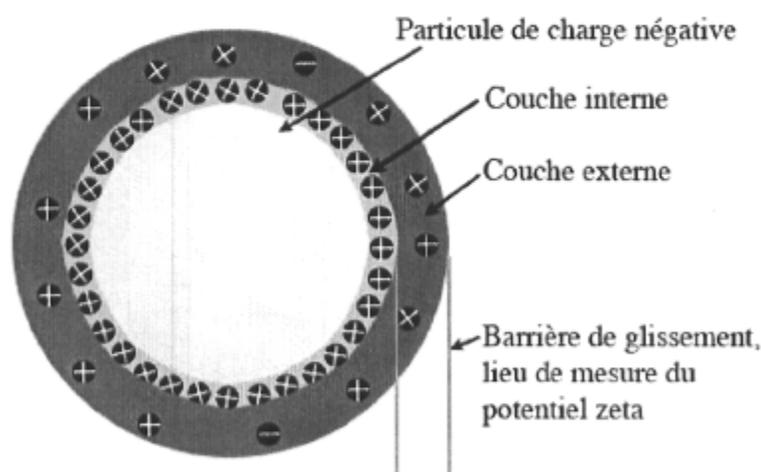


Figure 2.10 Illustration de la double couche électrique d'une particule chargée négativement et du lieu de mesure du potentiel zeta

Nous avons utilisé les mesures de potentiel zeta pour mieux comprendre ce qui se passe au niveau des charges lors de la détection d'ADN. En effet, si le potentiel zeta mesuré est négatif, cela signifie que la particule observée possède une charge nette négative à sa surface. Nous voulions donc savoir comment les agrégats de duplex (globalement neutres) réagissaient à l'ajout de brins d'ADN portant plusieurs charges négatives. Aussi, comme le potentiel zeta peut mesurer la stabilité relative des colloïdes, nous voulions savoir si l'ajout d'une grande quantité de charges négatives pouvait déstabiliser les agrégats de duplex marqués. Nous avons comparé ces études avec des expériences similaires où, au lieu du brin d'ADN complémentaire à la sonde, nous avons ajouté: soit un brin comprenant un défaut dans sa séquence pour être complémentaire à la sonde ou encore la même quantité relative de charges, mais provenant du chlorure de sodium plutôt que de provenir d'une chaîne d'ADN. Nous avons ainsi pu comparer le comportement de la charge relative de surface des agrégats de duplex lors d'une réaction de reconnaissance spécifique (avec le brin complémentaire) à celui observé lors d'une réaction de reconnaissance partielle (avec le brin 1 défaut) ou encore à l'effet de charges non impliquées dans le processus de détection (avec NaCl). La différence entre les trois comportements est frappante et nous a permis de confirmer l'interaction spécifique entre la sonde marquée présente dans les agrégats de duplex et le brin complémentaire ajouté en solution. Aussi, il est intéressant de mentionner que nous avons mesuré un potentiel zeta négatif pour les agrégats de duplex comme pour tous les complexes formés en ajoutant les brins d'ADN ou le NaCl. Cela peut paraître surprenant pour les agrégats de duplex qui sont préparés pour être globalement neutres. Nous avons trouvé une explication très intéressante à ce potentiel zeta négatif que nous avons appuyée par une expérience d'électrophorèse sur papier et des calculs de modélisation moléculaire (chapitre 6). On retrouve ces résultats tous obtenus avec le Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) de Malvern™ et leur analyse au chapitre 6.

2.5 Références

- (1) Meis, J. F.; Ruhnke, M.; De Pauw, B. E.; Odds, F. C.; Siegert, W.; Verweij, P. E. *Report from University Hospital Sint Radboud, Nijmegen, The Netherlands*. **1999**.
- (2) Ho, H. A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Dore, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1548-1551.
- (3) Corbeil, G. Mémoire de maîtrise en *Chimie*; Université Laval; Québec, 2003, 89 p.
- (4) Delvin, T. M. *Textbook of Biochemistry: With Clinical Correlations (5th Edition)*; 5th ed.; John Wiley and Sons: New York, 2001.
- (5) Chen, L.; Xu, S.; McBranch, D.; Whitten, D. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9302-9303.
- (6) Gaylord, B. S.; Wang, S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6417-6418.
- (7) Dore, K.; Dubus, S.; Ho, H. A.; Levesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M. G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.
- (8) Tao, S.-C.; Gao, H.-F.; Cao, F.; Ma, X.-M.; Cheng, J. *Molecular and Cellular Probes* **2003**, *17*, 197-202.
- (9) Gao, H. T., Shengce; Wang, Dong; Zhang, Chi; Ma, Xuemei; Cheng, Jing; Zhou, Yuxiang. *Analytical Letters* **2003**, *36*, 2849-2863.
- (10) Nikiforov, T. T. R., Robert B.; Kotewicz, Michael L.; Rogers, Yu Hui. *PCR Methods and Applications* **1994**, *3*, 285-291.
- (11) Cao YunWei, C.; Jin, R.; Mirkin Chad, A. *Science* **2002**, *297*, 1536-1540.
- (12) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 365-370.
- (13) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. *Science* **1997**, *277*, 1078-1081.
- (14) Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10954-10957.

- (15) Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 896-900.
- (16) Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science (Washington, D. C.)* **2000**, *289*, 1757-1760.
- (17) Wang, J.; Polsky, R.; Merkoci, A.; Turner, K. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 989-991.
- (18) D'Astous, M. Mémoire de maîtrise en *Médecine*; Université Laval: Québec, 1999, 92 p.
- (19) Greenfield, L, White, T. J., Ed.; ASM Press, 1993, p 664.
- (20) Maruyama, A.; Akaike, T.; Goto, T.; Yonemura, K.; (Japan). Application: US US, 2002, 26 p, Cont-in-part of U S Ser No 850,928, abandoned.
- (21) Ho, H. A.; Dore, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Tanguay, R. M.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12673-12676.
- (22) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*; 5th ed.; Thomson Brooks/Cole, 1997.
- (23) Ingle J. D., Crouch, S. R. *Spectrochemical Analysis*; Prentice Hall, 1988.
- (24) Smith, B. W.; Jones, B. T.; Winefordner, J. D. *Applied Spectroscopy* **1988**, *42*, 1469-1472.
- (25) Brunette, M. Mémoire de Maîtrise en *chimie*; Université Laval: Québec, 2004.
- (26) Atkins P, de Paula J. *Physical Chemistry*; Oxford University Press, 2001.

NOTE:

Les articles insérés dans cette thèse sont légèrement différents de ceux publiés dans la littérature. Ils ont été corrigés pour répondre aux exigences des évaluateurs de cette thèse.

CHAPITRE 3

FLUORESCENT POLYMERIC TRANSDUCER FOR THE RAPID, SIMPLE, AND SPECIFIC DETECTION OF NUCLEIC ACIDS AT THE ZEPTOMOLE LEVEL*

3.1 Résumé

La détection spécifique de quelques centaines de molécules de matériel génétique à l'aide d'un biocapteur polythiophène fluorescent est décrite. Cette réaction de reconnaissance est basée sur des interactions électrostatiques simples entre un polymère cationique servant de transducteur optique et la cible d'acides nucléiques négativement chargée. Cette dernière peut être effectuée simplement en moins d'une heure, sans aucune réaction chimique et à coût abordable. Ce système très simple est suffisamment versatile pour détecter des chaînes d'acides nucléiques de longueurs variées, incluant un segment du génome à ARN du virus *Influenza*.

* Doré, K.; Dubus, S.; Ho, H. A.; Lévesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M. G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.

Lien HTML : <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jacsat/2004/126/i13/pdf/ja038900d.pdf>

3.2 Abstract

We report the specific detection of a few hundred molecules of genetic material using a fluorescent polythiophene biosensor. Such recognition is based on simple electrostatic interactions between a cationic polymeric optical transducer and the negatively-charged nucleic acid target, and can be done in less than one hour simply and affordably and without any chemical reaction. This simple system is versatile enough to detect nucleic acids of various lengths, including a segment from the RNA genome of the *Influenza* virus.

3.3 Introduction

The rapid, sensitive, and specific detection of nucleic acids is of central importance for the diagnosis of infections, identification of genetic mutations, and forensic analyses. In particular, the efficient and affordable detection of infectious disease agents is envisioned by the World Health Organization as the most critical biotechnological development for improving health in developing countries.¹ The recognition capabilities of DNA through hybridization reactions are well-established but adequate transducing elements are needed to generate a physically measurable signal from the recognition event. In this regard, many interesting DNA hybridization transducers have been proposed, including molecular beacons,² DNA-derivatized nanoparticles,³⁻⁶ redox-active nucleic acids,⁷⁻⁹ and engineered allosteric enzyme.¹⁰ Electrochemical and optical DNA biosensors based on conjugated polymers have also been reported¹¹⁻¹⁹, in which, in most cases, the detection relies on a modification of the electrical and/or optical properties of an oligonucleotide-functionalized conjugated polymer through the hybridization with the complementary nucleic acid strand. However, up to now, none of these otherwise very impressive methods offer the simultaneous advantages of rapidity, simplicity, specificity, and detection sensitivity such that a chemical tagging of the DNA probe or target and/or a prior polymerase chain reaction (PCR) amplification step, which increases the assay's turnaround time and may limit quantitative analysis, is not required. Interestingly, conjugated polymers offer an amplification of the signal as compared to the response of individual monomers,²⁰⁻²³ an effect that could, in principle, lead to a genomic detection technique at ultralow concentrations. Along these lines, we report here a rapid and simple electrostatic approach based on a cationic water-soluble polythiophene which enables the direct detection and specific identification of a few hundred molecules of the negatively-charged complementary DNA or RNA target without any chemical reaction on the probes or targets.

3.4 Results and Discussion

As with any polyelectrolytes, the cationic water-soluble polythiophene can form stoichiometric polyelectrolyte complexes (coacervates) with anionic oligonucleotide probes (duplex; see Figure 3.1). These stoichiometric complexes tend to form aggregates in aqueous solutions.²⁴ Depending upon the concentration of these coacervates, precipitation can occur after several hours. As a result of aggregation, the intrinsic fluorescence of the polymer alone (quantum yield of 0.03 in its random coil conformation) is red-shifted and quenched, due to close proximity and stiffening of the polythiophene chains.^{15,19} However, fluorescence intensity increases again through the hybridization process with the perfectly matched complementary nucleic acid strand. Spectroscopic data suggest that the blue shift and increase in fluorescence is due to a helical structure of the polythiophene backbone that wraps with greater affinity around the anionic phosphate backbone of double-stranded nucleic acids (as compared to its affinity for single-stranded nucleic acids)¹⁵ combined with a better solubilization of the resulting non-stoichiometric polyelectrolyte complex (triplex) which limits interchain quenching.^{15,25}

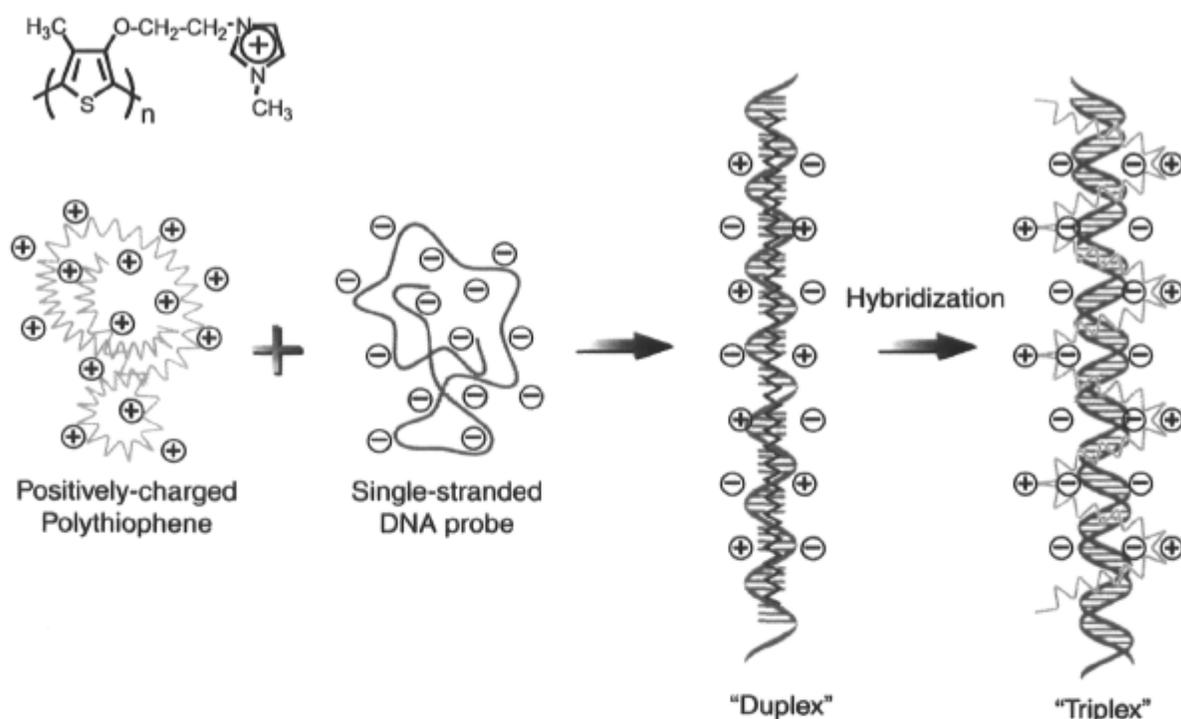


Figure 3.1 Schematic description of the formation of polythiophene/single-stranded nucleic acid duplex and polythiophene/hybridized nucleic acid triplex.

Efficient nucleic acid detection by this polymeric sensor is greatly aided by the relatively large Stokes shift between the optimal excitation wavelength (at ca. 425 nm) and the wavelength for peak fluorescence emission (ca. 525 nm) of the triplex formed between polymer, oligonucleotide capture probe and perfectly matched complementary nucleic acid strand (see Figure 3.2). This significant spectral separation allows the efficient rejection of background signals such as those generated by Rayleigh and Raman scattering using simple interference filters. In the present work, a tailored detection platform was developed specifically for the polythiophene sensor using such interference filters and a light-emitting diode (LED). LEDs are well-known for their very stable output intensity, and have been used as light sources for molecular absorption spectrometry,²⁶ for fluorimetry,²⁷ and even for optical detection in capillary electrophoresis.²⁸ In the latter case, the exceptional stability of a battery-powered LED source resulted in a relative standard deviation of the background signal of less than 0.0004%, despite the poor spatial beam quality of the LED

and the resulting deficient coupling of the excitation beam with the small-diameter cuvette. The simple detection platform developed herein and used in all the experiments mentioned in this paper combines a powerful and stable LED excitation source, a high-efficiency photon-counting detector and the high light throughput of a non-dispersive, filter-based optical design. This combination results in low light measuring capabilities with a typical relative noise-to-signal of 0.004%.

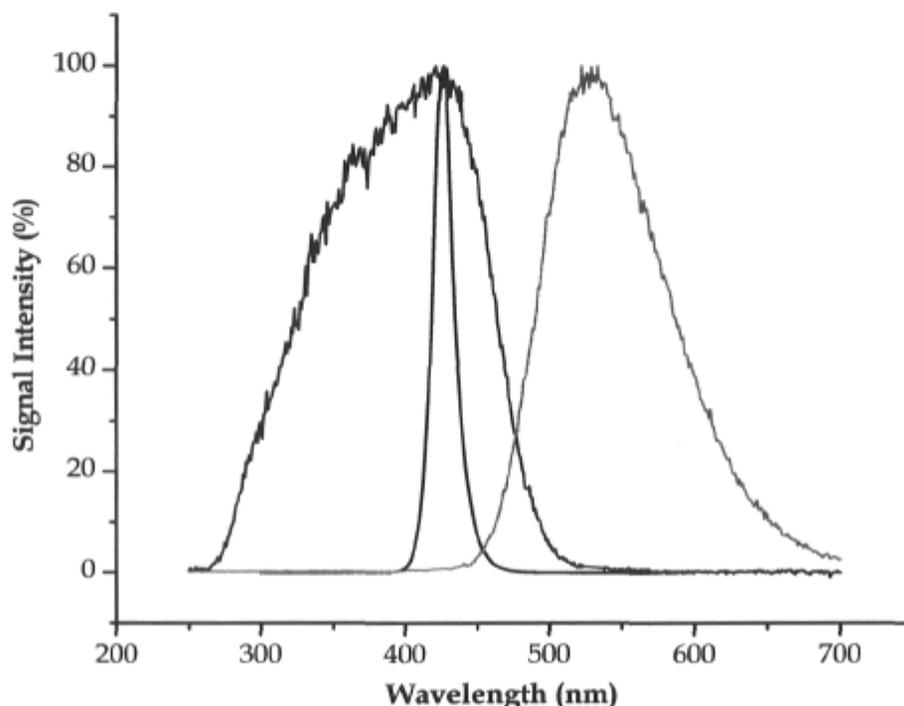


Figure 3.2 Excitation-emission spectrum for the polymer-DNA complex, measured with a commercial spectrofluorimeter. The blue trace is the excitation spectral profile and the green trace is the emission spectral profile. The black trace shows the spectral bandwidth of the LED excitation source.

Moreover, recent publications have reported the strong influence of surfactants on the luminescent properties of water-soluble conjugated polymers.²⁹⁻³¹ The detection of DNA in the presence of different non-ionic surfactants was investigated. In highly dilute regimes, it was observed that the presence of 0.3 mM of Triton X-100 improves the limit of detection by at least a factor of 10. This effect may be related to an increase of both the

molar extinction coefficient and the luminescence quantum yield which can be related to the release of interfacial water molecules and the formation of more extended polymer chains.^{29,31} The combined use of Triton X-100 with the dedicated fluorimeter instrument allowed to attain unprecedented simplicity, versatility, and analytical sensitivity.

As illustrated in Figures 3.3 and 3.4, it is now possible with this molecular system to specifically detect the hybridization of a few hundred molecules of complementary oligonucleotides within 60 min. A target DNA with two mismatches (black curve, Figure 3.3) can easily be discriminated from the perfectly matched analyte (red curve, Figure 3.3).

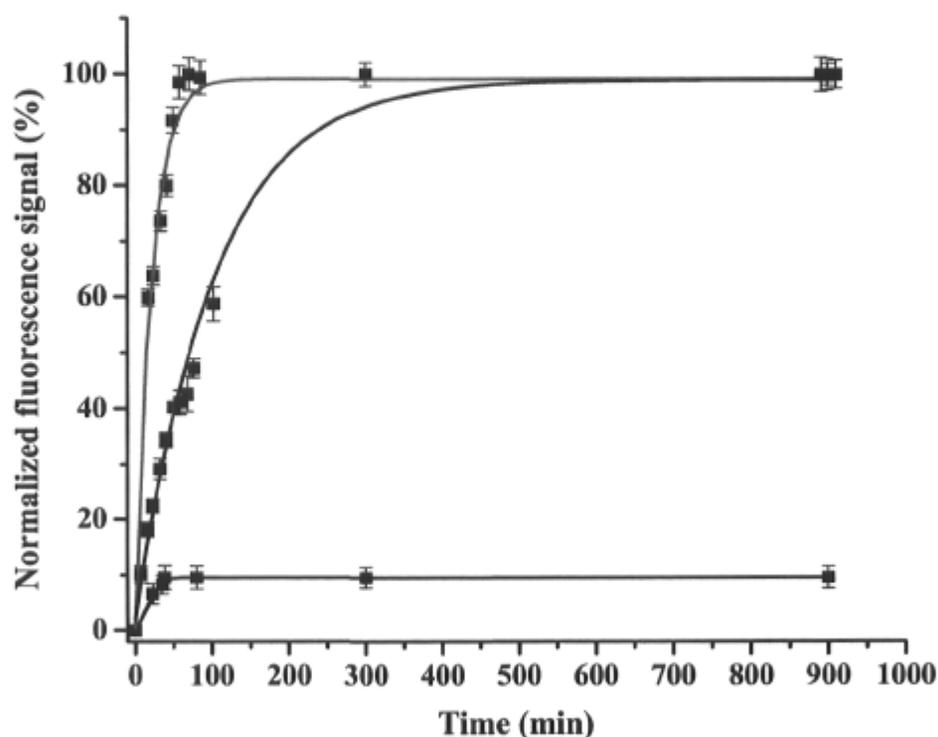


Figure 3.3 Hybridization kinetics of the perfectly matched target analyte (red curve), a two mismatch sequence (black curve) and a single mismatch sequence (blue curve).

Moreover, under kinetic monitoring, it is possible to discriminate perfect hybridization from a single defect in sequence matching (blue curve, Figure 3.3). As shown in Figure 3.4, there is a linear relationship between luminescence intensity and the

concentration of target analyte. In the case of 20-mer target oligonucleotides, one can extrapolate a limit of detection of ~ 310 molecules or 0.54×10^{-21} mole in an effective volume of $150 \mu\text{L}$, or 3.6×10^{-18} M. In comparison with the perfect hybridization, the presence of sequences having one or two mismatches induces only a slight increase of the luminescence intensity, and the addition of a large excess (100 equivalents) of the oligonucleotide with two mismatches only leads to a moderate increase of the luminescence.

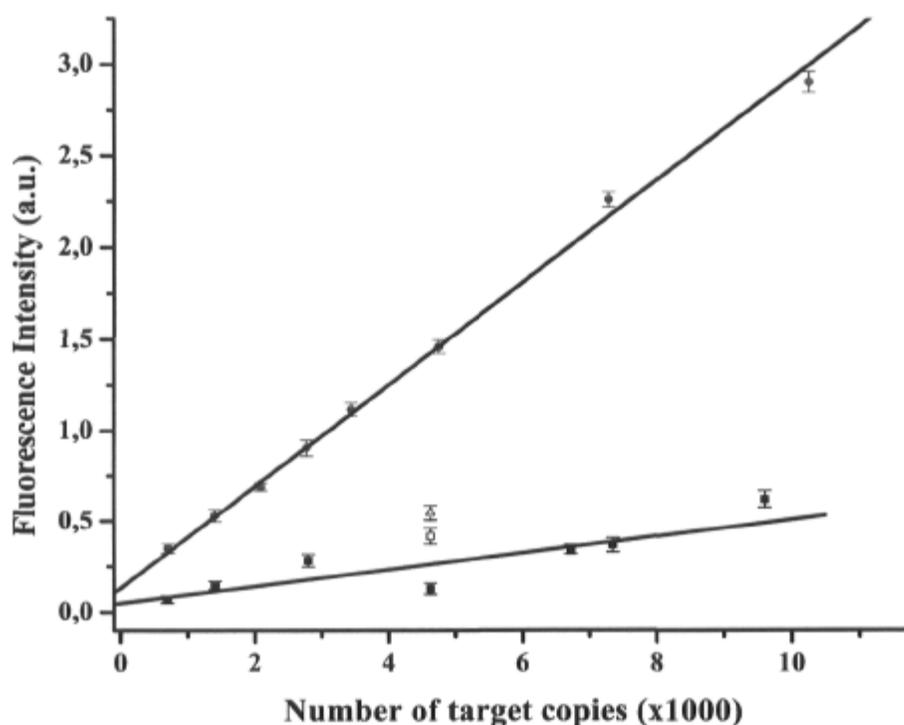


Figure 3.4 Calibration curves for 20-mer double-stranded DNA targets complexed with the polymer. Calibration curve in red (filled circles) for the perfectly matched target analyte (polymer/X1/Y1), in black (filled squares) for the two mismatch sequence (polymer/X1/Y2). The open square symbol indicates the signal from a 100 equivalent excess of the two mismatch sequence (polymer/X1/100eqY2), and the open triangle symbol indicates the signal from one equivalent of the single mismatch sequence (polymer/X1/Y3). The limit of detection for the perfectly matched 20-mer target is 310 molecules, or 0.54 zeptomole, in a volume of $150 \mu\text{L}$.

