

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand Frappier

Développement de nouvelle technologie de bio-détection de microorganismes par l'utilisation d'oligonucléotides et d'aptamères

Par
Emre Yurdusev

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Angela Pearson INRS-Institut Armand Frappier
Examineur externe	Christopher J. Wilds Département de Chimie et Biochimie Université Concordia
Examineur interne	Jonathan Perreault INRS-Institut Armand Frappier
Directeur de recherche	Jonathan Perreault INRS-Institut Armand Frappier

Remerciements

Merci premièrement à ma femme, bien sûr, ma plus grande complice et fidèle accompagnatrice dans les aventures de la vie où l'on s'entraîne l'un et l'autre.

Merci à mon père, sans le soutien de qui ma décision de faire ce retour aux études n'aurait pas été réalisable.

Merci ensuite à Jonathan, qui en plus de m'offrir cette opportunité en m'accueillant dans son laboratoire, a durant cette période était toujours un professeur à l'écoute, attentif et stimulant avec qui travailler est une expérience plaisante, enrichissante et créative.

Merci à Mehdi Haghdoost pour sa collaboration et son aide précieuse.

Merci également à tous les membres actuels et alumni, que j'ai côtoyé, du laboratoire Perreault. Spécialement Renaud Pavic, qui a fourni beaucoup de travail dans le projet de criblage des aptamères pour la détection de bactéries.

Je ne peux pas passer sans remercier ma grand-mère ('Fatma chavouch') qui m'a tellement donné. En cette année où je l'ai perdue, j'aimerais mettre les quelques personnes lisant cette page en témoin de la gratitude que j'éprouve envers elle. Une grande dame, d'une intelligence et surtout d'une bonté profonde qui mérite d'être honorée à toutes occasions. Je continuerai toujours à souligner la chance d'avoir eu dans cette vie une telle personne dont juste la pensée donne de la force, et j'écrirai, je l'espère, mes remerciements encore à d'autres occasions et d'autres témoins...

Et dernièrement, un merci également aux inventeurs du café, sans qui je n'aurais pas pu finir ce mémoire dans les délais.

Résumé

Les aptamères sont des acides nucléiques, qui de par leur structure tridimensionnelle, sont capables de reconnaître et lier spécifiquement une molécule donnée. À partir d'une banque d'oligonucléotides, les séquences présentant de telles particularités aptamériques peuvent être sélectionnées grâce à une méthode d'évolution accélérée *in-vitro*, nommée SELEX. Le SELEX est un processus qui, à travers les sélections positives et négatives constituant ses cycles, permet de moduler précisément l'affinité des aptamères sélectionnés pour une haute sélectivité envers des cibles données et une capacité à discriminer ces cibles de molécules très similaires.

Pour cette raison, entre autres, il existe un nombre grandissant de publications concernant le développement de nouveaux aptamères envers différentes cibles. Nous avons premièrement mis en examen la reproductibilité de résultats publiés concernant l'affinité d'un certain nombre d'aptamères envers des cibles bactériennes, dans l'objectif de constituer pour nos travaux futurs une banque d'aptamères bactériens dont la fonctionnalité a été approuvée entre 'nos mains'.

Le développement de plateformes de bio-détection en conjuguant des oligonucléotides à des senseurs à fibres optiques a constitué le deuxième volet de nos travaux, en lien avec le premier, car la preuve de concept apportée servira également à l'utilisation des aptamères sur ce type de plateforme.

Abstract

Aptamers are nucleic acids able to recognize and bind specific molecules due to their three dimensional structures. Sequences with such aptameric particularities can be selected from an oligonucleotide bank using an in vitro accelerated selection method, named SELEX. SELEX is a process constituted of positive and negative selection cycles that allow one to precisely modulate the affinity of the selected aptamers with high selectivity against a given target, and the capacity to discriminate this target from other even very similar molecules.

For this reason, among others, there is an exponentially growing number of publications with regard to the development of new aptamers against different types of targets. First, we have tested the reproducibility of published results concerning the affinity of a certain number of aptamers against their bacterial targets with the objective of establishing a bank of aptamers whose functionality have been confirmed in 'our hands' to use in our future studies.

The development of a bio-sensor platform through the immobilization of oligonucleotides on optic-fiber sensor surfaces was the second aim of our project. This second part of the project is linked to the first one by the fact that it paves the way to a proof of concept for the utilization of aptamers using this type of platform.

Table des matières

1 INTRODUCTION.....	1
1.1. LE CONTEXTE.....	1
1.2. LES BIOSENSEURS	2
1.3. LES BIOÉLÉMENTS DES BIOSENSEURS.....	3
1.4. LES APTAMÈRES	3
1.5. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	6
<u>PARTIE I : CRIBLAGE D'APTAMÈRES POUR LA DÉTECTION DE BACTÉRIES</u>	8
2 INTRODUCTION	8
2.1. LES PATHOGÈNES BACTÉRIENS ET LA SANTÉ PUBLIC.....	8
2.2. LES APTAMÈRES : DES BIOÉLÉMENTS DE CHOIX POUR LA DÉTECTION DES BACTÉRIES	9
2.3. OBJECTIFS.....	11
2.4. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	12
2.4.1 Aptamères	12
2.4.2 Purification des aptamères	15
2.4.3 Cultures bactériennes	15
2.4.4 Tests d'affinité avec l'utilisation d'aptamères conjugués à un fluorophore	16
2.4.5 Tests d'affinité avec l'utilisation d'aptamère marqué radioactivement.....	20
3 RÉSULTATS.....	21
3.1. TESTS D'AFFINITÉ AVEC L'UTILISATION D'APTAMÈRE CONJUGUÉ À UN FLUOROPHORE.....	21
3.1.1 Affinité de l'aptamère F23-FAM avec <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853.....	21
3.1.2 Affinité des aptamère E1-FAM et E2-FAM avec <i>E. coli</i> ATCC 8739.....	30
3.1.3 Affinité des aptamères DTMRSA1-FITC, SA17-FAM et SA23-FITC avec <i>S. aureus</i> HER1238..	31
3.1.4 Affinité des aptamère N°6-FAM et N°19-FAM avec <i>E. coli</i> K12 et <i>B. subtilis</i>	32
3.2. TESTS D'AFFINITÉ AVEC L'UTILISATION D'APTAMÈRES MARQUÉS RADIOACTIVEMENT	33
3.2.1 Affinité des aptamères E1 et E2 avec <i>E. coli</i> ATCC 8739	33
3.2.2 Affinité des aptamères DTMRSA1 et SA23 avec <i>S. aureus</i> HER1238	38
4 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	39
<u>PARTIE II : UTILISATION D'ACIDE NUCLÉIQUE SUR PLATEFORME FIBRE OPTIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT DE SYSTÈME DE DÉTECTION DE GÉNOMES VIRAUX ET BACTÉRIENS</u>	42
5 INTRODUCTION	42

5.1.	LES BIOSENSEURS:	42
5.2.	BIOSENSEUR À TRANSDUCTEUR EN FIBRE OPTIQUE:	44
5.3.	OBJECTIFS ET PROBLÉMATIQUES:.....	46
5.4.	LA MÉTHODE CHIMIQUE	47
6	MATÉRIELS ET MÉTHODES	50
6.1.	LES OLIGONUCLÉOTIDES.....	50
6.2.	L'HYBRIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES.....	51
6.3.	MARQUAGE RADIOACTIF DES OLIGOMÈRES	51
6.4.	PURIFICATION DES OLIGOMÈRES MARQUÉS.....	51
6.5.	LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SILICE	51
6.6.	L'IMMOBILISATION DES OLIGOMÈRES SUR LES SURFACES FONCTIONNALISÉES (CHIMIQUEMENT ACTIVÉES).....	53
6.7.	HYBRIDATION DES FRAGMENTS CIBLES AVEC OLIGOMÈRES IMMOBILISÉS SUR SURFACES	54
6.8.	RÉVÉLATION DE LA RADIOACTIVITÉ.....	54
7	RÉSULTATS.....	55
7.1.	LE DESIGN DES OLIGOMÈRES.....	55
7.2.	TEST D'IMMOBILISATION D'OLIGOMÈRES SIMPLE BRIN PAR LA MÉTHODE DU TESPSA	59
7.2.1	En utilisant des oligomères double brin	64
7.3.	TEST DE FONCTIONNALITÉ DES OLIGOMÈRES IMMOBILISÉS AVEC LA MÉTHODE TESPSA.....	66
7.4.	NOUVELLE MÉTHODE CHIMIQUE POUR LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SILICE	68
8	DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES.....	70
9	RÉFÉRENCES.....	74

Table des figures

FIGURE 1 : SCHÉMA D'UN BIOSENSEUR.....	3
FIGURE 2 : STRUCTURE TERTIAIRE D'UNE ZONE D'INTERACTION ENTRE UN APTAMÈRE ET SA CIBLE.	4
FIGURE 3 : SCHÉMA DU PRINCIPE DU SELEX (POUR <i>SYSTEMATIC EVOLUTION OF LIGANDS BY EXPONENTIEL ENRICHMENT</i>).....	5
FIGURE 4 : LES TENDANCES ANNUELLES DANS LE NOMBRE DE PUBLICATION RELIÉ AU THÈME DES APTAMÈRES ET BACTÉRIES. ..	10
FIGURE 5 : SCHÉMA DU PROCESSUS EXPÉRIMENTAL DU TEST D'AFFINITÉ AVEC L'UTILISATION D'APTAMÈRES CONJUGUÉS À UN FLUOROPHORE.....	19
FIGURE 6 : TESTS D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>P. AERUGINOSA</i> (1 ^{ER} ESSAI)	22
FIGURE 7 : TESTS D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>P. AERUGINOSA</i> (2 ^{ÈME} ESSAI : SANS RESUSPENDRE LES CULOTS)	23
FIGURE 8 : TESTS D'EXTINCTION DE LA FLUORESCENCE DU GROUPEMENT FLUOROCHROME DES APTAMÈRE PAR LA PRÉSENCE DE BACTÉRIES.....	24
FIGURE 9 : TESTS D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>P. AERUGINOSA</i> (3 ^{ÈME} ESSAI: EFFET DU CHAUFFAGE DU CULOT FINAL)	25
FIGURE 10 : TESTS D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>P. AERUGINOSA</i> (4 ^{ÈME} ESSAI : NOUVEAUX APTAMÈRES ET COMPARAISON APTAMÈRES PURIFIÉS/NON-PURIFIÉS).....	26
FIGURE 11 : TEST D'INTÉGRITÉ DE L'APTAMÈRE EN CONDITION D'INCUBATION.	27
FIGURE 12 : TEST D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>P. AERUGINOSA</i> (5 ^{ÈME} ESSAI : EFFECTUÉ PAR AMAL THAMRI) :	28
FIGURE 13 : TEST D'AFFINITÉ DE L'APTAMÈRE F23-FAM ENVERS DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE <i>P. AERUGINOSA</i> (7 ^{ÈME} ESSAI : EFFECTUÉ PAR RENAUD PAVIC)	29
FIGURE 14 : TEST D'AFFINITÉ DES APTAMÈRE E1-FAM ET E2-FAM ENVERS LA BACTÉRIE <i>E. COLI</i> (ATCC 8739).....	30
FIGURE 15 : TEST D'AFFINITÉ DES APTAMÈRES DTMRSA1-FITC, SA17-FAM ET SA23-FITC ENVERS LA SOUCHE HER1238 DE <i>S. AUREUS</i>	31
FIGURE 16 : TEST D'AFFINITÉ DES APTAMÈRES N°6-FAM ET N°19-FAM ENVERS <i>E. COLI</i> K12 ET <i>B. SUBTILIS</i>	32
FIGURE 17 : AUGMENTATION DE MOBILITÉ D'UN APTAMÈRE IMMOBILISÉ PAR LA PRÉSENCE DE SÉQUENCE ESPACEUR. (TIRÉE DE WHITE <i>ET AL.</i> [45])	34
FIGURE 18 : CARACTÉRISTIQUES DES BANQUES DE SÉQUENCES CANDIDATES UTILISÉES LORS DES SELEX POUR L'OBTENTION D'APTAMÈRES	34
FIGURE 19 : TEST PAR MARQUAGE RADIOACTIF D'AFFINITÉ DE E1, E2 ET LEURS DÉRIVÉS ENVERS <i>E. COLI</i>	36
FIGURE 20 : DISTRIBUTION DE LA RADIOACTIVITÉ SELON LES COMPARTIMENTS EXPÉRIMENTAUX LORS DES TESTS D'AFFINITÉ DE E1, E2 ET LEURS DÉRIVÉS ENVERS <i>E. COLI</i>	37
FIGURE 21 : TEST PAR MARQUAGE RADIOACTIF D'AFFINITÉ DE DTMRSA1 ET SA23 ENVERS <i>S. AUREUS</i>	38
FIGURE 22 : PREMIER BIOSENSEUR ANALYSEUR DE TAUX GLYCÉMIQUE SANGUIN, MODÈLE YSI 23A COMMERCIALISÉ PAR YELLOW SPRINGS INSTRUMENT, EN 1975.....	42
FIGURE 23 : LES FIBRES OPTIQUES LPFG.....	45

FIGURE 24 : SCHEMA D'INTERACTIONS	46
FIGURE 25 : FONCTIONNALISATION DES SURFACE DE SILICE AU TESPSA.....	49
FIGURE 26 : SCHÉMA DU MONTAGE /DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL POUR L'IMMOBILISATION DES OLIGOMÈRES SUR LAME DE VERRE FONCTIONNALISÉE	53
FIGURE 27 : REPRÉSENTATION DES DESIGNS D'OLIGOMÈRES ET DE LEUR HYBRIDATION SUR DES GÉNOMES CIBLES	56
FIGURE 28 : ISOLATION PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL DES OLIGOMÈRES MARQUÉ RADIOACTIVEMENT	60
FIGURE 29 : TEST D'IMMOBILISATION D'OLIGOMÈRES SIMPLE BRIN PAR LA MÉTHODE DU TESPSA.....	62
FIGURE 30 : GROUPEMENTS AMINES DES BASES AZOTEES	63
FIGURE 31 : SCHÉMATISATION DES ÉTAPES NÉCESSAIRES À L'OBTENTION D'UN SYSTÈME CAPABLE DE DÉTECTION PAR L'APPROCHE D'IMMOBILISATION D'OLIGOMÈRES DOUBLE BRIN	64
FIGURE 32 : TEST D'IMMOBILISATION D'OLIGOMÈRES DOUBLE BRIN PAR LA MÉTHODE DU TESPSA	65
FIGURE 33 : TEST DE FONCTIONNALITÉ SUR OLIGOMÈRES IMMOBILISÉS SOUS FORME DOUBLE BRIN PAR LA MÉTHODE DU TESPSA	67
FIGURE 34 : ESSAI DE LA MÉTHODE MALÉIMIDE ET COMPARAISON AVEC LA MÉTHODE TESPSA	69
FIGURE 35 : REPRÉSENTATION DE L'ENCOMBREMENT STÉRIQUE QUE PEUT CRÉER L'EXISTENCE D'UNE SECTION NON-HYBRIDÉE DIRIGÉE VERS LA SURFACE.....	72

Table des tableaux

TABLEAU 1 : LISTE DES APTAMÈRES UTILISÉS DANS LES TRAVAUX DE CRIBLAGE.....	12
TABLEAU 2 : LISTE DES APTAMÈRES ÉTUDIÉS.....	14
TABLEAU 3 : LISTE DES SOUCHES BACTÉRIENNES UTILISÉES.	15
TABLEAU 4 : LISTE DES CONDITIONS D'INCUBATION POUR LES TESTS D'AFFINITÉ	18
TABLEAU 5 : SÉQUENCES ET MODIFICATIONS DES OLIGOMÈRES UTILISÉS.....	50
TABLE 6 : SÉLECTION DE SÉQUENCES D'HYBRIDATION SUR GÉNOMES CIBLES À PARTIR DES RÉSULTATS D'OLIGOWALK.....	58

Liste des sigles et abréviations

³²P: isotope 32 de phosphore radioactif

ATCC : *American Type Culture Collection*

APS: Ammonium PerSulfate

ATP: Adénosine TriPhosphate

AT³²P: Adénosine TriPhosphate marqué à l' isotope 32 de phosphore radioactif

BPB: Bleu de BromoPhénol

COOH : carboxyle

DMF: Dimethylformamide

DO: Densité optique

EDTA: Éthylènediaminetétraacétique

FAM: Fluorescéine

FDA: Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (ou en Anglais : *Food and Drug Administration*)

FITC: isothiocyanate de fluorescéine

GOD: Glucose oxydase

Kd: Constante de dissociation

LPFG: *long-period fiber grating*

MAPAQ: Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PBS: tampon phosphate salin (abrégé PBS, de l'anglais *phosphate buffered saline*)

PMMA: Polyméthacrylate de méthyle

SELEX: évolution systématique de ligands par enrichissement exponentiel, (ou en Anglais *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)

SDS: dodécylsulfate de sodium

SPR: résonance des plasmons de surface (ou en Anglais: *surface plasmon resonance*)

T4PNK: Polynucléotide kinase T4

TB: tuberculose

TBE: Tampon Tris, Borate, EDTA

TEMED: TEtraMéthylEthylèneDiamine

TESPSA: Triethoxysilylpropylsuccinic anhydride

UV: Ultra-violet

UQO: Université du Québec en Outaouais

Ufc: unite formant colonie

XC: bleu de Xylène Cyanole

1 INTRODUCTION

1.1. LE CONTEXTE

Dans nombreux domaines, de l'industrie alimentaire à l'environnement, le suivi des contaminants pathogéniques ou chimiques constitue une préoccupation majeure. La nature du moyen utilisé influe fortement divers aspects importants comme la fiabilité (spécificité/sensibilité) de la détection, la fréquence et la régularité des suivis, de même que la représentativité en temps réel des résultats. L'utilisabilité sur le terrain, la rapidité, la nécessité de personnel qualifié et le coût de la méthode employée sont des facteurs qui ont des impacts directs sur les qualités précédemment citées de la surveillance. Par exemple, l'absence de moyen de détection sur le terrain et la nécessité du transport d'échantillons qui en résulte provoquera un écart temporel (plusieurs jours pour certaines méthodes couramment employées) entre le moment de prélèvement de l'échantillon et l'obtention de résultats. L'éventualité d'une altération de l'état de contamination de l'objet, du lieu ou de l'organisme sujet à l'analyse de manière plus rapide que le temps requis pour l'obtention de résultats réduit grandement l'utilité de telles méthodes de détection 'lentes'. Les méthodes qui nécessitent une certaine durée pour l'obtention de résultats ont donc une applicabilité limitée aux situations où le changement de l'état de contamination ne peut survenir que de manière graduelle. Ces méthodes serviront alors à la détection des signes précurseurs d'une éventuelle contamination. La procédure employée actuellement par exemple au Québec pour la détection des coliformes fécaux (seul test effectué au niveau de la qualité bactériologique) des eaux récréatives requiert 24 à 36 heures pour l'obtention de résultats [1]. Cette procédure permet le suivi de la qualité des eaux et la prévention des potentielles répercussions sur la santé publique, à la condition que le changement de l'état de contamination des eaux survienne graduellement. Les averses abondantes provoquant d'éventuels débordements d'égouts, une augmentation brusque des ruissellements agricoles acheminant les microorganismes vers les eaux récréatives, de déversements illicites de boues de fosses septiques et de toilettes chimiques, etc. peuvent causer des changements brusques dans les états de contamination de certains lieux. Pour protéger les utilisateurs de ces lieux il est important, ne serait-ce au moins que pour accompagner les méthodes traditionnelles (qui même si lentes, ont généralement la qualité d'être sensibles), de bénéficier de méthode rapides.

Sur un aspect économique la disponibilité de moyen de détection ne nécessitant ni employés

qualifiés, ni infrastructures élaborées (tel qu'un laboratoire spécialisé), ni temps de travaux prolongés pour l'obtention de résultats est attrayante. D'un autre côté, l'aspect économique est certainement étroitement lié à la fréquence et la régularité auxquelles les procédures de détection nécessaires sont appliquées. Autrement dit, la disponibilité de moyens de détection répondant aux qualités précédemment citées permettrait certainement aux intendances responsables d'effectuer plus facilement une surveillance régulière et donc rigoureuse dans les domaines qui le nécessitent.

La sensibilisation de l'opinion publique et l'affermissement des règles en la matière de la protection de l'environnement ont d'un autre côté engendré de nouveaux besoins de moyens de détection. Par exemple, la présence de pesticides et de leurs métabolites dans les aliments, les eaux ou les sols est actuellement une préoccupation majeure en matière d'environnement [2]. De part leur utilisation massive en agriculture, les pesticides sont devenus un des polluants environnementaux importants dont la surveillance en continu des taux présents dans les aliments, l'eau et l'air est devenue une activité clé à l'égard de la santé publique [3].

D'autre part, principalement dû à une certaine inertie législative et organisationnel, les industries tout comme les grandes institutions qui doivent pratiquer une surveillance et appliquer en continu des méthodes de détection pour des composés donnés, utilisent toujours de nos jours des technologies relativement anciennes [4]. Les nouvelles technologies de détection seraient utiles dans la mesure où elles apporteraient au fonctionnement du secteur de l'efficacité, de la rapidité, du rendement et éventuellement une mise à jour selon les besoins et cibles actuelles.

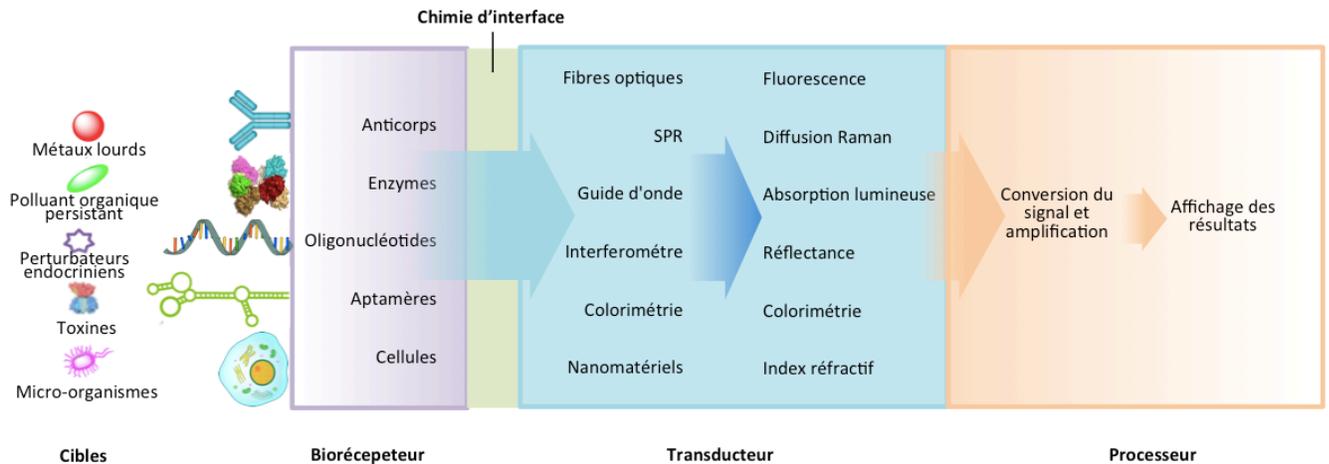
1.2. LES BIOSENSEURS

Au cours de cette dernière décennie très particulièrement, de nombreuses recherches ont été entreprises pour le développement de méthodes et de matériels innovateurs utilisables en technologie de détection et diagnostic [5]. Des travaux issus de différentes disciplines (biologie et chimie, mais aussi nanotechnologie, électronique, photonique, *etc.*) ont convergé, et continuent à le faire, vers cette perspective d'apporter innovation et amélioration au domaine de la détection et du diagnostic. Ce domaine de part sa nature est très multidisciplinaire. L'association d'un élément biologique ou biomimétique à un système de transformation de signal constitue la stratégie au grand potentiel qui est à la base de cette effervescence (**Fig. 1**). Les biosenseurs (ou biocapteurs), par la nomenclature communément acceptée pour désigner les dispositifs dans leur ensemble qui se base sur ce principe, sont très variés. Différentes

alternatives de plateformes de transformation de signal sont proposées par diverses approches technologiques (détaillées en partie I).