Interestingly, the binding of 50-mer oligonucleotides onto a complex made of the polythiophene transducer and a 20-mer oligonucleotide capture probe produces an even higher luminescent signal (curve A, Figure 3.5) than that obtained when a 20-mer target is hybridized with the capture probe. This could be related to the formation of more soluble and more extended oligomeric moieties which limits intrachain and interchain quenching. In this case, the complex (triplex) formed between polymer, oligonucleotide capture probe and perfectly matched complementary nucleic acid strand contains significantly more negative charges. These effects lead to a lower limit of detection of 220 molecules or 0.36 zeptomole in 150 μL , (i.e. 2.4×10^{-18}). We have also observed that hybridization with 50-mer targets is faster than with 20-mers. The hybridization of 50-mer target oligonucleotides presenting one and two mismatches (in the region complementary to the sequence of the 20-mer capture probe) was also tested. Results with one mismatch show that the system is still specific with analyte targets that are longer than the capture probe (Fig. 3.5). This versatility of the fluorescent polymer in transducing the hybridization of oligonucleotides of varying lengths is a great asset in the design of molecular diagnostic tools for diverse genetic material. These results highlight again the stronger affinity of the cationic polythiophene towards double-stranded nucleic acids. However, it is worth noting that the optical detection of very low concentrations of nucleic acid targets is only possible when the polythiophene-capture probe complexes are hybridized at those low concentrations with the complementary strand of the analyte.

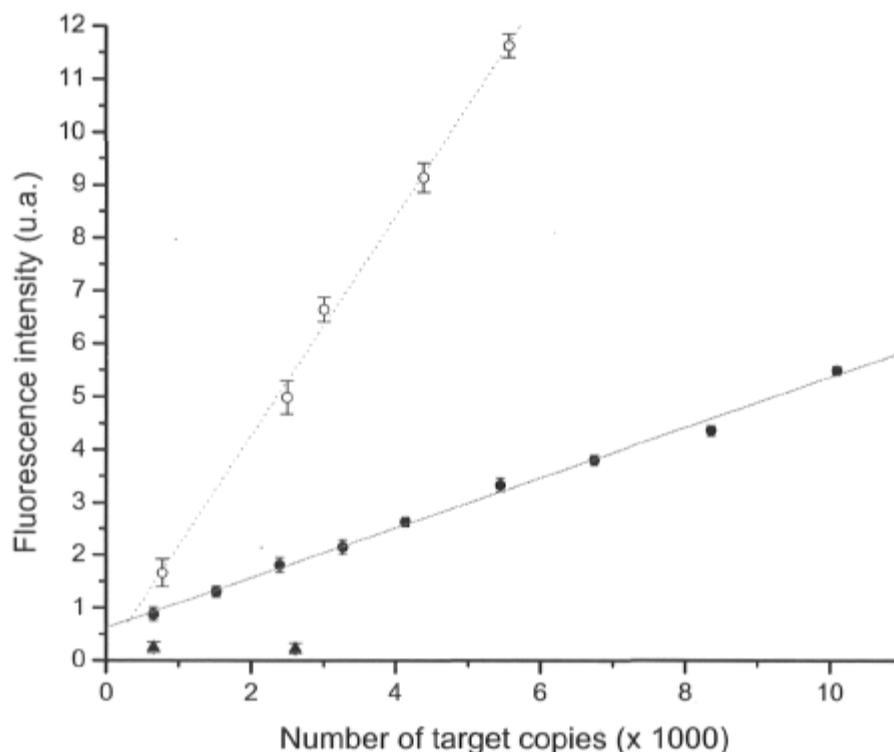


Figure 3.5 A) Calibration curve for a 50-mer oligonucleotide target analyte (perfectly matched over 20 nucleotides sequence of the capture probe) as detected by the polymer + 20-mer capture probe complex (polymer/Y2/X2-L). The triangle symbols are for the single mismatch sequence (polymer/Y3/X2-L). The limit of detection for the 50-mer perfectly matched target is 0.36 zeptomole or 220 molecules in a volume of 150 μ L. B) Calibration curve for *Influenza A* viral RNA as detected by the polymer + 32-mer probe complex.

Dilution of similar complexes of hybridized nucleic acids with the cationic polythiophene transducer made at higher concentrations (e.g. 10^{-12} M) leads to lower luminescence intensities probably due to differences in the aggregation behavior of the stoichiometric complexes (i.e. duplex) and structure of the resulting triplexes generated in diluted versus concentrated regimes. This property is indeed partly responsible for the high sensitivity and selectivity provided by the system and also enables the design of detection devices requiring only minimal amounts of reagents.

To test the validity of our system, a 32-mer oligonucleotide designed for the specific recognition of all *Influenza A* strains³² was complexed with the polythiophene and hybridized with crude lysates from viral particules. In parallel, a control experiment was carried out with a non-specific capture probe, and the fluorescent signal obtained from this control was subtracted from the signal generated by the *Influenza A*-specific probe. In less than 30 minutes, it was possible to detect nucleic acids corresponding to as few as 750 genome copies of the virus (curve B, Figure 3.5). Interestingly, this system based on a hybrid 32-mer oligonucleotide / polythiophene probe gives an enhanced fluorescence signal which can be related to an amplification of the detection coming from at least 32 repeat units of the fluorescent polymeric transducer together with a better solubilization of the resulting negatively-charged complexes.

3.5 Conclusions

All these results show that the present polymeric biosensor can detect and specifically identify a few hundred copies of either DNA or RNA. This very sensitive optical detection system allows the direct detection and identification of the perfect match between a nucleic acid target and its complementary sequence and possibly of single nucleotide polymorphisms (SNPs). A large excess of an oligonucleotide with a sequence having two mismatches did not affect significantly the sensor response to the perfectly matched target, an observation of importance in cases where the concentration of the analyte is not known. This study also demonstrates that the direct detection of the flu virus is possible. These viruses harbor a ~ 10000 nucleotides (nt) genome composed of seven to eight single-stranded RNA segments with lengths varying from 890 nt to 2400 nt. The 32-mer probe we used here for *Influenza A* is complementary to the 1028 nt genome segment. It is thus possible with our polymer sensor to detect the presence of long RNA segments in complex mixtures of genetic material. The sensitivity and specificity of this fluorescence-based approach should lead to simple and cost-effective molecular diagnostic tools without any amplification steps. Moreover, the possibility to follow hybridization reactions in real time at such low concentrations can also find interesting applications for kinetics and thermodynamics studies of nucleic acids in various biological systems. In addition to its fluorescence, this polythiophene possesses electroactive properties which may serve for detection purposes or to generate structures such as conducting nanowires wrapped around nucleic acid scaffolds.

3.6 Experimental Section

3.6.1 General procedure for the chemical polymerization of monomer

Monomer 1H-Imidazolium, 1-methyl-3-[2-[(4-methyl-3-thienyl)oxy]ethyl]-, bromide was prepared as previously described.¹⁵ The cationic, water-soluble, fluorescent polythiophene derivative, poly (1H-Imidazolium, 1-methyl-3-[2-[(4-methyl-3-thienyl)oxy]ethyl]-,chloride), was synthesized from the chemical oxidation of this monomer using iron trichloride in chloroform. In 33 mL of chloroform, 0.650 g (2.16 mmol) of the monomer was dissolved followed by the dropwise addition of 22 mL of a 0.26 M iron trichloride chloroform solution, under nitrogen atmosphere. The mixture was left at room temperature for 48 hours. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude black powder was washed with a minimum of cold methanol (10 mL). The polymer was then dissolved by adding a large volume of methanol (2500 mL) and a few drops of hydrazine were added. The solution is filtered and the solvent removed under reduced pressure. The resulting powder was washed using a Soxhlet apparatus and acetone as the solvent for 24 hours. This procedure removed low-molecular weight materials. The non-soluble part (the resulting powder in the Soxhlet tube) was dried and washed again, this time using ethanol in the Soxhlet apparatus. The ethanol-soluble fraction of the polymer was recovered. The solvent was removed under reduced pressure. This procedure led to a dark red powder with a yield after purification of 55%. This polymer was soluble in water, forming a yellow solution. Ion chromatography measurements indicated that the counter-ions to the cationic polythiophene, Cl⁻ and Br⁻ are present in a proportion of 88/12, which leads to a molecular weight of 262.83 g/mol per repeat unit.

3.6.2 Experimental conditions for the detection of nucleic acid target analytes

All hybridization experiments were carried out at 50°C, in a solution comprising sterile Nanopure water, 0.1 M NaCl and 0.3 mM of hydrogenated Triton X-100. All dilutions and solution handling were performed in plasticware. First, the complex composed of the polymer + oligonucleotide probe was prepared. Stoichiometric quantities of the polymer and of the oligonucleotide capture probe were mixed to give a concentration of 4×10^{13} copies/ μL of the resulting complex, which was then diluted to 1×10^4 copies/ μL for the next experiments. The target DNA or RNA analyte was also diluted to the same concentration to form stoichiometric complexes. For the fluorescence measurements, 3 mL of hybridization solution were placed in a standard quartz cell (Starna). The polymer + probe complex was added, and the signal for this blank solution was measured. The target DNA or RNA analyte was then added, and the fluorescent signal was measured for a period of approximately 60 minutes allowed for hybridization and stabilization. The 50-mer DNA and RNA target analytes were denatured for 10 minutes at 100°C prior to their addition into the sample quartz cell, in order to avoid secondary structures and the resulting signal artefacts. To acquire the data points presented in each calibration curve, additional amounts of polymer + probe complex and stoichiometric quantities of target analyte were added in the same quartz cell, and the measurements were taken as in the sequence described above. For all measurements, the blank signal measured for the probe + polymer complex was subtracted from the fluorescence signal measured for the polymer + probe + target analyte nucleic acid. This methodology was found to provide the best reproducibility.

For the experiments with 20-mer oligonucleotides, the capture probe (X1) was: 5' CATGATTGAACCATCCACCA 3' with perfect target (Y1): 3' GTACTAACTTGGTAGGTGGT 5'. This corresponds to a conserved region of the *Candida albicans* yeast genome. The non-specific target DNA was Y2: 3' GTACTAACTTCGAAGGTGGT 5', which contains 2 mismatches from Y1 and corresponds to a sequence specific to *Candida dubliniensis*. Y3: 3'

GTACTAACTTCGTAGGTTGGT 5' contains only one mismatch from Y1. With the 50-mer target, named X2-L: 5' GGAATGGTGACAACATGATTGAAGCTTCCACCAACTGTCCATGGTACAAG 3' (Trilink Biotechnologies Inc.), Y2 was used for the perfect match, Y1 for 2 mismatches and Y3 for one mismatch. For the experiments with the *Influenza A* virus, the specific 32 capture probe used correspond to probe M683 published by Klimov *et al.*³² while probe X1 was used for non-specific control experiments.

3.6.3 Influenza A virus culture and purification

Confluent monolayers of Madin Darby Canine Kidney (MDCK) cells were infected with recombinant *Influenza A*/WSN/33 in an F75 flask. The infection medium was Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 0.3% bovine serum albumin. After 4 days of incubation at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, supernatants from infected cells were preclarified by low speed centrifugation (6000 rpm for 5 min at 4°C) and viruses were subsequently pelleted by ultracentrifugation (28000 rpm for 2 hours at 4°C) (2). The virus pellet was resuspended in 1 ml of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and stored at -80°C.

3.6.4 Preparation of the RNA samples from Influenza A infected cells

The purified viral particles were thawed on ice. 100 µL of a stock solution of proteinase-K (Sigma) (20 µg/mL) was added to 1 mL of the viral suspension. The mixture was then vortexed for at least 10 seconds. After that, the resulting solution was incubated at 37°C for one hour. Finally, the preparation was heated at 95°C for ten minutes and the sample was ready to be tested.

3.6.5 Description of the fluorimetry detection platform

The excitation source is a prototype high intensity blue LED (Lumileds Lighting, LLC) with an emission maximum at 425 nm and a spectral bandwidth (FWHM) of 16 nm. The spectral emission profile of the LED overlaps quite neatly with the excitation spectral profile of the polymer sensor (see Figure 2). The optical output power of the LED source was measured at 140 mW when operated at a current of 200 mA. The LED is powered by an ultra-low noise current source (ILX Lightwave LDX-3620) with a broadband current noise of only 850 nA rms, or less than 0.0004% at the nominal operating current of the LED. Detection of the fluorescence is made at 90° from the excitation axis by a photon counting detector (Hamamatsu H7421-40). Interference filters (CVI Laser Corporation) of appropriate central wavelength and bandwidth for the excitation (425 nm / 15 nm) and emission (530 nm / 30 nm) were used. The sample cell holder was kept at a constant temperature by a temperature-regulated water circulator (Fisher Scientific 1006 P). An effective sample volume of 150 μ L was estimated from the volume probed by the excitation beam in the sample cell. For the purpose of comparing the analytical performances of this LED-based fluorimeter with a commercially-available instrument, a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter was used in the following configuration: spectral bandpass of 20 nm, PMT voltage at 1 kV, in a standard 1 cm cuvette. The detection limits obtained with the LED-based detection platform for the perfectly matched hybridized complexes were about 2 orders of magnitude better than what is achievable with the dispersive spectrofluorimeter.

3.6.6 Data analysis

Each fluorescence data point in the accompanying figures is the average of at least 10 optical measurements. Each optical measurement is obtained by the integration of the fluorescence signal over a period of 10 s. The limit of detection is calculated as 3 times the standard deviation of the optical measurements for the blank signal, divided by the slope of the calibration curve.

3.6.7 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Infectio Diagnostic (IDI) Inc., and the Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Research and Technology Initiative (CRTI). Lumileds Lighting, LLC, is gratefully acknowledged for the donation of LED prototypes. The authors acknowledge O. Desjardins for some optical measurements, Y. Abed for viral cultures as well as J.P. Gayral and B.W. Smith for many useful advices.

3.7 References

- (1) Daar, A.S.; Thorsteinsdottir, H.; Martin, D.K.; Smith, A.C.; Nast, S.; Singer, A.C. *Nature Genetics* **2002**, *32*, 229.
- (2) Tyagi, S.; Kramer, F.R. *Nature Biotechnology*. **1996**, *14*, 303.
- (3) Elghanian, R.; Storhoff, J.J.; Mucic, R.C.; Letsinger, R.L.; Mirkin, C.A. *Science* **1997**, *277*, 1078.
- (4) Cao, Y.C.; Jin, R.; Mirkin, C.A. *Science* **2002**, *297*, 1503.
- (5) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A.J. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 365.
- (6) Wang, J.; Polsky, R.; Merkoci, A.; Turner, K.L. *Langmuir* **2003**, *19*, 989.
- (7) Ihara, T.; Nakayama, M.; Murata, M.; Nakano, K.; Maeda, M. *Chemical Communications* **1997**, 1609.
- (8) Patolsky, F.; Lichtenstein, A.; Willner, I. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 253.
- (9) Boon, E.M.; Ceres, D.M.; Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 1096.
- (10) Saghatelian, A.; Guckian, K.M.; Thayer, D.A.; Ghadiri, M.R. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 344.
- (11) Livache, T.; Roget, A.; Dejean, E.; Barthet, C.; Bidan, G.; Teoule, R. *Nucleic Acids Research* **1994**, *22*, 2915.
- (12) Youssoufi, H.K.; Garnier, F.; Srivastava, P.; Godillot, P.; Yassar, A. *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 7388.
- (13) Bauerle, P.; Emge, A. *Advanced Materials* **1998**, *10*, 324.
- (14) Youssoufi, H.K.; Yassar, Y. *Biomacromolecules* **2001**, *2*, 58.
- (15) Ho, H.A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Doré, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1548.
- (16) Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10954.

- (17) Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 896.
- (18) Liu, B.; Gaylord, B.S.; Wang, S.; Bazan, G.C. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6705.
- (19) Nilsson, K.P.R.; Inganäs, O. *Nature Materials* **2003**, *2*, 419.
- (20) Swager, T.M. *Accounts of Chemical Research* **1998**, *31*, 201.
- (21) Faïd, K.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **1998**, *120*, 5274.
- (22) Chen, L.; McBranch, D.W.; Wang, H.L.; Helgeson, R.; Wuld, F.; Whitten, D.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 12287.
- (23) Harrison, B.S.; Ramey, M.B.; Reynolds, J.R.; Schanze, K.S. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 8561.
- (24) Petrak, K. in *Polyelectrolytes: Science and Technology*, M. Hara Ed., Marcel Dekker, New York, **1993**, pp. 265-297.
- (25) Nilsson, K.P.R.; Andersson, M.R.; Inganäs, O. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2002**, *14*, 10011.
- (26) Imasaka, T.; Kamibuto, T.; Kawabata, Y.; Ishibishi, N. *Analytica Chimica Acta*, **1983**, *153*, 261.
- (27) Smith, B.W.; Jones, B.T.; Winefordner, J.D. *Applied Spectroscopy* **1988**, *42*, 1469.
- (28) Tong, W.; Yeung, E.S. *Journal of Chromatography A*, **1995**, *718*, 177.
- (29) Chen, L.; Xu, S.; McBranch, D.; Whitten, D. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 9302.
- (30) Gaylord, B.S.; Wang, S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 6417.
- (31) Lavigne, J.J.; Broughton, D.L.; Wilson, J.N.; Erdogan, B.; Bunz, U.H.F. *Macromolecules* **2003**, *36*, 7409.
- (32) Klimov, A.I. ; Rocha, E. ; Hayden, F.G. ; Shult, P.A. ; Roumillat, L.F. ; Cox, N.J. *Journal of Infectious Diseases* **1995**, *172*, 1352.

CHAPITRE 4

DIRECT MOLECULAR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS BY FLUORESCENCE SIGNAL AMPLIFICATION*

4.1 Résumé

Un senseur à ADN intégré et sans PCR, qui combine un récepteur reconnaissant une séquence d'ADN spécifique, un transducteur optique moléculaire ainsi qu'un mécanisme d'amplification intrinsèque de la fluorescence, est décrit. Ce senseur est basé sur les différentes conformations qu'un polythiophène cationique adopte lorsqu'il y est lié de façon électrostatique avec de l'ADN simple ou double brin ainsi que sur un transfert énergétique rapide et efficace entre le complexe formé du polythiophène fluorescent et d'ADN double brin et les fluorophores à proximité qui sont attachés aux sondes d'ADN. Ce système de détection moléculaire permet la détection de seulement 5 molécules dans 3 mL de solution aqueuse, ou 3 zM, en 5 minutes. De plus, ces travaux démontrent pour la

* Ho, H.A.; Doré, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M.G.; Tanguay, R.M.; Boudreau, D. and Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12673-12676.
Lien HTML : <http://pubs.acs.org/cgi-bin/article.cgi/jacsat/2005/127/i36/pdf/ja053417j.pdf>

première fois la détection directe de polymorphismes mononucléotidiques dans la séquence d'ADN extraite d'échantillons cliniques en seulement quelques minutes sans qu'aucune amplification d'acides nucléiques ne soit nécessaire.

4.2 Abstract

An integrated PCR-free DNA sensor, which combines a sequence-specific receptor, an optical molecular transducer, and an intrinsic fluorescence amplification mechanism, is reported. This sensor is based on the different conformations adopted by a cationic polythiophene when electrostatically bound to ss-DNA or ds-DNA, and on the efficient and fast energy transfer between the resulting fluorescent polythiophene / ds-DNA complex and neighboring fluorophores attached to ss-DNA probes. This molecular system allows the detection of only 5 molecules in 3 mL of an aqueous solution, or 3 zM, in 5 minutes. Moreover, this work demonstrates for the first time the direct detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) from clinical samples in only a few minutes, without the need for nucleic acid amplification.

4.3 Introduction

Simple and ultrasensitive sequence-specific DNA biosensors are urgently needed for the rapid diagnosis of infections and genetic diseases as well as for environmental and forensic applications. For instance, the efficient and affordable detection of infectious disease agents is seen by the World Health Organization as the most critical biotechnological development for improving health in developing countries.¹ The recognition capabilities of DNA through hybridization reactions are well-established, but adequate transducers are needed to generate a physically measurable signal from the hybridization event. For this purpose, various optical (molecular beacons, DNA-derivatized nanoparticles, etc.) and electrochemical (redox-active nucleic acids, enzymatic systems, etc.) DNA sensors have been proposed.²⁻¹³ Many of them rely on some form of chemical amplification, such as the polymerase chain reaction¹⁴ (PCR), to provide the detection sensitivity and specificity needed for a rapid assessment of the identity of pathogens which might be present in various clinical and environmental samples. However, PCR requires complex mixtures and sophisticated hardware to perform efficiently the enzymatic reaction. To develop particularly simple and inexpensive assays, we report herein a DNA detection system which combines an anionic oligonucleotide probe, a cationic polymeric transducer which also serves as a localized counter-ion promoting specific hybridization, and an intrinsic photonic amplification mechanism. For the first time, it is possible to easily and specifically detect as few as 5 molecules of DNA extracted from clinical samples, in 5 minutes. This approach is suitable for the rapid assessment of the identity of single nucleotide polymorphisms (SNPs), genes, and pathogens without the need for nucleic acid amplification.

4.4 Results and Discussion

To develop this direct molecular detection approach, a cationic polythiophene (Polymer 1 in Figure 4.1) was first synthesized as described elsewhere.^{10,13} This water-soluble conjugated polymer exhibits color and fluorescence changes when put in the presence of single-stranded (ss) or double-stranded (ds) nucleic acids. For instance, when a 20-mer unlabeled capture probe (*i.e.* X1: 5'-CATGATTGAACCATCCACCA-3') is stoichiometrically (on a repeat unit basis) added to polymer 1, the fluorescence of the polymer is quenched and the mixture becomes red ($\lambda_{\text{max}} = 527$ nm), corresponding to a planar, highly conjugated aggregated form of the polythiophene. Upon addition of a complementary oligonucleotide (*i.e.* Y1: 3'-GTACTAACTTGGTAGGTGGT-5') to the capture strand, triplex formation results in a helical conformation of the polythiophene leading to a yellow color ($\lambda_{\text{max}} = 421$ nm; Figure 4.1A, a) with fluorescence at 530 nm (Figure 4.1B, a). This helical structure of the polythiophene in the triplex form was confirmed previously by circular dichroism measurements.¹⁰

A new integrated DNA sensor was then designed by combining this polymeric transducer with capture probes labeled with a fluorophore (e.g. Alexa Fluor 546) in order to induce Förster resonance energy transfer (FRET). With this new transduction strategy, the stoichiometric duplex still gives a red color (Figure 4.1A, b) and quenched fluorescence (Figure 4.1B, b). When this duplex hybridizes with its complementary oligonucleotide, a new absorption feature appears at 420 nm which is related to the formation of a triplex (see Figure 4.1A, c). Upon excitation at 420 nm, the fluorescence band at 530 nm of the resulting triplex (the donor in this FRET scheme) overlaps neatly with the absorption spectrum of the acceptor (Alexa Fluor 546, absorption peaks at 516 and 556 nm in Figure 4.1A, c) which then emits at longer wavelengths (emission maximum at 572 nm, see Figure 4.1B, c). Upon addition of non-complementary or mismatched DNA to the duplex, the complex remains in the red non-fluorescent form, preventing the FRET mechanism from occurring. Consequently, the fluorescence intensity measured (in the same experimental conditions) with the perfect complementary ss-DNA strand is always higher than that obtained with targets having two (*i.e.* Y2: 3'-GTACTAACTTCCGAAAGGTGGT-5') mismatches or even one (*i.e.* Y3: 3'-GTACTAACTTCGTAGGTGGT-5') mismatch.