Figure 1 : Schéma d'un biosenseur

Cette figure représente les principaux compartiments composant un biosenseur typique. La liste des exemples donnés pour chaque compartiment n'est pas exhaustive. (adapté de Long *et al.* [6])



1.3. LES BIOÉLÉMENTS DES BIOSENSEURS

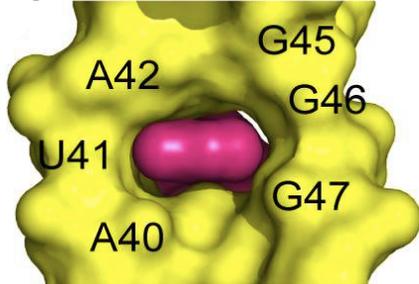
Il existe également différents types d'éléments pour la composante biologique (ou biomimétique) du système responsable de l'interaction avec l'analyte (cible de la détection) ayant donc le rôle de 'récepteur/senseur'. En 1962, Leland C. Clark et C. Lyons ont présenté leurs travaux où l'enzyme glucose oxydase, mise en contact avec une électrode, permet l'obtention d'un système mesurant le taux d'oxygène ambiant [7]. La glucose oxydase (GOD) est le premier bioélément utilisé dans une telle approche, considérée comme pionnière des biosenseurs. Par la suite, les anticorps ou dérivés d'anticorps (les immunosenseurs), des protéines (enzymes ou autres), des acides nucléiques, des phages et des cellules entières ont été les principaux bioéléments proposés en tant que parties constituantes de biosenseurs.

1.4. LES APTAMÈRES

Les aptamères sont parmi les bioéléments utilisés pour le développement de biosenseurs. Il s'agit d'acides nucléiques, capables d'adopter des structures tridimensionnelles particulières qui leur confèrent une affinité élevée et une haute spécificité pour leur cible [8]. La concordance géométrique entre la conformation de l'aptamère avec une section de la structure de sa cible est à la base de la liaison qui a lieu entre ces deux derniers (**Fig. 2**). Cette imbrication est

accompagnée de formation de liaisons chimiques tel que des interactions ioniques, interactions de Van der Waals, liaisons hydrogènes et interactions hydrophobes [9]. Il est important de noter qu'il s'agit là d'un type d'interaction (entre aptamère et sa cible) différent d'une interaction de complémentarité entre bases azotées, à la quelle souvent l'esprit est conditionné à penser lorsqu'il y a un acide nucléotidique en question. Ce type d'interaction est en fait similaire, par la façon dont les éléments rentrent en contact les uns avec les autres et la nature des liaisons qui surviennent, aux interactions qui ont lieu entre les anticorps et leur antigène. Toujours de manière similaire aux anticorps, les aptamères sont capables d'interagir avec toutes sortes de molécules. Ce point différencie drastiquement les aptamères du restant des acides nucléiques qui n'ont pas de particularités aptamériques, en les classant parmi les rares bioéléments capables d'interagir avec une gamme de cibles très large, voire illimitée.

Figure 2 : Structure tertiaire d'une zone d'interaction entre un aptamère et sa cible.



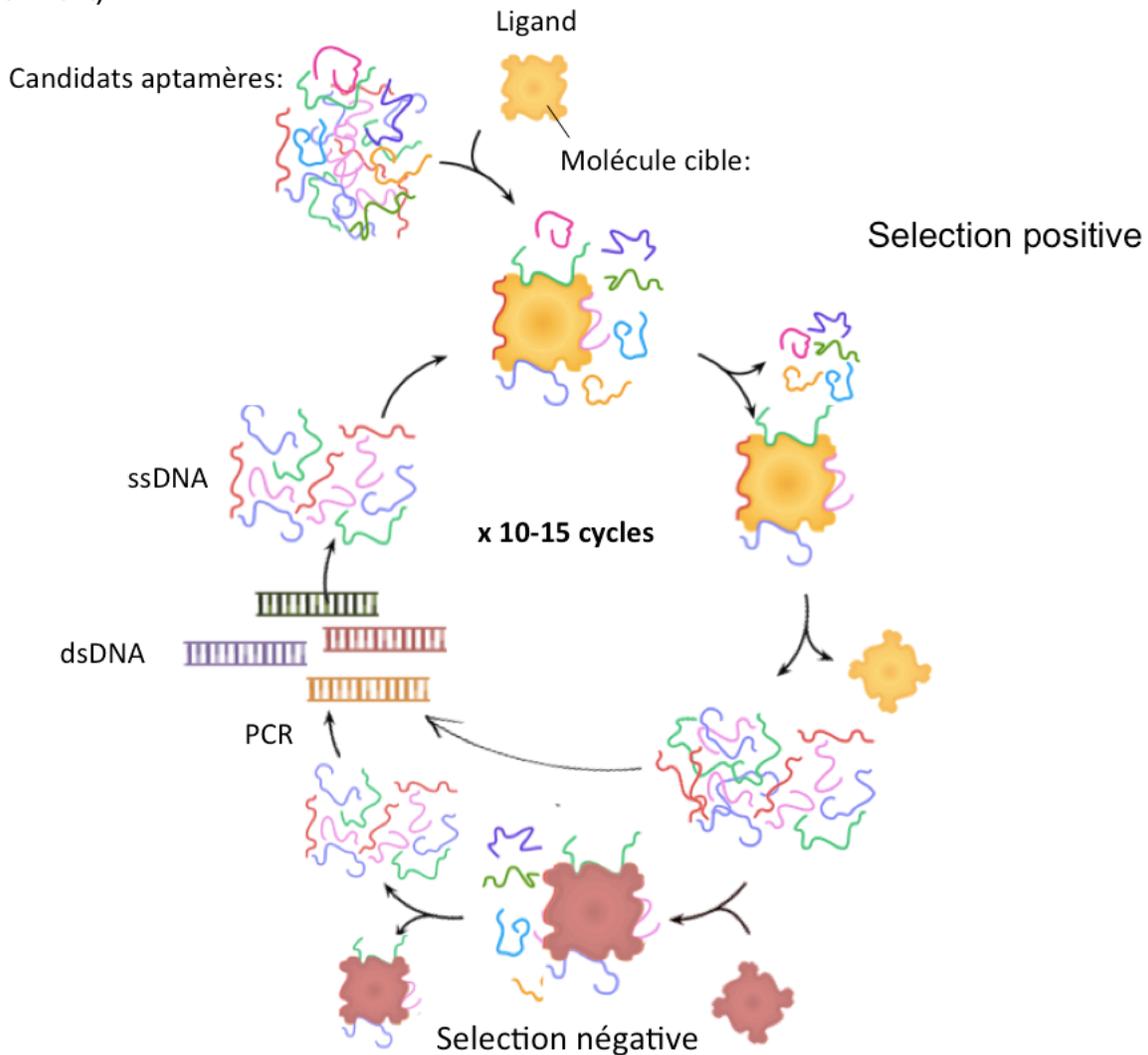
Représentation en jaune de la poche d'interaction dans la partie aptamérique du riboswitch déoxyguanosine, et de l'imbrication du déoxyguanosine, en rose, à cet endroit. Les nucléotides jouant un rôle clé sont indiqués par leur nom sur la zone en jaune. [10]

Un autre point fort des aptamères, probablement le majeur, découle du processus permettant leur obtention et de la maniabilité de ce dernier. À partir d'une banque d'oligonucléotides candidats (contenant généralement jusqu'à 10^{15} séquences aléatoires différentes les unes des autres) les séquences présentant des particularités aptamériques et une affinité envers la cible d'intérêt sont sélectionnées grâce à une méthode d'évolution accélérée *in-vitro* nommée SELEX (pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) [11]. Le SELEX est un processus qui, à travers les sélections positives et négatives constituant ses cycles, permet de moduler l'affinité et surtout la spécificité des aptamères sélectionnés (**Fig. 3**). Les cycles de sélections négatives permettent de se défaire des candidats qui ont de l'affinité pour des composés non-ciblés. En se défaisant de ces candidats, on permet au processus de faire émerger seulement les candidats spécifiques, qui auraient été 'éclipsés' par des candidats moins spécifiques si ces cycles négatifs n'avaient pas eu lieu. Ayant la possibilité d'intégrer autant de cycle de sélection négative avec autant de composés utilisés à ce niveau que l'on souhaite, on dispose d'un grand contrôle sur le(s) produit(s) de ce processus. Au final, les aptamères ainsi obtenus peuvent donc avoir une affinité hautement sélective envers des cibles

données et être capables de les discriminer d'autres molécules pourtant très similaires. Le SELEX permet d'obtenir des aptamères dotés d'une spécificité aussi affûtée que l'on souhaite.

Toujours grâce au SELEX, nous sommes en mesure de sélectionner spécifiquement les aptamères capables d'accomplir leur rôle (lier leur cible) dans les conditions auxquelles ils seront soumis dans le cadre de leur utilisation finale. En appliquant ces conditions (composition du milieu, pH, température, etc) lors des cycles de sélection du SELEX, nous obtiendrons des aptamères adaptés à celles-ci.

Figure 3 : Schéma du principe du SELEX (pour *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*).



Crédit Image : ATDBio LTD.

De part le fait que l'obtention des aptamères ne nécessite aucune utilisation d'organismes vivants ou cellules vivantes, il est tout-à-fait possible d'obtenir des aptamères pour des composés toxiques ou nuisible à ces derniers [12]. Tout comme il n'y a pas, ou peu, de limitation dans la nature chimique de la cible (nucléotidique, protéique, molécule organique ou inorganique, *etc.*) il n'existe pas non plus de limitation lié aux effets du composé ou organisme (bactérie pathogène par exemple) pour lequel on souhaite obtenir des aptamères. La gamme de cibles des aptamères est pratiquement illimitée.

D'un autre côté, une fois que l'aptamère est sélectionné, selon les conditions et la cible souhaitée, sa production est relativement simple et peu coûteuse. Il s'agit de synthétiser un oligonucléotide (généralement d'une longueur comprise entre 50-100 bases), tout comme sont effectuées les synthèses d'oligonucléotides conventionnels (non-aptamérique). Ces procédés de synthèses chimiques sont, depuis les années 70, automatisés et actuellement peu coûteux [13].

1.1. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Pour ces raisons citées, les aptamères font figure de bioéléments de choix pour diverses utilisations dont celles de récepteur dans des biosenseurs. Conséquemment, nous avons décidé d'entreprendre des travaux pour disposer d'une banque d'aptamères antibactériens fonctionnels pour ensuite pouvoir utiliser ceux-ci dans le développement de systèmes de détection innovateurs. Nos travaux ont été menés sur deux axes séparés, chacun relié à cet objectif principal:

Premièrement, nous avons initié des travaux de criblage d'aptamères ciblant les bactéries déjà publiées, en effectuant des tests visant à mettre en évidence l'affinité de ces aptamères envers leurs cibles. Les objectifs de ces travaux sont doubles : il s'agit, d'un côté, d'obtenir un nombre d'aptamères dont la fonctionnalité 'entre nos mains' a été validée pour une utilisation subséquente dans nos travaux de développement de nouveaux outils de détection. D'un autre côté, ces travaux ont pour but de mettre en place une méthodologie efficace pour l'analyse à grande échelle de la fonctionnalité des aptamères. Comme expliqué précédemment, le SELEX permet de sélectionner des aptamères de manière modulée par les conditions dans lesquelles ce SELEX a été appliqué. Nous émettons l'hypothèse que certaines de ces conditions peuvent parfois affecter la reproductibilité des résultats, faute de pouvoir reproduire toutes les conditions

nécessaires au fonctionnement de l'aptamère publié. Ces travaux ont donc pour but également de voir à quelle fréquence ceci est vrai.

Deuxièmement, nous avons engagé des travaux concernant l'utilisation des acides nucléiques dans un système de détection sur une plateforme de fibre optique, développée par nos collaborateurs du Centre de Recherche en Photonique de l'Université du Québec en Outaouais. Notre hypothèse est que le succès qui a été obtenu lors d'un précédent travail utilisant des phages comme récepteurs sur ce type de plateforme [14] est renouvelable par l'utilisation des acides nucléiques pour remplacer les phages. Ceci permettrait, au niveau pratique, d'élargir la gamme de cible du système initial, qui est limité à la détection des bactéries puisque les bio-récepteurs sont des phages. Le système que nous souhaitons développer envisage de permettre la détection de génomes bactériens, mais aussi viraux en utilisant des oligomères (acides nucléiques d'une longueur comprise entre 10-100 bases) complémentaires aux génomes de ces cibles. Une preuve de concept de la fonctionnalité des acides nucléiques permettra d'autre part de disposer d'un savoir-faire adaptable à l'utilisation des aptamères (qui sont également des acides nucléiques) pour bénéficier de tous les avantages que ceux-ci ont à fournir et éventuellement élargir encore plus la gamme de cibles, puisque les aptamères peuvent se lier à tout type de molécules.

Ce mémoire est séparé en deux grandes parties selon les deux objectifs cités ci-dessus. Ces objectifs et les moyens employés à leur réalisation sont approfondis dans les parties correspondantes à chacun.

PARTIE I : CRIBLAGE D'APTAMÈRES POUR LA DÉTECTION DE BACTÉRIES

2 INTRODUCTION

2.1. LES PATHOGÈNES BACTÉRIENS ET LA SANTÉ PUBLIC

Les pathogènes bactériens font partie intégrante de l'histoire de l'humanité, en raison des nombreuses pathologies humaines, mais aussi vétérinaires ou végétales (aux répercussions sur la condition humaine) dont ils ont été, et sont encore, la cause. Parmi quelques exemples des épisodes épidémiques bactériens majeurs de l'Histoire, 'la peste noire' causée par la bactérie *Yersinia pestis*, a tué entre 25 et 50 millions de personnes en Europe entre 1347 et 1352, soit 30 à 50% de la population européenne de l'époque, la peste de Justinien (541-767) causée par le même pathogène tua environ 25 millions de personnes à travers le monde [15], et jusqu'à la date très récente de 1946, où la Streptomycine a été découverte, la tuberculose (TB) causée par *Mycobacterium tuberculosis* a touché des grandes portions de la population mondiale avec un pronostic de survie inférieur à 50% [16]. Aujourd'hui encore, ces microorganismes continuent à être responsables d'un taux important de mortalité et morbidité à travers le monde [17]. En reprenant l'exemple de la TB, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a rapporté dans son rapport de 2015 que parmi les 9,6 millions de cas diagnostiqués, 1,5 millions de décès dus à la TB sont survenus en 2014 [18].

Les contaminations bactériennes sont également un problème au niveau de la salubrité alimentaire. Les bactéries peuvent provoquer des pathologies suite à leur ingestion via des nourritures ou boissons contaminées, cas où l'on parle de toxi-infection alimentaire (en incluant tous les cas d'intoxications alimentaires causées par des agents infectieux bactériens, viraux, parasitaires ou prionique), ou en raison des toxines qu'elles ont sécrétées dans l'aliment préalablement à son ingestion, cas où le terme d'intoxication alimentaire est utilisé. En Europe, les bactéries se classent en tant que première cause des toxi-infections alimentaires et même des intoxications alimentaires en général (les intoxications alimentaires incluant également les cas où des médicaments, métaux lourds, etc. sont sources d'empoisonnement). En France, par exemple, des 3 127 événements de toxi-infections collectives, déclarés entre 2006 et 2008, touchant 33 404 personnes et provoquant 15 décès, plus de 50% se sont avérés être de cause bactérienne (*Salmonella typhimurium* dans 40% des cas) [19]. Aux Etats-Unis, la FDA (Food and Drug Administration) rapporte 48 millions de cas annuels d'intoxications alimentaires,

généralisant 128 000 hospitalisations et 3000 décès par année. La cause principale des intoxications alimentaires aux États-Unis est cependant virale (les norovirus provoquant 57 % des maladies transmises par les aliments en 2004). Au Québec Le ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec (MAPAQ) reporte dans son rapport de 2013 [20] les salmonelles, suivies de *Escherichia coli* O157:H7 et de *Campylobacter* comme étant les principales causes de cas de toxi-infections alimentaires.

En santé vétérinaire et élevage agricole, les pathogènes bactériens compromettent la productivité et le bien-être des animaux. De plus, nombreux de ces pathogènes sont à l'origine de zoonoses (agents infectieux atteignant les animaux, et qui peuvent être transmis à l'homme, responsable éventuellement des toxi-infections et infections transmises par contact) qui nécessitent d'être identifiées et déclarées.

L'environnement tout simplement peut également abriter des pathogènes bactériens et les véhiculer (par exemple *Vibrio cholerae* l'agent étiologique du choléra).

La liste des bactéries pathogènes et les façons par lesquelles elles peuvent affecter la santé publique est donc longue et bien évidemment non-limitée aux quelques exemples cités. Pour prévenir la propagation et empêcher ou réduire les lourdes répercussions éventuelles en santé publique d'une contamination d'un environnement, d'aliments, d'individus ou d'animaux, il est essentiel d'effectuer des surveillances rigoureuses et efficaces afin d'avoir une prise de conscience anticipée sur l'évènement et maintenir un pouvoir de contrôle sur la situation. Autrement dit, la surveillance et la détection d'agents pathogènes à un stade précoce d'une éventuelle propagation du pathogène permettra de mettre en place les précautions nécessaires (par exemples: si il s'agit d'un lieu, d'y empêcher l'accès ; si il s'agit d'un individu, de le traiter et si il s'agit d'un animal d'élevage de l'isoler du troupeau et éventuellement le traiter ou l'abattre).

2.2. LES APTAMÈRES : DES BIOÉLÉMENTS DE CHOIX POUR LA DÉTECTION DES BACTÉRIES

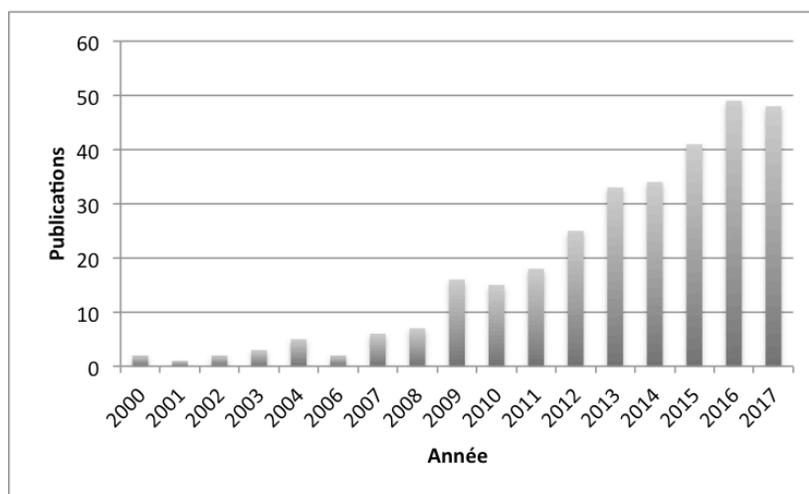
Le développement de méthodes fiables, rapides et utilisables sur le terrain est donc important pour permettre la mise en place de tels systèmes de surveillance minutieux, précis et assidus. Les aptamères capables de lier les bactéries sont des outils biologiques puissants pour le développement de ces méthodes de détection adaptées aux besoins modernes du domaine. Ils se présentent comme une alternative importante aux anticorps. Ces derniers sont très couramment utilisés dans diverses techniques en recherche, dans le domaine biomédical, et font actuellement figure d'outils majeurs comme récepteur pour le développement de

biosenseurs. Toutefois, des études ont rapporté que les procédés employés pour l'obtention d'anticorps spécifiques à une certaine cible donne lieu à des anticorps ciblant essentiellement des épitopes séquentiels [21]. Dans une approche de développement de biosenseur pour la détection de bactéries, le besoin est généralement d'avoir des bioéléments capables de détecter leur cible sous leur état natif, donc d'épitopes conformationnels et ceci très spécifiquement. Le processus d'obtention des aptamères, d'un autre côté, permet d'obtenir aisément des aptamères spécifiques capables de cibler des épitopes conformationnels, plaçant ainsi les aptamères en position plus adaptée à une telle utilisation.

D'ailleurs, le nombre de publications concernant les aptamères capables de lier des bactéries (à la grande majorité des pathogènes) a hautement augmenté depuis les vingt dernières années, depuis que Ellington *et al.* [22] et Tuerk *et al.* [11] ont publié (séparément) pour la première fois à propos de ces acides nucléiques capables de lier des molécules [23]. Le site internet de 'Thomson Reuters Web of Science' répertorie 311 articles concernant les aptamères ciblant les bactéries, avec un nombre de publications à ce sujet augmentant d'année en année (Fig.4). Le sujet des aptamères ciblant les bactéries pathogènes a suscité un intérêt assez important au cours de cette dernière décennie notamment lui permettant d'amasser un nombre conséquent de publications puisque même des revues traitant très spécifiquement du sujet des aptamères de bactérie pathogènes [24] et de leur utilisation en tant qu'outils biotechnologiques [23, 25] sont apparues.

Figure 4 : Les tendances annuelles dans le nombre de publication relié au thème des aptamères et bactéries.

Les termes 'aptamer' et 'bacteria' ont été utilisés pour une recherche de littérature dans la base de données Thomson Reuters Web of Science.



2.3. HYPOTHÈSE ET OBJECTIF

Les travaux énoncés dans cette partie concernent la validation d'aptamères publiés, par la mise en évidence, entre nos mains, de leur affinité envers leur(s) cible(s). Cette validation s'avère être indispensable puisque comme en témoigne une enquête menée par le journal *Nature* [26], enrôlant quelque 1500 scientifiques de divers domaines, 70% des chercheurs avouent n'avoir pas été capables à un moment de leur carrière, de reproduire des résultats publiés et 50% d'entre eux se sont avoués incapables de reproduire leurs propres résultats. Dans cette enquête où la moitié des répondants sont des biologistes (703 sur les 1576 répondants), 73% ont déclaré qu'au moins la moitié des publications sont crédibles, plus optimiste qu'une analyse concernant spécifiquement le biologie du cancer [27] où seulement 10% des publications sont jugées reproductibles.