More interestingly, as shown in Figure 4.2, starting with a large number of duplexes probes (*ca.* 10^{10} copies), 30 copies of 20-mer target oligonucleotides are easily detected from a volume of 3 mL, and perfectly complementary targets can still be distinguished at such low concentrations from sequences having two or even one mismatch. The detection limit calculated from these data is 5 copies in 3 mL, or 3 zM, with a custom blue-LED fluorimeter whereas a somewhat higher detection limit of 30 copies in 3 mL, or 18 zM, was obtained using a commercial (Varian Cary Eclipse) spectrofluorimeter (see supporting information). Previous studies described an amplified quenching of the signal¹⁵⁻²⁰, whereas our approach involves a “turn-on” signal amplification.^{10,11,15} In the present case, the amplification of the signal does not come only from the large optical density of the polymer but could also come from a fast and efficient energy transfer¹⁵⁻²⁰ from the helical and well-structured polythiophenes to many neighboring chromophores, a process that can be described as “superlighting” or “fluorescence chain reaction” (FCR) (see Figure 4.3). Moreover, because of the small Stokes shift of the Alexa Fluor chromophore, it is possible

that energy transfer occurs also between the aggregated chromophores.¹⁹ To support these assumptions, dynamic light scattering measurements have clearly revealed the formation of nano-aggregates of duplexes ca. 80 nm in diameter which are preserved upon hybridization (see chapter 6 of this thesis for a more detailed description of the aggregates). Moreover, it is worth noting that this photonic amplification effect is not observed for unlabeled ss-DNA probes, for which limits of detection in the attomolar range were reported.¹³

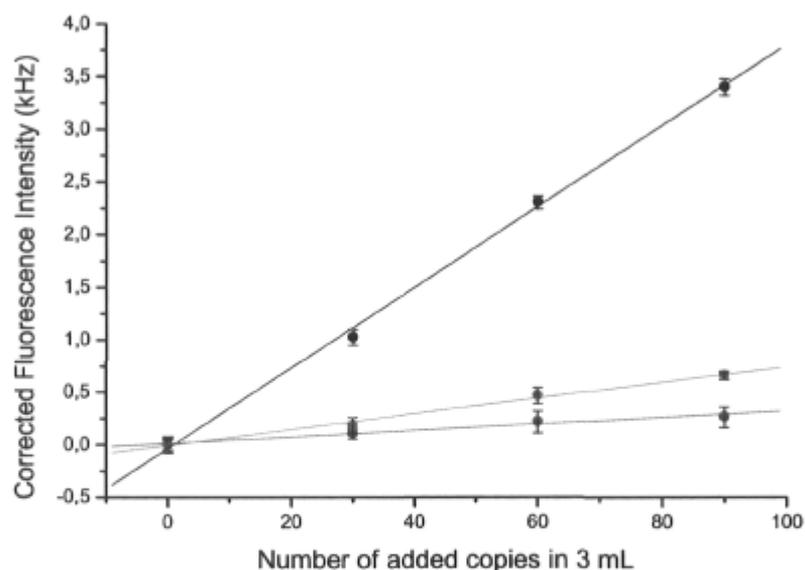


Figure 4.2 Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm in pure water at 55°C, as a function of the number of 20-mer oligonucleotide target copies: (blue) polymer 1/X1+AF546 + Y1 (perfect match); (red) polymer 1/X1+AF546 + Y2 (two mismatches); (green) polymer 1/X1+AF546 + Y3 (one mismatch).

This novel signal amplification detection scheme also makes possible the direct detection of ds-DNA at ultralow concentration levels. Because the probe-to-target hybridization reaction is in competition with rehybridization of the ds-DNA, most previously reported direct DNA detection techniques rely on the availability of the target sequence as ssDNA. In the case of our polythiophene transducer, previous studies^{10,13} have

shown that the presence of non-complementary ds-DNA may lead to false positive signals since the polythiophene has a higher affinity towards ds-DNA compared to the ss-DNA probes. However, experimental conditions have been found that selectively enhance the recognition reaction between the DNA capture probe and the DNA target. Specifically, in pure water at 65°C, all denaturated DNA material remains denaturated and hybridization essentially only occurs with labeled ss-DNA probes in the duplexes, promoted by the electrostatically-bound cationic polythiophene transducer which also serves as a localized counter-ion for the negative charges of the phosphate moieties.

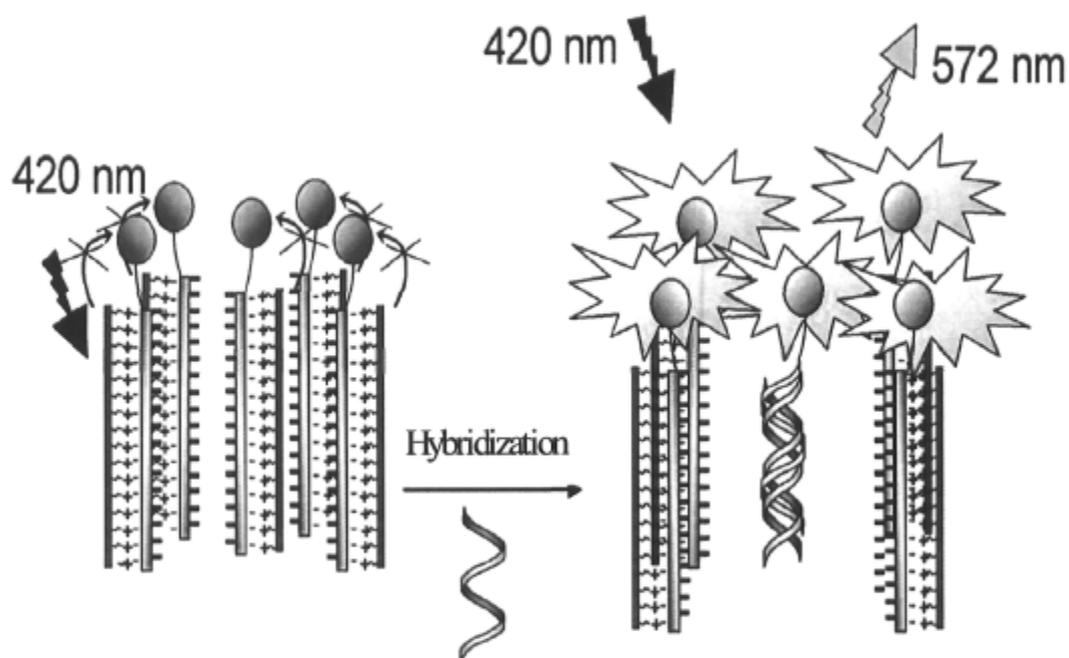


Figure 4.3 Schematic description of the proposed signal amplification detection mechanism based on the conformational change of cationic polythiophene and energy transfer for ultrasensitive, selective, and rapid DNA detection.

The high selectivity provided by the FRET-enhanced detection scheme and this ability of the polythiophene transducer to promote hybridization in otherwise unfavorable conditions was used to distinguish disease-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) in non amplified human genomic DNA samples. For instance, Figure 4.4A shows calibration curves obtained by testing normal (*i.e.* wild type) human genomic DNA, with

probe sequences complementary to the wild type (TAN 101: 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3') and mutated (TAN 100: 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3') sequences of the gene defective in the human genetic disease, hereditary tyrosinemia type I.^{21,22} Similarly, Figure 4.4B shows curves obtained with mutated DNA (from ill patients) tested with the same two probes. Interestingly, heterozygote samples gave a fluorescence signal about half of the values obtained for the perfect match with homozygote samples. These data were obtained in 5 minutes and show that we can easily and rapidly distinguish wild-type DNA from mutated DNA, *i.e.* we can detect a single nucleotide polymorphism (SNP) in the entire genome, without prior amplification or enrichment of the target and at concentration levels similar to those achieved with 20-mer oligonucleotides (Figure 2), *i.e.* about 5 copies in the entire 3 mL sample volume. Other examples are provided in the supplementary information section.

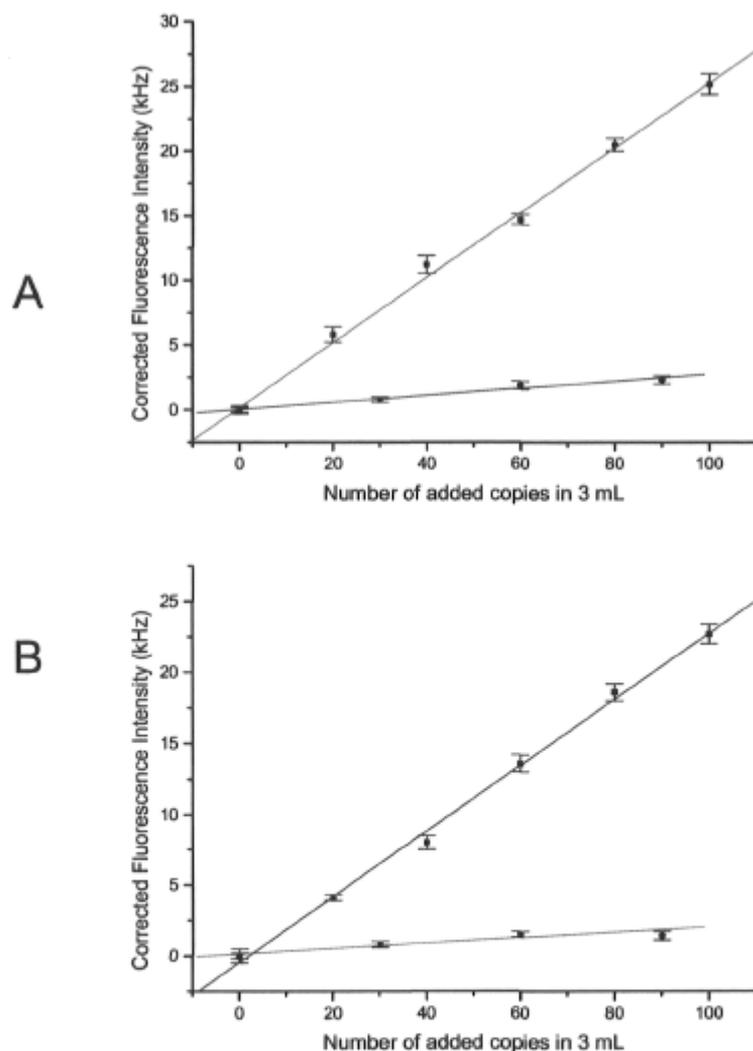


Figure 4.4 A) Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm in pure water at 65°C, as a function of the number of genomic DNA copies: (red) TAN 101 + wild type genomic DNA (perfect match); (blue) TAN 100 + wild type genomic DNA (one mismatch). **B)** Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm, as a function of the number of genomic DNA copies: (blue) TAN 100 + mutated genomic DNA (perfect match); (red) TAN 101 + mutated genomic DNA (one mismatch).

Furthermore, although both 15-mer oligonucleotides used to probe tyrosinemia in the example above were designed to be unique in the human genome, there are numerous loci presenting only one mismatch with these probes, notably at the extremities. However, no significant hybridization signal was detected from these non-specific target sequences. We believe that very high stringency is obtained by hybridizing in water at 65°C where the only counter-ion available to neutralize the phosphate backbone of the nucleic acids is the cationic polythiophene transducer localized on the capture probe therefore, permitting exquisite specificity. All these features suggest broad applicability of our new method to selectively detect few copies of target nucleic acid sequences in complex mixtures, without the need for nucleic acid amplification. To the best of our knowledge and according to a recent review,²³ this combination of sensitivity, selectivity, and simplicity cannot be reached by any other available technique.

4.5 Conclusion

We have developed an integrated molecular system which combines a specific receptor, an optical transducer, and an amplification mechanism. This novel method is based on different electrostatic interactions between a cationic polythiophene (i.e. polymer 1) and ss-DNA or ds-DNA, and the efficient energy transfer between the resulting triplex (complexation between the cationic polythiophene and ds-DNA) and neighboring fluorophores attached to ss-DNA probes. This impressive methodology leads to the specific detection of few copies of nucleic acids in 5 minutes in water. The sensitivity and specificity of this new approach should therefore lead to simple, rapid, and cost-effective diagnostic tools without any PCR amplification steps. In addition, this polymeric system shows all of the necessary features to be easily adapted for multi-parametric detection on solid supports.

4.6 Experimental Section

4.6.1 Materials

Polymer 1 was synthesized according to our previously published work.^{10,13} On the basis of size-exclusion chromatography measurements calibrated with monodisperse polyvinylpyridinium samples, this polymer has a number-average molecular weight of 11,000 with a polydispersity index of 2.0.²⁴ Labeled and unlabeled oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies, Inc. For studies on 20-mer oligonucleotides, the probe (X1) and targets (Y1, Y2, and Y3) were derived from probes designed for the detection of *Candida* yeast species.¹⁰ For the studies involving human genomic DNA, the hereditary disease called *hereditary tyrosinemia* was chosen as a target because of its severity and importance in the Quebec region.²¹ We first focused our efforts on the IVS12 splice mutation, mostly because it is well documented and very frequent. For the detection of tyrosinemia type I IVS12+5 G->A splice mutation,^{21,22} the 15-mer capture probe sequence complementary to the mutated sequence in the genome was (TAN 100) 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3', and the capture probe complementary to wild type DNA was (TAN 101) 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3'. Alexa Fluor 546 was attached at the 5'-end of the oligonucleotide probes. For the detection of a specific sequence in the entire human genome to be quantitatively valid, it is very important to verify that this sequence is unique. The probes TAN 100 and TAN 101 were thus tested against the human genome, using BLAST and FASTA calculations and the GenBank database. The TAN 100 and TAN 101 probe sequences were found to be unique to the IVS12 mutation. Despite this uniqueness, it should be noted that several sites displaying a single nucleotide difference were found. All oligonucleotides solutions were diluted with sterilized water, and all dilutions and solution handling were performed in plasticware.

4.6.2 Extraction and purification of DNA from blood

Human genomic DNA used in figure 4 was extracted from patient blood as previously described²² and stored frozen at -20°C until use and aliquoted to the desired concentrations.

4.6.3 General procedure for optical measurements

UV-visible absorption spectra (Figure 4.1A) were taken using a Hewlett-Packard (model 8452A) spectrophotometer. Fluorescence spectra (Figure 4.1B) were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter, while the fluorescence calibration curves (Figures 4.2 and 4.4) were obtained on a custom portable fluorimeter described elsewhere¹³ and modified for measurement of Alexa Fluor emission at 572 nm. In all cases, excitation was made at 420 nm, and the fluorescence data points on the calibration curves come from the average of 5 optical measurements at 572 nm. Each optical measurement is obtained by the integration of the fluorescence signal over a period of 10 s. For all optical measurements, 3-mL quartz cells with an optical path length of 1.0 cm were utilized. The limit of detection is calculated as 3 times the standard deviation of the optical measurements for the blank signal, divided by the slope of the calibration curve. Duplexes were prepared by mixing stoichiometric quantities of the polymer and of the oligonucleotide capture probes to give a concentration of 2.14 μM (stock solution). The resulting complex was then diluted to the desired concentrations. Hybridization experiments were carried out at 55°C for the 20-mer oligonucleotides and at 65°C, for the detection of tyrosinemia SNPs. For the tyrosinemia studies, the samples were first denatured at 100°C.

4.6.4 Dynamic light scattering measurements

Dynamic light scattering measurements were made on a Malvern Zetasizer Model 3000 HSA. An aqueous solution of the polymer-labeled probe complex (“duplex”) at a concentration of 2.67×10^{-7} M (or 1.61×10^{11} copies/ μ L) was analyzed. The resulting particle size distributions were narrow (FWHM < 20nm) and obtained several times with good precision ($\chi^2 < 2$).

4.6.5 Acknowledgements

This work was supported by the Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Research and Technology Initiative (CRTI), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). K.D. acknowledges also NSERC for a scholarship. The authors thank Dr. Farid Bensabaa (ICPET, NRC, Ottawa, Canada) for assistance during dynamic light scattering measurements as well as Professors G.D. Scholes (Univ. of Toronto), R.D.J. Miller (Univ. of Toronto) and J.L. Brédas (Georgia Tech) for valuable discussions about energy transfer in conjugated systems.

4.6.6 Supporting Information Available

Additional detection examples using a commercial (Varian Cary Eclipse) spectrofluorometer or a custom blue-LED fluorimeter with different DNA targets. This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>, and for the purpose of this thesis, will be following the references section.

4.7 References

- (1) Daar, A.S.; Thorsteindottir, H.; Martin, D.K.; Smith, A.C.; Nast, S.; Singer, A.C. *Nature Genetics* **2002**, *32*, 229-232.
- (2) Fodor, S.P.A.; Read, J.L.; Pirrung, M.C.; Stryer, L.; Lu, A.T.; Solas, D. *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- (3) Tyagi, S.; Kramer, F.R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
- (4) McQuade, D.T.; Pullen, A.E.; Swager, T.M. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2537-2574.
- (5) Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1192-1199.
- (6) Storhoff, J.J.; Lucas, A.D.; Garimella, V.; Bao, Y.P.; Müller, U.R. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 883-887.
- (7) Nam, J.M.; Stoeva, S.I.; Mirkin, C.A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
- (8) Liu, R.H.; Yang, J.; Lenigk, R.; Bonanno, J.; Grodzinski, P. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1824-1831.
- (9) Liu, B.; Bazan, G.C. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 4467-4476.
- (10) Ho, H.A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Doré, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1548-1551.
- (11) Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**, *99*, 10954-10957.
- (12) Nilsson, K.P.R.; Inganäs, O. *Nature Materials* **2003**, *2*, 419-424.
- (13) Doré, K.; Dubus, S.; Ho, H.A.; Lévesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M.G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.
- (14) Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.

- (15) McQuade, D.T.; Hegedus, A.H.; Swager, T.M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 12389-12390.
- (16) Levitsky, I.A.; Kim, J.; Swager, T.M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1466-1472.
- (17) Nguyen, T.-Q.; Wu, J.; Doan, V.; Schwartz, B.J.; Tolbert, S.H. *Science* **2000**, *288*, 652-656.
- (18) Kim, J.; Swager, T.M. *Nature* **2001**, *411*, 1030-1034.
- (19) Beljonne, D.; Pourtois, G.; Silva, C.; Hennebicq, E.; Herz, L.M.; Friend, R.H.; Scholes, G.D.; Setayesh, K.; Müllen, K.; Brédas, J.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10982-10987.
- (20) Chen, L.; McBranch, D.W.; Wang, H.L.; Helgeson, R.; Wudl, F.; Whitten, D.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 12287-12292.
- (21) St-Louis, M.; Tanguay, R.M. *Human Mutation* **1997**, *9*, 291-299.
- (22) Phaneuf, D.; Lambert, M.; Laframboise, R.; Mitchell, G.; Lettre, F.; Tanguay, R.M. *Journal of Clinical Investigation* **1992**, *90*, 1185-1192.
- (23) Piunno, P.A.E.; Krull, U.J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *381*, 1004-1011.
- (24) Le Floch, F.; Ho, H.A.; Harding-Lepage, P.; Bédard, M.; Neagu-Plesu, R.; Leclerc, M. *Advanced Materials*, **2005**, *17*, 1251-1254.

4.8 Supporting information

Experiments similar to those described in figure 2 in the main text were performed on a commercial spectrofluorimeter (Varian Cary Eclipse). Highly sensitive and selective detection of ss-oligonucleotides was also obtained, as shown in Figure 4.5. In this case, the limit of detection is about 30 copies in 3 mL in pure water at 55°C. We also tested the applicability of the method to various kinds of genetic material, i.e. PCR products (amplicons) and human genomic DNA. Although our technique aims at eliminating the need for PCR amplification, amplicons products are an obvious choice because they are widely used in biotechnology research. Furthermore, they are also a model of double-stranded DNA, and thus serve as a good intermediate between oligonucleotides and the complete human genome. For this study, we use the probe named X1+AF546, which was also used in the oligonucleotide studies (see figure 2 in the main text), with the *C. albicans* and *C. dubliniensis* amplicons prepared as described below.

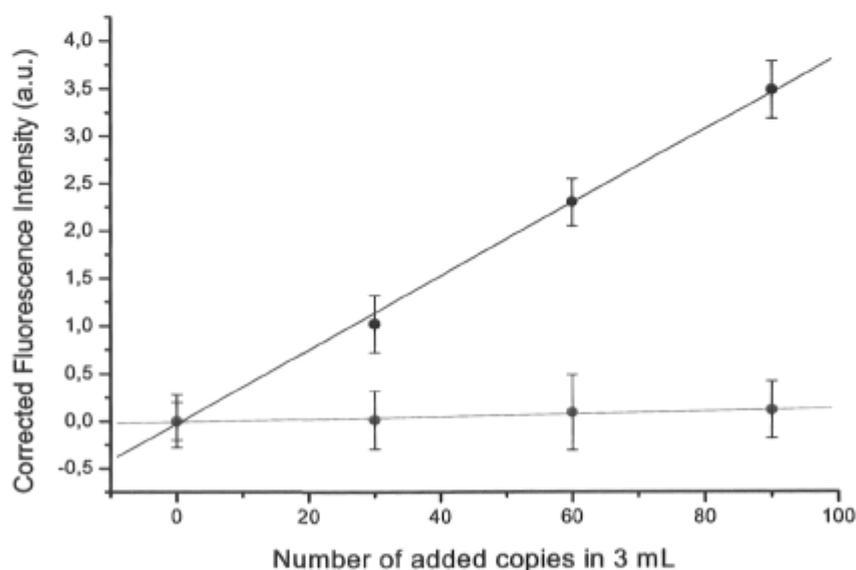


Figure 4.5 Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to the initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm in pure water at 55°C, as a function of the number of 20-mer oligonucleotide target copies: (blue) perfect match; (red) two mismatches.

Preparation of 150 bp amplicons of a portion of the EF-1a gene from *C. albicans* and *C. dubliniensis*

350 pg of genomic DNA preparation at a concentration of 350 pg/ μ L was transferred into a 19 μ L PCR mixture containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.1), 0.1% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 μ M concentrations of primers ECal61 [5'-CAAGAAGGTTGGTTACAACCCAAAGA-3'] and Ecal184 [5'-AGGTCTTACCAGTAACTTTACCGGAT-3'], 200 μ M deoxynucleoside triphosphate (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.), 3.3 μ g of bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada) per μ L, and 0.025 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, Wis.) combined with the TaqStart antibody (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, Calif.). The PCR mixtures were subjected to thermal cycling (3 min at 95°C and then 40 cycles of 30 sec at 95°C for the denaturation step, 30 sec at 55°C for the annealing step and 30 sec at 72°C for the extension step) on a PTC-200 thermal cycler (MJ Research Inc., Watertown, Mass.). PCR amplification products were purified by QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc., Mississauga, Ontario, Canada) using deionized water for eluting the amplicons.

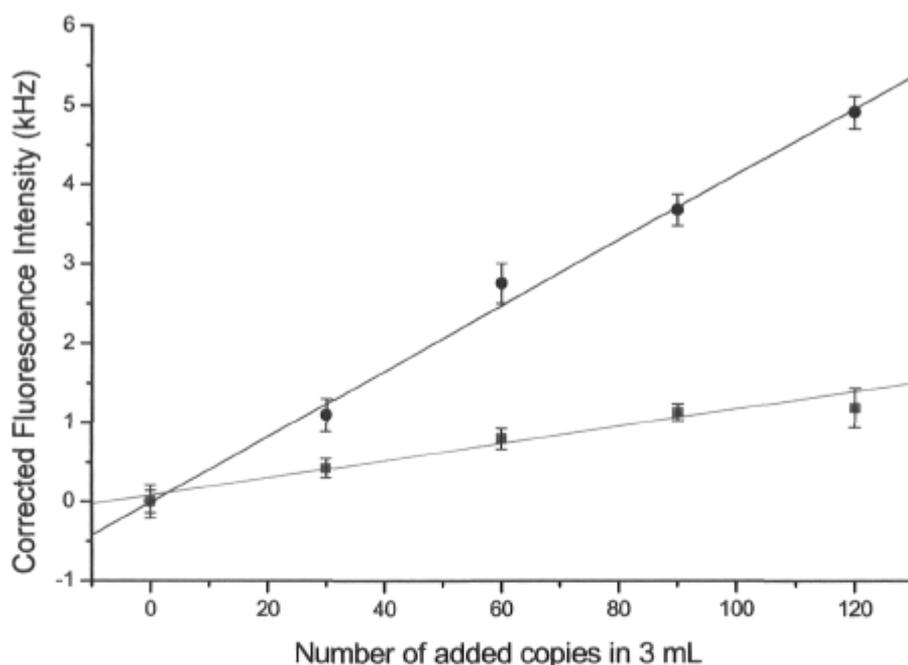


Figure 4.6 Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to the initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm in pure water at 65°C, as a function of the number of 150 bp amplicon target copies ; (blue) perfect match (*C. albicans* amplicon); (red) two mismatches (*C. dubliniensis* amplicon).

Figure 4.6 was obtained using the same procedure described in the text. One can see that the method developed can easily distinguish perfectly matched amplicons from those differing by only two nucleotides in a 150 nucleotide-long ds-DNA. This high degree of selectivity was obtained using the intrinsic signal amplification process described in the main text and optimized experimental conditions (pure water at 65°C).

For human DNA, and using the same calculations and database than those reported in the experimental section of the main manuscript, we then tested our method using another probe sequence, this time specific to the E357X mutation, which is also reported as causing hereditary tyrosinemia [ref 21 in the text]. New probes specific to the E357X mutation, i.e. TAN 102a: 5'-/5Alex546N/ AGGAGCCAGAAAACCTTCG-3 and TAN 103a :5'-/5Alex546N/ AGGAGCCATAAAAACCTTCG-3 were designed in-house and synthesised

by IDT DNA technologies Inc. In order to test the applicability of our method to human genomic DNA extracted using various extraction techniques (in the main text we presented results obtained using the phenol-chloroform extraction method), we used human genomic DNA extracted using another, broadly used method, the Promega protocol which is described below.

Purification of DNA from the blood of human healthy volunteers

7 mL of blood were drawn from healthy volunteers using Vacutainer™ tubes containing (K3) EDTA (Lavender caps, order number 366450, Becton Dickinson). 200 µL of this blood were used for DNA extraction and purification using the MagneSil KF Genomic System (Cat no. MD1460) from Promega. The sample preparations were performed according to the manufacturer's instructions (MagneSil™ KF Genomic System, MD1460rev01) except for one slight modification: in step IVb of the Promega protocol, 200 µL of TE were used instead of 200 µL of nuclease-free water. The magnetic particles were handled using a KingFisher™ mL magnetic particle processor from Thermo Labsystems driven by the "PromegaGenomic" program Version 1.0 (MagneSil™ KF genomic system, program downloaded from the Promega web site as "KfmLMagGenomv1_0").

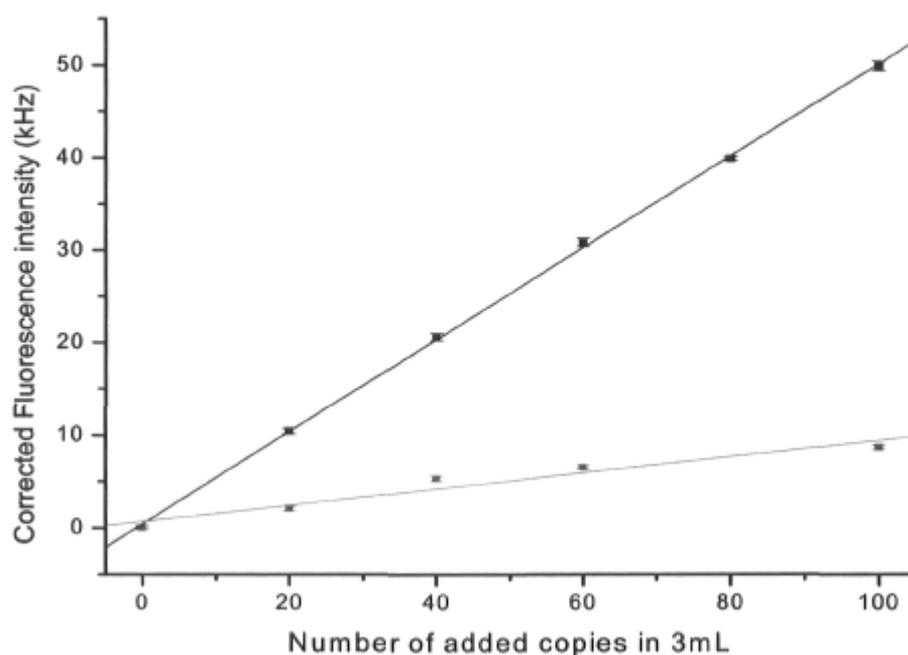


Figure 4.7 Corrected fluorescence intensity (after subtraction of the signal due to the initial duplex) measured at 572 nm, with excitation at 420 nm in pure water at 65°C, as a function of the number of genomic DNA copies: (blue) TAN 102a + wild type genomic DNA (perfect match); (green) TAN 103a + wild type genomic DNA (one mismatch).

Figure 4.7 was obtained using the same experimental protocol as described in the main text. The curves obtained with the TAN102a and TAN103a probes specific to the E357X mutation are very similar to those obtained for the IVS12 mutation (Figure 4.4 in the main text). The higher detection sensitivity in the present case is due to the increased number of polymeric chromophoric units when working with longer, 18-mer probes (as compared with the 15-mer probes used for the IVS12 mutation). This further example of SNP detection in total, non-amplified human genomic DNA confirms the capacity of our technique to selectively and specifically detect a few copies of DNA strands in the presence of a much greater amount of non-specific DNA material.

CHAPITRE 5

INVESTIGATION OF A FLUORESCENCE SIGNAL AMPLIFICATION MECHANISM USED FOR THE DIRECT MOLECULAR DETECTION OF NUCLEIC ACIDS*

5.1 Résumé

Un mécanisme d'amplification du signal de fluorescence permettant d'obtenir des limites de détection pour l'ADN de l'ordre de la zeptomole a été étudié. Les propriétés photophysiques du système moléculaire ont été mesurées de façon à mieux expliquer l'amplification de signal observée. Nous démontrons que le confinement du transducteur fluorescent de l'hybridation de l'ADN dans des agrégats améliore son rendement quantique et sa photostabilité. De plus, nous démontrons que la combinaison du transfert d'énergie résonnant au sein des agrégats avec l'utilisation d'un polymère conjugué comme transducteur d'hybridation et donneur, donne naissance à un couplage énergétique ultrarapide et efficace qui peut mener à l'excitation d'un grand nombre d'accepteurs par un seul donneur.

* Dore, K.; Leclerc, M.; Boudreau, D. *Journal of Fluorescence* **2006**, *16*, 259-265.
Lien HTML : <http://www.springerlink.com/media/274eulluuk0w7a768x2m/contributions/c/2/2/3/c2235417504h4r52.pdf>

5.2 Abstract

A fluorescence signal amplification mechanism allowing detection limits for DNA in the zeptomolar range was investigated. Photophysical properties of the molecular system were studied in order to better explain the signal amplification that is observed. We show that the confinement of a fluorescent DNA hybridization transducer in aggregates improves its quantum yield and photostability. Furthermore, we show that the combination of the resonance energy transfer occurring within the aggregates with the use of a conjugated polymer as the hybridization transducer and donor allows ultrafast and efficient energy coupling to the aggregates and can lead to the excitation of a large number of acceptors by only one donor.

5.3 Introduction

The interest for simple yet robust tools for the rapid detection of genetic or infectious diseases, via the recognition of specific sequences of their genome, has grown tremendously in recent years. For example, rapid and accurate detection is essential in order to accurately diagnose pathogenic diseases at the first stages of an infection¹. For this purpose, various optical and electrochemical DNA sensors have been proposed²⁻¹³, most of them relying either on complex instrumentation or on some form of chemical amplification (such as the polymerase chain reaction, PCR¹⁴), or both. We recently reported on the development of an ultrasensitive and sequence-specific DNA detection system that is particularly simple and reliable^{10,15}. This DNA sensor is based on electrostatic interactions between a cationic polymeric optical transducer and a fluorescently-tagged negatively-charged nucleic acid probe. It was previously reported¹⁰ how this cationic polythiophene transducer, fluorescent in its native random coil configuration, is quenched when it combines with a single-stranded DNA (*ssDNA*) probe to adopt a highly conjugated, planar conformation (hereafter called a “duplex”), but becomes luminescent ($\lambda_{exc}=420$ nm, $\lambda_{em}=530$ nm) when a complementary oligonucleotide target is added to this molecular system and the polymer binds in an helical and non-planar configuration (a “triplex”) with the negatively-charged phosphate backbone of the double-stranded DNA (*dsDNA*) (Figure 5.1A). More recently¹⁵, we have shown that tagging the DNA probe with a suitable fluorophore (Figure 5.1B) ($\lambda_{exc}=530$ nm, $\lambda_{em}=575$ nm) dramatically increases the detection sensitivity: starting with a large number of duplex probes (ca. 10^{10} copies), this sensing system allows the detection of as little as 5 *dsDNA* copies in 3 mL (3 μ M) in the presence of the entire human genome, in only 5 minutes and without the need for prior amplification of the target.

The model proposed to explain this massive increase in sensitivity involves the formation of aggregates of duplexes in solution, prior to the introduction of the target, which allows resonance energy transfer (RET) among one given donor and a large number of neighboring acceptors, the RET donor being a triplex formed of the DNA double helix

and the polymer chain wrapped around it (Figure 5.1B). The use of multiple acceptors to amplify the response of optical transducers has been used by other researchers, some of them also for biodetection purposes; however, they described an amplified quenching of the signal, whereas our approach seems to involve a signal amplification more akin to a “superlighting” process¹⁶⁻¹⁸. As was discussed by Scholes¹⁹, the donors and acceptors in supramolecular aggregates such as these may be close enough to perturb the transition densities of each species and the resulting energy transfer properties. Furthermore, some studies on RET systems localized in micelles²⁰ or well-structured aggregates²¹⁻²² show that the confinement of chromophores in specific domains in solutions could help the mechanism of energy transfer, either by decreasing the background from free chromophores²⁰ or the Förster distance²¹, or by increasing the rate of energy transfer²².

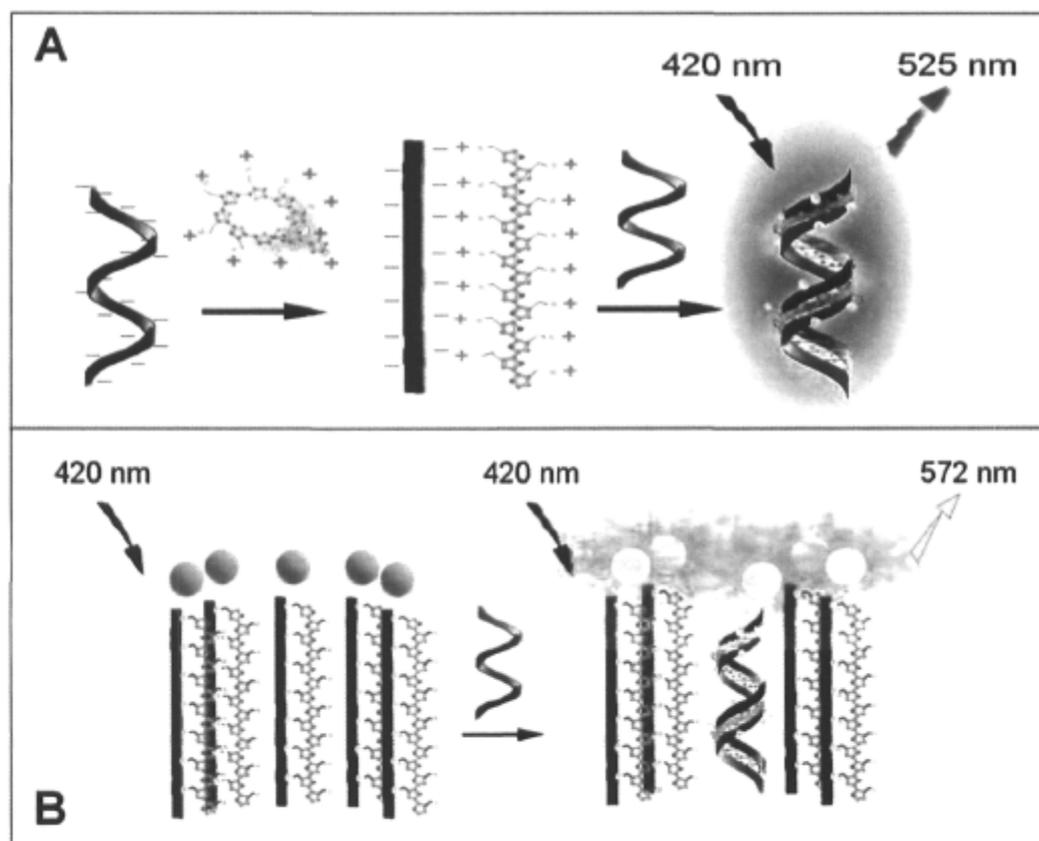


Figure 5.1 Schematic representation of the hybridization transduction mechanism for the non labeled (A) and labeled (B) systems.

In the present work, photophysical properties were studied by UV-visible photometry and spectrofluorimetry, in order to investigate the workings of the amplification mechanism process displayed by this molecular detection system. In particular, the energy transfer efficiency and dynamics were measured by frequency-domain spectrofluorimetry. These experiments should shed some light on the mechanisms involved in this optical system and eventually lead to the rational design of a completely new generation of ultrasensitive chemical and biochemical sensors.

5.4 Materials and methods

5.4.1 Materials

The polymeric transducer was synthesized according to the procedure previously published^{10,13}. Oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies, either labeled or not with Alexafluor 546 (referred to as AF546 in the text). For the sensitivity comparison studies, the DNA capture probe was a 20-mer sequence specific to the *Candida* yeast species, 5'-CAT GAT TGA ACC ATC CAC CA-3', and the target sequence was its perfect complementary strand 3'-GTA CTA ACT TGG TAG GTG GT-5'¹³. For all other experiments, the DNA capture probe was a 15-mer sequence specific to the human genomic IVS12 mutation responsible for the hereditary disease *tyrosinemia*, 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3', and the target sequence was its perfect complementary strand 3'-GGC CAC TTA TAG ACC-5'¹⁵. All dilutions and solution handling were performed in sterilized water and plasticware.

5.4.2 Hybridization conditions

For all studies involving DNA hybridization, the polymeric transducer was first mixed with the oligonucleotide probe, and the resulting mixture was diluted in pure water to the desired concentration after an equilibration period of at least 60 seconds to allow electrostatic complexation. The solution was then heated to 50°C (another 5 minutes is needed for equilibration) and the target DNA is added. Whereas less than five minutes are needed for hybridization to occur at the concentration level used for the present work ($\sim 10^{-7}$ M of probe-polymer complex), an additional equilibration period of 10 minutes was added to ensure complete and stable complex formation. For the non labeled system, hybridization was done in 0.1 M NaCl unless specified otherwise; for the labeled system, hybridization was performed in sterilized Nanopure® water. Detailed information on these experimental procedures can be found in references¹⁰ and¹³ for the non labeled system and in reference¹⁵ for the labeled system.

5.4.3 Determination of fluorescence quantum yield

The quantum yield (QY) of the fluorescent polymeric transducer within the aggregates (or associated with dsDNA) was determined using the following formula²³:

$$\phi_u = \phi_{ref} \cdot \frac{A_{fluo_u}}{A_{fluo_{ref}}} \cdot \frac{A_{ref}}{A_u} \cdot \frac{n_u^2}{n_{ref}^2} \quad (1)$$

Where ϕ_u is the QY to be determined and ϕ_{ref} is the QY of the reference; A_{fluo_u} and $A_{fluo_{ref}}$ stand for the area of the fluorescence spectra of the unknown and of the reference, respectively; A_u and A_{ref} represent the absorbance of the unknown and of the reference, respectively; and n_u^2 and n_{ref}^2 are the squared value of the refraction index of the solvent for the unknown and the reference, respectively. Lucifer Yellow, with a QY in water of 0.21²⁴ and a peak fluorescence wavelength of 530 nm, was used as the reference. The fluorescence spectra of Lucifer Yellow and of the labeled aggregates (fluorescence maximum at 575 nm, i.e. the peak fluorescence wavelength of AF546) were taken in identical experimental conditions. All fluorescence measurements were recorded on a Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. Absorbance measurements were performed at 425 nm (the peak absorption wavelength of both fluorophores) using a custom-made high-stability absorption photometer that allowed the measurement of very low absorbance changes with sufficient accuracy¹³. The instrument is based on a superluminescent blue LED source powered by an ultra low noise current source (Model LDX-3620, ILX Technologies), a photomultiplier tube detector (Model R3896, Hamamatsu) and a low noise current preamplifier (Model SR570, Stanford Research Systems).

5.4.4 Determination of RET efficiency

The RET efficiency (E) can be obtained experimentally according to equation 2²³, where F_{da} is the resulting fluorescence of the donor in presence of the acceptor and F_d the original fluorescence of the donor.

$$E = 1 - \left(\frac{F_{da}}{F_d} \right) \quad (2)$$

Both F_{da} and F_d were measured at 530 nm, the emission maximum of the donor.

5.4.5 Fluorescence lifetime measurements

Fluorescence lifetime measurements were performed using a frequency-domain lifetime spectrofluorimeter (Model Fluorolog Tau 3, Horiba Jobin-Yvon). The experiments were done using a 450 W Xenon excitation lamp and a photomultiplier tube detector. The modulation achieved by the Pockell cell and the high frequency RF amplifiers allowed a frequency modulation range of 5-300 MHz. In order to maximize the detection sensitivity, the emission monochromator was removed from the instrument and measurements were performed either using a highpass (>440 nm) dichroic filter (in which case Fluorescein was used as the lifetime calibration standard) or without any filter (in which case LUDOX® was used as the calibration standard).

5.4.6 Determination of Förster distance, donor-acceptor distance and RET transfer rate

The Förster distance R_0 for a RET system (i.e. the distance at which RET is 50%) is given by:

$$R_0 = 0.211 \left[\kappa^2 n^{-4} \cdot \phi_D \cdot J(\lambda) \right]^{\frac{1}{6}} \quad (3)$$

where κ is an orientation factor that varies between 0 and 4 (a value of 2/3 is usually taken for solutions, i.e. without orientation²³), n is the refractive index (for biological molecules in water, a value of 1.4 is suggested²³), ϕ_D is the quantum yield of the donor and $J(\lambda)$ is the

overlap integral between the donor emission and the acceptor molar extinction coefficient. The average distance between the donor and the acceptor (r) can then be obtained from the following expression:

$$\frac{1}{\tau_{DA}} = \frac{1}{\tau_D} + \left(\frac{1}{\tau_D} \cdot \frac{R_0^6}{r} \right) \quad (4)$$

where τ_{DA} is the lifetime of the AF546 quenched triplex and τ_D is the lifetime of the triplex. Finally, the transfer rate (k_t) can be obtained by:

$$k_t = \frac{1}{\tau_{DA}} - \frac{1}{\tau_D} \quad (5)$$

5.5 Results and Discussion

The degree of signal amplification achieved by the labeled molecular system was determined by comparing the signal sensitivity and RSD obtained for labeled and non labeled 20-mer oligonucleotides, using the best experimental conditions found for both systems^{13,15}. The results, presented in Table 5.1, show that the sensitivity is about 4000 times higher and the RSD on the polymer-probe complex signal (i.e. the blank signal) is 7 times lower for the labeled probe system vs. the non labeled system. This massive amplification of the detection sensitivity hinges on two conditions: the aggregates must be stable and compact enough to ensure a sufficient proximity between the donor and the acceptors, and the energy transfer between the triplex and the AF546 must allow the excitation of a large number of acceptors with only one donor. Dynamic light scattering has shown that aggregates are formed spontaneously when the polymer-labeled probe duplex is formed. The diameter of these aggregates is about 100 nm on average and remains stable upon hybridization¹⁵ (see chapter 6 of this thesis for a more detailed description of the aggregates). Assuming that the aggregates are spherical, that *ds*DNA is rod-shaped and has a radius of 9.5 Å and a length of 3.4 Å per base²⁵, and that the polymer-probe duplex has approximately the same volume (a volume of 5 nm³ is added for the AF546), a maximum of about 4200 labeled polymer-probe duplexes can fit in a 100 nm diameter spherical aggregate.

Table 5.1 Detection of *Candida* 20-mer target strand hybridized with labeled or non labeled probe using the polymer as a transducer

Sample	Experimental conditions	Sensitivity (counts/copy)	RSD on the duplex signal (%)
Non labeled probe ¹³	50°C, 0.1 M NaCl + 0.3 mM Triton X-100, detection at 530 nm	0.01	3.40
Labeled probe ¹⁵	50°C, pure water, detection at 575 nm	40	0.49

In order to confirm the dependence of the increase in signal amplification observed on the large excess of labeled probe-polymer duplexes (vs. DNA targets), the fluorescence intensity and QY of the triplex in the aggregates as well as the RET efficiency were measured as a function of the target to probe ratio, i.e. the number of added target *ssDNA* strands (in probe *ssDNA* equivalents), which turns out to be also the number of RET donors in the system (Figure 5.2). The results show that the slope of the fluorescence curve is greatest at the smallest target/probe ratios and diminishes rapidly as this ratio is increased. This is in agreement with the expected behavior of our model duplex aggregates, i.e. the relationship between the fluorescence intensity and the number of target copies should only be linear until the number of targets becomes equal, on average, with the number of aggregates. Past this point, the rate of increase in fluorescence will gradually diminish with increasing target concentration, until the increasing fraction of probes that become hybridized within the aggregates threaten the stability of the latter. Measurements by light scattering have shown that, for target/probe ratios higher than 25%, the aggregates collapse and reorganize into smaller entities. In addition, extrapolation of the QY and RET curves towards zero target concentration indicates that the RET efficiency and QY of the aggregates is close to 100% in the range of lowest concentrations. This observation, which could result from the confinement of the AF546 fluorophores and triplex donors within the aggregates and away from quenching species, is consistent with recent studies on the confinement of fluorescent guest molecules (pyrene butyric acid, PBA) in host capsules and the significant increase in fluorescence QY, an effect attributed by the authors to the structural constraint imposed by the host, which minimizes the radiationless decay pathways such as collisional quenching by solvent molecules. Furthermore, Nesterov and coworkers²⁶ found that the orientation of end-capped polymers within a liquid-crystal phase enhances its intrachain transfer rate and fluorescence QY.

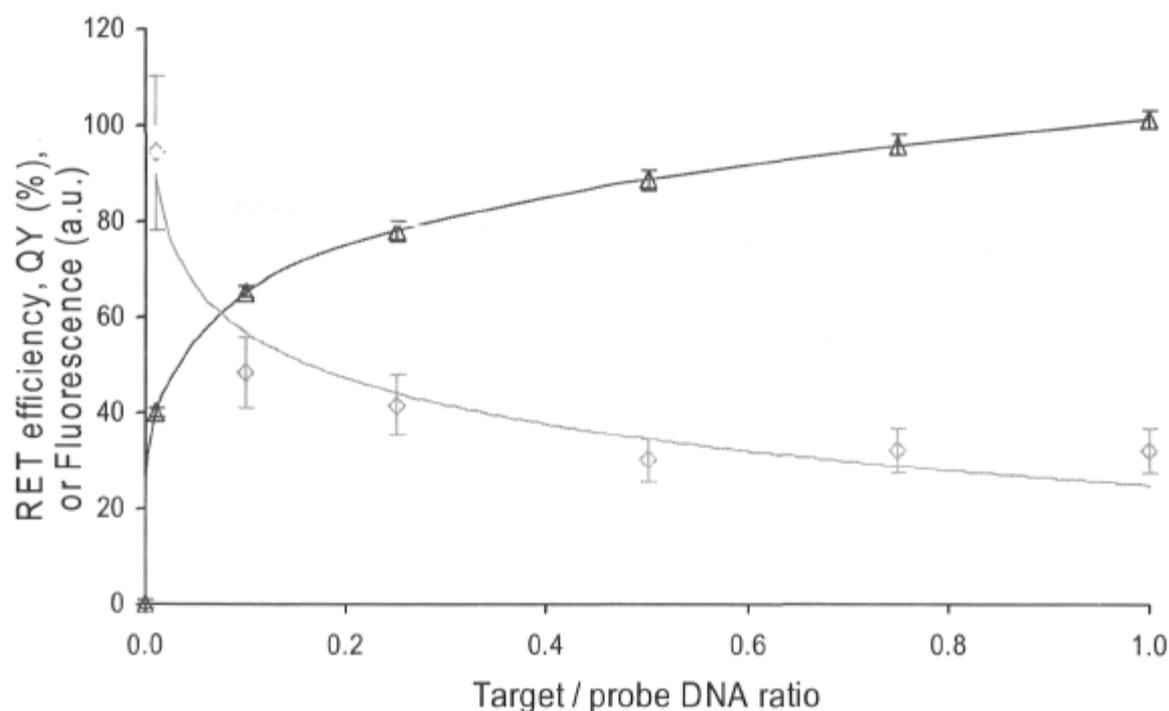


Figure 5.2 Fluorescence properties of the amplification system when varying the number of triplex donors (square symbols show the RET efficiency, diamonds show the triplex fluorescence quantum yield in the aggregates, and triangles represent fluorescence intensity).