En ce qui concerne les aptamères ciblant les bactéries, on remarque que pour une cible relativement populaire dans le domaine, comme la souche *E. coli* O157:H7 (pathogène responsable de nombreux cas de toxi-infection alimentaires [28, 29]) à propos duquel ont été publiés un nombre d'articles [30-38], la plupart des travaux publiés repassent par le processus de SELEX pour développer de nouveaux aptamères envers cette cible. Parmi les neuf articles publiés concernant les aptamères ciblant la souche O157:H7, il y a trois articles [32, 35, 36] où le même aptamère est utilisé (validant la reproductibilité des résultats obtenus) dont deux sont produits par la même équipe de recherche. Cette tendance à redécouvrir de nouveaux aptamères envers des cibles pour lesquelles il existe déjà des aptamères publiés semble être répandue. Pourquoi les auteurs de ces articles se donnent la peine de refaire des SELEX pour des cibles envers lesquelles il existe déjà des aptamères? Est-ce en raison de la non réussite à obtenir des résultats concluants avec les aptamères préalablement publiés?

Pour ces raisons, nous avons émis l'hypothèse qu'il existe un problème de reproductibilité des résultats concernant l'affinité de certains aptamères publiés qui nécessitent une validation préalable à ce sujet lorsqu'un aptamère va être utilisé pour un projet.

Dans ce contexte nous nous sommes fixé l'objectif suivant : nous avons décidé d'établir une liste (extensible à plus long terme) d'aptamères, à partir de la riche littérature existant dans le domaine, et tester leur fonctionnalité entre 'nos mains'. Le but primaire dans ceci est donc de constituer une banque d'aptamères disponibles pour notre laboratoire et les divers travaux envisagés. Ces aptamères pourront être utilisés directement dans des projets de développement d'outils de détection, mais également pour des essais ou optimisation de

méthodes impliquant l'utilisation d'aptamères (tel que leur immobilisation sur certaines plateformes/surfaces ou leurs soumissions à certains procédés suivis de tests de préservation de fonctionnalité dans différentes conditions). Dans une diversité de circonstances, la disposition d'une telle banque d'aptamères fonctionnels est indispensable. Un certain nombre d'aptamères est nécessaire afin d'avoir la représentativité permettant de valider des démarches expérimentales qui seront éventuellement transposées par la suite vers d'autres aptamères.

2.4. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.4.1 Aptamères

Nous avons sélectionné huit aptamères publiés pour leur capacité à lier des cibles bactériennes (**Tableau 1**). La sélection a été intentionnellement éclectique, dans un souci de représentativité et de satisfaire avec cette banque diverses possibilités d'utilisation. Ainsi, cette liste est constituée d'aptamères ciblant des agents pathogènes, mais aussi d'aptamères ciblant des bactéries non-pathogènes. Ces aptamères ciblant des agents non pathogènes ont été choisis essentiellement pour leur qualité à nous permettre de faire les validations de certaines méthodes sans avoir à appliquer des précautions nécessaires qui s'imposent lors de manipulation d'agent pathogènes, compliquant parfois considérablement les démarches expérimentales. Certains aptamères de cette liste proviennent d'articles de journaux scientifiques tandis que d'autres sont issus de brevets. Finalement, certains aptamères de cette liste sont spécifiques à une souche de bactérie donnée tandis que d'autres ont des spectres larges d'affinité.

Tableau 1 : Liste des aptamères utilisés dans les travaux de criblage

Nom	Cible	Intérêt
E1, E2, E10, E12 [39]	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	
DTMRSa1 [40] SA17 [41] SA23 [42]	<i>Staphylococcus aureus</i>	pathogène
F23 [43]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	pathogène
No.06, No.19 [44]	multiples (<i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>C. freundii</i> , <i>B. subtilis</i> , and <i>S. epidermidis</i>)	

Les oligonucléotides aptamériques utilisés lors de ces travaux, leur séquence et les fournisseurs sont listés dans le **tableau 2**. Un processus de désalinisation (la méthode n'est pas spécifiée par les fournisseurs) a été appliqué aux aptamères par les deux fournisseurs suite à leur

synthèse, sans autres procédures de purification supplémentaires. Certaines séquences aptamériques ont été modifiées avec des groupements fluorochromes FAM tandis que d'autres ont été modifiées avec des groupements FITC, en accordance avec les publications références, par souci de fidélité aux conditions établies par celles-ci.

Tableau 2 : Liste des aptamères étudiés.

Nom	Séquence	Fournisseur
E1	5-GCAATGGTACGGTACTTCCACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E1-polyA 5'	5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAATGGTACGGTACTTCCACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E1-polyA 3'	5-GCAATGGTACGGTACTTCCACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E1 tronqué	5-ACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCG-3'	BioCorp DNA Inc.
E1 tronqué-polyA 5'	5-AAAAAAAAAAAAAAAAAACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCG-3'	BioCorp DNA Inc.
E1 tronqué-polyA 3'	5-ACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E2	5-GCAATGGTACGGTACTTCCCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E2-polyA 5'	5-AAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAATGGTACGGTACTTCCCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E2-polyA 3'	5-GCAATGGTACGGTACTTCCCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E2 tronqué	5-CCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCG-3'	BioCorp DNA Inc.
E2 tronqué-polyA 5'	5-AAAAAAAAAAAAAAAAAACCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCG-3'	BioCorp DNA Inc.
E2 tronqué-polyA 3'	5-CCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	BioCorp DNA Inc.
E1-FAM	5-FAM-GCAATGGTACGGTACTTCCACTTAGGTCGAGGTTAGTTTGTCTTGCTGGCGCATCCACTGAGCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'.	BioCorp DNA Inc.
E2-FAM	5-FAM-GCAATGGTACGGTACTTCCCATGAGTGTTGTGAAATGTTGGGACACTAGGTGGCATAGAGCCGCAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	BioCorp DNA Inc.
F23-FAM*	5-FAM-ATACCAGCTTATTCAATCCCCGTTGCTTTTCGCTTTTCCITTCGCTTTTGTTCGTTTCGTCCTGCTTCCITTTCTTGAGATAGTAAGTGCAATCT-3'	BioCorp DNA Inc., Alpha DNA
DTMRS1	5-ATCCAGACGTGACGCAGCATGCGGTTGGTTGCGGTTGGGCATGATGTATTTCTGTGTGGACACGGTGGCTTAGTA-3'	Alpha DNA
SA17	5-TCCCTACGGCGCTAACCCCCCAGTCCGTCCTCCAGCCTCACACCGCCACCGTGCTACAAC-3'	Alpha DNA
SA23	5-GCAATGGTACGGTACTTCCGGCTGGCCAGATCAGACCCCGGATGATCATCCTTGTGAGAACCACAAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	Alpha DNA
DTMRS1-FITC	5-FITC-ATCCAGACGTGACGCAGCATGCGGTTGGTTGCGGTTGGGCATGATGTATTTCTGTGTGGACACGGTGGCTTAGTA-3'	Alpha DNA
SA17-FAM	5-FAM-TCCCTACGGCGCTAACCCCCCAGTCCGTCCTCCAGCCTCACACCGCCACCGTGCTACAAC-3'	Alpha DNA
SA23-FITC	5-FITC-GCAATGGTACGGTACTTCCGGCTGGCCAGATCAGACCCCGGATGATCATCCTTGTGAGAACCACAAAAGTGACGCTACTTTGCTAA-3'	Alpha DNA
N°6-FITC	5-FITC-CGTACGGAATTCGCTAGCCATATCCGGTGCCTGCGCTCAGACCCACCACGCAACCGGATCCGAGCTCCACGTG-3'	Alpha DNA
N°19-FITC	5-FITC-CGTACGGAATTCGCTAGCGGACCGCAGGTGCACTGGGCGACGCTCTCTGGGTGTGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG-3'	Alpha DNA

*F23-FAM a été synthétisé par deux fournisseurs différents. Dans la partie des résultats, lorsque les expériences sont faites avec l'aptamère F23-FAM synthétisé par Alpha DNA ceci est spécifié.

2.4.2 Purification des aptamères

La purification des aptamères a été effectuée par électrophorèse en gel. Un gel polyacrylamide dénaturant a été polymérisé en préparant une solution de 6% d'acrylamide/bis-acrylamide (19:1) dans du TBE-urée (90mM tris, 90mM borate, 1mM EDTA, 8M urée, pH 8), à laquelle ont été ajoutés les catalyseurs de réticulation: le persulfate d'ammonium (APS) à 0,1% et le tétraméthyléthylènediamine (TEMED) à 0,04% (v/v). Les solutions d'oligonucléotides aptamériques ont été mélangées à un ratio de 1:1 (v/v) avec un tampon de charge (10 mM EDTA, 0,05% xylène cyanol, 0,05% bleu de bromophénol, 97% formamide) pour être déposées dans les puits du gel puis mises à migrer dans un tampon TBE pendant 1 heure à 500 volts. Pour les aptamères conjugués à des fluorochromes, les bandes de migration ont été visualisées sous source de lumière UV large spectre. Dans le cas des purifications effectuées suite aux marquages radioactifs des aptamères, la visualisation des bandes d'intérêt a été faite par révélation sur plaque d'imagerie au phosphore (Kodak Storage Phosphore Screen S0230) et lecture au Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare).

Les bandes d'intérêt excisées à partir du gel polyacrylamide ont ensuite été incubées dans 400 µL de tampon d'éluion (EDTA 0,1mM, 0,3 M NaCl, 0,005% SDS) durant la nuit à 4°C. L'éluat obtenu de 400 µL (contenant les aptamères) a été précipité par l'ajout de 140 µL d'acétate de sodium (3M, pH 5,2) et 860 µL d'éthanol 100%, laissé à -80°C pendant 2 heures suivies dans l'ordre d'une centrifugation à 14000 rpm à 4°C pendant 20 minutes, du lavage du précipité avec 100 µL d'éthanol 100%, d'une seconde centrifugation identique à la précédente et resuspension dans 20 µL d'eau Milli-Q.

2.4.3 Cultures bactériennes

Les cultures bactériennes avec lesquelles nous avons travaillé, leur provenance et les milieux utilisés sont listés dans le **tableau 3**. Des pré-cultures en milieux liquides ont étéensemencées à partir des stocks glycérol de la souche voulue dans le milieu adapté, mis en incubation durant la nuit à 37°C, sous agitation à 220 rpm, et ont ensuite servi à l'ensemencement de cultures fraîches (500 µL de pré-culture dans 5 mL de milieu) dans les mêmes conditions, jusqu'à l'obtention de la densité optique souhaitée (selon l'expérience) pour utilisation le jour même.

Tableau 3 : Liste des souches bactériennes utilisées.

Souche	Provenance	Milieux
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	ATCC	Luria Broth (LB, Alpha Biosciences)
<i>Escherichia coli</i> K12 GFP	Laboratoire C. Dozois	Luria Broth (LB, Alpha Biosciences)
<i>Escherichia coli</i> K12 cherry	Laboratoire C. Dozois	Luria Broth (LB, Alpha Biosciences)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	ATCC	Tryptic Soy Broth (TSB, Difco ^{1M})
<i>Staphylococcus aureus</i> HER1238	Université de Laval	Luria Broth (LB, Alpha Biosciences)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 23857	ATCC	Luria Broth (LB, Alpha Biosciences)

1.1.1 Tests d'affinité avec l'utilisation d'aptamères conjugués à un fluorophore

Les tests d'affinité ont été effectués en utilisant des cultures bactériennes fraîches. Les cultures en phase exponentielle de croissance ayant une DO_{600nm} comprise entre 0,6 et 0,8 ont été utilisées pour les tests. Pour les tests impliquant l'utilisation de *P. aeruginosa* possédant des particularités pathogéniques et dont la manipulation nécessite un niveau de confinement 2, des procédures de fixation au NaCl 0,9 % et formaldéhyde 6% pendant 1 h à 62,5°C et une exposition UV de 10 minutes ont été appliquées préalablement aux tests d'affinité, suivies de trois lavages avec 1 mL de NaCl 0,9 % et centrifugations à 6000 rpm 10 minutes à 4°C. Ces procédures sont conformes aux conditions énoncées dans la publication d'origine de l'aptamère à *P. aeruginosa* [45]. Des tests d'innocuité visant à vérifier l'efficacité des procédures d'inactivation de *P. aeruginosa* ont été effectués en mettant en culture les bactéries ainsi traitées (résultats non montrés). Lors des tests d'affinité impliquant *P. aeruginosa*, les bactéries non-pathogènes utilisées pour les tests témoins ont été également soumises à ces mêmes procédures d'inactivation.

Les aptamères analysés mis en solution au double de la concentration finale souhaitée dans 100 µL du tampon d'incubation approprié (**Tableau 4**), préalablement aux tests d'affinité, ont été soumis à une procédure de dénaturation/renaturation. Cette procédure consistant à placer les aptamères pendant 5 minutes à 95°C puis dans de la glace pour une durée de 10 minutes permet de s'assurer de la prise de la conformation qui leur attribue leur particularité aptamérique. Lors de la synthèse des oligonucléotides, qui est un processus séquentiel, il est possible que des conformations alternatives soient adoptées selon les nucléotides disponibles à un instant précis et que ces conformations persistent à la fin de la synthèse. Le processus de dénaturation/renaturation défait ce type de conformations alternatives et permet l'adoption par

l'aptamère de la conformation la plus stable qui lui a valu sa sélection lors du processus de SELEX (où cette procédure de dénaturation/renaturation a également été appliquée).

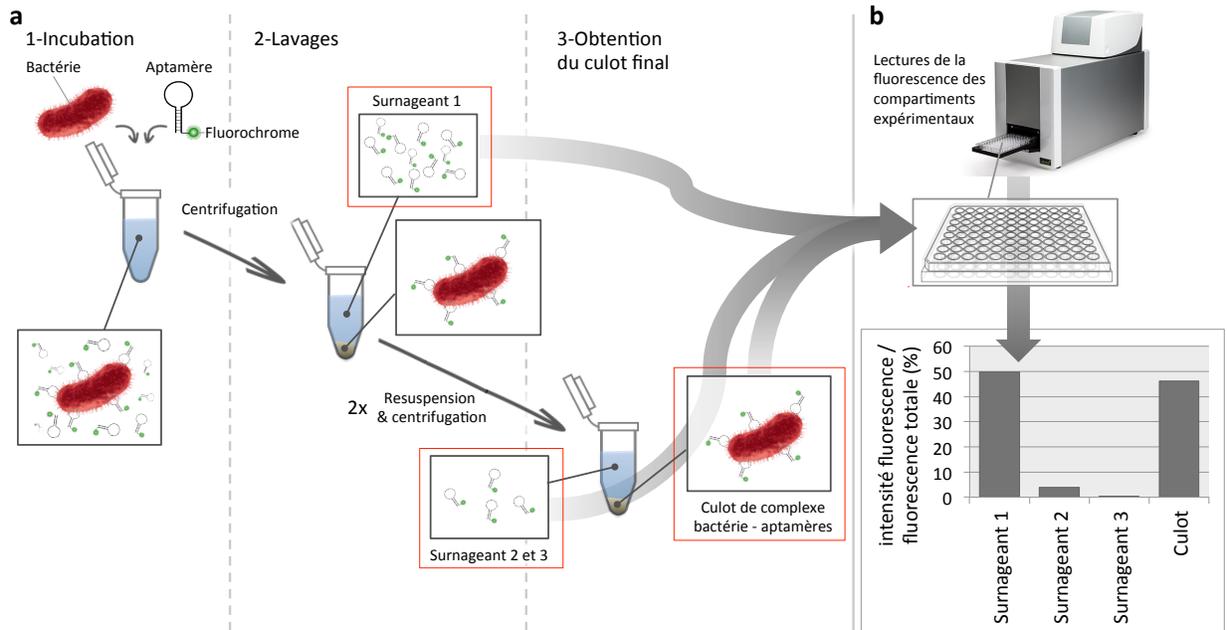
Les aptamères ainsi préparés ont ensuite été mis en incubation avec 100 µL de suspension bactérienne dans les tampons appropriés, aux concentrations et conditions listées dans le **tableau 4**, afin de permettre leur attachement s'il y a affinité. Comme représenté en **figure 5**, les incubations ont ensuite été centrifugées à 8000 rpm durant 15 minutes pour séparer les aptamères non-attachés/libres (surnageant 1) des aptamères attachés aux bactéries (en culot). En utilisant 200 µL du tampon d'incubation et en centrifugeant dans les mêmes conditions que précédemment, deux lavages successifs ont ensuite été effectués. Finalement, le culot final resuspendu dans 200µl de tampon d'incubation, les surnageant 2 et 3 issus des deux lavages et le surnageant 1 (**Fig. 5**) ont tous été prélevés et disposés sur plaque 96 puits (BD Falcon, cat. no. 353912). La fluorescence de chacun des échantillons à une longueur d'onde d'excitation de 495 nm et d'émission de 521 nm ainsi que les DO_{600nm} a été lue en utilisant les instruments Tecan Infinite® M1000 Pro ou BioTek Cytation 3 (la provenance des données est spécifiée dans la partie des résultats).

Tableau 4 : Liste des conditions d'incubation pour les tests d'affinité

Aptamères	Concentration aptamères* / concentration pour aptamères radiomarqués	Quantité bactéries (dans les 200ul de milieux d'incubation)	Durée et température d'incubation	Tampon d'incubation
F23-FAM [45]	200nM	Entre 10^7 et 10^8 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (spécifié dans les résultats)	1 h à 37°C	50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM KCl; 100 mM NaCl; 1 mM MgCl ₂ ; 0,01 % SDS
E1-FAM et E2-FAM [39]	1µM/3nM	10^7 <i>E. coli</i> ATCC 8739	1 h à température ambiante	0,1 µg/µL d'ADN de sperme de saumon ; 1% BSA ; 0,05% (v/v) Tween-20 ; PBS pH 7,4
DTMRSA1-FITC [40]	200nM / 0,5 nM	10^7 <i>S. aureus</i> HER1238	45 min à 4°C	25 mM glucose ; 2 mM MgCl ₂ ; 0,1 % BSA ; PBS pH 7,4
SA17-FAM [41]	200nM/ 0,5 nM	10^7 <i>S. aureus</i> HER1238	45 min à 37°C	40 mM HEPES pH 8 ; 5 mM KCl ; 1 mM CaCl ₂ ; 2 mM MgCl ₂ ; 150 mM NaCl
SA23-FITC [42]	200nM/ 0,5 nM	10^7 <i>S. aureus</i> HER1238	45 min à 4°C	0,1 µg/µL d'ADN de sperme de saumon ; 1% BSA ; 0,05% (v/v) Tween-20 ; PBS pH 7,4
N°6-FAM et N°19-FAM [44]	400nM	10^7 <i>E. coli</i> ATCC 8739 et <i>B. subtilis</i> ATCC 23857	1 h à température ambiante	0,1 mg/mL d'ADN de sperme de saumon ; 1 % BSA ; 0,05 % tween-20 ; PBS

*(dans les 200 µl de milieux d'incubation)

Figure 5 : Schéma du processus expérimental du test d'affinité avec l'utilisation d'aptamères conjugués à un fluorochrome



a) 1: mise en contact de l'aptamère conjugué à un fluorophore avec sa cible bactérienne dans un tampon d'incubation adapté (en accord avec les conditions publiées). L'encadré gris représente la situation hypothétique obtenue à l'issue de cette étape d'incubation avec une certaine proportion des aptamères fixés à la cible bactérienne et une autre portion libre en solution selon la K_d de l'aptamère. 2: étape des lavages. Suite à une centrifugation, un culot contenant les bactéries et les aptamères qui y sont attachés est séparé du surnageant contenant les aptamères libres non fixés à la cible bactérienne. Le surnageant de l'incubation est conservé (surnageant 1) dont le taux de fluorescence, indicateur de la teneur en aptamère, sera lu par la suite (avec les autres compartiments expérimentaux encadrés en rouge). Lors de l'étape des lavages, après le prélèvement du surnageant, du tampon d'incubation est ajouté au culot et une centrifugation est faite. Ce lavage est répété à deux reprises (surnageants 2 et 3). Le culot final ainsi obtenu contient hypothétiquement exclusivement les aptamères attachés aux bactéries. Resuspendu dans du tampon d'incubation, ce culot final est également prélevé pour les lectures de fluorescence. b) Représentation hypothétique des proportions des taux de fluorescence qui pourraient être obtenus si il y a affinité entre l'aptamère et la cible bactérienne. Les proportions représentées dans l'histogramme correspondent aux rapports en pourcentage des taux de fluorescence lus dans la fraction d'intérêt sur la somme de la fluorescence de toutes les fractions correspondantes. Même en cas d'affinité entre l'aptamère et la bactérie, on s'attendrait à avoir un certain taux de fluorescence au niveau du premier surnageant, puisque même avec une K_d très faible, une certaine portion d'aptamères libres résidera dans l'équilibre d'interaction, qui donnera à ce compartiment expérimental un taux de fluorescence non négligeable. La quantité d'aptamères fluorescents sera probablement réduite graduellement dans les surnageant 2 et 3 issus successivement des étapes de lavages, effectués dans le but de 'nettoyer' les aptamères libres restant dans le milieu. En cas d'affinité, on s'attend à retrouver une fluorescence dans la resuspension du culot final contenant les bactéries et donc les aptamères fluorescents qui y sont liés.

1.1.2 Tests d'affinité avec l'utilisation d'aptamère marqué radioactivement

Pour le marquage radioactif 40 pmoles de l'aptamère d'intérêt ont été incubés pendant 1 heure à 37°C dans 24 µL d'eau Milli-Q (Millipore), 3 µL de tampon 10 X de réaction de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4 PNK ; New England Biolabs), 1,5 µL de l'enzyme T4 PNK et 0,5 µL d'adénosine 5'-triphosphate [γ -³²P] (ATP-³²P) (Easy Tides®). Les réactions de marquage ont été stoppées par l'ajout de 30 µL de tampon de dénaturation 2X (10 mM EDTA, 0,05% xylène cyanol, 0,05% bleu de bromophénol, 97% formamide). Les préparations ont ensuite été purifiées sur un gel dénaturant en suivant la procédure expliquée dans la partie 'purification des aptamères'.

La procédure du test d'affinité avec l'utilisation d'aptamères marqués radioactivement est la même que celle employée pour les aptamères conjugués à un fluorophore, à l'exception des concentrations d'aptamères mis en incubation (**Tableaux 4**) et de la méthode de lecture des taux de radioactivité contenu dans les compartiments expérimentaux.

Pour les tests effectués avec E1 et E2 marqués radioactivement, 2 µL du produit de marquage purifié ont été mis en incubation avec des quantités de bactéries identiques à celles utilisées lors des tests avec les aptamères fluorescents. En considérant que la réaction de marquage a été efficace à 100%, on estime que les 2 µL mis en incubation contiennent 0,625 pmoles d'aptamères marqués radioactivement, ce qui correspond à une concentration finale dans le milieu d'incubation de 3nM. Pour DTMRSA1, SA17 et SA23 les dilutions ont été effectuées de façon à avoir des concentrations finale dans le milieu d'incubation en aptamères marqués radioactivement de 3 nM.

Pour la quantification des taux de radioactivité contenus dans les expériences issues du test d'affinité, des aliquotes de 20µL de chaque compartiments ont été imbibés sur papier Whatman 3MM, lequel a servi à exposer des plaques d'imagerie au phosphore (Kodak Storage Phosphor Screen S0230) lues ensuite au Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare). Les intensités de marquages détectés ont été quantifiées en utilisant le logiciel ImageJ.