In a similar way, our polymer, confined in the aggregates, could also be oriented within them, which could explain the increase of the quantum yield from 3% for the non labeled triplex to around 94% for the labeled aggregates (for a 1% equivalent of target DNA strand). The improved photostability of the triplex fluorophore when placed within the aggregates (100% of conserved fluorescence intensity after 60 min irradiation period, vs. 40% for the non labeled triplex) is also in agreement with the increase in QY observed in the studies described above^{26,27}.

Whereas the confinement and orientation of the triplex donor in the molecular aggregates may improve its quantum yield and energy transfer efficiency, the amplification mechanism proposed by our aggregate model must also involve a very fast means to transfer energy between the triplex donor and the AF546 acceptors, in order to explain the massive amplification factor observed. Recent studies on ultrafast intra- and interchain

energy transfer in conjugated polymers similar to ours¹⁶⁻¹⁸ mention that the energy transfer occurring in these molecules might differ from usual Förster type transfer. This type of energy transfer is indeed ultrafast; Beljonne *et al*¹⁶ calculated an interchain transfer rate of 139 ps^{-1} (i.e., each energy hop takes $\sim 7.2 \text{ fs}$) for short polyindenofluorene chains. In view of these studies and of the extremely high detection sensitivity of our sensing system, it is likely that the transfer rate of the triplex donor within the aggregates is also in the ultrafast regime (i.e. excited state lifetimes in femtosecond to picosecond range) to allow the excitation of a large number of AF546 molecules from only one triplex donor.

It has previously been reported²⁸ that oligothiophenes have fluorescence lifetimes below 1 ns; the measured lifetime of our polythiophene derivative (Table 5.2, line 1) is thus in agreement with the literature. We also determined that the lifetime of the polymer increases when complexed with *ds*DNA, the donor in the RET system (Table 5.2, line 2) and decreases drastically, as expected, when associated with the AF546-labeled probe (Table 5.2, lines 3-6). Interestingly, the τ_A values in lines 3-6 show that the measured lifetime of the AF546 acceptors is influenced by the RET of the donor. In the case of measurement 5, in which the tagged probe and the polymer are in 1:1 stoichiometric concentrations, the lifetime of the AF546 acceptors (1.59 ns) is shorter than the accepted value of 4 ns for the free fluorophore²⁸, due to the influence on the acceptor decay time of a fast RET rate between the donor and the acceptor²³. Given the significant difference in wavelength ($>100 \text{ nm}$) between the donor and acceptor absorption bands, we can assume that, for 1:1 stoichiometric conditions, the excitation of the AF546 is only due to RET. In such a case, the more efficient the RET becomes, the greater will be its influence on the decay of the acceptor²⁹. This might explain why the acceptor lifetime measured for samples with a higher percentage of hybridized probes (Table 5.2, line 6) is closer to the lifetime of the free AF546, since the RET of the labeled triplex was shown to decrease with increasing target/probe ratio (Figure 5.2). As for the acceptor lifetime values measured at 10% of hybridized probes but with a 1.5:1 excess of tagged DNA probes (Table 5.2, lines 3 and 4), which is shorter than the lifetime of the free AF546 (3.41 and 3.25 vs. 4 ns) but longer than that measured at a 1:1 probe-polymer ratio (1.59 ns), these results were probably influenced by the presence in the aggregates of uncomplexed AF546-labeled probes.

The values presented in Table 5.2 (obtained with 10% of hybridized probes) were used to calculate the Förster distance R_0 (equation 3). Calculating an overlap integral $J(\lambda)$ equal to $5.601 \times 10^{15} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ nm}^4$ between the triplex emission and the AF546 molar extinction coefficient, we obtained a R_0 of 53 Å for $\kappa = 2$ (a typical value for an oriented system), which falls within the range of 20 to 90 Å that is usual for molecular systems that display RET properties²³. In this case, the calculated average distance between donor and acceptor is 33 Å, which is lower than the Förster distance for the system. From these values, one can finally calculate a RET rate of 1.884×10^{10} transfers per second, or 53 ps per transfer, which is ca. 16 times faster than the emission decay time of 865 ps measured for the non labeled triplex. Faster energy transfers can even be anticipated with a lower degree of hybridization. Thus, the increase in detection sensitivity obtained from the use of labeled probes and the subsequent formation of labeled aggregates could result from the combination of this fast energy transfer between the polymer donor and the AF546 acceptors, the significant increase in the QY of the acceptors, as well as the homotransfer between AF546 chromophores (Stokes shift < 20 nm).

Table 5.2 Results from multiexponential analysis of lifetime measurements. (all lifetimes in ns and taken at 50°C in pure water, unless specified otherwise)

Sample	α_T	τ_T	α_A	τ_A	α_S	τ_S	χ^2
1- Polymer alone (with filter)	1	0.17	-	-	-	-	4.21
2- Non labeled triplex in NaCl 0.1M (without filter)	0.38	0.86	-	-	0.62	≈ 0	0.67
3- AF546 quenched triplex, 10% equiv. of target DNA (with filter), 1.5:1 probe-polymer ratio	0.17	0.01	0.83	3.41	-	-	2.46
4- AF546 quenched triplex, 10% equiv. of target DNA (without filter), 1.5:1 probe-polymer ratio	0.66	0.07	0.15	3.25	0.19	≈ 0	1.1
5- AF546 quenched triplex, 10% equiv. of target DNA (without filter), 1:1 probe-polymer ratio	0.14	0.06	0.21	1.59	0.65	≈ 0	26.7
6- AF546 quenched triplex, 15% equiv. of target DNA (without filter), 1.5:1 probe-polymer ratio	0.76	0.09	0.14	3.94	0.10	≈ 0	3.1

α_T and τ_T (α_A and τ_A , α_S and τ_S) are the proportional coefficient and lifetime for the triplex donor, the AF546 acceptor, and the scatter component; respectively; the χ^2 parameter indicates the goodness of fit. For all measurements, uncertainties of 0.5 for the phase (ρ_p) and 0.01 for the modulation (ρ_m) were used.

5.6 Conclusion

The results presented herein on the photophysical properties of our molecular system support the hypothesis of a superlighting process within self-assembled aggregates that provide an enhancement in the fluorescence yield of acceptor molecules and an efficient resonance energy transfer mechanism by conjugated polymer-based donor molecules. The confinement and orientation of the RET donor in these supramolecular aggregates were shown to improve the quantum yield and photostability, while the polymeric, structured, and conjugated nature of the DNA hybridization transducer and its proximity to the multiples acceptors makes possible an ultrafast transfer rate. This important data should contribute to the design of a new generation of ultrasensitive optical biosensors.

5.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Drs. B. Simard and S. Denommée at the Steacie Institute for Molecular Sciences, NRC, Ottawa, Canada, for the lifetime measurements and Dr. H.A. Ho (U. Laval) for the gift of the polymeric transducer and fruitful discussions. K. D. also acknowledges the Natural Sciences and Engineering Council of Canada for a scholarship.

5.8 References

- (1) Daar, A.S.; Thorsteindottir, H.; Martin, D.K.; Smith, A.C.; Nast, S.; Singer, A C. *Nature Genetics* **2002**, *32*, 229-232.
- (2) Fodor, S.P.A.; Read, J.L.; Pirrung, M.C.; Stryer, L.; Lu, A.T. and Solas, D., *Science* **1991**, *251*, 767-773.
- (3) Tyagi, S.; Kramer, F.R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
- (4) McQuade, D.T.; Pullen, A.E.; Swager, T.M. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2537-2574.
- (5) Drummond, T.G.; Hill, M.G.; Barton, J.K. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1192-1199.
- (6) Storhoff, J.J.; Lucas, A.D.; Garimella, V.; Bao, Y.P.; Müller, U.R. *Nature Biotechnology* **2004**, *22*, 883-887.
- (7) Nam, J.M.; Stoeva, S.I.; Mirkin, C.A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
- (8) Liu, R.H.; Yang, J.; Lenigk, R.; Bonanno, J.; Grodzinski, P. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1824-1831.
- (9) Liu, B.; Bazan, G.C. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 4467-4476.
- (10) Ho, H.A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Doré, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angewandte Chemie Internationnal Edition* **2002**, *41*, 1548-1551.
- (11) Gaylord, B.S.; Heeger, A.J.; Bazan, G.C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10954-10957.
- (12) Nilsson, K.P.R.; Inganäs, O. *Nature Materials* **2003**, *2*, 419-424.
- (13) Doré, K.; Dubus, S.; Ho, H.A.; Lévesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M.G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.
- (14) Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.

- (15) Ho, H.A.; Doré, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M.G.; Tanguay, R.M.; Boudreau, D. and Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12673-12676.
- (16) Beljonne, D.; Pourtois, G.; Silva, C.; Hennebicq, E.; Herz, L.M.; Friend, R.H.; Scholes, G.D.; Setayesh, K.; Müllen, K.; Brédas, J.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10982-10987.
- (17) Klimov, V.I.; McBranch, D.W.; Barashkov, N.N. and Ferraris, J.P. *Chemical Physics Letters* **1997**, *277*, 109-117.
- (18) Chen, L.; McBranch, D.W.; Wang, H.L.; Helgeson, R. F. Wuld; and Whitten, D.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 12287-12292.
- (19) Scholes, G.D. *Annual Review of Physical Chemistry* **2003**, *54*, 57-87.
- (20) Vallotton, P.; Tairi, A.P.; Wohland, T.; Freidrich-Bénet, K.; Pick, H.; Hovius, R. and Vogel, H. *Biochemistry* **2001**, *40*, 12237-12242.
- (21) Jones, G.M.; Wofsy, C.; Aurell, C. and Sklar, L.A. *Biophysical Journal* **1999**, *76*, 517-527.
- (22) Sautter, A.; Kaletas, B.K.; Schmid, D.G.; Dobrawa, R.; Zimine, M.; Jung, G.; van Stokkum I.H.M.; de Cola, L.; Williams, R.M. and Würthner, F. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 6719-6729.
- (23) Lakowicz, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy 2nd Ed.*, **1999**, Plenum Press, New York.
- (24) Stewart, W.W. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103*, 7615-7620.
- (25) Halperin, A.; Buhot, A. and Zhulina, E.B. *Biophysical Journal* **2004**, *86*, 718-730.
- (26) Nesterov, E.E.; Zhengguo, Z. and Swager, T.M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 10083-10088.
- (27) Dalgarno, S. J.; Tucker, S.A.; Bassil, D.B. and J.L. Atwood, *Science* **2005**, *309*, 2037-2039.
- (28) ISS, Innovations in Fluorescence website:
www.iss.com/Resources/fluorophores.html.
- (29) Maliwal, B.P.; Gryczynski Z. and Lakowicz, J. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 4277-4285.

CHAPITRE 6

CHARACTERIZATION OF SUPERLIGHTING POLYMER-DNA AGGREGATES: A FLUORESCENCE AND LIGHT SCATTERING STUDY*

6.1 Résumé

L'amplification massive du signal de fluorescence observée lors de l'hybridation d'aussi peu que 5 molécules d'ADN cible à l'intérieur de structures autoassemblées formées entre un polymère cationique et des oligonucléotides d'ADN est étudiée dans cet article. Ces agrégats d'ADN-polymère super luminescents ont été étudiés par spectroscopie de fluorescence, par diffusion de lumière statique et dynamique ainsi que par des mesures du potentiel Zeta de façon à caractériser le mécanisme d'agrégation et de mieux comprendre les processus impliqués lors de la détection d'ADN. La diffusion de lumière multi-angles a aussi été utilisée pour obtenir la masse molaire des agrégats (A_M), le nombre d'agrégation (N_{agg}), le rayon de giration (R_G) ainsi que le ratio de dissymétrie (z) des agrégats. Ces résultats ont été utilisés, de pair avec la microscopie électronique à transmission (TEM), de façon à proposer un modèle physique adéquat pour les agrégats.

* Doré, K.; Naegu-Plesu, R.; Léclerc, M., Boudreau, D.; Ritcey, A.M. *Langmuir* **2007**, *23*, 258-264

Lien HTML: <http://pubs.acs.org/cgi-bin/sample.cgi/langd5/2007/23/i01/pdf/la061699a.pdf>

6.2 Abstract

The massive amplification of fluorescence signal observed upon hybridization of as little as 5 DNA molecules into self-assembled structures formed between a cationic polymer and DNA oligonucleotides is investigated. These superlighting polymer-DNA aggregates were studied by fluorescence spectroscopy, static and dynamic light scattering and Zeta potential measurements in order to characterize the aggregation behavior and to understand the processes involved during DNA detection. Multi-angle laser light scattering was also used to obtain the weight-averaged aggregate mass (A_M), the aggregation number (N_{agg}), the radius of gyration (R_G) and the dissymmetry ratio (z). These results have been used, together with TEM imaging, to propose a suitable physical model for the aggregates.

6.3 Introduction

The development of biosensors able to detect bacteria and viruses with the use of their genetic signature has been generating increasing interest recently. For this purpose, various optical and electrochemical DNA sensors have been proposed,¹⁻¹⁰ most of them relying either on complex instrumentation or some form of chemical amplification (such as the polymerase chain reaction, PCR¹¹) or both. We recently reported on the development of an ultrasensitive and sequence-specific DNA detection system that is particularly simple.^{4,8} Basically, a cationic polymeric transducer (poly[1H-imidazolium bromide, 1-methyl-3-[2-(4-methyl-3-thienyl)oxy]ethyl], belonging to the poly(3-alkoxy-4-methylthiophenes) class is stoichiometrically mixed with a single-stranded DNA (ss-DNA) probe, which forms a complex (the “duplex”); when target ss-DNA is added, hybridization takes place and the polymer seems to wrap around the double-stranded DNA (ds-DNA) in a structure called the “triplex”. Interestingly, this change in polymer conformation upon hybridization is associated with an important increase in fluorescence intensity,⁴ which makes possible the detection of a few hundred copies of target DNA.⁸ Furthermore, we recently demonstrated that the use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) between the polymer sensor and a fluorophore (Alexafluor 546) tagged on the ss-DNA probes leads to an improvement in detection sensitivity by a factor of ~4000 and to the detection of as few as 5 copies of target DNA.^{10,12} It has been postulated that the increase in sensitivity provided by this process (called “fluorescence chain reaction”, or FCR) is made possible by the self-assembly of hundreds of polymer-labeled probe complexes in supramolecular aggregates with a geometry that favors fast energy transfer between FRET donors and acceptors.¹²

In the present work, these aggregates are studied by fluorescence spectroscopy, static and dynamic light scattering and Zeta potential measurements. The role played by aggregation in determining the luminescence properties of the unlabeled system is shown, as well as the micellar character of labeled aggregates. Moreover, results from measurements of micelle hydrodynamic size and Zeta potential as a function of the amount of perfectly matched DNA targets, targets having one mismatch, or NaCl added are discussed. Important information about the shape of supramolecular aggregates has also be

retrieved from multi-angle laser light scattering (MALLS).¹³⁻¹⁵ The weight-averaged aggregate mass (A_M), aggregation number (N_{agg}), radius of gyration (R_G) and dissymmetry ratio (z) values determined with this technique have been used, together with TEM microscopy, to build a suitable physical model of the aggregates. Ultimately, these studies will lead to an improved understanding of the processes involved in the FCR process, and to improved robustness and reproducibility of this DNA sensing system.

6.4 Materials and Methods

6.4.1 Materials

The polymeric transducer was synthesized according to a previously published procedure.^{4,8} Unlabeled oligonucleotides and oligonucleotides labeled with Alexafluor 546 (referred to as AF546 in the text) were both purchased from Integrated DNA Technologies. For all experiments, DNA capture probes consisted of a 15-mer sequence specific to the human genomic IVS12 mutation responsible for the hereditary disease *tyrosinemia*, TAN 100: 5'-CCG GTG AAT ATC TGG-3', with the target sequence being its perfect complementary sequence, TAN 100a: 3'-GGC CAC TTA TAG ACC-5'.¹⁰ The studies involving 1-mismatch targets were done with the following capture probe sequence: TAN 101: 5'-CCG GTG AGT ATC TGG-3' and the same target sequence, TAN 100a.¹⁰ Cresyl violet (CV in the text) acetate dye (65%) was purchased from Sigma-Aldrich. All dilutions and solution handling were performed in sterilized water and plasticware.

6.4.2 Hybridization conditions

For all studies involving DNA hybridization, stoichiometric quantities (on a monomeric basis) of polymer and oligonucleotide capture probes were mixed and the resulting solution was diluted in pure water to the desired concentration after an equilibration period of at least 60 seconds to allow for electrostatic complexation. The solution was then heated to 50°C. Following another equilibration period of 5 minutes, target DNA was added. Although less than 5 minutes are needed for hybridization to occur at the concentration level used for the present work ($\sim 10^{-7}$ M of polymer-probe complex), an additional equilibration period of 5 minutes (10 minutes total) was added to ensure complete and stable complex formation. For the unlabeled system, hybridization was done in 0.1 M NaCl; for the labeled system, hybridization was performed in sterilized Nanopure® water. Detailed information on these experimental procedures can be found in Refs. 4 and 8 for the unlabeled system and in Ref. 10 for the labeled system.

6.4.3 Light scattering experiments

6.4.3.1 Static light scattering

Static light scattering measurements were performed with a DAWN laser photometer (model DSP) using the 90° detector. This instrument was also used to determine the weight-averaged mass of the aggregates (A_M) by multi-angle laser light scattering (MALLS), using all 18 detectors and the DAWN software and procedure provided by the manufacturer. Measurements made between 38° and 147° were used for the calculations and the concentration of polymer-probe complex was varied from 5.2×10^{-7} g/ml to 4.07×10^{-6} g/ml. The absence of deleterious effects due to fluorescence on scattered light intensity was verified by confirming that the insertion of a bandpass filter centered at 633 nm in front of the MALLS detectors resulted in no change in signal. The Debye formalism was used for the calculation of A_M , R_g (gyration radius) and A_2 (second virial coefficient). Berry and Zimm models were also considered but resulted in significantly larger errors on the numerical values obtained. Prior to the MALLS measurements, the specific refractive index increment dn/dC , which must be known very precisely since the calculated molecular weight scales as $(dn/dC)^2$, was determined with a Wyatt Optilab interferometric refractometer (Model 903) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Care was taken to clean the refractometer cell between each measurement with nitric acid to avoid contamination from BSA adhesion. All measurements were carried out with an incident wavelength of 633 nm, at room temperature and in pure, sterilized and filtered (0.45 μ m) water.

6.4.3.2 Dynamic light scattering

Dynamic light scattering measurements were performed with a Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600) instrument. Sizes were determined using the "Z average" parameter throughout this work with the exception of data in Table 6.3 and Figure 6.3, for which particle size distributions were evaluated from intensity measurements. All size values are the average of at least three different measurements of 15 runs each. All measurements were taken in

pure, sterilized and filtered (0.45 μm) water, at 50°C except for the temperature-dependent sizes reported in Table 1.

6.4.4 Fluorescence experiments

Fluorescence measurements were performed on a Varian Cary-Eclipse spectrofluorimeter. For Figure 6.1, the excitation wavelength was 425 nm and the emission wavelength was 530 nm (the fluorescence maximum for the free polymer). For the energy transfer measurements reported in Figure 6.2, the excitation wavelength was either 425 nm (for the polymer-DNA + CV samples) or 546 nm (for the AF546-DNA+CV solution), and the emission wavelength was measured at both 575 nm (the emission maximum for AF546) and 638 nm (the emission maximum for CV). The FRET efficiency (E) was calculated from

$$E = 1 - F_{da}/F_d \quad (1)$$

where F_{da} and F_d are fluorescence intensities of the donor in the presence and absence of the acceptor, respectively, according to Lakowicz.¹⁶ The excitation and emission slits were set at 10 nm for all data taken and all measurements were carried out at 50°C.

6.4.5 Zeta potential experiments

Zeta potential measurements were performed with a Zetasizer NanoZS instrument using a standard dip cell. All data points correspond to an average over five measurements of 30 runs each. The average electric field strength was 2500 V/m and all measurements were carried out at 50°C.

6.4.6 Paper electrophoresis

Paper electrophoresis was performed using a Bio-Rad wide mini subTM cell, in pH 7.0 Tris-HCl (50 mM) buffer, on 15 cm of Whatman 3M paper. 90 V was applied between the electrodes and a current 10 mA was measured during the experiment (thus giving 6V/cm). 10 μ L of a concentrated labeled duplex solution (10^{-4} M) were deposited in the center of the paper along with 1 μ L of a positively charged control (Ethidium bromide, 1 μ g/ μ L) and 5 μ L of a negatively charged control (AF546 labeled TAN 100 oligonucleotide, 10^{-4} M).

6.4.7 Transmitting Electron Microscopy (TEM)

TEM images were acquired with a JEOL 1230 transmitting electron microscope. Measurements were carried out on Formvar (Fluka-BioChemika) coated nickel grids from Canemco. Polymer-DNA aggregates were deposited on the grids after 20 minutes of ultrasonic treatment, and were then allowed to dry for two hours. Osmium tetroxyde staining was then performed with a drop of 0.1% solution (Sigma-Aldrich OsO₄ 4%) deposited on each of the grids, which were finally allowed to dry overnight.

6.5 Results and Discussion

Figure 6.1 shows the static light scattering intensity measured at 90° for the free polymer in solution, as well as for solutions containing unlabeled polymer-probe complexes (duplexes) to which various amounts of DNA target have been added. The fluorescence intensity recorded for the same samples is also shown. There is a clear correlation between the two parameters, suggesting that the fluorescence intensity emitted by the complexes is closely related to their aggregation properties. The polymer alone is highly fluorescent, and is also highly water-soluble due to the positive charge present on each repeat unit; the corresponding scattered intensity is thus very low. The polymer-DNA probe complex (duplex) is only weakly fluorescent, whereas the scattered light intensity is high because duplexes aggregate in aqueous solution due to their overall neutral state. Upon incremental introduction of target DNA, hybridization occurs, leading to triplex formation and to an increase in fluorescence intensity, i.e. the change in fluorescence which forms the basis for the DNA detection scheme. As shown in Figure 6.1, triplex formation is associated with a decrease in light scattering intensity, as duplex aggregates dissolve as they become charged.