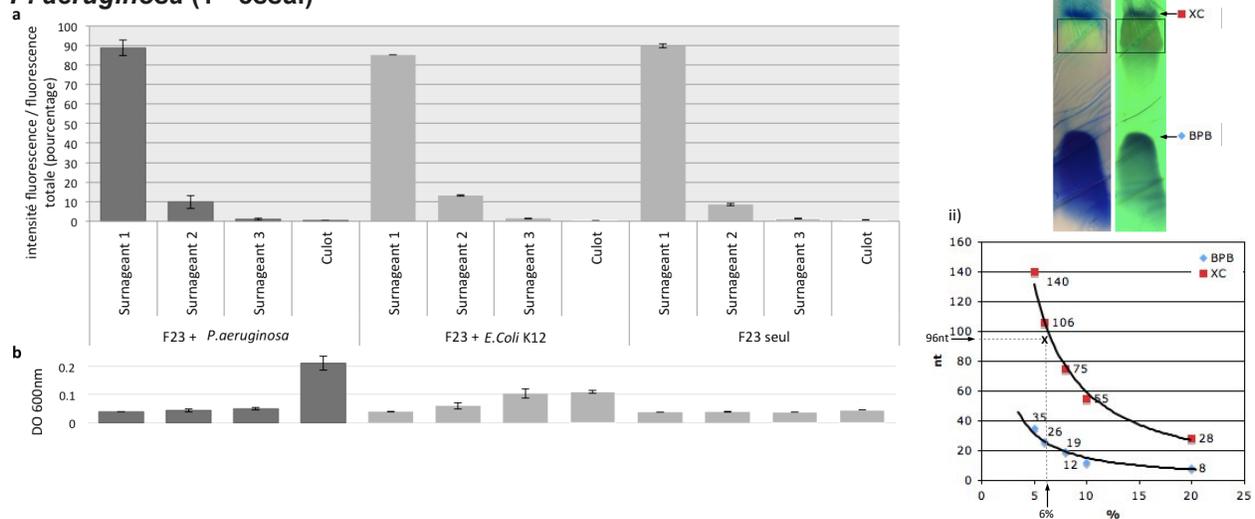
2 RÉSULTATS

2.1. TESTS D’AFFINITÉ AVEC L’UTILISATION D’APTAMÈRES CONJUGUÉS À UN FLUOROPHORE

2.1.1 Affinité de l’aptamère F23-FAM avec *P. aeruginosa* ATCC 27853

Les premiers tests d’affinité ont été effectués selon les conditions énoncées dans la partie ‘matériels et méthodes’ et avec des aptamères purifiés par migration sur gel acrylamide (**Fig. 6-c**). Les résultats obtenus n’ont pas permis de mettre en évidence une affinité de l’aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa*, puisqu’aucune fluorescence significative n’a pu être observée dans la resuspension du culot (voir l’explication du principe du test d’affinité, **Fig. 5**). Identiquement aux contrôles, où l’aptamère F23-FAM a été incubé avec *E. coli* (bactérie pour laquelle il n’a pas d’affinité connue) ou tout seul, sans bactérie, la majorité de la fluorescence a été observée au niveau du premier surnageant (<85%), tandis que la resuspension du culot final n’a pas donné de taux de fluorescence supérieur à 0,5% (en proportionnalité sur la somme de la fluorescence observée dans les différents compartiments expérimentaux : fluorescence culot / somme de fluorescence en S1, S2, S3 et dans le culot).

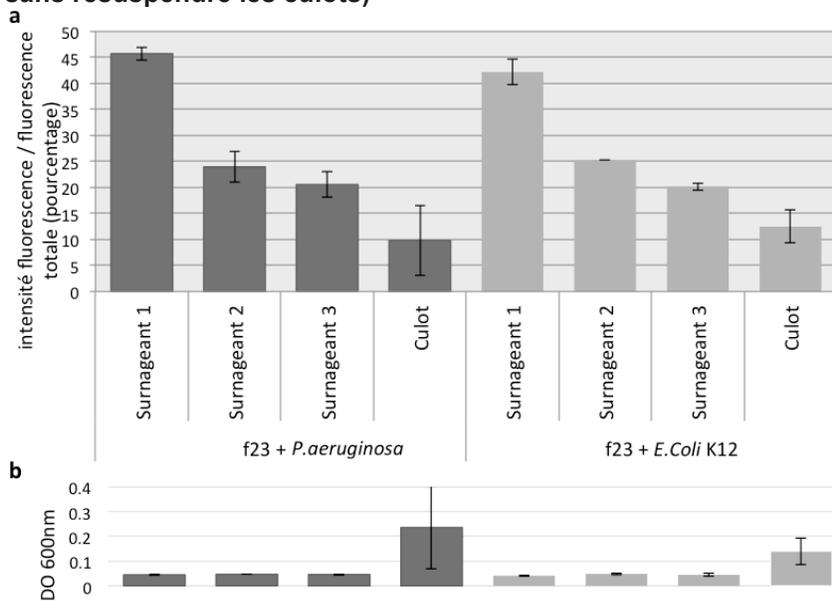
Figure 6 : Tests d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa* (1^{er} essai)



Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. a) Proportion (en pourcentage) de la fluorescence observée sur la somme des fluorescences des différents compartiments ajoutées les unes aux autres, à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Cytation3. Les tests ont été effectués avec l'aptamère purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation. La quantité de bactéries (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles) mise en incubation a été de 10^7 . b) Densité optique (DO) à 600nm, révélatrice de la quantité de bactéries présente dans chaque compartiment expérimentaux, nous permettant de vérifier si nos culots contiennent effectivement les bactéries ou si celles-ci se sont retrouvées être partiellement resuspendues et réparties dans les autres compartiments expérimentaux. On remarque que les culots (sauf celui de l'expérience où F23-FAM est incubé tout seul) contiennent bien effectivement les bactéries. La DO observée pour les autres compartiments correspond au bruit de fond c) Isolation et purification de l'aptamère F23-FAM. En i) se trouve l'image du gel acrylamide 6% dans lequel l'aptamère F23-FAM a été fait migré, avec à gauche la révélation de la bande de migration de l'aptamère par fluorescence et à droite par la méthode de UV shadowing. La section du gel prélevée pour extraction est encadrée. Les positions des fronts de migration du xylène de cyanol (XC) et du bleu de bromophénol (BPB) sont également représentées. En ii), se trouve au point de croisement des lignes en pointillées la position hypothétique d'un fragment d'oligonucléotides simple brin de 96 nt de long (taille de F23) dans un gel de 6%, relativement aux positions du XC et BPB. Cette position correspond à ce qui est observé en i).

Afin d'obtenir des résultats plus concluants, nous avons ensuite reproduit la même procédure, sans toutefois resuspendre le culot bactérien à chaque étape de lavage pour prévenir la dissociation des aptamères déjà liés aux bactéries. Nous avons pensé que resuspendre le culot signifie 'remettre' successivement l'aptamère dans de nouvelles conditions d'équilibre où sa concentration est à chaque fois amoindrie (puisque une partie des aptamères se retrouve inévitablement non lié à sa cible à l'issue de l'incubation et donc au niveau du surnageant, même avec un aptamère ayant une K_d très faible, selon sa vitesse de dissociation [k_{off}]). Les résultats obtenus n'ont encore une fois pas permis de mettre en évidence une affinité entre l'aptamère F23-FAM et *P. aeruginosa* (Fig. 7).

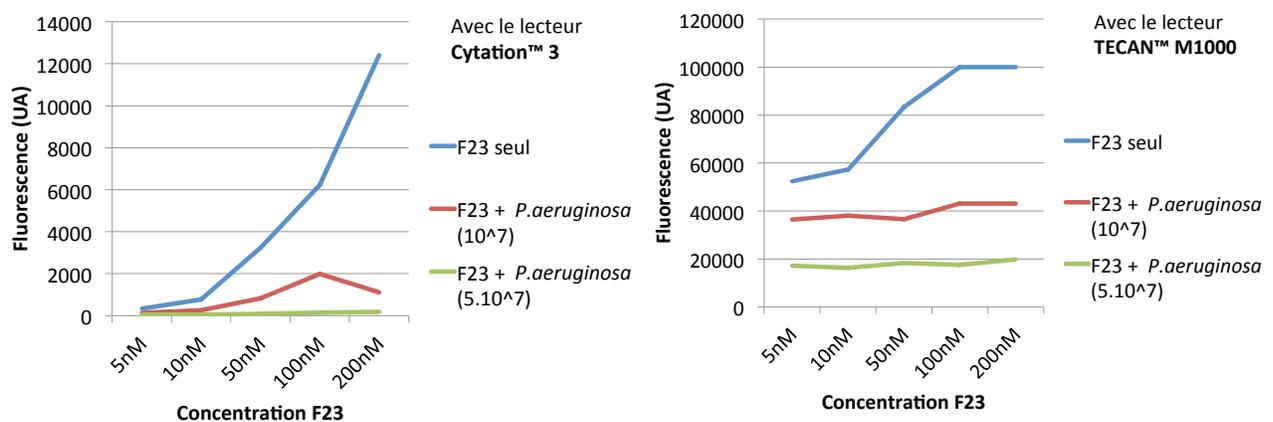
Figure 7 : Tests d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa* (2^{ème} essai : sans resuspendre les culots)



Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair a) Proportion de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Cytation3. Les tests ont été effectués avec l'aptamère purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation. et 10^8 bactéries (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles). b) DO_{600nm} révélatrice de la quantité de bactéries présente.

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'entreprendre des tests pour vérifier si un évènement d'extinction ('*quenching*') de la fluorescence du fluorochrome (FAM) par les bactéries survenait. Pour cela, nous avons lu les fluorescences de différentes concentrations d'aptamères F23-FAM seuls ou en mélange avec deux différentes concentrations de bactéries (*P. aeruginosa*). Ceci a été fait en utilisant deux appareils de lecture, le Tecan et le Cytation3 de Biotek, dans le but de tester et comparer par cette occasion les deux moyens de lecture de fluorescence (capable de lire des plaques 96 puits) dont nous disposons. Les résultats (**Fig. 8**) ont en effet mis en évidence une diminution de la fluorescence lue pour les essais où la même concentration d'aptamère est en présence de bactéries. Cette diminution est constatée avec les deux spectrophotomètres et est d'autant plus accentuée lorsque la concentration de bactéries avec laquelle l'aptamère est mélangé augmente.

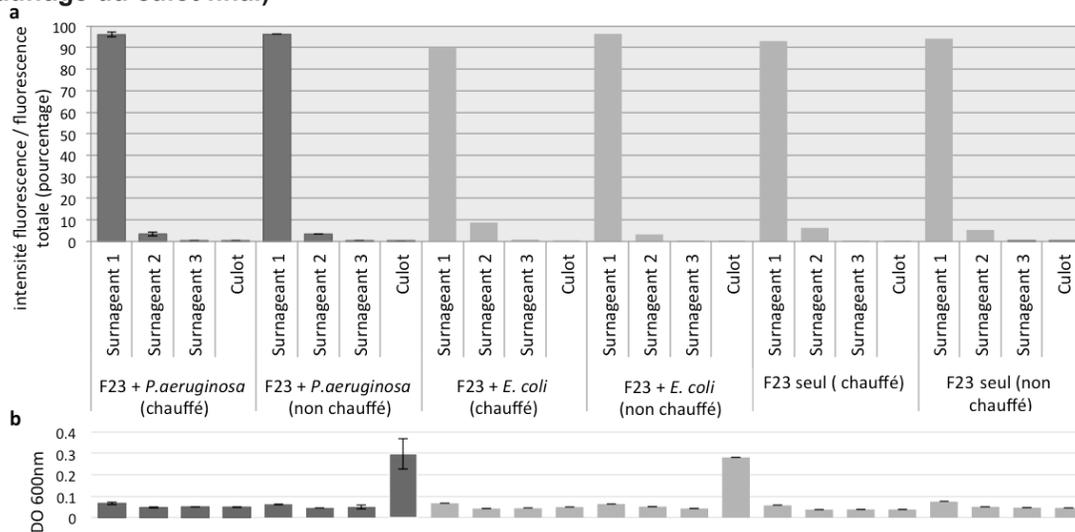
Figure 8 : Tests d'extinction de la fluorescence du groupement fluorochrome des aptamère par la présence de bactéries



Comparaison des fluorescences lues (à droite : avec le lecteur Cytation3, à gauche: avec le lecteur Tecan) à différentes concentrations de l'aptamère F23-FAM, seul et en présence de *P. aeruginosa* (10⁷cfu/ml et 5.10⁷cfu/m).

Avec l'hypothèse d'une extinction de la fluorescence par les bactéries, renforcée par les résultats précédemment cités, nous avons décidé de chauffer à 95°C, pendant 5 minutes, les culots bactériens de la dernière étape de notre processus expérimental pour ensuite les centrifuger (5 minutes à 5000g) et analyser le surnageant. Ainsi, nous envisageons de libérer (en les dénaturants) les aptamères qui sont hypothétiquement liés aux bactéries et de contourner l'éventuel problème d'extinction en isolant ainsi les aptamères (dans le surnageant) des bactéries et débris bactériens (culot) responsables éventuellement de l'extinction de la fluorescence des aptamères. Dans cette perspective, nous avons donc effectué des tests d'affinité en appliquant cette méthode de chauffage du culot final et avons comparé les résultats avec des essais où ceci n'a pas été effectué (**Fig. 9**). Aucune différence significative n'a été constatée entre les essais où le culot final a été chauffé et ceux où il ne l'a pas été.

Figure 9 : Tests d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa* (3^{ème} essai: effet du chauffage du culot final)

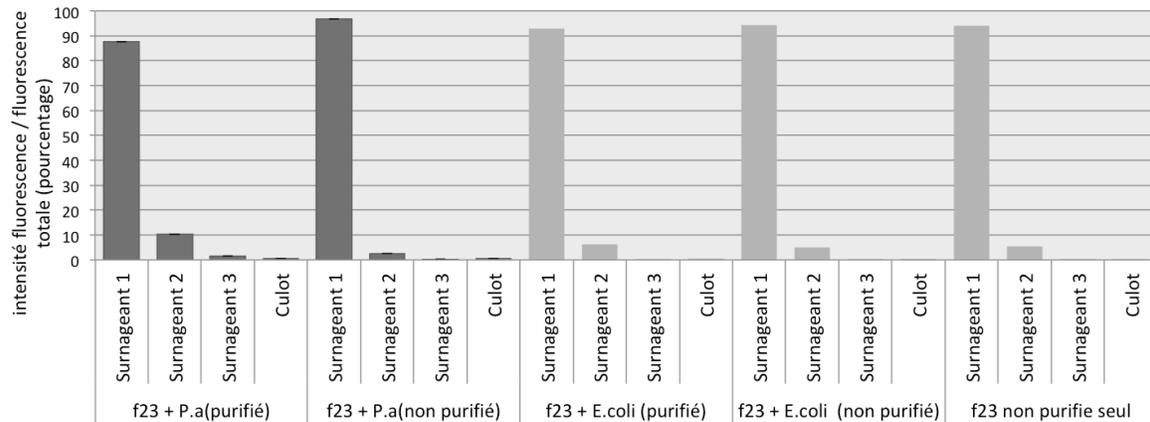


Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair
a) Proportion de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec l'aptamère purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation avec 10^8 bactéries (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles). b) DO_{600nm} révélatrice de la quantité de bactérie présente.

Nous avons ensuite commandé de nouveaux aptamères, de l'entreprise Alpha DNA (les précédents aptamères provenant de l'entreprise Biocorp), et effectué des tests avec ces derniers pour vérifier si les résultats jusqu'alors obtenus étaient dus à une synthèse d'oligonucléotides erronée (sachant qu'une différence d'une base à un emplacement critique peut affecter le fonctionnement d'un aptamère). Lors des tests faits avec les nouveaux aptamères, nous avons vérifié si la purification des aptamères influence les résultats. La raison pour laquelle nous avons initialement décidé de procéder avec des aptamères purifiés était due

au fait que la suspension d'aptamères contient éventuellement des groupements fluorochromes libres, issus de la production ou d'éventuelle dégradation subséquente des aptamères. Nous redoutons que ces fluorochromes libres puissent interférer avec nos résultats. Les lectures du culot final ont été effectuées deux fois, une première avant l'étape de chauffage (comme décrit précédemment) et une deuxième lecture après avoir chauffé et centrifugé la resuspension du culot final (les résultats montrés sont ceux de la première lecture, ceux de la deuxième ne montrant aucune différences significatives). Les résultats obtenus (**Fig. 10**) ont permis de voir premièrement que le nouvel aptamère n'améliorait pas les résultats, avec toujours une fluorescence non significative au niveau du culot final (chauffé ou pas), et deuxièmement que l'omission de la purification des aptamères ne semble pas affecter les résultats (du moins ne semble pas générer de signaux faux positif).

Figure 10 : Tests d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa* (4^{ème} essai : nouveaux aptamères et comparaison aptamères purifiés/non-purifiés)

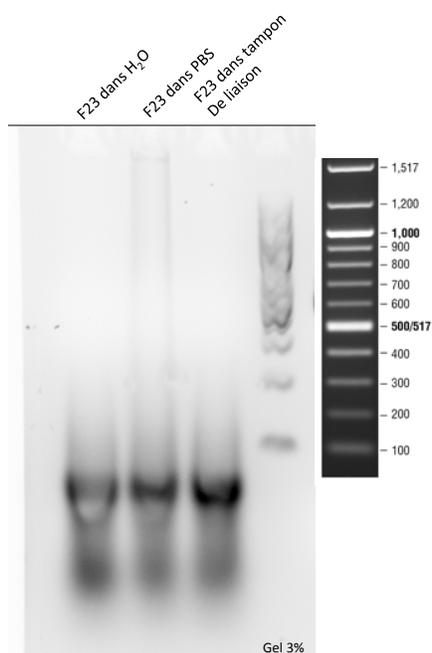


Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. Les histogrammes indiquent les proportions de fluorescence observée à $\lambda_{\text{excitation}}=495\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}}=521\text{nm}$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec le nouvel aptamère (Alpha DNA) non-purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation avec 10^8 bactéries (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles).

Nous avons ensuite souhaité vérifier si l'intégrité de l'aptamère est préservée dans les conditions d'incubation, auxquelles l'aptamère est soumis lors des tests d'affinité. L'intégrité de l'aptamère est en effet un paramètre essentiel dont l'altération nuirait très certainement au bon fonctionnement des tests d'affinité effectués. En **figure 11** se trouve l'image d'un gel agarose où l'aptamère F23 a été fait migrer après avoir été incubé durant une heure dans de l'eau distillée (Milli-Q), du PBS, et le tampon de liaison utilisé lors des tests d'affinité. En se basant sur la similarité des bandes (fronts de migration identiques) issus de la migration de l'incubation dans l'eau distillé, où l'aptamère est supposé être intact (contrôle positif) et celles issus de la migration des incubations dans le PBS et le tampon de liaison, on peut conclure que l'aptamère ne semble pas dégradé par les conditions d'incubation appliqué lors des tests d'affinité.

Figure 11 : Test d'intégrité de l'aptamère en condition d'incubation.

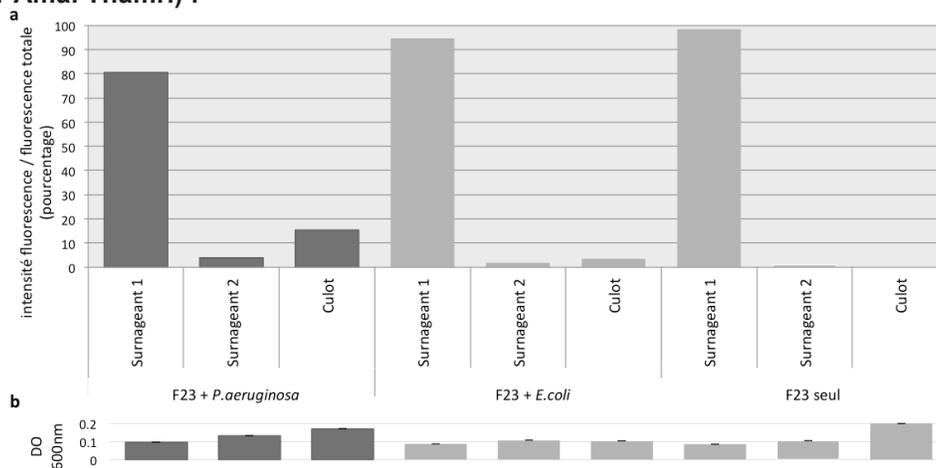
Des préparations de 2 μL de la solution stock (100 μM) de l'aptamère F23-FAM dans 20 μL d'eau distillé, de PBS et de tampon de liaison ont été incubées durant une heure à 37°C puis mises à migrer dans un gel d'agarose 3%. L'indicateur de taille étant adapté à l'ADN double brin ne donne qu'une indication très approximative sur le positionnement des bandes obtenues. On observe dans les trois conditions une bande supérieure correspondant au F23 - FAM probablement intact puisque la même bande est présente dans la migration de l'incubation avec l'eau distillée. Le *smear* se trouvant en dessous de cette bande correspond probablement aux oligonucléotides plus courts produits lors de la synthèse de l'aptamère (la proportion de produits courts lors d'une synthèse d'oligonucléotides est augmentée lorsqu'il s'agit d'une synthèse d'un oligonucléotides long, comme c'est le cas pour F23).



N'ayant pas pu obtenir de résultat positif à ce test d'affinité qui a pourtant été exécuté auparavant avec succès par une ancienne étudiante du laboratoire, nous avons invité cette étudiante à reproduire ses résultats. Le projet a été à cette même étape confié à un stagiaire de maîtrise (Renaud Pavic), qui est l'auteur des résultats qui suivront concernant les tests de F23.

Avec comme seule différence apparente l'utilisation de SDS à 0,01% dans le tampon de liaison (détail non mentionné dans son mémoire) l'ancienne étudiante, Amal Thamri a effectué les tests d'affinité de F23 pour *P. aeruginosa* avec l'assistance de Renaud Pavic. Les résultats obtenus (**Fig. 12**) semblent positifs puisqu'une fluorescence supérieure à celles observées pour les contrôles a été obtenue pour la resuspension du culot de l'essai F23-FAM incubé avec *P. aeruginosa*. Ce test effectué dans une perspective de vérification du fonctionnement de l'aptamère n'a pas été répété. Il ne nous est donc pas possible d'évaluer statistiquement la signification de la différence de fluorescence observée au niveau du culot F23-FAM+*P.aeruginosa* vis-à-vis des contrôles correspondants.

Figure 12 : Test d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers la bactérie *P. aeruginosa* (5^{ème} essai : effectué par Amal Thamri) :

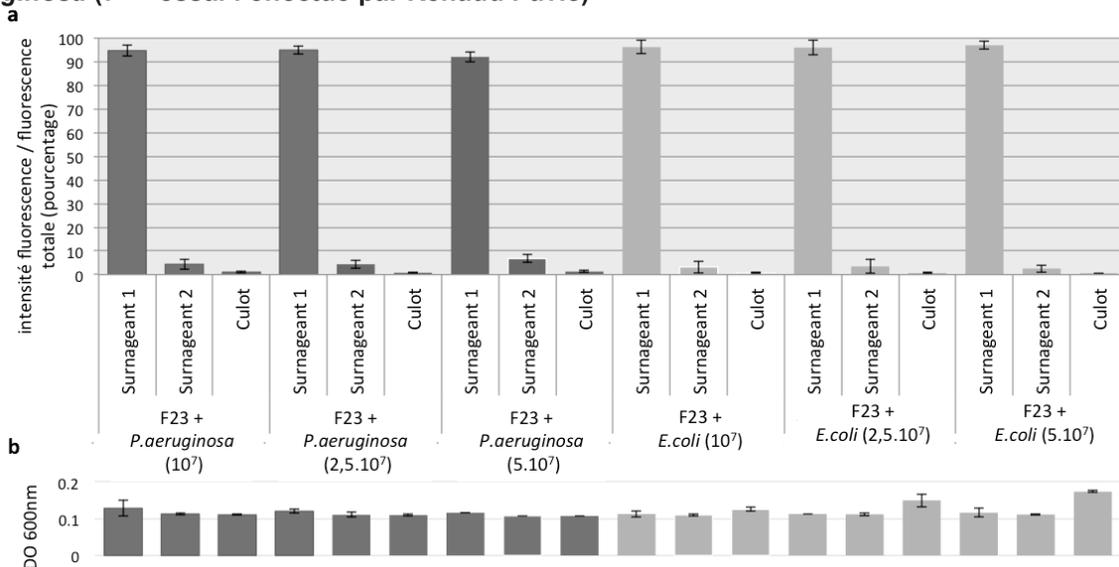


Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. Les histogrammes indiquent les proportions de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec le nouvel aptamère (Alpha DNA) non-purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation avec 10^7 bactéries (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles). b) DO_{600nm} révélatrice de la quantité de bactérie présente.

Renaud Pavic a fait des tests d'affinité pour reproduire les résultats obtenus par Amal Thamri. Il a répété à trois reprises ces tests. Le premier d'entre eux a été effectué en utilisant directement des cultures bactériennes ayant attendu à 4°C durant une nuit, ce qui a pu être la cause d'un changement du phénotype bactérien (la non expression de la molécule cible par la bactérie) affectant l'affinité de l'aptamère F23, expliquant la différence des résultats obtenus lors de ce

test avec ceux d'Amal (résultats non montrés). Deux autres tentatives de reproduction des résultats d'Amal ont été entreprises par Renaud, en se calquant au mieux sur la façon de procéder d'Amal. La **figure 13** résume les résultats obtenus lors du dernier test effectué par Renaud, où trois différentes concentrations de *P. aeruginosa* ont été utilisées, sans toutefois pouvoir reproduire les résultats de Amal. Renaud avait choisi de travailler avec des concentrations de bactéries identiques ou proches à celle utilisée par Amal, dans un souci de se calquer sur tous les points possibles aux conditions semblant fournir des résultats positifs. Cependant, on avait pu remarquer auparavant que de telles concentrations engendraient l'obtention de culots bactériens fragiles avec *P. aeruginosa* et se désintégrant facilement lors des récupérations des surnageants aux étapes de lavage. Ceci provoquant un risque de ne plus être capable d'obtenir un culot final contenant les bactéries (et éventuellement les aptamères s'il y a liaison), essentiel au principe du test appliqué. Les valeurs de DO₆₀₀ obtenues lors de ce dernier test ne permettent pas de mettre en évidence la présence de bactéries (notamment dans le cas des essais d'intérêt avec *P. aeruginosa*, en contraste avec les essais contrôles où la présence de *E. coli* dans les culots semble avoir provoqué une légère augmentation de la DO₆₀₀). L'absence de bactéries dans le culot, due à leur resuspension lors des étapes de lavage, ou une quantité en dessous du seuil de détection du spectrophotomètre utilisé peuvent être deux explications aux résultats de DO₆₀₀ observés.

Figure 13 : Test d'affinité de l'aptamère F23-FAM envers différentes concentrations de *P. aeruginosa* (7^{ème} essai : effectué par Renaud Pavic)



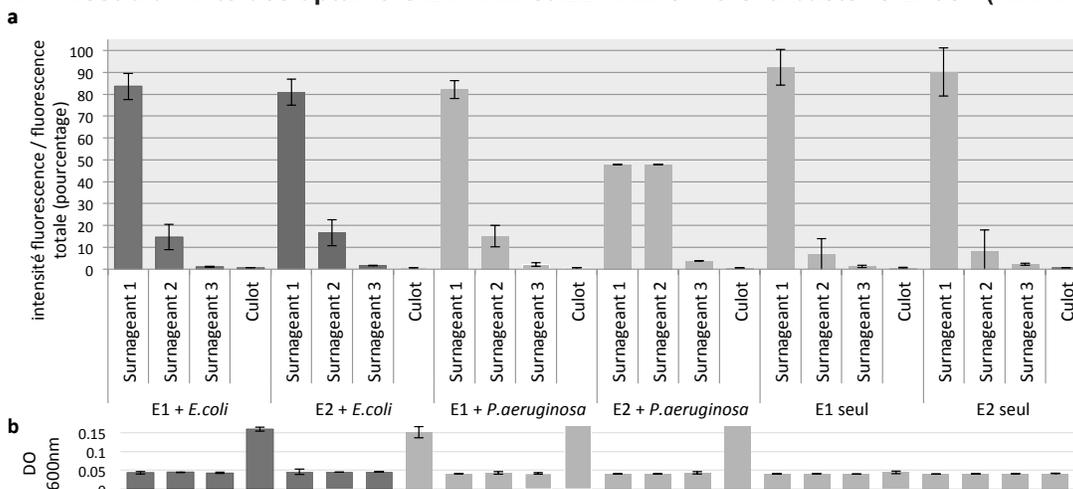
Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. Les histogrammes indiquent les proportions de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec le nouvel aptamère (Alpha DNA) non-purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation avec le nombre de bactéries indiqué (*P. aeruginosa* et *E. coli* pour les contrôles). b) DO_{600nm} révélatrice de la quantité de bactéries présente.

Au total, six différents test pour mettre en évidence l'affinité de l'aptamère F23-FAM envers *P. aeruginosa* ont été effectués. A chaque répétitions de ces tests différents paramètres (methode de lavage, *quenching*, concentration de la cible, etc.) suspectés d'être à l'origine des résultats négatifs obtenues lors des précédents essais ont été rectifiés ou contrôlés avec des expérience supplémentaire (par ex : test d'intégrité des aptamères en condition d'incubation). Cependant aucun des tests n'a permis au final de mettre en évidence l'affinité de F23-FAM envers sa cible publiée, *P. aeruginosa*.

2.1.2 Affinité des aptamère E1-FAM et E2-FAM avec *E. coli* ATCC 8739

Les tests d'affinité des aptamères E1-FAM et E2-FAM ont été effectués selon les conditions énoncées dans la partie 'matériels et méthodes' et avec des aptamères purifiés par migration sur gel acrylamide, comme fait pour l'aptamère F23-FAM (**Fig. 6-c**). Les premier résultats obtenus (**Fig. 14**) n'ont pas permis de mettre en évidence une affinité ni de l'aptamère E1-FAM, ni de E2-FAM envers la bactérie *E. coli* (ATCC 8739), puisqu'aucune fluorescence significative n'a pu être observée dans la resuspension des culots issus des incubations de ces deux aptamères avec la bactérie *E. coli* (explication du principe du test d'affinité, **Fig. 5**).

Figure 14 : Test d'affinité des aptamère E1-FAM et E2-FAM envers la bactérie *E. coli* (ATCC 8739)



Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris claire. a) Proportion de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec l'aptamère non-purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation et 10^7 bactéries (*E. coli* et *P. aeruginosa* pour les contrôles). Les fluorescences lues pour les surnageants 1 et 2 de l'essai E2+*P. aeruginosa*, étant en saturation, elles ont été toutes deux considérées égales à 100000 (UA). C'est la raison pour laquelle ces deux compartiments affichent une proportion de fluorescence égale l'une à l'autre, qui n'est certainement pas le cas en réalité avec une fluorescence dans le premier compartiment supérieur

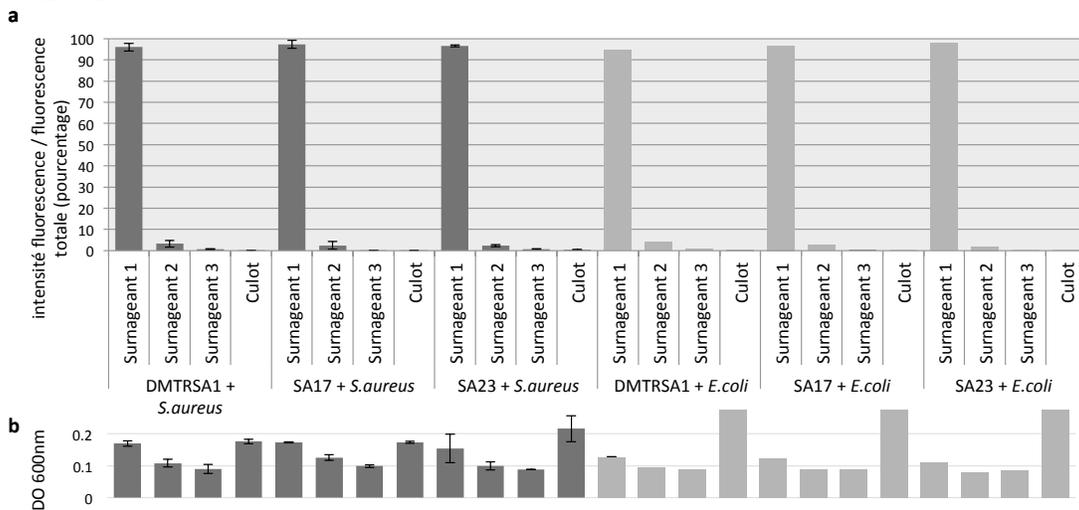
au second comme pour le restant des essais. b) DO_{600nm} , révélatrice de la quantité de bactéries présentes dans chaque compartiment expérimentaux.

Renaud Pavic a répété ce test d'affinité obtenant des résultats ne permettant pas non plus de mettre en évidence l'affinité de E1-FAM ou E2-FAM envers la bactérie *E. coli* (ces données ne sont pas illustrées).

2.1.3 Affinité des aptamères DTMRSA1-FITC, SA17-FAM et SA23-FITC avec *S. aureus* HER1238

Les aptamères DTMRSA1-FITC, SA17-FAM et SA23-FITC ont été testés pour leur affinité envers la souche HER1238 de *S. aureus*. Ces aptamères ont également été purifiés (comme précédemment pour les aptamères E1-FAM, E2-FAM et les premiers tests effectués pour l'aptamère F23-FAM) préalablement à leur utilisation. Les résultats obtenus lors du premier test d'affinité n'ont pas permis de mettre en évidence une affinité de ces aptamères envers la souche HER1238 de *S. aureus* (Fig. 15).

Figure 15 : Test d'affinité des aptamères DTMRSA1-FITC, SA17-FAM et SA23-FITC envers la souche HER1238 de *S. aureus*



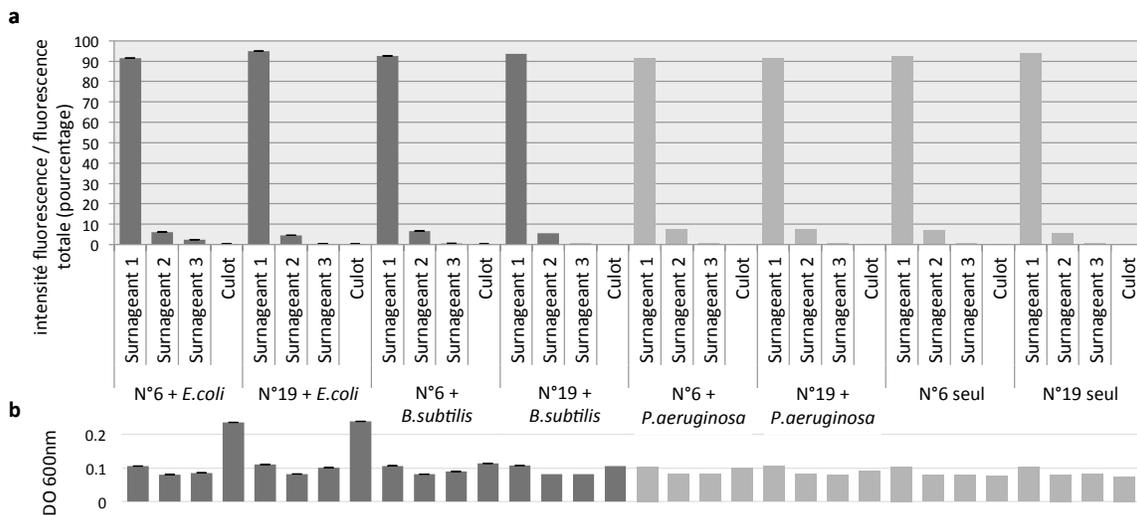
Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. a) Proportion de fluorescence observée à $\lambda_{excitation}=495nm$ et $\lambda_{émission}=521nm$, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec l'aptamère non-purifié à une concentration finale de 200 nM dans le milieu d'incubation et 10^7 bactéries (*S. aureus* et *E. coli* pour les contrôles). b) DO_{600nm} , révélatrice de la quantité de bactéries présentes dans chaque compartiment expérimentaux.

Renaud Pavic a répété ce test d'affinité obtenant des résultats ne permettant pas non plus de mettre en évidence l'affinité de DTMRSA1-FITC, SA17-FAM et SA23-FITC envers la souche HER1238 de *S. aureus* (ces données ne sont pas illustrées).

2.1.4 Affinité des aptamère N°6-FAM et N°19-FAM avec *E. coli* K12 et *B. subtilis*

Les aptamères N°6-FAM et N°19-FAM sont des aptamères brevetés (US 20150260717 A1) pour leur affinité envers une large gamme de bactéries dont *E. coli* et *B. subtilis*, avec lesquelles nous avons effectué des tests d'affinité. *P. aeruginosa*, ne figurant pas parmi les espèces bactériennes listées pour lesquelles ces aptamères ont une affinité, a été utilisé en tant que contrôle. Cependant il est important de noter qu'il n'y a pas de données indiquant que les aptamères N°6 et N°19 n'ont pas d'affinité pour *P. aeruginosa*, choisie en tant que souche de contrôle négatif. D'ailleurs, n'existant aucune information concernant l'absence d'affinité des aptamères N°6 et N°19 envers une quelconque souche, le choix de contrôle négatif a dû être par la force des choses hasardeux, surtout en considérant le fait que les aptamères en question visent un très large spectre de bactérie. Les tests ont été effectués par Renaud Pavic, toujours en concordance avec les conditions citées précédemment. Les aptamères non-purifiés ont été utilisés lors de ces tests. Les résultats obtenus, comme pour les tests précédents, n'ont pas permis de mettre en évidence l'affinité des aptamères N°6-FAM et N°19-FAM envers *E. coli* K12 et *B. subtilis* (Fig. 16).

Figure 16 : Test d'affinité des aptamères N°6-FAM et N°19-FAM envers *E. coli* K12 et *B. subtilis*



Les résultats des échantillons d'intérêt sont représentés en gris foncé et les contrôles en gris clair. a) Proportion de fluorescence observée à λ excitation=495nm et λ émission=521nm, lus au lecteur Tecan. Les tests ont été effectués avec l'aptamère non-purifié à une concentration finale de 400 nM dans le milieu d'incubation et 10^7 bactéries (*B. subtilis*, *E. coli* et *P. aeruginosa* pour les contrôles). b) DO_{600nm}, révélatrice de la quantité de bactéries présentes dans chaque compartiment expérimentaux.

2.2. TESTS D’AFFINITÉ AVEC L’UTILISATION D’APTAMÈRES MARQUÉS RADIOACTIVEMENT

Les tests d’affinité par l’utilisation d’aptamères marqués radioactivement (au phosphore 32, ^{32}P) repose sur le même principe que les tests d’affinité effectués avec l’utilisation d’aptamères conjugués à des fluorophores (section précédente). La procédure effectuée est identique (**Fig.5**) jusqu’aux méthodes de lecture adaptées à chacun des cas (lecture de la fluorescence dans le cas des aptamères conjugués à un fluorophore et la lecture de la radioactivité lorsque des aptamères radioactivement marqués sont utilisés). La méthode employée pour les lectures de la radioactivité des compartiments expérimentaux est détaillée dans la partie ‘matériels et méthodes’.

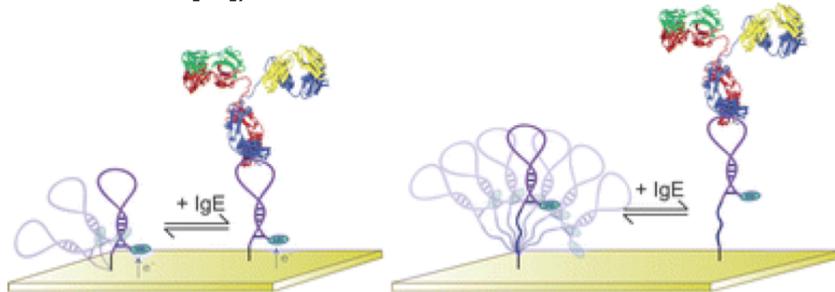
L’utilisation d’aptamères radioactivement marqués permet théoriquement d’augmenter la sensibilité des tests d’affinité effectués. Autrement dit, avec des aptamères radioactivement marqués on est capable de détecter de plus petite quantité d’aptamères. L’utilisation d’aptamère radioactivement marqué est en contrepartie contraignante en raison des mesures de sécurité qui s’imposent.

2.2.1 Affinité des aptamères E1 et E2 avec *E. coli* ATCC 8739

L’utilisation d’aptamères radioactifs est la méthode avec laquelle nous avons effectué nos premières analyses pour tester l’affinité des aptamère E1 et E2 envers *E. coli*, avant d’opter pour l’utilisation d’aptamère fluorescent en vue de pouvoir effectuer un criblage d’aptamère extensif de manière moins contraignante. À ce stade nous voulions en plus de confirmer les affinités de E1 et E2 envers *E. coli*, tester certaines modifications apportées aux aptamères E1 et E2 et comparer les changements d’affinité, s’il y a lieu, éventuellement provoqués par ces modifications. Deux types de modifications ont été effectuées sur les versions originales de E1 et E2. La première modification a consisté à faire des ajouts de queue poly-adénosine (poly-A) séparément en extrémité 3’ et 5’. Dans une perspective d’utilisation des aptamères dans des systèmes de biosenseur qui exigera très certainement l’immobilisation de l’aptamère sur une surface, la queue poly-A a été pensée en tant qu’élément de réticulation entre l’aptamère et la surface sur laquelle elle sera immobilisée, permettant une meilleure mobilité de l’aptamère et une meilleure exposition de son site de liaison (**Fig. 17**). La seconde modification testée a été le tronquage des aptamères, en éliminant les séquences d’hybridation des amorces (utilisées à l’étape d’amplification, cf. **Fig. 18**). Ainsi nous avons souhaité tester la possibilité de rendre l’aptamère plus court, donc plus simple à synthétiser, en le dénuant de ces séquences

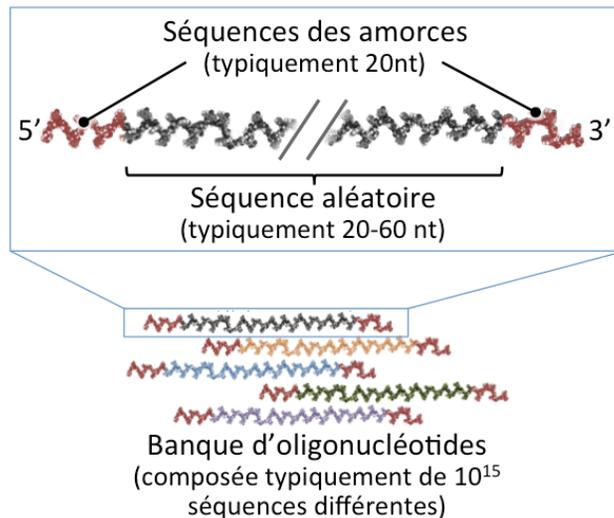
génériques qui ne joueraient pas de rôle majeur dans sa fonction et qui seraient peut-être même encombrantes.

Figure 17 : Augmentation de mobilité d'un aptamère immobilisé par la présence de séquence espaceur. (tirée de White *et al.* [46])



À gauche est représenté la situation où l'aptamère est immobilisé directement (sans utilisation de séquence espaceur) sur une surface. À droite est représenté la situation où l'aptamère est immobilisé avec utilisation de séquence espaceur sur une surface. La mobilité de l'aptamère et par conséquent sa zone d'interaction avec sa cible est accrue dans le deuxième cas.

Figure 18 : Caractéristiques des banques de séquences candidates utilisées lors des SELEX pour l'obtention d'aptamères



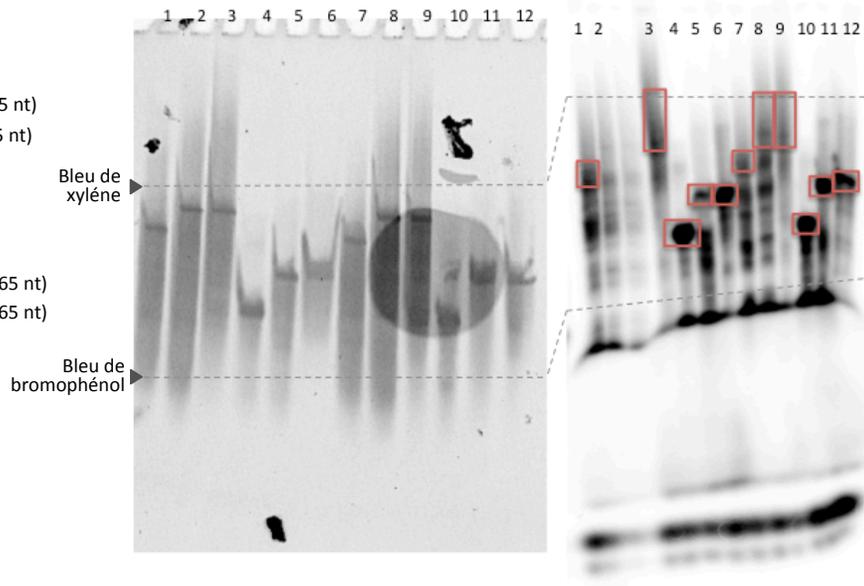
Les séquences candidates utilisées lors de SELEX sont typiquement d'une longueur approximant 100 nucléotides, avec une région centrale variable composée typiquement d'une soixantaine de nucléotides aléatoires, flanqués aux extrémités de deux séquences connues (d'une vingtaine de nucléotides) servant à l'hybridation des amorces lors de l'étape d'amplification par PCR entre les cycles de SELEX. Une banque d'oligonucléotides contient typiquement 10^{15} séquences différentes les unes des autres (dont certaines représentées éventuellement en quelques exemplaires).