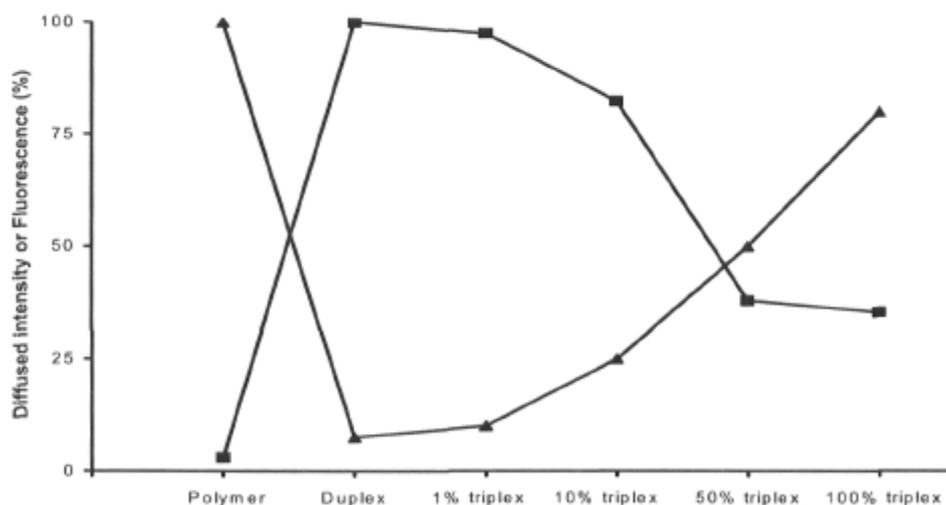


Figure 6.1 Fluorescence intensity (▲) and static light scattering intensity (■) of the unlabeled system upon detection of perfectly complementary DNA. For the fluorescence measurements, $\lambda_{exc} = 425$ nm, $\lambda_{em} = 530$ nm. The scattered light was recorded at 90° .

These results suggest that aggregated complexes only become fluorescent upon dissolution, a behavior that has also been observed by Inganäs¹⁷ for polythiophene derivatives. On the other hand, it has been postulated that the FRET-enhanced fluorescence observed with the labeled system (the FCR system) could be due to an aggregation of labeled probe – polymer complexes that maintains the donor and acceptor moieties in close proximity in an aggregated state that persists upon hybridization.¹² For this hypothesis to be valid, labeled triplexes should differ significantly from unlabeled ones.

The size of labeled and unlabeled duplex aggregates, as determined by dynamic light scattering, is presented in Table 6.1 as a function of temperature. Important differences between the two systems are evident. At 25°C, unlabeled aggregates are about 5 times larger than labeled ones. Perhaps more significant is the dependence of aggregate size on temperature. The mean diameter of labeled aggregates increases with increasing temperature whereas the size of unlabeled aggregates decreases. A decrease in aggregate size upon heating would be expected for any precipitated solute. The behavior observed for the labeled system, on the other hand, indicates that the aggregation process is primarily driven by entropy. Such behavior is characteristic of micellar structures¹⁸ that form because of hydrophobicity. In other words, aggregation takes place to diminish the organization of water molecules around the hydrophobic parts of labeled polymer/DNA complexes.

Table 6.1 Size of labeled and unlabeled duplex aggregates at different temperatures. (Concentrations of polymer-probe complexes is $\sim 10^{-7}$ M)

Temperature (°C)	Mean size of unlabeled aggregates (nm)	Mean size of labeled aggregates (nm)
25	397	78
40	197	80
55	116	90
65	104	111

In addition to the differences shown in Table 6.1, it is important to note that labeled and unlabeled systems also differ with respect to particle size distribution. Typically, particle size distributions are broader and repeatability is poorer for the unlabeled system. These observations also support the hypothesis of a micelle-like structure, for the labeled system, that exhibits a defined characteristic size. In order to investigate further the micellar behavior of labeled aggregates, a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study was undertaken. In this experiment, cresyl violet (CV) dye was added in various concentrations to solutions containing labeled duplex aggregates, with and without added target DNA. CV can act as a FRET acceptor and absorb the fluorescence emitted by AF546 if the two fluorophores are in close proximity. Because CV has a charged polyaromatic structure like AF546, it should therefore be co-located with AF546 units within the micellar-like structures. Figure 6.2 shows the AF546-CV FRET efficiency as a function of CV/AF546 molar ratio. For this experiment, the AF546 concentration was kept constant ($\sim 10^{-7}$ M) while CV was added successively for each data point. The optical density of the samples at 575 nm was kept below 0.02 in order to avoid inner filter effects. For comparison, results are also shown for the two dyes free in solution. As shown in Figure 6.2, there is a distinct difference in FRET efficiency, as a function of CV/AF546 molar ratio, for the solutions containing labeled aggregates and that containing only the two dyes. The maximum FRET efficiency is reached at a very low CV/AF546 molar ratio (11) in the case of labeled duplex aggregates, indicating that donors and acceptors are located in close proximity, i.e. within the micelles. Very similar results were obtained for duplex aggregates with and without added target DNA, indicating that the aggregated state is maintained during triplex formation. This behavior differs significantly from the unlabeled system, for which hybridization results in the dissolution of aggregates.

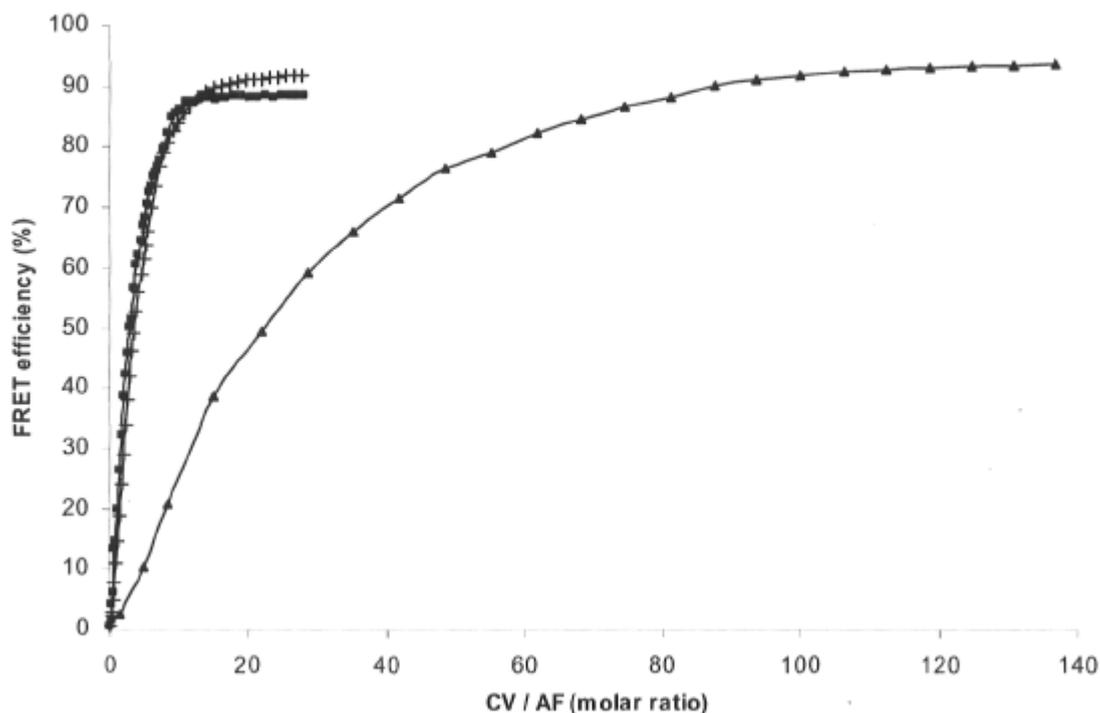


Figure 6.2 AF546-CV FRET efficiency versus the CV/AF546 molar ratio; in solution (▲), in duplex aggregates (■) and in 10% hybridized aggregates (+). For ■ and + curves, $\lambda_{\text{exc}} = 425$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 575$ and 638 nm. For ▲ curve, $\lambda_{\text{exc}} = 546$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 575$ and 638 nm.

Given the micellar behavior suggested by the results above, the critical micellar concentration (cmc) of labeled aggregates was determined. In order to follow aggregation as a function of duplex concentration, fluorescence intensity was measured at two wavelengths: 575 nm (wavelength for maximum emission of duplex micelles) and 530 nm (wavelength for maximum emission of the free polymer). The ratio of fluorescence intensities measured at these two wavelengths should reflect the ratio of polymer within the micelles to polymer outside of them. Because duplexes are formed by stoichiometric amounts of polymer and labeled probe, concentrations of both components were varied simultaneously to obtain each data point. The same experiment was carried out for the unlabeled system. The results are plotted in Figure 6.3. The slopes of both curves change with increasing concentration, although no sharp discontinuity corresponding to a classic cmc is observed. The fact that there is some overlap between the emission bands of the

complexed/free polymer may partially explain the absence of a sharp transition. Critical aggregation/micellar concentrations were evaluated by tracing a tangent line at the onset of the transition, and a cmc of 6.3×10^{-11} M was calculated for the labeled system, whereas a critical aggregation concentration of 2.8×10^{-9} M was obtained for the unlabeled system. The significantly lower critical concentration measured for the labeled system confirms that the self-assembly of duplex molecules into micelle-like structures is promoted by the AF546.

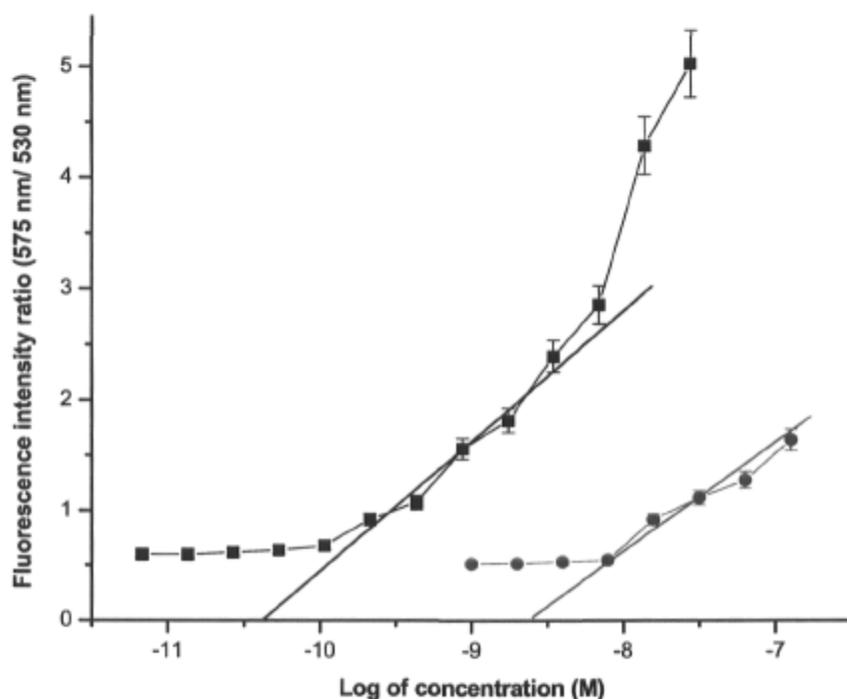


Figure 6.3 Evaluation of critical micellar concentration of labeled duplex aggregates (black squares) and critical aggregation concentration of unlabeled duplexes (red circles).

The behavior of duplex aggregates upon dilution was also investigated and the results are presented in Table 6.2 for the labeled and unlabeled systems. In the case of labeled aggregates, aggregate size remains constant and the size distribution narrows with increasing dilution. The behavior of unlabeled duplexes is quite different, as both the size and particle size distribution width do not display a clear trend either towards larger or smaller values with increasing dilution. This is a further indication that aggregates formed

in the labeled system are micelle-like, since their size seems to be independent of concentration above the cmc.

Table 6.2 Unlabeled and labeled duplex aggregate size and particle distribution width as a function of concentration (increasing dilution), as determined by dynamic light scattering.

Concentration M	Unlabeled Duplex		Labeled Duplex	
	Size nm	Distribution width nm	Size nm	Distribution width nm
1.00E-06	-	-	125	80
5.00E-07	190	86	123	61
2.50E-07	211	79	131	69
1.25E-07	243	97	119	49
6.25E-08	347	118	110	36
3.13E-08	293	68	123	32

The size distribution of labeled duplex aggregates in water was also measured at 65°C at different times after formation (results not shown). Distribution profiles were found to become narrower with time and stable aggregates of uniform size were obtained within 10 minutes. This behavior confirms the results of the dilution study, i.e. aggregates tend to adopt a well-defined and stable size. It is also worth noting that the size of aggregates depends strongly on the experimental procedure used to prepare them. To obtain aggregates of a uniform size, one must mix solutions of polymer and labeled ss-DNA probes of stoichiometric concentrations ($\approx 2 \times 10^{-5}$ M), then dilute the duplexes thus formed to the desired final concentration. Also, it has been observed that aggregates submitted to temperature stresses (formation at 25°C, stabilization at 65°C and storage at 5°C) are not uniform in size after the process and may not be able to detect DNA anymore. Thus, characterization of aggregates by dynamic light scattering is a pivotal tool to optimize the experimental procedure used for DNA detection.

As outlined in the Introduction section, these systems have been developed for the detection of DNA based on the fluorescence changes associated with hybridization. Elucidating the effect of DNA hybridization on the micelles is therefore of crucial

importance to understand the sensing mechanism and the role of fluorophore confinement in the observed signal amplification. Interestingly, light scattering techniques were shown to be useful tools to study supramolecular aggregates as well as surfactants mixtures properties.¹⁹⁻²² In order to investigate the present sensing system, aggregate size and Zeta potential were thus measured as a function of the amount of target ss-DNA added relatively to the amount of probe ss-DNA (i.e. target ss-DNA expressed in probe ss-DNA equivalents). Figure 6.4 shows the behavior of aggregates upon hybridization with perfectly matched target ss-DNA. At very low degrees of hybridization (below ~ 0.05 in probe ss-DNA equivalents), there is an increase in aggregate size with increasing target concentration that can be attributed to the incorporation of target DNA into existing aggregates. Between 0.05 and 0.10 equivalents (or 5% and 10 % of added target DNA), a decrease in size is observed that might be caused by a reorganization of micelles due to an increase in electrostatic repulsion as charges are added. At 10% of added target DNA and higher, the now smaller micelles can accommodate a larger amount of target DNA, with the result that micelle size increases further as the percentage of added target DNA reaches 100%. Note that the size increase is modest with respect to the amount of material added; at 100% hybridization, 1/3 of the micelles are made of target DNA, so it appears that micelle reorganization occurs continuously during the process. This hypothesis is supported by Zeta potential measurements, which suggest that micelles might be stabilized by the collapse in size and further hybridization of target DNA improves their stability.

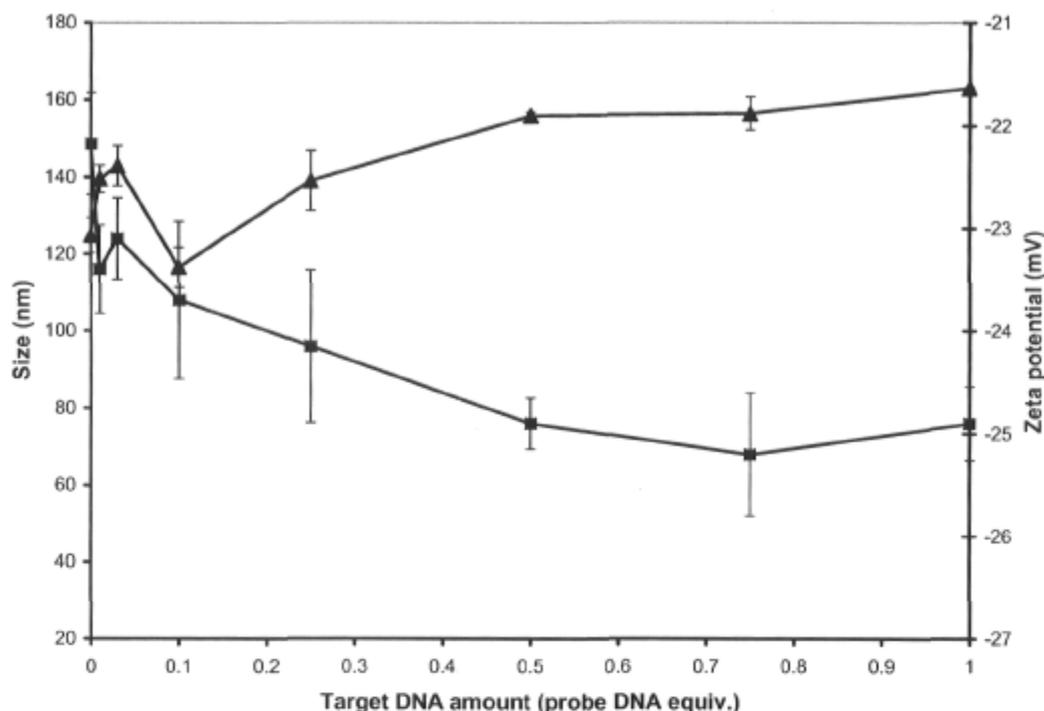


Figure 6.4 Hybridization of target DNA on micelles viewed by size (▲) and Zeta potential measurements (■).

In order to confirm that the changes in micelles observed upon the addition of target DNA are related to specific DNA hybridization, experiments were performed to study the effect of non specific charges on the electrical double layer of aggregates. Because dynamic light scattering measures the hydrodynamic radius, this double layer is included in the size measurements. Also, Zeta potential is known to be strongly influenced by the addition of salt. To visualize these effects on the micelles, we measured the changes in size and Zeta potential upon an increase in ionic strength by the addition of NaCl. The amounts of NaCl added were calculated to be equivalent to the charges introduced by each DNA addition. Figure 6.5 shows the change in micelle size upon an increase in ionic strength, either through the addition of perfectly matched target ss-DNA, of NaCl, or of target ss-DNA with a single defect in its sequence (1-mismatch). The three curves show significant differences. The micelle behavior upon the addition of salt or mismatched ss-DNA is quite different from that observed upon the addition of perfectly matched target ss-DNA. Classical ionic surfactants typically exhibit an increase in micelle size at higher ionic

strengths as a result of higher aggregation numbers. In the present case, the micelles are found to be larger in lower ionic strength conditions and decrease in size when the electrical double layer is compressed by incremental additions of NaCl. This decrease in size can be attributed primarily to changes in polymer conformation and micelle packing as a result of charge screening. Interestingly, the introduction of mismatched target ss-DNA does not seem to perturb the micelles, as their size remains relatively unchanged during the entire process. This behavior is an indication that only perfectly matched oligonucleotides interact significantly with micelles.

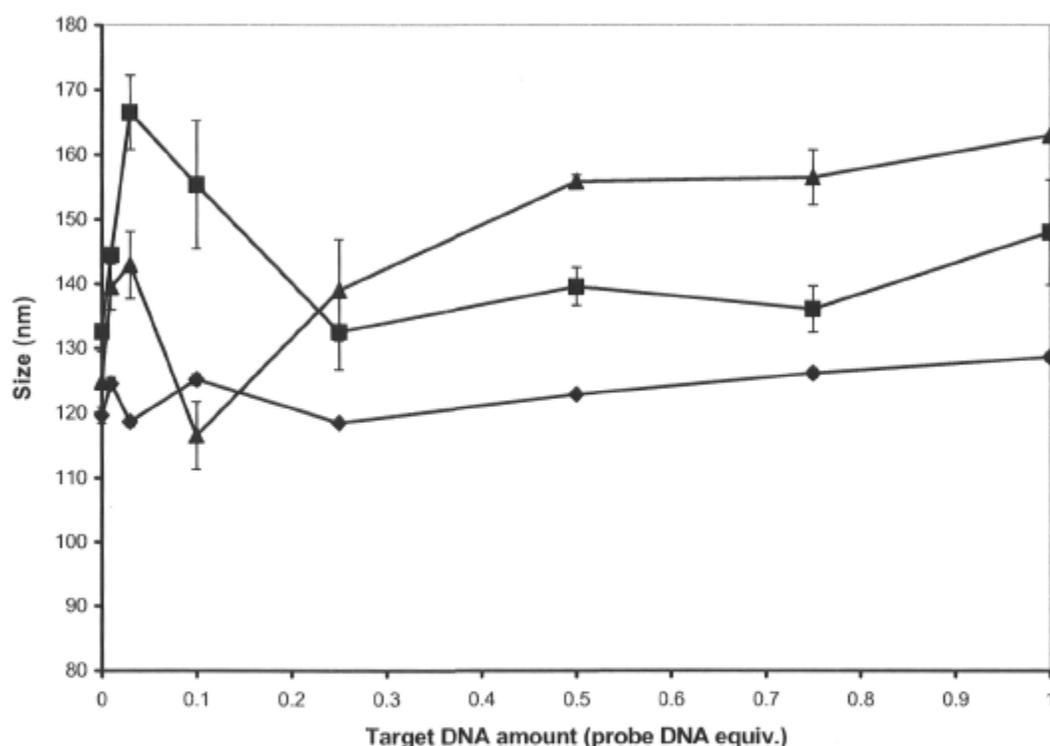


Figure 6.5 Size of duplex micelles upon the addition of charges either from specific DNA (▲), NaCl (■) or 1-mismatch target DNA (◆).

The same species were studied using Zeta potential measurements, and the results are shown in Figure 6.6. Interestingly, the Zeta potential globally decreases upon hybridization with specific DNA whereas it increases upon the addition of the same amount of charges from NaCl. This increase in Zeta potential with an increase in ionic strength, through the addition of unspecific charges, is to be expected since the Debye length is

known to decrease with increasing electrolyte concentration. On the other hand, hybridization with complementary ss-DNA results in a decrease in Zeta potential. This behavior clearly indicates that specific hybridization is a distinct process that adds charges to micelles through the incorporation of target ss-DNA. In the case of mismatched target ss-DNA, there is no clear tendency and only small fluctuations in Zeta potential are observed.

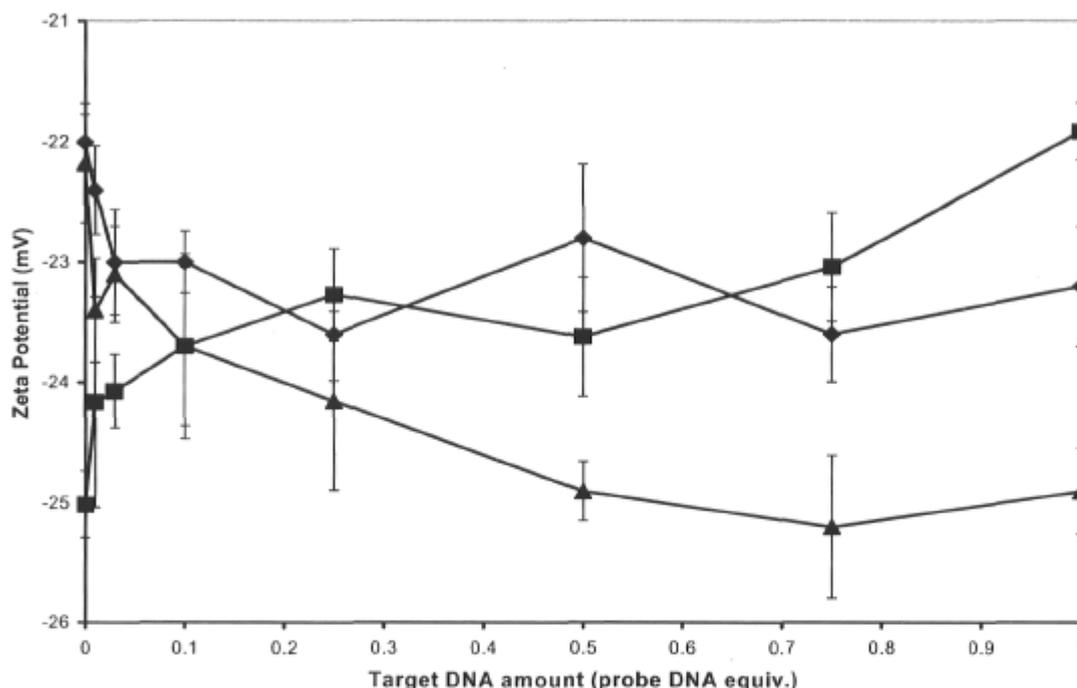


Figure 6.6 Zeta potential of duplex micelles upon the addition of charges either from specific DNA (▲), NaCl (■) or 1-mismatch target DNA (◆).

It is interesting to note that all Zeta potential measurements gave negative values for duplex aggregates, even if these entities are electrically neutral. Paper electrophoresis was performed in order to confirm the net negative charge of the aggregates. In accordance with the Zeta potential measurements discussed previously, the labeled duplex aggregates and the negatively charged control (AF546-labeled TAN 100 oligonucleotide) migrated toward the positive electrode whereas the positively charged control (Ethidium bromide) migrated toward the negative electrode. Moreover, molecular dynamics simulations²³ were performed on a model system corresponding to a duplex formed of a 20-mer DNA sequence and the

cationic polymer (20 repeating units). Preliminary results indicate that the 20-mer DNA probe is slightly longer than its associated polymer chain. This effect is attributed to the small chain torsion observed in the polymer chain, which makes it shorter and more compact when surrounded by the DNA chain. Moreover, the potential energy of the system was shown to decrease with time, suggesting a stabilization of the duplex in this configuration. The negative surface charge reported by Zeta potential and paper electrophoresis experiments could therefore be due to the protruding negative charges from DNA probes. To maintain the globally uncharged state of duplex aggregates, local positive charges must exist within the micelles and could promote hybridization; aggregate stabilization and the observed promotion of hybridization¹⁰ could thus be two manifestations of this charge separation.

To construct a physical model for the labeled aggregates, the aggregate mass and corresponding aggregation number were determined by MALLS. Since the hydrodynamic diameter of the aggregates is relatively large (110 nm), the angular dependence of light scattering cannot be neglected. The refractive index increment dn/dC was determined to be +0.43 mL/g. This value is relatively high when compared to those typically determined for polymer solutions (the dn/dC of polymethacrylamide in water is +0.209²⁴) but is consistent with a conjugated polymer in a low refractive index solvent such as water. Figure 6.7 shows the Debye plot obtained for our labeled aggregates. From this plot, three important parameters can be evaluated: the weight-averaged aggregate mass (A_M), equal to $4.7 \pm 0.3 \times 10^7$ g/mol; the radius of gyration (R_G), equal to 116 ± 6 nm; and the second virial coefficient (A_2), equal to $2 \pm 10 \times 10^{-5}$ mol.mL.g⁻². Assuming a low polydispersity index, dividing A_M by the number-averaged molecular weight of a single polymer-labeled probe complex (10,244 g/mol) provides an aggregation number of (N_{agg}) \sim 4000-5000 polymer-probe complexes. This number is reasonable since a relatively large number of aggregated molecules are necessary in order to explain the large amplification of the fluorescence signal.

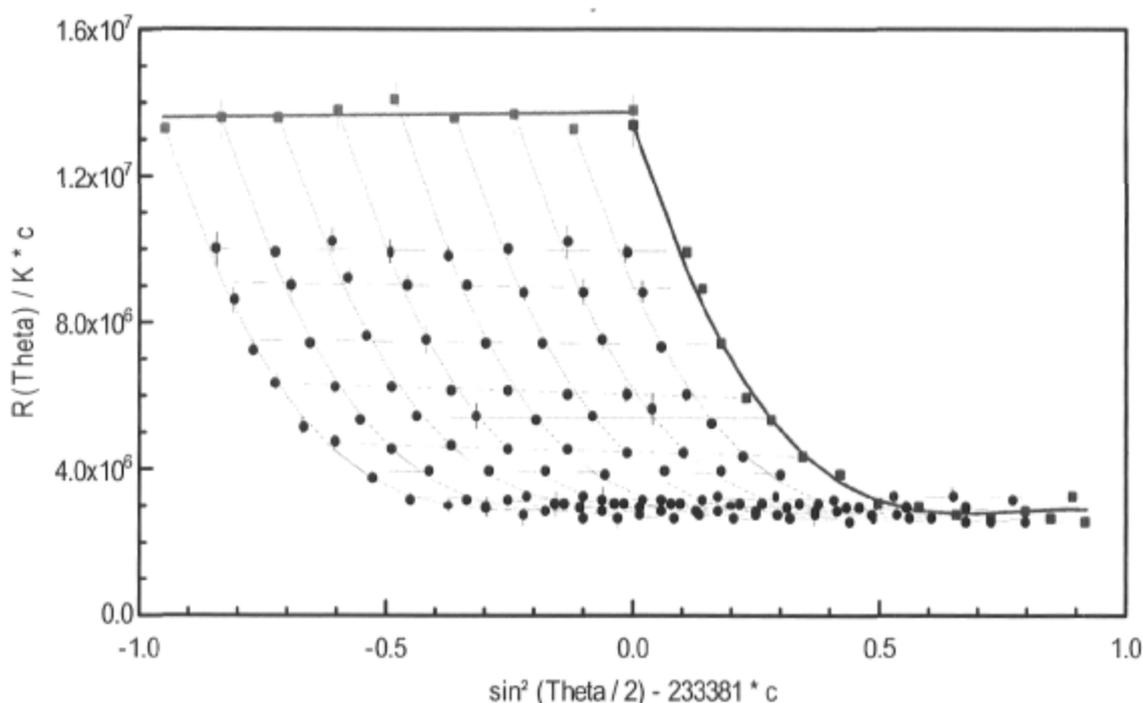


Figure 6.7 Debye plot obtained from MALLS measurements for labeled duplex micelles.

The ratio of radius of gyration to hydrodynamic radius (R_G/R_H) is known to be a sensitive indicator of aggregate geometry.¹⁵ In the case of labeled duplex aggregates, this ratio is equal to 2.1. Previous reports indicate a R_G/R_H ratio of 2 for well characterized rod micelles.¹³⁻¹⁵ For rod-shaped aggregates, the radius of gyration can also be related to aggregate dimensions by the expression $R_g^2 = L^2/12$, where L is the length of the rod.²⁵ For duplex micelles a rod length of 402 nm can be calculated in this way. Finally, the shape of a scattering entity can also be evaluated from the dissymmetry ratio (z), defined as the ratio of scattering intensity at two complementary angles ($i_{45^\circ}/i_{135^\circ}$). The value of z at a given characteristic size parameter (L/λ in the present case, where λ is the radiation wavelength in vacuum (632.98 nm) divided by the refractive index of the scattering medium ($n_{\text{water}} = 1.33$)) differs significantly for spheres, rods and coils. MALLS measurements yield values of z and L/λ equal to 1.3 and 0.84, respectively, which place this system in the rod conformation region.²⁵ A rod model for the labeled aggregates is therefore consistent with our results as well as with the fact that, given the size of the constituent molecules, it would be impossible to form a spherical micelle with a single hydrophobic core and having the

dimensions given by the light scattering measurements. The polymer-probe duplex has approximately the same dimensions as ds-DNA, which has a radius of 9.5 \AA and a length of 3.4 \AA per base²⁶ for a total length of $\sim 5.1 \text{ nm}$. One can easily see that a simple spherical micelle formed with these constituents cannot have a hydrodynamic radius of 55 nm . Figure 6.8 presents the schematic representation of a rod micelle arrangement having the dimensions given by the light scattering measurements of labeled duplex aggregates. Furthermore, TEM images taken of duplex and triplex aggregates deposited on TEM grids (Figure 6.9) substantiate the rod micelle model described above, i.e. the dimensions of the rod-shaped structures observed by TEM are very similar to those that were calculated using light scattering measurements (see supplementary information).

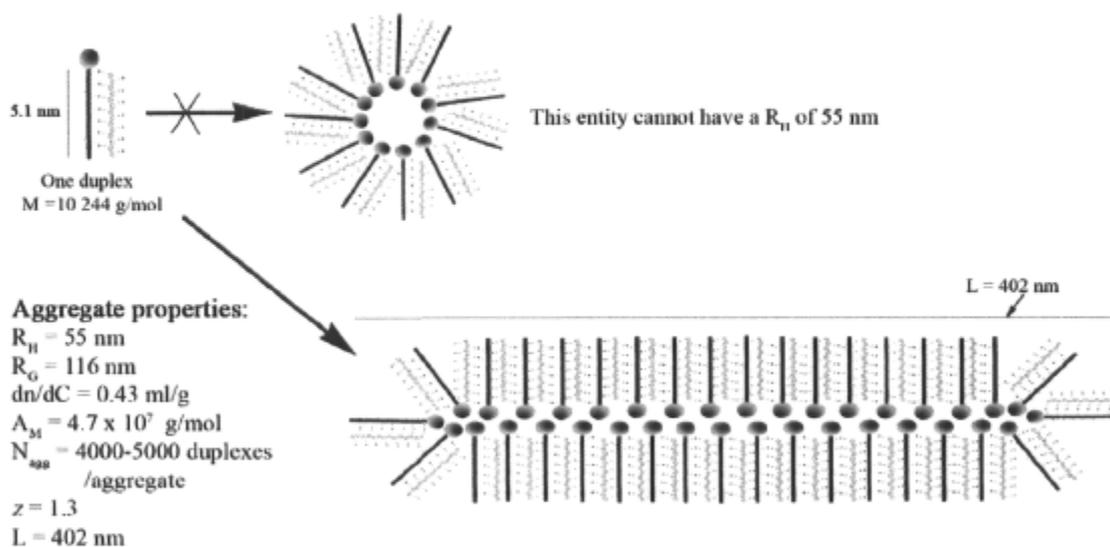


Figure 6.8 Proposed physical rod-like model of the labeled aggregates.

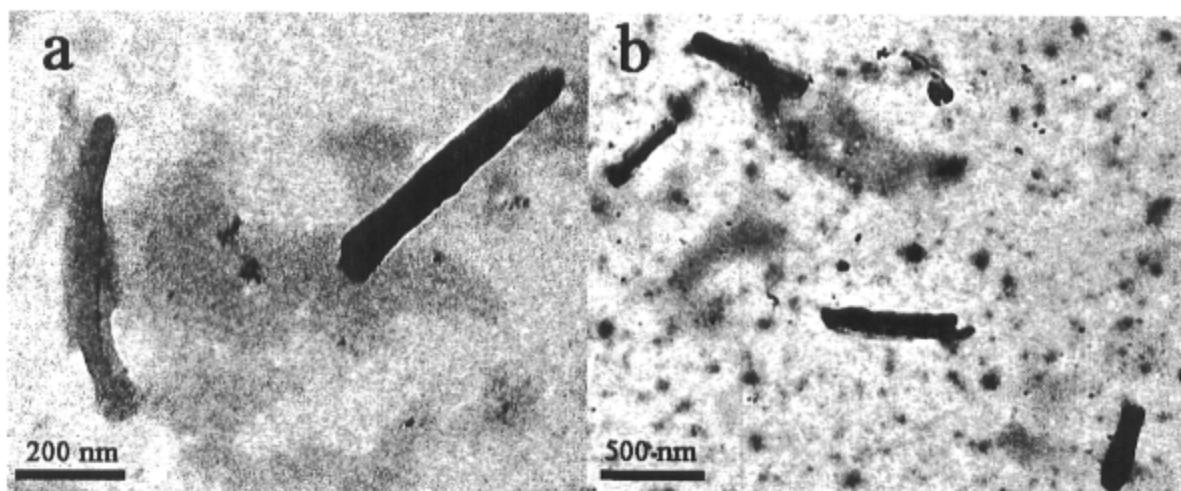


Figure 6.9 TEM images of labeled aggregates. A) Duplex aggregates; B) 10% hybridized aggregates.

6.6 Conclusions

We have shown that a cationic polythiophene complexed with labeled or unlabeled DNA probes forms supramolecular aggregates which possess fluorescence properties that are closely related to their aggregation properties. For the unlabeled system, the fluorescence intensity of complexes is inversely proportional to the scattered light intensity. In duplex form, when charges are neutralized by the DNA probe, polymer chains are in a planar conformation and non-fluorescent aggregates are formed; when free in solution or complexed with ds-DNA, polymer chains adopt a random coil or helical conformation, respectively, which are highly soluble.⁴ For the labeled system, high quantum yield, photostability and FRET efficiency values hinge on the conservation of an aggregated state upon hybridization.¹² FRET measurements using an acceptor dye with a charged molecular structure similar to that of AF546 support the micellar nature of labeled aggregates, as does the observation of a slight increase in aggregate size with increasing temperature. Fluorescence measurements also helped us to evaluate the critical micellar and aggregate concentrations of the labeled and unlabeled aggregates at 6.3×10^{-11} M and 2.8×10^{-9} M, respectively. Dynamic light scattering measurements highlighted the fact that labeled micelles tend to adopt a definite size and it has been noticed that the size distribution widths become narrower with either time or dilution.

In addition, studies of micelle hydrodynamic size and Zeta potential as a function of the amount of perfectly matched DNA, 1-mismatch DNA or NaCl added, also contributed to the elucidation of micelle behavior. During hybridization of specific ss-DNA targets, micelle size changes to accommodate the charges carried by target ss-DNA, whereas the addition of 1-mismatch target ss-DNA or NaCl does not have this effect. Zeta potential measurements support this interpretation and suggest that the nature of the target greatly influences the stability of micelles, as it was observed that the addition of charges only from specific ss-DNA increases their stability.

Furthermore, to obtain more information about the molecular structure of these aggregates, MALLS experiments were performed. An aggregate mass of $4.7 \pm 0.3 \times 10^7$

g/mol was calculated, which indicates an aggregation number ($N_{\text{agg}} \sim 4000\text{-}5000$ duplexes/aggregate. This number is consistent with previous fluorescence results.¹⁰ Moreover, the measurement of z and R_G/R_H pointed towards a rod micelle model for the labeled duplex aggregates, a hypothesis confirmed by TEM images of rod-shaped micelles of approximately 400 nm in length. This new physical model will be of great help to visualize the molecular and photophysical processes that happen within these promising DNA-responsive aggregates.

6.7 Acknowledgements

The authors thank M. Viger for help with TEM imaging and N. Lebouch for molecular dynamics simulations, as well as the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) for financial support. K. D. acknowledges NSERC for a Ph. D. scholarship.

6.8 References

- (1) Tyagi, S.; Kramer, F. R. *Nature Biotechnology* **1996**, *14*, 303-308.
- (2) Dubertret, B.; Calame, M.; Libchaber, A. J. *Nature Biotechnology* **2001**, *19*, 365-370.
- (3) Gaylord, B. S.; Heeger, A. J.; Bazan, G. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10954-10957.
- (4) Ho, H. A.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Corbeil, G.; Dore, K.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1548-1551.
- (5) Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 1192-1199.
- (6) Wang, J.; Polsky, R.; Merkoci, A.; Turner, K. L. *Langmuir* **2003**, *19*, 989-991.
- (7) Liu, B.; Bazan, G. C. *Chemistry of Materials* **2004**, *16*, 4467-4476.
- (8) Dore, K.; Dubus, S.; Ho, H. A.; Levesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M. G.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 4240-4244.
- (9) Nam, J.-M.; Stoeva, S. I.; Mirkin, C. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5932-5933.
- (10) Ho, H. A.; Dore, K.; Boissinot, M.; Bergeron, M. G.; Tanguay, R. M.; Boudreau, D.; Leclerc, M. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12673-12676.
- (11) Saiki, R. K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Arnheim, N. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.
- (12) Dore, K.; Leclerc, M.; Boudreau, D. *Journal of Fluorescence* **2006**, *16*, 259-265.
- (13) Fuetterer, T.; Nordskog, A.; Hellweg, T.; Findenegg, G. H.; Foerster, S.; Dewhurst, C. D. *Physical Review E* **2004**, *70*, 041408.
- (14) Appell, J.; Porte, G. *Journal of Colloid and Interface Science* **1981**, *81*, 85-90.
- (15) Ishizu, K.; Toyoda, K.; Furukawa, T.; Sogabe, A. *Macromolecules* **2004**, *37*, 3954-3957.

- (16) Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*, 2nd Ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 1999.
- (17) Nilsson, K. P. R.; Andersson, M. R.; Inganas, O. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2002**, *14*, 10011-10020.
- (18) Myers, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*, 2nd Ed.; Wiley Interscience: New York, 1991.
- (19) Wang, J.; Jiang, M. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 3703-3708.
- (20) Li, Y.; Khanal, A.; Kawasaki, N.; Oishi, Y.; Nakashima, K. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **2005**, *78*, 529-533.
- (21) Collings, P. J.; Gibbs, E. J.; Starr, T. E.; Vafek, O.; Yee, C.; Pomerance, L. A.; Pasternack, R. F. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103*, 8474-8481.
- (22) Moises de Oliveira, H. P.; Gehlen, M. H. *Langmuir* **2002**, *18*, 3792-3796.
- (23) Lebouch N.; Brisson J.; Leclerc M. **To be published.**
- (24) Huglin, M. B. *Light Scattering from Polymer Solutions*; Academic Press: New York, 1972.
- (25) Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed.; M. Dekker: New York, 1997.
- (26) Halperin, A.; Buhot, A.; Zhulina, E. B. *Biophysical Journal* **2004**, *86*, 718-730.

6.9 Supporting information

6.9.1 Atomic Force Microscopy (AFM)

The AFM images shown below were acquired with a Nanoscope IIIa atomic force microscope from Digital Instruments. Measurements were carried out using silicon cantilevers from MikroMasch with a typical resonant frequency of 325 kHz and a force constant of 40 N/m. Polymer-DNA aggregates were deposited on freshly cleaved mica surfaces after 20 minutes of ultrasonic treatment, and the dried samples were then imaged with different cantilevers to ensure that the imaged structures were not due to tip artifacts. Tapping-mode AFM was used to image the different deposits and substrates, since contact-mode AFM measurements in aqueous media were inconclusive.

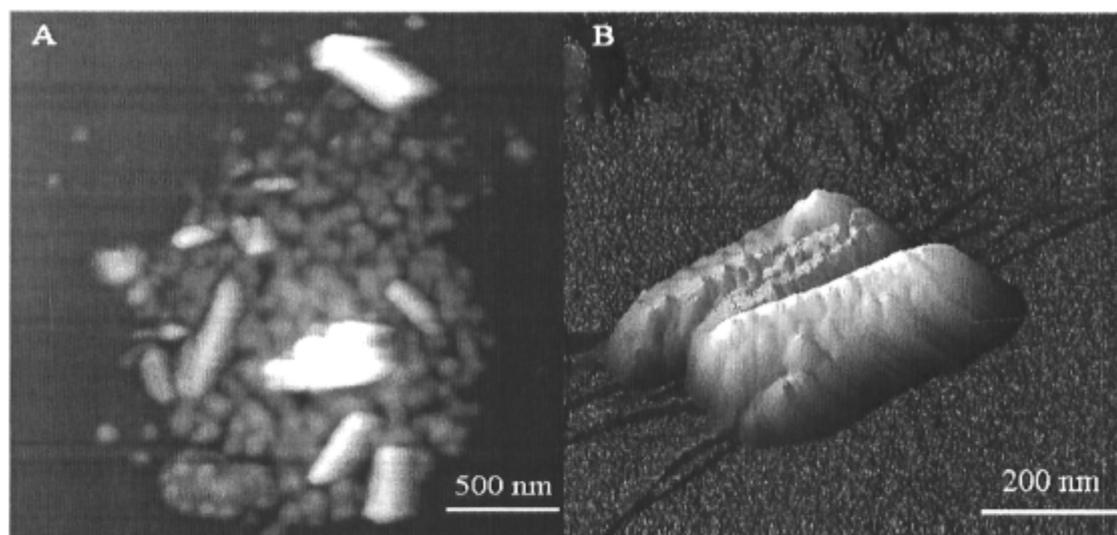


Figure 6.10 AFM images of labeled duplex aggregates. A) Top view image of several aggregates; B) Surface plot of some micellar rods.

The authors thank N. Desgagné for help with AFM imaging.

CHAPITRE 7

CONCLUSION

Nous avons, au cours de ce doctorat, participé au développement de deux principales méthodes qui permettent une détection ultrasensible d'ADN en solution aqueuse. Il s'agit d'abord de la méthode avec le polymère transducteur développé par Hoang-Anh Ho du laboratoire du professeur Mario Leclerc. Ultérieurement, nous avons marqué les sondes d'ADN utilisées avec un fluorophore pouvant être excité par la lumière émise par le polymère (l'alexafleur 546) et placé en solution une grande quantité des complexes formés avec ces sondes marquées et le polymère afin de faire la détection d'aussi peu que 5 copies d'ADN cible; nous avons nommé cette méthode le superallumage. L'article présenté chapitre 4 élabore le concept de superallumage et illustre sa capacité pour détecter un nombre très faible de copies d'ADN double brin provenant d'un échantillon d'ADN génomique humain total. Les deux méthodes développées possèdent leurs avantages et leurs inconvénients qui font que l'une ou l'autre des deux méthodes sera préférée selon l'application que l'on souhaite en faire. Le choix entre les deux méthodes va surtout se faire en fonction du nombre de copies d'ADN que l'on doit être en mesure de détecter. Avant de discuter de cet aspect, nous allons voir comment nous avons été en mesure d'expliquer les phénomènes permettant la détection d'ADN avec le biocapteur polymère.

Partie 7.1 Étude des phénomènes permettant la détection d'ADN

7.1.1 Détection d'ADN avec le polymère

Lors de ces études de doctorat, nous avons étudié quelques aspects du processus de détection avec le polymère. Notamment, nous avons relié l'intensité de fluorescence observée lors de la détection d'ADN par le polymère à ses propriétés d'agrégation. En effet, on voit à la figure 6.1 que l'intensité de fluorescence du polymère est inversement proportionnelle à son degré d'agrégation. Le processus de la détection d'ADN par fluorescence serait donc lié aux aspects combinés du changement de conformation du polymère de la forme planaire à non-planaire et de la formation d'agrégats lorsque le polymère est sous la forme duplex, ces derniers se solubilisant lorsque la double hélice d'ADN est formée pour donner le triplex qui devient alors fluorescent. Au chapitre 6, nous avons aussi étudié les propriétés physiques des agrégats de duplexes pour pouvoir les comparer aux agrégats marqués. Cela nous donne quelques données intéressantes sur les caractéristiques de ces agrégats. Notamment, nous avons vu que la taille des agrégats de duplex diminuait considérablement en augmentant la température de la solution de 25°C à 65°C, ceci indiquant une dissolution des agrégats (tableau 6.1). Ce comportement montre aussi que les agrégats non-marqués ne seraient pas de nature micellaire, comme le sont les agrégats marqués. Nous avons aussi évalué la concentration d'agrégation critique (cac) des duplex, qui correspond à la concentration minimale de polymère et de sonde d'ADN qui permet la formation du duplex; nous avons ainsi évalué que la cac des duplex non-marqués est de $2,8 \times 10^{-9}$ M (figure 6.3).

Par ailleurs, nous avons développé une méthode expérimentale qui permet la détection d'ADN double brin. Cette méthode nous a permis de comprendre le double rôle que le polymère cationique joue lors de la détection d'ADN. Premièrement, surtout lorsque la concentration en sels de la solution d'hybridation est presque nulle, le polymère cationique agit comme un sel local, ses charges positives présentes sur chaque unité de répétition favorisant l'appariement des deux brins d'ADN complémentaires. Ce rôle de sel local joué par le polymère cationique favorise l'hybridation d'ADN seulement en sa

proximité, ce qui permet une détection sélective dans le cas où l'on analyse de l'ADN double brin. Lorsque l'ADN cible s'est hybridé avec la sonde, le polymère joue alors son deuxième rôle qui est de traduire cette réaction d'hybridation en un signal mesurable, ce que le polymère fait en émettant de la fluorescence à 530 nm.

Il semble important de préciser que nous n'avons pas fait d'études visant à comprendre la relation entre la structure du polymère biocapteur et ses propriétés permettant la détection ultrasensible d'ADN. Cet aspect du projet a été confié à Mme Nolwenn LeBouch, étudiante au doctorat chez le professeur Mario Leclerc, codirecteur de cette thèse.