Nous avons donc effectué des tests d'affinité sur un total d'une douzaine d'aptamères (en considérant les aptamères E1 et E2 modifiés comme des aptamères différents; cf. liste des modifications, **tableau 2** dans la partie 'matériel et méthodes'). La **figure 19-a** résume les résultats obtenus lors des étapes de purification des aptamères après marquage. Les données brutes radiographiques révélant les taux de radioactivité observés lors des tests d'affinité sont montrées en **figure 19-b**. En **figure 20** sont illustrées les proportions auxquelles ces taux de radioactivité correspondent. Ensemble, la **figure 19-b** et **figure 20** indiquent la présence de radioactivité plus importante aux niveaux de la resuspension du culot final des essais faits avec les bactéries *E. coli* en comparaison avec les essais contrôles *B. subtilis* pour 9 des 11 aptamères testés, soit 82% des essais (11 aptamères ont été testés au lieu des 12 listés dans la partie matériel et méthodes car le marquage de E1-polyA 5' a mal fonctionné, cf. **Fig. 19-a**). Ceci signifie que la plupart des aptamères E1 et E2 (versions originales et modifiées) se lie préférentiellement aux bactéries *E. coli* en comparaison à *B. subtilis* (par ex. : pour E2 poly-A 3', lorsque l'essai est fait en utilisant *E. coli cherry*, le culot concentre 23% de la radioactivité totale contre 14% lorsque l'essai est fait en utilisant *B. subtilis*). Toutefois, des résultats similaires sont obtenus avec l'oligonucléotide contrôle (oligonucléotides de 88 nt de long sans particularité aptamérique connue) qui donne des taux de radioactivité significativement plus importants dans les culots des essais fait avec *E. coli* en comparaison à l'essai fait avec *B. subtilis*. De ce fait, il est impossible de conclure que la liaison observée entre E1, E2 et leurs dérivés avec les bactéries *E. coli* est de nature aptamérique. Il s'agirait, en considérant également les résultats obtenus avec l'oligonucléotide contrôle, d'interactions non-spécifiques qui pourraient survenir avec tout type d'oligonucléotides indépendamment de leur séquence et particularité aptamérique.

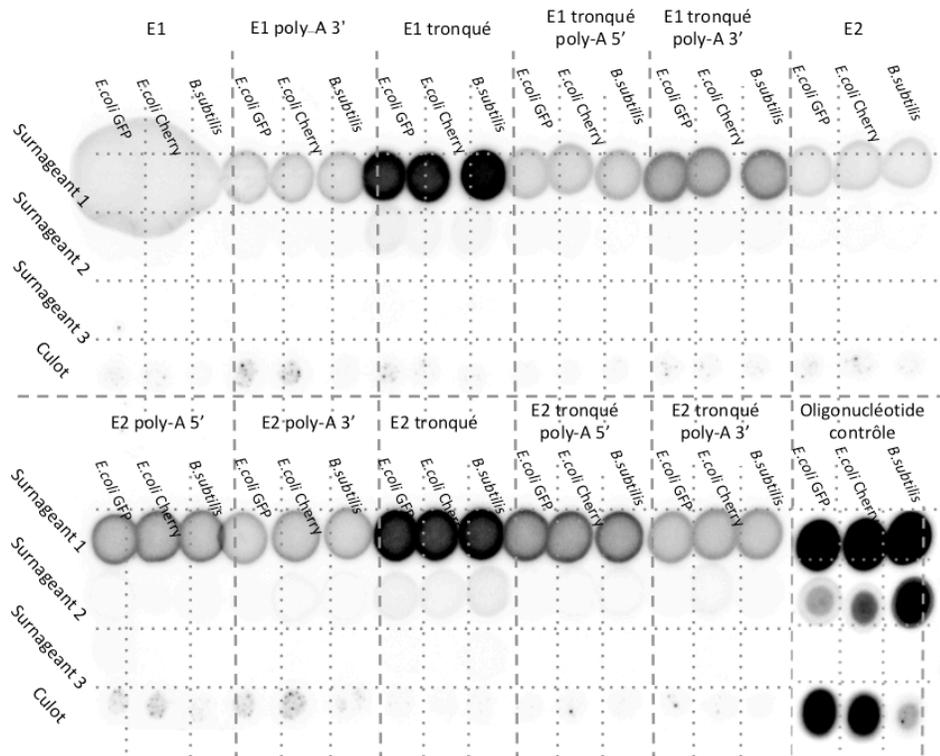
Figure 19 : Test par marquage radioactif d'affinité de E1, E2 et leurs dérivés envers *E. coli*.

a

- 1: E1 (88 nt)
- 2: E1 poly-A 5' (108 nt)
- 3: E1 poly-A 3' (108 nt)
- 4: E1 tronqué (45 nt)
- 5: E1 tronqué poly-A 5' (65 nt)
- 6: E1 tronqué poly-A 3' (65 nt)
- 7: E2 (88 nt)
- 8: E2 poly-A 5' (108 nt)
- 9: E2 poly-A 3' (108 nt)
- 10: E2 tronqué (45 nt)
- 11: E2 tronqué poly-A 5' (65 nt)
- 12: E2 tronqué poly-A 3' (65 nt)



b

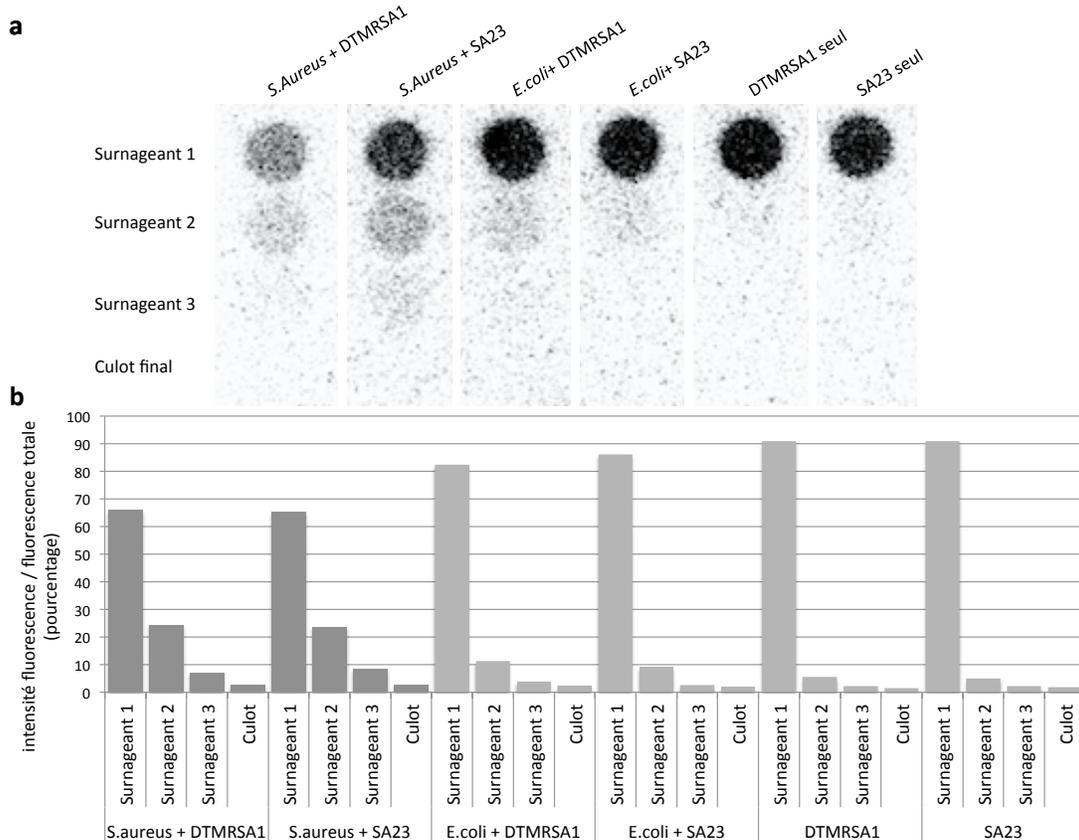


a) Migration sur gel acrylamide 6% dénaturant des aptamères. Dans le gel de gauche, les aptamères ont été mis à migrer avant marquage et par révélation au GelRed et, dans le gel de droite, après marquage par révélation sur plaque d'imagerie au phosphore. Les rectangles rouges indiquent les sections de gel prélevées pour extraction et purification des aptamères marqués. b) Taux de radioactivité observé par révélation sur plaque d'imagerie au phosphore d'échantillons de 20 μ l prélevé à partir des 200 μ l de chaque compartiment expérimental égouttés sur papier Whatman.

2.2.2 Affinité des aptamères DTMRSA1 et SA23 avec *S. aureus* HER1238

Renaud Pavic a également utilisé la méthode des aptamères marqués radioactivement pour tester l'affinité de DTMRSA1 et SA23 envers *S. aureus*. Le marquage radioactif de l'aptamère SA17 ayant échoué, cet aptamère n'a pas été inclus dans ce test. Les résultats obtenus ont été similaires à ceux obtenus avec les aptamères fluorescents (**Fig. 21**). L'affinité de DTMRSA1 et SA23 envers *S. aureus* n'a également pas pu être mise en évidence par l'utilisation de radioactivité.

Figure 21 : Test par marquage radioactif d'affinité de DTMRSA1 et SA23 envers *S. aureus*



a) Taux de radioactivité observé par révélation sur plaque d'imagerie au phosphore d'échantillons de 20 μ L prélevés à partir des 200 μ L de chaque surnageant (ou culot resuspendu) et imbibés sur papier Whatman. b) Représentation en pourcentage de la proportion des taux de radioactivité observés en a).

3 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

De nombreuses expériences ont été effectuées, sans succès au final, pour la mise en évidence de l'affinité des huit aptamères testés (issus de six différentes publications) envers leurs cibles respectives. Dans une telle situation les doutes se portent bien évidemment en premier sur la méthode et la pratique employée pour l'évaluation de l'affinité. Nous avons d'ailleurs mis en question sur plusieurs aspects nos propres façons d'exécuter les tests d'affinité, en essayant à plusieurs reprises de rectifier les points suspectés d'être la cause des résultats négatifs. Des essais ont été effectués sans remise en suspension du culot bactérien lors des lavages, laquelle recrée de nouvelles conditions d'équilibre qui à chaque fois diminue la quantité d'aptamères liés à la cible, si liaisons faites, rendant éventuellement un résultat positif indétectable au bout de quelques lavages. Des tests d'intégrité des aptamères dans les conditions d'incubation utilisées lors des tests d'affinité ont été menés pour vérifier si un problème existait à ce niveau. Pour contourner les effets du 'quenching' (mis en évidence chez l'aptamère F23-FAM par *P. aeruginosa*) nous avons effectué des tests en chauffant à 95°C les culots bactériens finaux pour libérer les aptamères potentiellement présents, si liaison il y avait. Dans cette même optique de contourner le problème du quenching et également pour augmenter la sensibilité de la méthode, nous avons testé des aptamères radiomarqués. En dépit donc des différentes approches employées pour rectifier les éventuelles erreurs commises qui empêcheraient les tests de fonctionner, nous n'avons pas été capables d'obtenir un résultat positif. Le principe lui-même du test d'affinité employé est pourtant simple. Le problème ne peut non plus pas provenir de là puisque cette méthode est appliquée par d'autres études publiées dans le domaine [41, 47].

Revient alors la question du contrôle sur les conditions du SELEX ayant permis l'obtention des aptamères publiés et testés lors de ces travaux. Comme mentionné en introduction, notre hypothèse initiale est que les aptamères sont des bioéléments dont le fonctionnement dépend fortement des conditions d'incubation. Si le processus de SELEX permet une sélection d'aptamères avec une excellente affinité à travers les cycles de sélection qui le composent, il peut en même temps créer un produit hautement dépendant des conditions dans lesquelles sa sélection a eu lieu. Le fonctionnement d'un aptamère pourrait par exemple être très dépendant de la nature du tampon utilisé lors du SELEX qui a permis sa sélection (hormis les cas où des précautions particulières ont été appliquées à cet effet comme l'utilisation de tampons variants à chaque cycle de SELEX). Ce phénomène est peut être d'autant plus amplifié par le fait que le SELEX est composé d'une série successive de sélections qui au final écarte éventuellement les candidats plus flexibles si ils sont moins adaptés aux conditions spécifiques appliquées. L'aptamère est dépendant de plusieurs conditions modulant sa sélection (la température, le

matériel utilisé, les conditions concernant sa cible, etc.) dont certaines sont hors du contrôle et de la connaissance de l'exécuteur du SELEX (contaminant au niveau de la cible, conditions de croissance de la bactérie, composant non désiré dans le tampon, fluctuation du pH, etc.). Faute de pouvoir recréer ces conditions, il est possible que dans plusieurs cas il soit particulièrement difficile de reproduire la liaison de l'aptamère à sa cible. C'est en partie la reproductibilité des expériences en lien avec les aptamères que nous avons voulu déterminer par ces travaux.

Ceci pourrait expliquer la situation rencontrée dans ces travaux. Le cas de l'aptamère F23 reste par contre plus intrigant puisque celui-ci a déjà donné des résultats positifs dans le laboratoire. Serait-ce tout de même une nuance non-intentionnelle entre les façons de faire qui aurait, comme expliqué, des grandes répercussions et empêcherait la reproductibilité? Dans tous les cas, pour pouvoir classer cet aptamère parmi ceux dont la fonctionnalité dépend de conditions incontrôlées et inconnues, on doit être sûr de la capacité de notre méthode de test à pouvoir mettre en évidence l'affinité des aptamères quand elle a lieu. Pour cela on doit être capable avec au moins un aptamère à obtenir des résultats positifs lors de nos tests d'affinité.

L'utilisation de la cible adéquate lors des tests d'affinité est également un point important. Nous avons accordé de l'attention à ce point lors de nos travaux, à l'exception des tests faits avec les aptamères DTMRSA1, SA17 et SA23 pour lesquels nous ne disposons pas des souches identiques à celles utilisées dans les articles de références, utilisant des souches résistantes (voire multi-résistantes) aux antibiotiques, 'délicates' pour certaines à manipuler. Nous avons tout de même voulu tester l'affinité de ces aptamères envers les souches de *S. aureus* dont nous disposons pour vérifier si l'un de ces aptamères cible un épitope commun entre nos souches et celle de la publication de référence.

En considérant ces différents points cités, nous planifions d'effectuer de nouveaux tests avec quelques nouveaux aptamères choisis sur le critère majeur de confirmations préexistantes de la reproductibilité des résultats par des équipes différentes que celle des auteurs de la publication d'origine. Si reconfirmer ce qui a déjà été publié a normalement peu d'intérêt scientifique, cela nous permettra d'avoir une validation de la méthode employée pour les tests d'affinité et de pouvoir évaluer les résultats obtenus avec la certitude de la fiabilité à la méthode employée. Nous pourrions ainsi poursuivre le criblage d'aptamères antibactériens publiés dans la perspective d'un côté d'évaluer le taux de reproductibilité des résultats de la littérature dans le domaine et d'un autre de disposer d'aptamères utilisables dans nos travaux de développement de nouveaux systèmes de détection de microorganismes. La perspective à long terme est donc

par la suite d'élargir largement la liste des aptamères testés pour aboutir à un réexamen exhaustif des aptamères publiés ciblant les bactéries, et obtenir une revue expérimentale dans ce domaine, pour laquelle nous pensons qu'un besoin existe. Si un problème de reproductibilité des résultats s'avère omniprésent dans le domaine des aptamères ciblant des bactéries (ou plus généralement des aptamères issus du cell-SELEX), cela remettrait en cause les façons de faire et suggérerait des amendements importants à la méthode, telle que l'alternance de conditions entre les cycles de sélection.

PARTIE II : OPTIMISATION DES MÉTHODES D'IMMOBILISATION DES ACIDES NUCLEIQUES SUR SURFACE DE SILICE POUR PERMETTRE LEUR UTILISATION SUR PLATEFORME FIBRE OPTIQUE POUR LE DÉVELOPPEMENT DE SYSTÈME DE DÉTECTION DE GÉNOMES VIRAUX ET BACTÉRIENS

5 INTRODUCTION

5.1. LES BIOSENSEURS:

Une large variété de techniques peut être utilisée pour le développement de biosenseurs. Depuis le développement, en 1956, de "l'électrode de Clark" [7] considérée en tant que l'ancêtre des biosenseurs, suivi des adaptations de cette même technique d'utilisation des électrodes ampérométriques à enzymes pour mesurer l'urée par Guibault et Montalvo [48] la technologie dans le domaine n'a cessé de se développer. En 1975, la compagnie Yellow Springs Instrument a commercialisé la technologie de Clark avec l'analyseur modèle 23A (**Fig. 22**), utilisé essentiellement dans les laboratoires cliniques pour les mesures de taux de glucose sanguin [49]. Le succès de cette commercialisation a sans doute contribué à créer de l'intérêt supplémentaire autour du domaine des technologies de diagnostic et détection. Cet intérêt scientifique c'est traduit, entre autres, par certaines avancées majeures tel que les développements, en 1982, de biosenseurs en fibres optiques pour la détection du glucose [50], en 1985, d'immunosenseurs utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR) [51] et, en 1992, l'apparition des systèmes portatifs de bio-analyse sanguin, système i-STAT, par la compagnie Abbott [52]. Aujourd'hui, le domaine continue à faire des liens entre les diverses sciences fondamentales (physique, chimie et biologie) entre elles mais également entre celles-ci et les sciences plus 'jeunes' telles que l'informatique, l'électronique et les nanotechnologies.

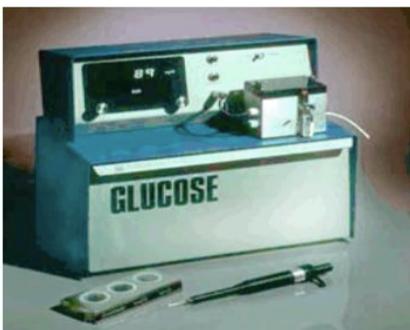


Figure 22 : Premier biosenseur analyseur de taux glycémique sanguin, modèle YSI 23A commercialisé par Yellow Springs Instrument, en 1975.

Les principaux défis de la recherche pour le développement de biosenseurs est de créer des systèmes permettant la détection de molécules de plus en plus variées, de la manière la plus sensible, spécifique, rapide et simple d'utilisation. Pour cela différentes combinaisons entre les diverses technologies utilisables pour les différentes composantes du système du biosenseur sont envisageables. Le biosenseur typique (**Fig. 1**) est constitué des composantes suivantes, lesquelles sont séparément sujettes à de continuelles innovations:

-Le biorécepteur: il s'agit de l'élément chimique, biologique ou biomimétique capable de reconnaître l'analyte d'intérêt.

-Le transducteur: Le transducteur est la plateforme en contact direct ou indirect avec le biorécepteur qui transforme l'évènement d'interaction entre le biorécepteur et l'analyte (évènement nommé bio-reconnaissance) en un signal éventuellement quantifiable. Cette conversion de la bio-reconnaissance en signal est nommée signalisation. La plupart des transducteurs produisent un signal optique ou électrique souvent proportionnel au taux d'interaction biorécepteur-analyte.

-L'électronique: Cette composante n'existe pas dans tous les systèmes de biorécepteur. Les kits de test immunochromatographique ('lateral flow/strip test') par exemple, qui peuvent également être considéré comme des systèmes biorécepteurs, ne possèdent pas de composantes électroniques. Quand elle est présente, cette composante permet le traitement du signal provenant du transducteur et sa préparation pour son affichage.

-L'affichage: Cette composante également n'est pas présente dans tous les biorécepteurs. Dans l'exemple précédent du test immunochromatographique où la bio-reconnaissance se traduit par un marquage colorimétrique un système d'affichage supplémentaire n'est pas nécessaire. Lorsqu'elle est présente cette composante permet l'exposition des données de manière interprétable par l'utilisateur. Souvent l'affichage implique l'utilisation de matériel et logiciel informatique.

Les innovations et développements concernant les deux premières composantes cités précédemment sont particulièrement susceptibles d'améliorer les systèmes existant de détection et diagnostic. D'ailleurs la plupart des 84000 études répertoriés sous le thème de 'biosenseur' pour la période comprise entre 2005 et 2015 dans la base de données 'Web of Science', concernent des nouveautés apportées au moins à l'une de ces deux composantes ou font l'objet de nouveaux types d'association biorécepteur-transducteur.

5.2. BIOSENSEUR À TRANSDUCTEUR EN FIBRE OPTIQUE:

L'étude publiée en 2012 [14] par nos collaborateurs du Centre de Recherche en Photonique de l'Université du Québec en Outaouais fait partie de ces études sous le thème des biosenseurs. Dans cette étude Tripathi *et al.* ont démontré l'efficacité dans la détection des bactéries *E. coli* d'un système de biosenseur basé sur l'utilisation de fibre optique de type LPFG (pour 'long-period fiber grating') avec des bactériophages attachés par liaison covalente à leur surface. Ce système élaboré par Tripathi et al. a démontré une capacité de détection quantitative avec une corrélation parfaite entre l'intensité du signal obtenu et les concentrations d'*E. coli* analysées et une exactitude de détection de >99% à des concentration de *E. coli* aussi basse que 10^3 ufc/ml. Ces données classent ce système au même rang que les senseurs SPR qui attirent l'attention pour leur très haute sensibilité [53-55], nécessaire pour les mesures biologiques de haute précision. Autrement dit, les fibres optiques de type LPFG constituent une alternative concurrentielle aux méthodes SPR qui présentent certains inconvénient liés entre autre à la nécessité d'une laborieuse et coûteuse déposition de couche de métal, support à la résonance plasmonique, des possibilités de faux positifs dues aux fluctuations dans l'alimentation électrique du système, un fonctionnement limité au spectre visible où les pertes d'énergie sont plus grandes, etc. La plateforme de type LPFG se démarque, en plus de sa haute sensibilité et son exactitude dans la détection, par sa capacité à être compacte et peu coûteuse.

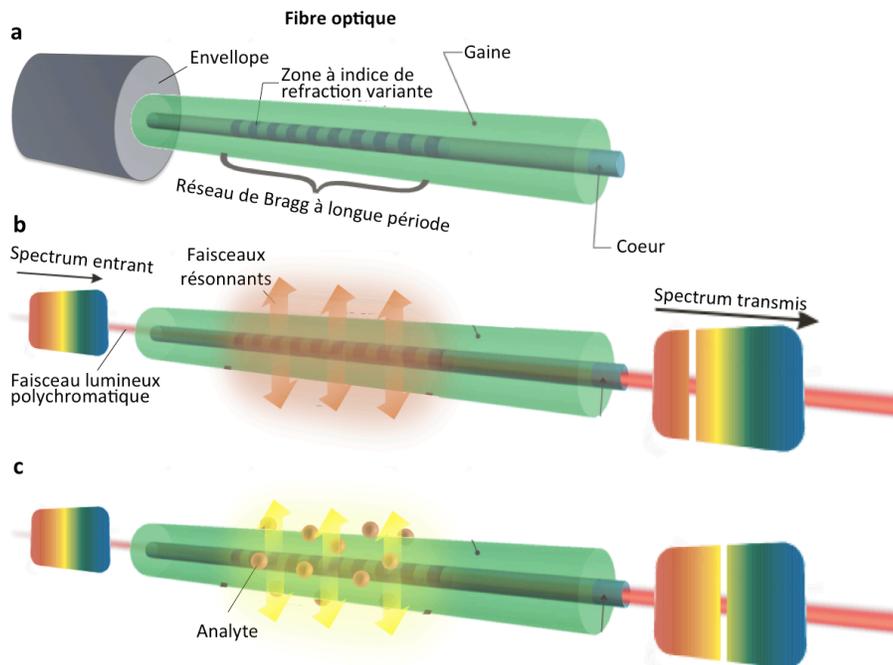
Le LPFG est une variation périodique de l'index de réfraction créée dans le coeur de la fibre optique (**Fig. 23**). Cette succession de zones ayant un indice de réfraction différent du reste du coeur de la fibre génère un phénomène de résonance qui redirige certaines longueurs d'onde de la source lumineuse entrante polychromatique (à plusieurs longueurs d'onde) vers la gaine (couche extérieure) de la fibre. La longueur d'onde rentrant spécifiquement en résonance (λ_R) dépend, entre autres, de l'indice de réfraction de la gaine, qui elle-même varie en fonction des composés qui se trouvent en contact direct ou très étroit avec sa surface (lorsqu'elle est défaite de l'enveloppe de protection et directement exposé au milieu extérieur). Cette relation est exprimée par la formule suivante [56]:

$$\lambda_R = (n_{\text{eff}}^c - n_{\text{eff}}^g) \Lambda + (K_{c-c} - K_{g-g})$$

où n_{eff}^c et n_{eff}^g sont les indices de réfraction du coeur et de la gaine respectivement; où Λ correspond à la périodicité des rayures du réseau ; où K_{c-c} et K_{g-g} correspondent au coefficient d'auto couplage du coeur et de la gaine, respectivement, et permettent de définir une constante de physique optique. Le principe de détection des LPFG repose sur le changement de n_{eff}^g induit

par les molécules/structures qui interagissent avec la surface de la gaine et la répercussion de ceci sur λ_R . Autrement dit, le principe des LPFGs repose sur la mesure des changements de λ_R .