7.1.2 Détection d'ADN avec le superallumage

Nous avons beaucoup discuté du superallumage au cours de cette thèse. Cette méthode permet la détection spécifique d'acides nucléiques à des niveaux de sensibilité inégalés. Le phénomène du superallumage en tant que tel est aussi très intéressant du point de vue de l'étude de systèmes fluorescents. En effet, nous n'avons vu dans la littérature aucun exemple de système similaire. Les méthodes d'amplification de signal apparentées décrivent plutôt une amplification de l'extinction de la fluorescence¹⁻⁶. Pour expliquer le phénomène d'amplification de l'émission de fluorescence observé, nous avons d'abord formulé deux hypothèses soit : premièrement, le maintien d'un état agrégé tout au long du processus de détection permet au triplex donneur de fluorescence d'exciter efficacement les AF546 accepteurs se trouvant rapprochés dans les agrégats et deuxièmement, au sein de ces agrégats, un seul triplex donneur peut exciter un grand nombre d'AF546 accepteurs dans le même cycle d'excitation. Nous avons par la suite tenté de vérifier ces hypothèses en effectuant une caractérisation des propriétés physiques des complexes formés du polymère transducteur et d'une sonde d'ADN marquée avec l'AF546 lorsqu'ils sont mis en présence d'ADN cible. Nous allons donc tenter dans cette section de mettre ensemble ces données pour voir à quel point nous avons réussi à expliquer le phénomène du superallumage.

Nous avons donc des agrégats micellaires de complexes polymère-sonde marquée en solution qui s'autoassemblent sous la forme de bâtonnets de 400 nm de long et qui contiennent entre 4000 et 5000 unités de duplex par bâtonnet (chapitre 6). Les micelles, utilisées dans plusieurs domaines comme les nanosciences, les procédés de séparation, la science des aliments et les cosmétiques, peuvent jouer plusieurs rôles dans ces divers domaines, par exemple celui de microréacteurs, rôle joué lors de la synthèse de nanoparticules dans des micelles inverses, méthode très efficace et qui commence à être utilisée dans plusieurs laboratoires. D'ailleurs, des micelles inverses ont déjà été employées pour confiner l'hybridation de l'ADN dans ces microréacteurs et ainsi décupler la vitesse d'hybridation⁷. De façon similaire, le confinement de l'hybridation du brin cible avec les brins sondes au sein des agrégats pourrait expliquer la vitesse d'hybridation accélérée que nous avons observée. En effet, seulement 5 minutes sont nécessaires à l'hybridation de 20 copies du brin cible d'ADN diluées dans le volume total de 3 mL (chapitre 4) alors que pour la détection avec le polymère seul, une heure d'hybridation est nécessaire pour faire la détection d'une concentration en brin d'ADN cible 1000 fois supérieure (la concentration détectée avec le superallumage est de 3×10^{-21} M (chapitre 4) et celle avec le polymère seul est de 3×10^{-18} M (chapitre 3)).

Dans ces agrégats micellaires, les espèces fluorescentes présentes dans les agrégats sont très proches les unes des autres, ce qui a un effet de confinement et de protection. Intuitivement, on peut concevoir que si le fluorophore donneur se trouve dans une capsule remplie de fluorophores accepteurs, le transfert énergétique sera plus efficace que s'il se produisait en solution; la concentration locale de fluorophores est très élevée alors qu'elle est beaucoup plus basse lorsque les fluorophores sont répartis de façon homogène dans toute la solution. Cet effet est démontré au chapitre 6 où l'on introduit un fluorophore accepteur pouvant être excité par l'AF546 dans les agrégats de complexes polymère-sonde marquée. Si l'on compare l'efficacité du transfert énergétique résonnant (RET) observée dans les agrégats avec celle observée en solution; dans les agrégats, 11 fois moins d'accepteurs sont nécessaires pour obtenir une efficacité de RET maximale. Par ailleurs, le triplex formé au sein des agrégats serait protégé des collisions avec les molécules de solvant ainsi que de la puissance de la lumière excitatrice puisque nous avons mesuré que la

photostabilité de ce dernier était grandement supérieure à celle du triplex non-marqué (chapitre 5). Aussi, le rendement quantique et l'efficacité du RET des agrégats marqués atteignent leurs valeurs maximales lorsque la quantité de brin complémentaire est la plus faible (1 % d'hybridation) (voir figure 5.2). Les deux courbes sont de type logarithmique (coefficient de corrélation pour une courbe de tendance logarithmique $R^2 = 0,94$ pour le rendement quantique des agrégats et coefficient $R^2 = 0,99$ pour l'efficacité du RET), ce qui nous indique que les valeurs maximales seraient obtenues avec un rapport triplex/duplex minimal.

Lorsqu'il y a 10% de sondes qui sont hybridées avec leur brin complémentaire, donc lorsqu'il y a autour de 450 triplexes donneurs par bâtonnet, la distance moyenne séparant les donneurs des accepteurs serait, selon le formalisme de Förster, de 33 Å (chapitre 5). Si l'on divise la longueur de cet agrégat par le nombre de triplexes présents à l'intérieur, on obtient la distance latérale moyenne sur laquelle un triplex doit être capable de transférer son énergie, soit 0,89 nm. Si l'on assume que l'épaisseur d'un complexe polymère sonde marquée est de 0,89 nm, on peut se représenter ces tranches de bâtonnet micellaire comme on le voit à la figure 7.1. Tous les AF546 accepteurs présents dans cette section (≈ 10) du bâtonnet seraient donc selon le formalisme de Förster à 33 Å du triplex donneur. On voit à la figure 7.1 que les AF546, au centre du bâtonnet, sont situés très près les uns des autres.

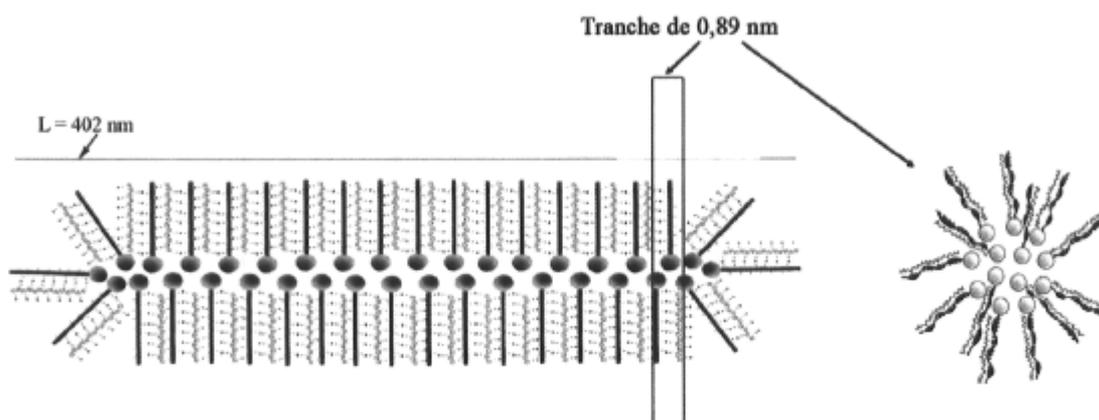


Figure 7.1 Représentation d'une tranche de bâtonnet micellaire d'une épaisseur d'environ 0,89 nm

Avec ce même pourcentage d'hybridation (10 %), nous avons calculé que chaque transfert énergétique se faisait en l'espace de seulement 53 ps, ce qui est 16 fois plus rapide que le temps de vie du triplex seul en solution. Comme chaque triplex doit exciter environ dix AF546, chaque AF546 pourrait ainsi être excité pendant le même temps que prend habituellement le triplex pour se désactiver. L'encapsulation du triplex donneur a aussi une influence sur cette amplification de signal (voir figure 5.2). Par contre, le rendement quantique de fluorescence des agrégats ainsi que l'efficacité du RET dans ces derniers ont une influence beaucoup plus grande pour des rapports triplex/duplex inférieurs à 1/10. Cela est sans doute relié à la réorganisation des agrégats en des entités plus petites lorsque le rapport triplex/duplex atteint 1/10 (voir figure 6.4). Les agrégats obtenus avec des rapports triplex/duplex inférieurs à 1/10 sont plus réceptifs à l'ajout de brins complémentaires et le triplex résultant est mieux protégé au sein de l'agrégat.

Comme travaux futurs, il serait très intéressant de pouvoir étudier la relation entre le temps de vie de fluorescence du triplex dans les agrégats en fonction du rapport triplex/duplex. Nous serions alors en mesure de confirmer notre hypothèse qu'un seul triplex donneur peut exciter tous les AF546 présents dans l'agrégat dans lequel il se trouve et d'étudier plus en profondeur comment ce mécanisme d'excitation se produit. En étudiant le comportement du temps de vie des AF546 dans les agrégats, il serait intéressant de voir l'impact de l'homotransfert entre les AF546 sur le transport énergétique global. Si l'on divise le temps de vie du triplex non marqué (865 ps) par le nombre d'AF456 présents en moyenne dans un agrégat (4500), on aurait une idée de l'échelle de temps que devrait prendre le transfert énergétique entre le triplex donneur et un seul AF546. Selon ce calcul, chaque transfert énergétique durerait environ 0,192 ps, ce qui donnerait le temps à un triplex donneur d'exciter tous les AF546 présents dans l'agrégat dans lequel il se trouve. Ainsi, si le temps de vie de fluorescence du triplex donneur lorsque le rapport triplex/duplex est assez faible pour que l'on considère qu'il y ait un seul triplex par agrégat est près de 0,192 ps, on pourra conclure que l'homotransfert entre les AF546 ne joue pas un rôle important dans le superallumage. Par contre, si ce temps de vie de fluorescence est suffisamment supérieur à cette durée, on pourra conclure que l'homotransfert participe à transmettre l'énergie le long des bâtonnets. Pour étudier la relation entre le temps de vie de

fluorescence du triplex dans les agrégats et le rapport triplex/duplex, nous allons devoir utiliser un appareil possédant une résolution temporelle de l'ordre de la femtoseconde. Finalement, ces études sur le mécanisme particulier de RET qui mène au phénomène de superallumage nous ont permis de valider nos hypothèses de départ et de mieux caractériser ce phénomène prometteur d'amplification du signal de fluorescence qui peut être très utile pour détecter un très petit nombre de copies d'ADN pathogène.

Partie 7.2 Détection ultrasensible d'ADN

7.2.1 Détection de plus de 25 000 copies d'acides nucléiques

Lorsque la quantité d'ADN cible que l'on désire détecter est relativement abondante, soit supérieure à 25 000 copies d'ADN par échantillon à analyser, la méthode avec le polymère seul devrait être préférentiellement choisie. Il existe plusieurs situations où l'on veut détecter une quantité d'ADN supérieure à 25 000 copies. Avant de décrire ces applications possibles, il importe de justifier le choix de la méthode de détection avec le polymère seul pour la détection de 25 000 copies et plus d'acides nucléiques. Tout d'abord, cette méthode est très sensible comparativement aux autres méthodes développées n'utilisant pas une amplification du nombre de copies d'ADN (voir tableau 1.1). Pertinemment, nous avons évalué que la limite de détection de cette technique variait selon la longueur et la pureté du brin d'acide nucléique à détecter. Nous avons ainsi obtenu une limite de détection de 4400 copies dans le volume total de l'analyse soit 3 mL pour l'oligonucléotide X2-L (voir section 2.1.1 pour la séquence et la figure 3.5 pour la courbe d'étalonnage). Pour la détection du virus de l'*influenza A*, dont le génome est constitué de 8 segments d'ARN à simple brin, nous avons obtenu une limite de détection de 15 000 copies dans 3 mL (figure 3.5). La sensibilité de détection pour l'ARN viral est meilleure que pour le brin X2-L, mais le signal de fluorescence fluctuait de façon plus importante. Aussi, nous avons rapporté les limites de détection dans un volume de 3 mL parce que c'est dans ce volume que l'analyse a été faite. Par contre, nous avons évalué que le volume maximal de l'échantillon analysé était d'environ 150 μ L, ce qui a permis de calculer les limites de détection données au chapitre 3 (220 copies pour X2-L et 750 copies pour le virus de l'*influenza A*). Conséquemment, si l'on développe un appareil d'une sensibilité semblable au fluorimètre prototype conçu dans notre laboratoire et capable d'accueillir un volume d'échantillon inférieur à 3 mL, la détection de 25 000 copies d'acides nucléiques cibles devrait se faire sans problèmes. Si l'analyse est faite dans un volume de 150 μ L, la détection de 25 000 copies correspond à 25 fois la limite de détection (si l'on considère 1000 copies/150 μ L comme la limite de détection maximale pour un brin d'acides

nucléiques de nature et de purification inconnue), ce qui nous place dans un domaine très confortable pour faire l'analyse. Un autre avantage de cette méthode de détection se situe au niveau de son coût. En effet, l'ADN marqué avec l'AF546 coûte environ 50 fois plus cher que l'ADN non marqué; ce qui rend le superallumage d'autant plus cher que la méthode avec le polymère.

Nous avons démontré l'applicabilité de cette méthode de détection pour faire la détection de brins simples d'ADN ou d'ARN de différentes longueurs, et nous avons évalué des limites de détection pour ces analytes. Par ailleurs, nous avons aussi démontré qu'en utilisant un milieu d'hybridation dépourvu de sels en solution et une température de 65°C, il était possible de détecter de l'ADN double brin avec le polymère. La limite de détection de l'étude réalisée avec des amplicons présentée à la figure 2.4 est de 1500 copies de cet ADN double brin dans le volume total de l'analyse soit 2,5 mL. La détection de plus de 25 000 copies d'ADN double brin devrait donc s'effectuer sans problèmes. Il est à noter que pour effectuer la détection de la fluorescence émise par le polymère, on doit faire l'excitation de celui-ci à 425 nm et la détection de l'émission à 530 nm. Aussi, pour détecter des oligonucléotides d'ADN, il a été déterminé que le meilleur milieu d'hybridation est une solution contenant 0,1 M de NaCl et 0,3 mM de triton X-100 hydrogéné, la température de cette solution doit être entre 50-55°C. Pour faire la détection d'ARN simple brin, on utilise les mêmes conditions expérimentales mais il faut préalablement faire la dénaturation du brin d'ARN cible pour défaire les structures secondaires et ainsi s'assurer que la région qui doit s'hybrider avec la sonde soit sous la forme de simple brin. Le même principe s'applique à la détection d'oligonucléotides d'ADN d'une longueur supérieure à 30 nucléotides. Pour faire la détection d'ADN ou d'ARN double brin, il faut travailler dans une solution contenant le moins possible de sels en solution et à une température autour de 65°C. Il est aussi nécessaire de dénaturer l'échantillon avant de l'introduire dans le milieu d'hybridation. Il nous semble important de préciser qu'il est mieux d'avoir une idée de la concentration de l'ADN cible avant d'utiliser cette méthode; nous avons établi que pour obtenir de bons résultats, le brin d'ADN cible doit être ajouté de façon à former 100% de triplex, on doit donc savoir approximativement la concentration de duplex qu'on doit placer en solution avant d'ajouter l'échantillon d'ADN à détecter. Pour les exemples d'applications donnés

dans le prochain paragraphe, la concentration approximative de l'ADN cible est connue, comme c'est habituellement le cas lorsque la quantité d'ADN cible à détecter est supérieure à 25 000 copies.

Nous pouvons maintenant donner quelques exemples d'applications pour lesquelles l'échantillon à analyser contient plus de 25 000 copies d'acides nucléiques. Par exemple, lorsqu'on veut faire la détection d'une mutation génétique comme la tyrosinémie héréditaire, l'ADN cible est l'ADN génomique du patient dont on retrouve en moyenne 10^7 copies par mL de sang⁸. Donc, pour toutes les applications où l'ADN cible est de l'ADN génomique, la quantité d'ADN à détecter est suffisante pour faire plusieurs tests avec le même échantillon en utilisant la méthode avec le polymère seul. Si l'ADN à détecter a d'abord été amplifié par PCR, il est presque certain que le nombre de copies obtenues sera détectable par notre méthode avec le polymère. Il existe aussi certaines applications en infectiologie qui pourraient bénéficier de notre méthode de détection d'ADN avec le polymère. Plusieurs infections par des virus entraînent l'apparition d'une quantité de particules virales (charge virale) supérieure à 25 000 copies/ mL de sang. Notamment, il est très important de suivre régulièrement l'évolution de la charge virale chez les patients atteints du VIH (virus de l'immunodéficience humaine, ou SIDA) pour pouvoir traiter le patient avec le médicament antiviral adéquat. En effet, chez ces patients, la charge virale peut être contrôlée pendant une période relativement longue (quelques années) par un médicament antiviral donné. Pendant ce temps, la charge virale varie entre 1000 et 10 000 copies/mL de sang⁹. Par la suite, le VIH devient résistant à l'agent antiviral et la charge virale augmente pour atteindre entre 50 000 et 75 000 copies de virus par mL de sang¹⁰, le médicament antiviral doit donc être changé. On pourrait concevoir un test pour mesurer périodiquement cette charge virale en détectant l'ARN génomique du VIH avec une sonde d'ADN spécifique à cet ARN et en utilisant le polymère comme transducteur.

7.2.2 Détection de moins de 25 000 copies d'acides nucléiques

Le superallumage rend possible la détection d'aussi peu que 5 copies d'ADN double brin dans 3 mL d'échantillon, ce qui équivaut à une concentration de 3 zeptomoles d'ADN cible par litre. De plus, le superallumage permet une détection très rapide, le signal de fluorescence augmente en l'espace de 5 minutes, puis se stabilise lors des 5 minutes suivantes. Cette rapidité d'hybridation serait due au confinement des sondes d'ADN à l'intérieur des agrégats, ce qui favorise une réaction d'hybridation très rapide une fois que le brin complémentaire est introduit à l'intérieur de l'agrégat (voir section 7.1.2). Pour mesurer la fluorescence émise par les agrégats marqués, il faut faire l'excitation du polymère à 425 nm et la détection de la fluorescence émise par les AF546 à 572 nm. Nous avons déterminé que le meilleur milieu d'hybridation à utiliser avec cette technique est l'eau nanopure stérile. La température d'hybridation à utiliser doit être de 50-55°C pour faire la détection d'oligonucléotides d'ADN ou de brins simples d'ARN et autour de 65°C pour faire la détection d'ADN ou d'ARN double brin. Les remarques que nous avons faites à la section 7.2.1 concernant la dénaturation préalable des échantillons sont aussi valables pour le superallumage.

La sensibilité de détection très impressionnante du superallumage le rend très compétitif par rapport aux autres méthodes ultrasensibles de détection d'acides nucléiques (voir tableau 1.1). L'amplification du nombre de copies d'ADN cible par PCR ne serait même plus nécessaire en utilisant le superallumage, ce qui simplifierait beaucoup les tests de diagnostic. Les applications où l'on veut détecter moins de 25 000 copies d'ADN cible par échantillon sont très nombreuses, notamment en infectiologie. Par exemple, l'infection bactérienne nommée *méningite à pneumocoques* cause l'apparition dans le sang d'environ 120 - 4000 bactéries pathogènes par microlitre¹¹. Cette infection étant très sérieuse, un traitement doit être fait même si une quantité inférieure de bactéries est détectée. Le superallumage pourrait donc détecter cette infection à son tout début, réduisant ainsi les risques de complications. Par ailleurs, nous avons récemment entendu parler de la présence de souches pathogènes de la bactérie *Escherichia coli* dans l'eau de consommation. La dose infectieuse de ces souches entérohémorragiques (causant des hémorragies dans le système

digestif) varie de 10 à 1000 bactéries par ingestion⁹. Pour éviter ce genre d'infection, il est nécessaire de pouvoir détecter une quantité très faible de bactéries. En effet, il serait intéressant d'être en mesure de détecter une seule de ces bactéries et ce même si elle est la seule dans un volume d'eau important. Pour réaliser ce projet, on pourrait utiliser des filtres retenant les bactéries pour filtrer toute l'eau potable d'une municipalité et d'ensuite effectuer la détection spécifique sur une base quotidienne de cette souche d'*E. coli* pathogène (O157:H7) avec le superallumage.

7.2.3 Notes sur la sélectivité des deux méthodes

Il nous semble important de mentionner que pour les deux méthodes utilisées, la sélectivité du test effectué doit être contrôlée avec des tests négatifs. La sélectivité recherchée dépend de l'analyte que l'on doit détecter. Par exemple, si l'on fait la détection d'une mutation génétique dans de l'ADN génomique, on doit pouvoir faire la différence entre un brin d'ADN parfaitement complémentaire et un brin d'ADN comprenant un seul défaut de séquence. Lorsque nous avons fait la détection de la *tyrosinémie héréditaire* au chapitre 4, nous étions exactement dans cette situation. Or, on voit aux figures 2.4 et 4.4 que l'on peut faire une détection sélective avec les deux méthodes. Faire la distinction entre un brin parfaitement complémentaire et un autre avec seulement un défaut est donc possible avec les deux méthodes, mais il est important de faire un test négatif dans les deux cas. Par ailleurs, dans cette situation, l'ADN analyte est constitué à 100% de brin complémentaire ou encore à 100% de brin comprenant la mutation recherchée, ce qui facilite énormément une détection sélective avec nos méthodes. Il est aussi important de mentionner que dans le cas où l'échantillon est de l'ADN génomique (figure 4.4), l'ADN cible constitue une infime portion de l'échantillon d'ADN total et la détection de ce brin cible est néanmoins faite avec une excellente sélectivité. Par contre, dans le cas où l'échantillon d'ADN à analyser serait composé par exemple d'un centième d'ADN cible et de 99 centièmes d'ADN comprenant un défaut de séquence par rapport au brin cible, la détection sélective avec nos deux méthodes de détection serait impossible. Dans cette situation, on pourrait ajouter une étape préalable au processus de détection de façon à parvenir à détecter sélectivement l'ADN cible. Il s'agit

de la capture préalable du brin d'ADN cible par des billes magnétiques portant la séquence sonde à leur surface, ce qui permet ainsi une capture sélective du brin cible. Après lavage et dénaturation de l'ADN cible des billes, on pourra analyser l'échantillon majoritairement constitué d'ADN cible par la méthode avec le polymère ou encore, si l'ADN est présent en petite quantité, par superallumage.

7.3 Références

- (1) McQuade, D.T.; Hegedus, A.H.; Swager, T.M. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 12389- 12390.
- (2) Levitsky, I.A.; Kim, J.; Swager, T.M. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 1466-1472.
- (3) Nguyen, T.-Q.; Wu, J.; Doan, V.; Schwartz, B.J.; Tolbert, S.H. *Science* **2000**, *288*, 652-656.
- (4) Kim, J.; Swager, T.M. *Nature* **2001**, *411*, 1030-1034.
- (5) Beljonne, D.; Pourtois, G.; Silva, C.; Hennebicq, E.; Herz, L.M.; Friend, R.H.; Scholes, G.D.; Setayesh, K.; Müllen, K.; Brédas, J.L. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 10982-10987.
- (6) Chen, L.; McBranch, D.W.; Wang, H.L.; Helgeson, R.; Wudl, F.; Whitten, D.G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96*, 12287-12292.
- (7) Park, L.-C.; Maruyama, T.; Goto, M. *The Analyst* **2003**, *128*, 161-165.
- (8) Greenfield, L; White, T. J., Ed.; ASM Press, 1993, p. 664.
- (9) Tortora, G. J. ; Fuke, B. R. ; Case, C. L. *Introduction à la microbiologie*; Éditions du renouveau pédagogique (ERPI), 2003.
- (10) Peter, J.B.; Sevall, J.S. *AIDS Patient Care STDs* **2004**, *18*, 2, 75-79.
- (11) Ostergaard, C; O'Reilly, T; Brandt C; Frimodt-Moller N; Lundgren, J.D. *BMC Infectious Diseases* **2006**, *6*, 78.