Figure 23 : Les fibres optiques LPFG



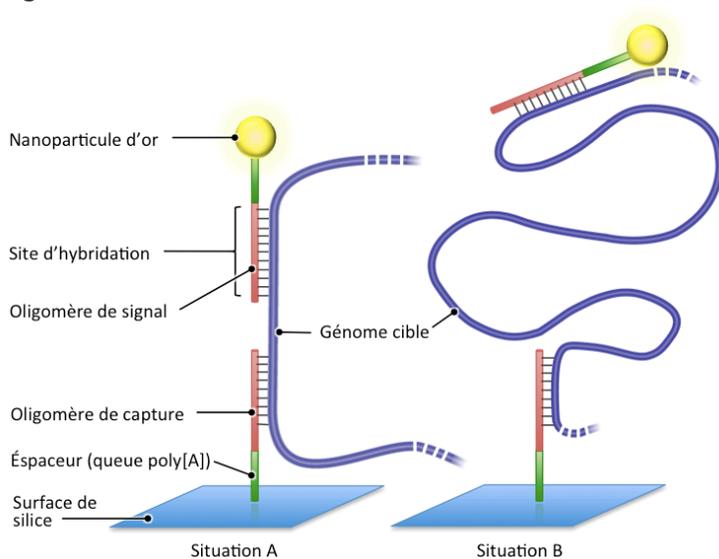
a) Représentation des différents compartiments de la fibre optique. b) Représentation du principe de la résonance au niveau du réseau à longue période, générant l'absence de certaines longueurs d'ondes dans le spectre sortant en comparaison avec le spectre entrant de la lumière polychromatique. c) Représentation de l'effet de l'attachement de bactéries à la surface de la gaine de la fibre sur la longueur d'onde résonante λ_R avec un spectre sortant différent lorsque la fibre est recouverte de bactéries en comparaison avec la situation en b) où la fibre est exempte de bactéries à sa surface.

5.3. OBJECTIFS ET PROBLÉMATIQUES:

Les travaux expliqués dans cette partie ont été entrepris dans l'objectif de tester l'utilisabilité des oligonucléotides avec ce type de plateformes fibres optiques LPFG. Dans un premier temps nous avons envisagé d'utiliser des oligonucléotides n'ayant pas de particularités aptamériques pour établir une preuve de concept de la fonctionnalité dans un tel système de simples oligomères complémentaires à des cibles d'intérêt. Cette approche pourrait permettre le développement de biosenseurs LPFG pour la détection de virus ou microorganismes basé sur l'utilisation d'oligomères complémentaires à leur génome. Avec des oligomères complémentaires au génome des cibles de détection, dont le design et l'obtention sont particulièrement simples, on serait en mesure de développer des biosenseurs utilisables pour la détection de tous types d'agents infectieux à partir de lysat sanguin ou autre fluide corporel.

Nous avons utilisé comme modèles des oligomères complémentaires aux génomes des virus bactériens MS2 et M13. Un système d'interaction en sandwich, comme représenté en **figure 24**, a été envisagé. Lorsque le fonctionnement de chaque étape aura été optimisé on obtiendra un tel système d'interaction où la cible d'intérêt (génome de MS2 ou M13) est d'un côté hybridé à l'oligomère de capture lui-même immobilisé sur la gaine de la fibre et d'un autre côté hybridé à une seconde sonde oligonucléotidique conjuguée à une nanoparticule d'or (**Fig. 24**). L'introduction dans le système d'une seconde sonde conjuguée à une nanoparticule d'or, dite sonde signal, a l'intérêt de conférer à la structure obtenue un certain volume et masse pour augmenter la capacité de la structure à générer un signal.

Figure 24 : Schéma d'interactions



Le schéma de gauche (situation A) représente le cas où les sites d'hybridation des oligomères de capture et oligomères signal sont rapprochés l'un de l'autre et le schéma de droite (situation B) représente le cas où ils sont éloignés l'un de l'autre. Dans les deux situations l'oligomère de capture, immobilisé sur la surface de silice, sera l'élément récepteur de l'analyte (le génome cible) lié également en 'sandwich' par un oligomère de signal conjugué à une balise, une nanoparticule d'or, apportant à la structure d'interaction une masse supplémentaire et ainsi une capacité augmentée à être détectée par le système envisagé.

La problématique de cette partie du projet repose essentiellement sur le choix et l'efficacité de la méthode chimique choisie pour immobiliser les oligonucléotides sur les surfaces de silice. Un grand nombre de choix détaillés dans la sous-section suivante est disponible à cet effet. Le défi est de choisir celle (ou celles) qui sont adéquates et permettent une immobilisation efficace tout en permettant aux oligonucléotides d'opérer par la suite leurs rôles qu'on leur a administré.

Pour répondre à cette problématique et valider la faisabilité de chaque étape menant au schéma d'interaction envisagé, nous avons défini les sous-objectifs suivants:

- Validation de l'efficacité et optimisation d'un protocole pour l'immobilisation par liaison covalente des oligomères de capture sur surface représentative de la gaine des fibres optiques (lame de verre).
- Validation de la préservation des capacités des oligomères immobilisés à établir des interactions de complémentarité avec les séquences cibles.

L'objectif principal est d'établir une preuve de concept d'une approche qui permettra, comme décrit précédemment, le développement de biosenseurs basés sur l'utilisation d'oligomères complémentaires à des génomes viraux ou bactériens. La réussite de ces sous-objectifs nous permettra de disposer d'une méthode prouvée efficace pour la fonctionnalisation de fibre optique applicable aux aptamères, également de nature oligonucléotidique. Finalement, la gamme de cibles de détection initiale limitée aux bactéries avec l'utilisation des bactériophages comme biorécepteur aura été augmentée par les présents travaux qui permettront de développer des systèmes de détection pour tous organismes ayant un génome (virus, mycètes, bactéries, protozoaires, etc.). Éventuellement, ces travaux et le savoir-faire acquis pourront servir à l'utilisation d'aptamères sur des plateformes LPFG pour le développement de biosenseurs dont la gamme de cibles sera alors pratiquement illimitée puisque les aptamères peuvent interagir avec presque tous types de molécules.

5.4. LA MÉTHODE CHIMIQUE

L'immobilisation des oligonucléotides sur surface de silice (lame de verre ou gaine de fibre optique) implique l'utilisation de méthodes chimiques pour lesquelles il existe une riche littérature qui nécessite un "état-de-l'art", un bilan.

La chimie de l'immobilisation des oligonucléotides a bénéficié de l'engouement pour la technologie des biopuces qui a eu lieu à partir des années 2000 où cette technologie a commencé à être significativement utilisée dans le domaine de la diagnostic rapide et de la

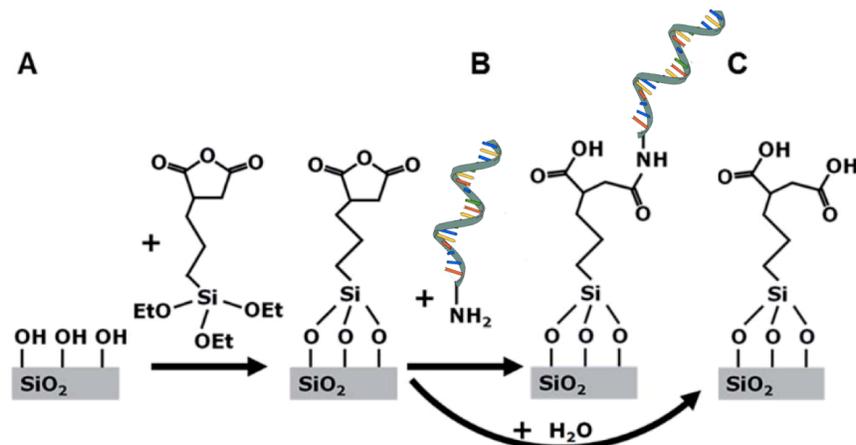
recherche médicale [57]. Les oligonucléotides étant les principaux bioéléments utilisés dans les biopuces, les efforts mis pour le développement de ce type de technologie ont également concerné les méthodes d'immobilisation des oligonucléotides. Parmi les divers matériaux utilisés pour la production de biopuces tels que la nitrocellulose, le polyacrylonitrile, le polypropylène, le polystyrène, le téflon, le nylon, le silicone, polypyrrole, polyuréthane, polyméthylméthacrylate, polyéthylène glycol, PMMA, etc. [58-61], le verre est le matériel qui s'avère être le plus approprié pour plusieurs raisons : (i) il peut être facilement modifié via la silanisation pour générer les groupements fonctionnels désirés (amine, mercapto, carboxylique, epoxy, aldéhyde, etc.), (ii) il a une excellente résistance chimique face aux solvants et peut subir une exposition à des hautes températures et des lavages rigoureux et (iii) sa surface plate et non-poreuse minimise les volumes d'hybridation nécessaires. [62]. Par conséquent les efforts de recherche se sont concentrés pour le développement de méthodes efficaces d'immobilisation d'oligonucléotides sur surface de verre. Deux approches différentes ont fait l'objet de nombreuses recherches et propositions de méthodes: la synthèse d'oligonucléotides 'on-chip' et l'immobilisation post-synthèse des oligonucléotides sur la surface de verre. Les études concernant la deuxième catégorie de méthode offrent un grand choix d'alternatives applicables à notre projet.

Cependant il ne semble pas exister une méthode en particulier qui se démarquerait des autres avec une utilisation récurrente dans les divers procédés d'immobilisation d'oligonucléotides publiés. Il semblerait plutôt que chaque méthode présente des avantages contextuels qui ne correspondraient pas à toutes les situations. Certaines méthodes, par exemple, peu coûteuses au niveau du matériel nécessaire (réactifs chimiques, etc.), mais nécessitant en contrepartie une procédure élaborée et des infrastructures spécialisées seront avantageuses pour des applications industrielles, mais peu adaptées à une utilisation expérimentale.

Dans ce contexte, Fatma Khalfaoui, initiatrice de ce projet, avait été inspirée par une méthode publiée par Gang *et al.* en 2017 [63]. Cette étude propose un protocole en une seule étape de silanisation avec l'anhydride de silane 3-(triéthoxysilyl) propylsuccinique (TESPSA) qui permet de générer des groupements COOH sur la surface de silice/verre (**Fig. 25**) capable d'interagir et former des liaisons covalentes avec des molécules aux groupements amino-terminaux (tels que des oligonucléotides modifiés en position 3' ou 5' par une fonction $[\text{CH}_2]_6\text{-NH}_2$, par exemple). Il existe d'autres méthodes disponibles pour modifier la surface de silice (verre) avec des silanes (composés tétraédriques avec pour atome central le silicium) aux fonctions aldéhydes [64], isocyanates [65] ou époxydes [66] tous capables, de la même manière qu'avec le TESPSA, de

former des liaisons covalentes avec des molécules aux groupements amino-terminaux. Cependant avec l'utilisation de ces méthodes il est nécessaire de désactiver les sites actifs de liaisons ainsi générées sur la surface de silice, subséquemment à l'immobilisation des oligomères d'intérêt, pour prévenir les éventuels attachements de molécules non-spécifiques. Avec la méthode du TESPSA la passivation des sites actifs de liaisons en excès, par l'eau, se déroule parallèlement à l'immobilisation des oligomères d'intérêt lors de l'incubation faite à cet effet dans un milieu aqueux (**Fig. 24**).

Figure 25 : Fonctionnalisation des surface de silice au TESPSA



Représentation schématique de A) la fonctionnalisation de la surface par l'utilisation du TESPSA, B) la liaison covalente des groupements amines via une réaction d'ouverture du cercle de la fonction anhydride succinique menant à une liaison amide, et en C) l'hydrolyse de la fonction anhydride succinique générant deux groupes carboxyliques. (adapté de Gang *et al.* [63]).

Une deuxième approche a été envisagée avec l'inclusion dans ce projet de Mehdi Haghdoost, chimiste de formation, post-doctorant dans le laboratoire du Dr. Annie Castonguay. Nous avons testé l'efficacité d'une seconde méthode reposant sur l'ajout d'une couche supplémentaire contenant des fonctions maléimides rendant la surface capable d'interagir avec des groupement SH (tel que des oligonucléotides avec un thiol). Les raisons pour lesquelles une telle méthode a été également utilisée sont expliquées dans la partie des résultats où la chronologie des circonstances est retracée.

6 MATÉRIELS ET MÉTHODES

6.1. LES OLIGONUCLÉOTIDES

Les oligonucléotides utilisés lors de ces travaux ont été fournis par Alpha DNA (Canada). Les séquences et les modifications chimiques ajoutées à celles-ci, s'il y a lieu, sont listées dans le **tableau 5**

Tableau 5 : Séquences et modifications des oligomères utilisés

Nom	Séquence
EY050	5'-AAGAGGCTGTAGCAGGAGCGTAAAAAAAAA-SH-3'
EY051	5'-NH-AAAAAAAAAGTCAAGTTTGGCTTACAGGG-3'
EY052	5'-NH-AAAAAAAAAGTGTACGCCTTACGAGCGC-3'
EY053	5'-AGTTTGTCTGCGATTGCTGAGGAAAAAAAAA-SH-3'
EY054	5'-NH-AAAAAAAAAATGGCCGGCGTCTATTAGTA-3'
EY055	5'-NH-AAAAAAAAATTTCGAGAGAAAATCGCGA-3'
EY054	5'-ACTCCGAAGTGCCTATAACGCAAAAAAAAA-SH-3'
EY055	5'-TTCATGCTGTCGGTGATTTCAAAAAAAAA-NH-3'
EY056	5'-NH-AAAAAAAAAGTTACCAAATCGGGAGAATCC-3'
EY057	5'-AGTTTTAACGGGGTCAGTGCCAAAAAAAAA-SH-3'
EY058	5'-NH-AAAAAAAAATTGATGATACAGGAGTGTACT-3'
EY059	5'-NH-AAAAAAAAATTGACAGGAGTTGAGGCAG-3'
EY060	5'-AATAGCAGCCTTACAGAGAGAAAAAAAAA-SH-3'
EY061	5'-AAACAGGGAAGCGCATTAGACAAAAAAAAA-NH-3'
EY062	5'-AAAAAAAAATCTTACCAACGCTAACGAGC-SH-3'
EY063	5'-NH-AGGGATTTTAGACAGGAACGGAAAAAAAAA-3'
EY064	5'-NH-AAAAAAAAATTTCTCGTTGGAATCAGAGC-3'
EY065	5'-NH-AAAAAAAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG-3'
EY066	5'-NH-AAAAAAAAATTTCTCGTTGGAATCAGAGC-3'
EY067	5'-NH-AAAAAAAAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG-3'
EY068	5'-CCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTAATCGGCCCTCTGTTAGCTCCCGCTCTGATTCCAACGAGGAAA-3'
EY069	5'-GTCTAATGCGCTTCCCTGTTTTATGTTATCTCTCTGTAAAGGCTGCTATT-3'
EY070	5'-GGCACTGACCCGTTAAAATTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAA-3'
EY071	5'-ACGCTCCTGTACAGCCTCTCCCTGTAAGCCAAAACCTTGAC-3'
EY072	5'-CCTCAGCAATCGCAGCAAACCTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGCCATT-3'
EY073	5'-TGAAATCACCGACAGCATGAAGTCCGCCGGCGTGCCGTTATACGCACATTCGGAGT-3'
EY074	5'-CCCTGTAAGCCAAAACCTTGACTTTTTTTTTT-3'
EY075	5'-GCGCTCGTGAAGGCGTACACTTTTTTTTTT-3'
EY076	5'-TACTAATAGACGCCGCCATTTTTTTTTT-3'
EY077	5'-TCGCGATCTTCTCTCGAAATTTTTTTTTT-3'
EY078	5'-TTTTTTTTTGTAAATCACCGACAGCATGAA-3'
EY079	5'-GGATTCTCCGATTTGGTAACTTTTTTTTTT-3'
EY080	5'-AGTACACTCCTGTATCATCAATTTTTTTTT-3'
EY081	5'-CTGCCTCAACCTCCTGTCAATTTTTTTTTT-3'
EY082	5'-TTTTTTTTTGTCTAATGCGCTTCCCTGTT-3'
EY083	5'-GCTCGTTAGCGTTGGTAAAGATTTTTTTTTT-3'
EY084	5'-GCTCTGATTCCAACGAGGAAATTTTTTTTT-3'
EY085	5'-CGCCCGCTCCTTCGCTTCTTTTTTTTTT-3'
EY086	5'-AGGGATTTTAGACAGGAACGGAAAAAAAAA-3'

En rouge sont indiquées les modifications et en bleu les queue poly[A] (ou poly[T] pour les oligomères complémentaires utilisés pour l'obtention des oligomères doubles brins).

6.2. L'HYBRIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES

Pour certaines expériences l'utilisation d'oligomères double brin a été nécessaire (cf. partie des résultats). Pour se faire, un protocole d'hybridation entre les oligonucléotides complémentaires a été appliqué. Celui-ci a consisté à soumettre un mélange des deux oligonucléotides complémentaires à un ratio de 1:1 chacun à une concentration finale de 50 pmoles/ μ L en solution dans de l'eau Milli-Q à un programme d'hybridation dans le thermocycleur C1000 Touch (Biorad, Canada), 5 minutes 95°C suivit d'une diminution graduelle de la température de 2°C/seconde jusqu'à atteindre 25°C.

6.3. MARQUAGE RADIOACTIF DES OLIGOMÈRES

Pour le marquage radioactif, 7,5 μ L d'oligonucléotides (simple ou double brin) ont été incubés pendant 1 heure à 37°C dans 24 μ L d'eau Milli-Q (Millipore), 3 μ L de tampon de réaction 10X de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4 PNK, New England Biolabs), 1,5 μ L de l'enzyme T4 PNK et 0,5 μ L d'adénosine 5'-triphosphate [γ -³²P](ATP) (Easy Tides®). Les réactions de marquage ont été arrêtées par incubation à 65°C pendant 20 minutes.

6.4. PURIFICATION DES OLIGOMÈRES MARQUÉS

La purification des oligomères marqués radioactivement a été effectuée par électrophorèse en gel, dans le but notamment de se défaire des ATP-³²P susceptibles de se lier à la surface de silice et engendrer des résultats faux positifs.

La procédure utilisée est identique à celle décrite dans la partie I, rubrique des matériels et méthodes.

6.5. LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SILICE

Représentative de la surface des fibres optiques également composées de silice, des lames de verre de microscopie Fisherbrand (ThermoFisher Scientific, Massachussetts, USA) ont été utilisées dans ces travaux.

Une version modifiée (adaptée aux moyens techniques et équipement du laboratoire) du protocole de Gang *et al.* [63] a d'abord été utilisée pour fonctionnaliser la surface de silice des lames de verre utilisées (en liant des groupes chimiques fonctionnels sur leur surface). Celle-ci a

consisté à effectuer une étape de lavage rigoureux pour se débarrasser des contaminants éventuellement présents sur la surface des lames, préalablement à la silanisation, par l'incubation de celle-ci pendant 24 heures dans une solution Piranha (3 :1 acide sulfurique: peroxyde d'hydrogène), suivie d'étape de rinçages à l'eau et séchage [67]. La silanisation, ensuite, a été réalisée par immersion durant 15 minutes des lames dans une solution d'anhydride triéthoxysilylpropylsuccinique (TESPSA, Sigma Aldrich, Missouri, USA) diluée à 2% dans une solution de 95:5 acide acétique: éthanol 100% [68]. Rincées à l'éthanol 100% et séchées, les lames ont soit servi directement aux expériences d'immobilisation (cf. rubrique suivante) ou ont été stockées à 4°C.

Avec l'aide de Mehdi Haghdost, le protocole de silanisation utilisant le TESPSA a connu certaine rectification. La nouvelle procédure débutait également par un lavage avec une solution Piranha. Les lames ont ensuite été lavées rigoureusement à l'eau Milli-Q (Millipore) et incubées pendant la nuit également dans de l'eau Milli-Q. La silanisation a été effectuée sous atmosphère d'azote dans des boîtes à gants en condition anaérobie ou la technique standard de *Schlenk line* (également appelée rampe à vide, il s'agit d'un appareillage permettant de manipuler des échantillons sensibles à l'air ambiant). Dans notre cas, ces précautions ont été utilisées pour prévenir le contact des surfaces avec l'humidité atmosphérique, susceptible d'inactiver les groupements fonctionnels créés par la silanisation (**Fig. 25**). Dans ces conditions, les lames ont été immergées dans une solution de TESPSA 10% (v/v) diluée dans du toluène anhydre pendant 24 heures. Ensuite, les lames ont été lavées rigoureusement avec du toluène anhydre, du diméthylformamide (DMF) et du dichlorométhane pour se débarrasser des multicouches physisorbées. Séchées ensuite sous vide, les lames ont été conservées dans un dessiccateur jusqu'à leur utilisation.

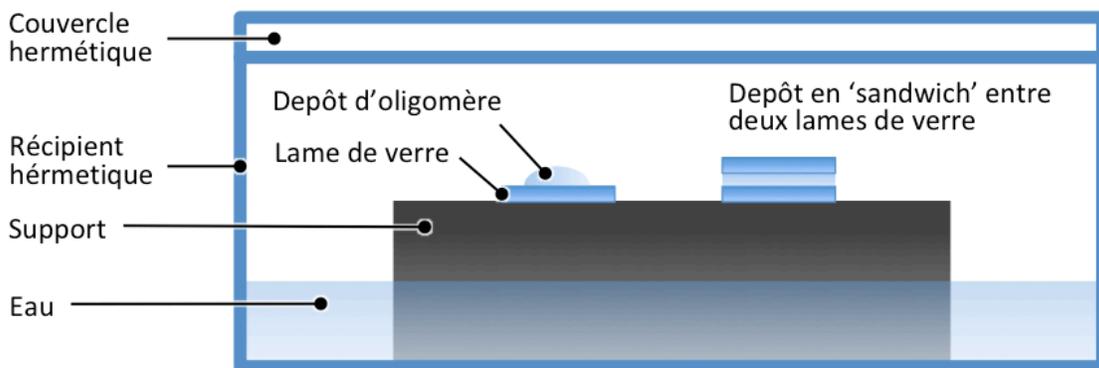
En outre, une méthode de fonctionnalisation en utilisant du maléimide pour modifier les surfaces de silices a été testée. Le protocole employé a consisté à immerger pendant 2 heures les lames traitées au TESPSA (comme expliqué précédemment) dans une solution de dichlorométhane contenant 300 mg de N-(2-aminoéthyl) maléimide trifluoroacétate et de triméthylamine (~1 equiv., 165 µL). Les lames ont ensuite été lavées plusieurs fois avec du dichlorométhane et de l'eau Milli-Q. Ensuite, pour inactiver les groupements TESPSA en excès (n'ayant pas réagi avec le maléimide) (**Fig.25**), les lames ont été immergées dans de l'eau Milli-Q pendant 1 heure, séchées sous vide et conservées dans un dessiccateur.

6.6. L'IMMOBILISATION DES OLIGOMÈRES SUR LES SURFACES FONCTIONNALISÉES (CHIMIQUEMENT ACTIVÉES)

Quelque-soit la méthode de fonctionnalisation utilisée parmi celles qui ont été décrites précédemment, le protocole de l'étape d'immobilisation des oligomères sur les surfaces fonctionnalisées reste le même. Celui-ci consiste à déposer une quantité de 750 pmoles d'oligomères, diluée dans de l'eau Milli-Q ou dans un mélange de marquage dépendamment de l'expérience (cf. Partie des résultats), dans un volume dans tous les cas inférieur à 20 μL . Les lames de verre sur lesquelles les dépositions sont faites, sont placées dans un récipient hermétique contenant de l'eau pour permettre de générer une humidité dans le milieu d'incubation et éviter le séchage des gouttes déposées (**Fig. 26**). Pour les expériences où une étape supplémentaire est à accomplir suite à l'immobilisation, pour s'assurer de l'immobilisation des oligomères de capture sur toute la surface de la lame le dépôt est mis en 'sandwich' entre deux lames de verre (une d'entre elle n'étant pas fonctionnalisée). Ainsi lors du second dépôt, on ne sera pas confronté au souci de faire coïncider le deuxième dépôt à l'endroit exact du premier.

Suite à une incubation d'une heure à température ambiante, les lames sont lavées rigoureusement par des passages d'eau dé-ionisées par osmose-inverse sur la surface des lames.

Figure 26 : Schéma du montage/dispositif expérimental pour l'immobilisation des oligomères sur lame de verre fonctionnalisée



L'eau contenue dans le récipient hermétique permet de générer une humidité dans le milieu d'incubation permettant d'éviter le séchage des gouttes déposées. À gauche est représenté le cas où le dépôt des oligomères est laissé sous forme de goutte. À droite, est représenté le cas où le dépôt est étendu sur toute la surface de la lame par mise en 'sandwich'. Ce dernier schéma d'immobilisation est appliqué pour permettre une immobilisation sur toute la surface, lorsqu'il y a une étape expérimentale à accomplir suite à l'immobilisation, où une seconde couche de dépôt devra être ajoutée (les fragments cibles).

6.7. HYBRIDATION DES FRAGMENTS CIBLES AVEC OLIGOMÈRES IMMOBILISÉS SUR SURFACES

S'il y a lieu, l'hybridation se fait par la déposition des fragments cibles dans les même quantités et conditions que celles énoncées pour l'immobilisation.

6.8. RÉVÉLATION DE LA RADIOACTIVITÉ

Pour la quantification des taux de radioactivité présent au niveau des dépôts, révélateur de la présence des oligomères d'intérêt, les lames sur lesquelles les dépôts ont été faits ont servi a exposer des plaques d'imagerie au phosphore elles-mêmes lues ensuite au Typhoon FLA 9500. Les intensités de marquages ont été quantifiées en utilisant le logiciel ImageJ.

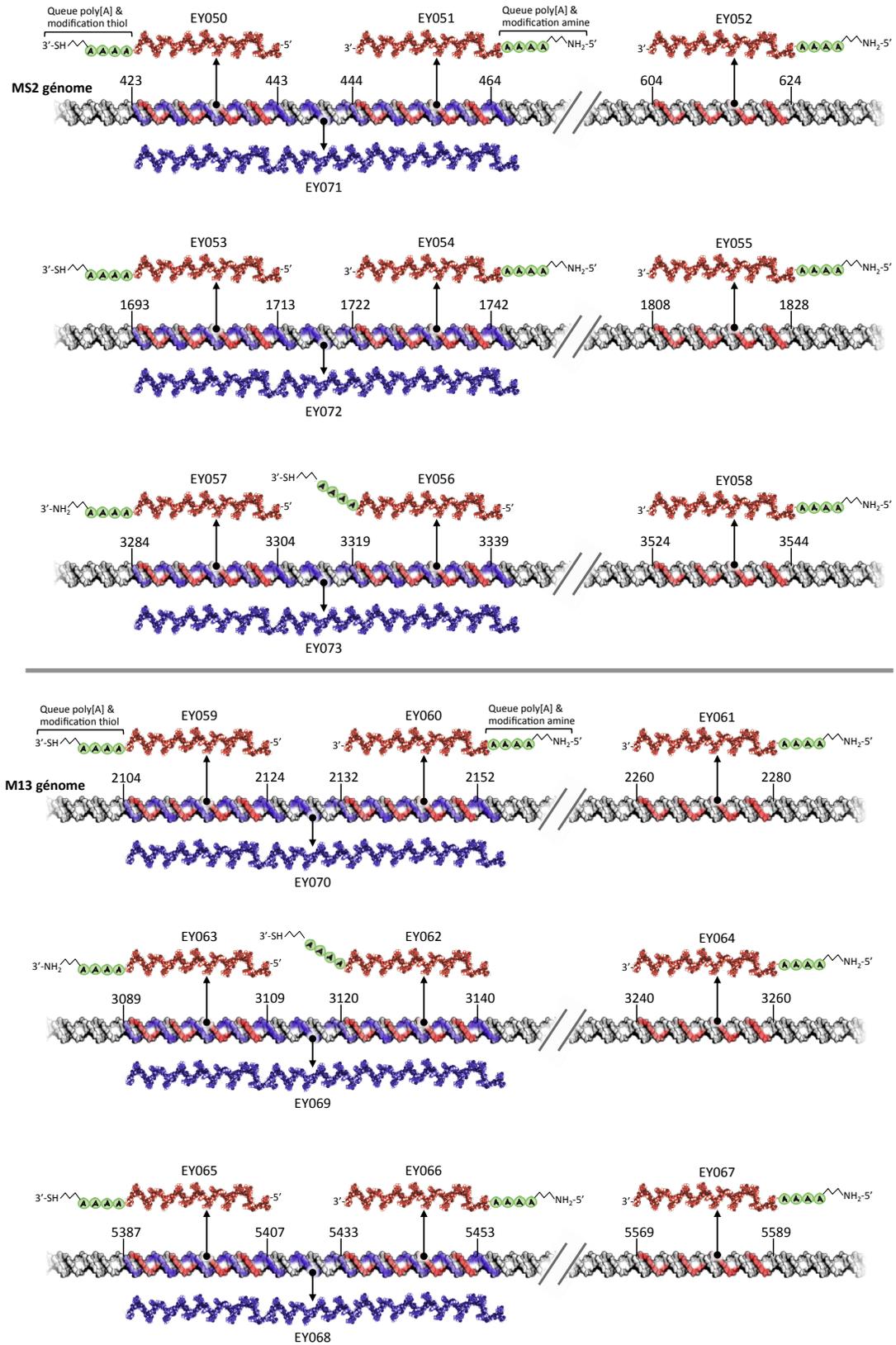
7 RÉSULTATS

Les résultats sont présentés dans l'ordre chronologique de leur obtention, suivis des interprétations et, pour certains, suivis également des explications des raisons ayant poussé à procéder à l'étape suivante.

7.1. LE DESIGN DES OLIGOMÈRES

Nous avons décidé d'essayer deux types de schéma d'interaction en sandwich avec un premier cas où les sites d'hybridation des oligomères de capture et signal sur le génome cible sont séparés l'un de l'autre d'une distance d'environ une dizaine de nucléotides et un deuxième cas où cette distance est de l'ordre d'une centaine de nucléotides (**Fig. 24**). Dans ce but, pour un oligomère de capture nous avons fait des designs de deux oligomères signaux différents, l'un rapproché et l'autre éloigné (**Fig. 27**). Le design des oligomères a été fait en utilisant le logiciel en ligne Oligowalk [69] permettant de classer les meilleurs sites d'hybridation disponibles sur une séquence soumise au logiciel selon les caractéristiques thermodynamiques de chacun des sites proposés. Parmi les sites proposés, nous avons choisi ceux qui ont un pointage élevé (selon l'algorithme du logiciel utilisé) et se situant à des distances d'environ 10 et 100 nucléotides d'autres sites également à haut pointage. Des triplets de sites d'hybridations pour trois régions différentes des génomes de MS2 et M13, soit un total de 18 sites d'hybridations, ont ainsi été sélectionnés. Les sites sélectionnés sont représentés selon leur pointage et caractéristiques thermodynamiques calculées par Oligowalk dans le **tableau 6**, et leur positions sur les génomes cibles sont représentées en **figure 27**. Cette dernière figure montre également les oligonucléotides synthétiques (EY068-EY073) représentant certains fragments des génomes de MS2 et M13 qui ont été utilisés dans nos travaux de mise au point du procédé.

Figure 27 : Représentation des designs d'oligomères et de leur hybridation sur des génomes cibles



Légende de la figure 27 : Les triplets d'oligomères sélectionnés pour opérer ensemble (comme représenté sur Fig. 24) sont représentés sur une même ligne. Les oligomères en rouge sont les oligomères capture (si modification aminée) ou signal (si modification thiol) et leur site d'hybridation est représenté également en rouge sur le génome cible avec les indications chiffrées indiquant leur positionnement sur le génome. En mauve sont représentés les oligomères synthétiques commandés pour être utilisés dans certaines de nos expériences en tant que fragment représentatif de certaines régions du génome auquel ils correspondent, zone bleu sur les génomes. Ce même code de couleur est utilisé dans la figure 24, où la fonction envisagée pour chaque oligomère est schématisée. Les identifiants (commençant par les lettres EY) de chaque oligomère sont indiqués au-dessus ou au-dessous de ceux-ci. Les choix des positions des modifications thiol et amine ont été faites en considérant les critères suivants: i) on a favorisé les modifications en 3' pour permettre le marquage radioactif en 5'. ii) Pour les oligomères dont les sites d'hybridation sur la séquence cible sont très rapprochés, nous avons positionné les modifications de façon à limiter l'encombrement au niveau des sites d'hybridation.,iii) La modification thiol en 3' a été préférée à celle en 5' pour son coût moins élevé.

Table 6 : Sélection de séquences d'hybridation sur génomes cibles à partir des résultats d'Oligowalk

Classement selon pointage (sur 464)	Nom de l'oligomère	Position	Séquence (5'→3')	Overall kcal/mol	DTPlex kcal/mol	Tm-DTp degC	Break-targ. kcal/mol	Intraoligo kcal/mol	Interoligo kcal/mol	End_diff kcal/mol	prefilter_score
1	EY056	3318	ACTCCGAAGTGGGTATAACGC	-29.2	-38.1	88.5	-4.9	-3.4	-15.8	1.63	6
2	EY050	422	AAGAGGCTGAGCAGGAGCGT	-28.8	-42.3	94.2	-9.3	-3.6	-16.3	0.86	6
3	EY053	1692	AGTTTGTGGATTGCTGAGG	-27.3	-38.9	88.9	-7	-1.9	-17.4	1.63	6
36	EY051	443	GTCAAAGTTTTGGCTTACAGGG	-24.6	-36.6	86.8	-8.1	-2.9	-15.9	0.57	6
39	EY055	1807	ATTTCGAGAAAAGATCGCA	-24.5	-34.4	81.9	-6.2	-3.4	-15.2	0.8	7
105	EY052	603	AGTGTACGCCTTCCAGGCGC	-22.4	-42.4	93.4	-15.5	-3.8	-17	1.79	6
133	EY057	3283	TTATGCTGTCGGTGATTCA	-21.9	-35.5	84.2	-10.2	-2	-15	0.73	7
376	EY058	3523	GTTACCAAATCGGGAGAATCC	-16.2	-36.8	85.1	-18.1	-2.2	-12.6	0.57	7
407	EY054	1721	AATGGCCGGGCTCTTAGTA	-14.6	-37.4	88.9	-16.3	-1.8	-21.1	0.4	6
Classement (sur 1682)											
6	EY067	5569	AGAAAGCGAAAAGCGGGCG	-31.8	-41.9	93	-7.1	-2	-14	0.73	6
11	EY065	5387	AGGGATTTAGACAGGAACGG	-31.4	-37	87	-4.4	-0.1	-10.4	1.63	6
15	EY062	3120	AATAGCAGCTTTACAGAG	-31.2	-35.7	85.6	-2.9	-0.6	-11.4	1.6	7
17	EY059	2104	AGTTTTAACGGGTCAGTGCC	-31	-38.9	90.4	-5.6	-1.4	-12.7	1.63	6
46	EY061	2260	ATTGACAGAGGTTGAGGCGAG	-29.3	-40	89.8	-8.3	-1.5	-12.8	1.43	6
124	EY063	3089	AAACAGGGAAGCCATTAGAC	-27.6	-36.9	87	-5.8	0	-15.1	1.76	6
130	EY060	2132	TTGATACAGGAGTGTACT	-27.5	-34.6	83.7	-4.7	-2.2	-12.4	0.7	6
503	EY064	3240	ATCTTACCAACGCTAACGAGC	-24.2	-36.5	86.6	-9.9	-1.2	-13	2.32	7
528	EY066	5433	TTTCTCGTTGGAAATCAGAGC	-24.1	-37.2	85.9	-9.1	-4	-14.6	2.49	6

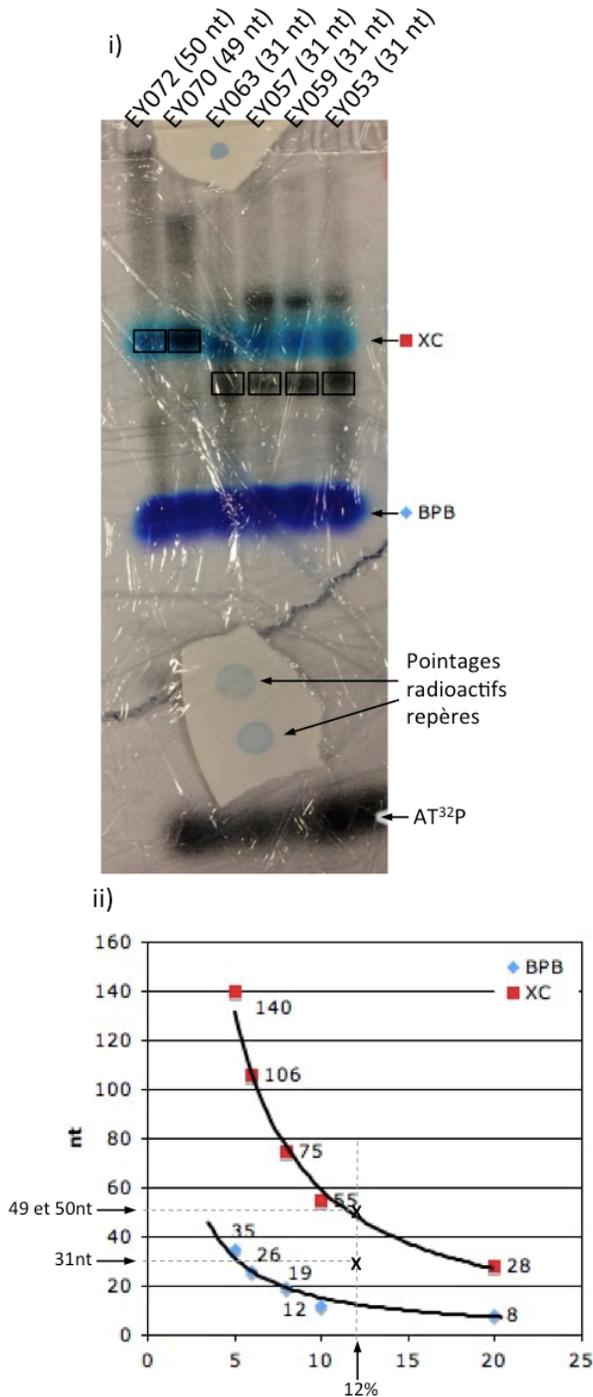
Les séquences sélectionnées parmi la liste proposée par le logiciel Oligowalk pour le design des oligomères utilisés sont listés dans ce tableau, avec en haut les séquences pour le génome de MS2 et en bas pour le génome de M13. Ces séquences correspondent aux séquences des zones d'hybridation, auxquelles seront ajoutées les espaceurs et modifications adéquates (cf. Fig. 28). Les séquences qui ont servi au design d'oligomères constituant un triplet qui servira sur la même région du génome (Fig. 28) sont surlignées par la même couleur. La colonne de gauche des tableaux indique le classement de la séquence sélectionnée dans la liste initiale proposée par le logiciel Oligowalk, où les séquences sont classées selon un système de pointage basé sur les caractéristiques thermodynamiques de l'hybridation entre la séquence et sa cible. Le détail de ce pointage est listé dans la partie droite du tableau. Le système de pointage est expliqué en détail sur ce lien: <http://rna.urmc.rochester.edu/servers/oligowalk2/help.html>

7.2. TEST D'IMMOBILISATION D'OLIGOMÈRES SIMPLE BRIN PAR LA MÉTHODE DU TESPSA

Pour évaluer son efficacité, nous avons utilisé la méthode du TESPSA pour immobiliser sur surface de silice (lames de verre) des oligomères amino-modifiés en 3' et radioactivement marqués en 5'. Avant d'étendre les tests au 18 sites sélectionnés, nous avons choisi d'utiliser quelques exemples d'oligomères en plus de différents contrôles (dépourvus de modification amine).

Plusieurs répétitions de cette expérience ont été effectuées en utilisant notamment l'oligomère EY063 (et EY057 pour un des tests) en raison de la présence d'une modification amine sur cet oligomère permettant la réaction avec la surface activée au TESPSA et la position de cette modification en extrémité 3' de l'oligomère ne risquant pas d'interférer avec le marquage radioactif effectué en utilisant la T4 PNK qui agit ajoute un phosphate ^{32}P en position alpha sur le groupement hydroxyle 5'. Une raison supplémentaire importante à l'utilisation de l'oligomère EY063 est que l'oligomère EY057 donne une seconde bande inattendue lorsqu'il a été mis en migration sur gel acrylamide pour la purification post-marquage radioactif (**Fig. 28**). Cette bande pourrait être indicatrice d'un événement de dimérisation de l'oligomère susceptible d'interférer avec la réactivité de l'oligomère avec la surface de silice activée.

Figure 28 : Isolation par électrophorèse sur gel des oligomères marqué radioactivement

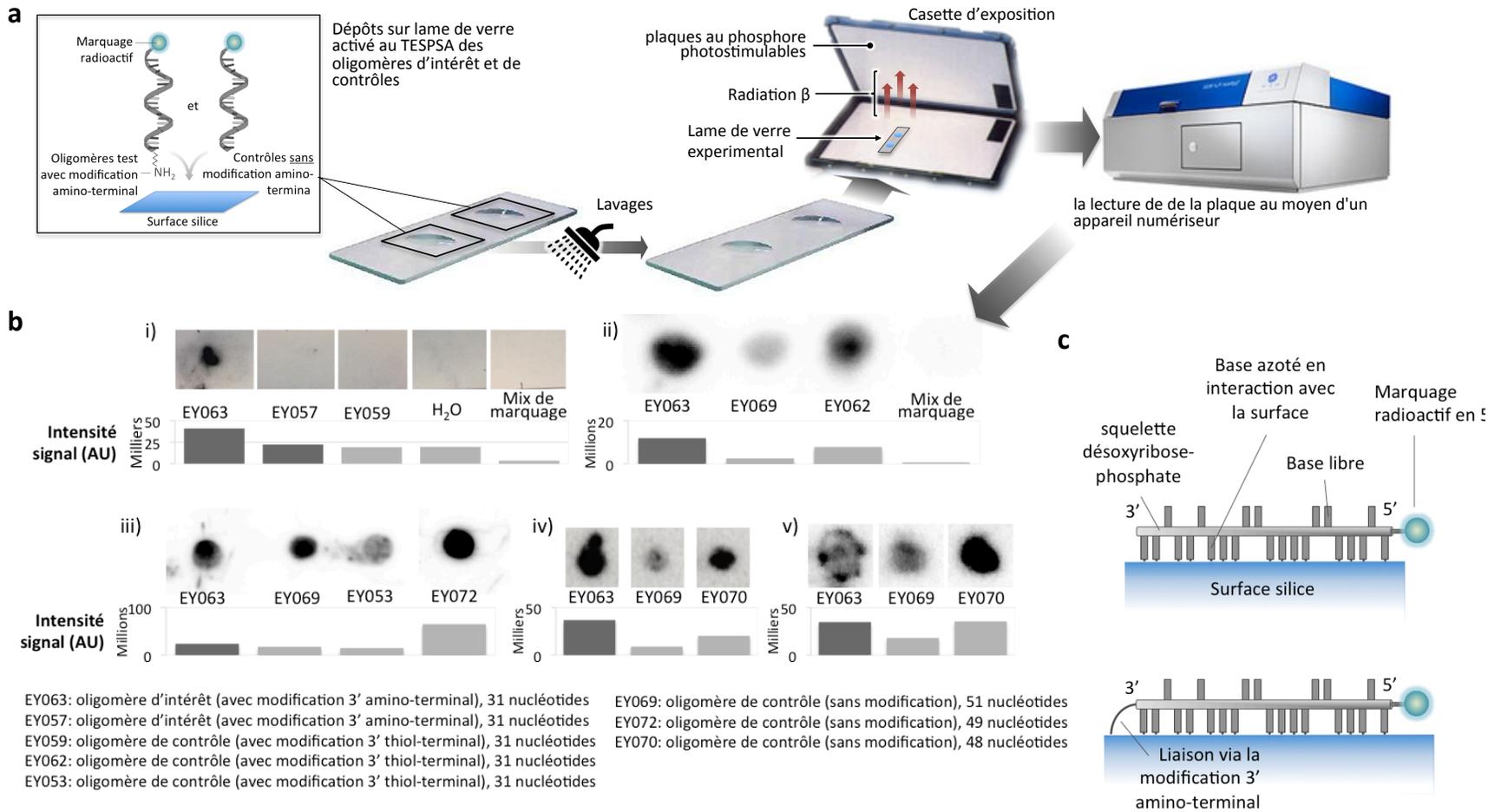


i) Image du gel de migration acrylamide 12% superposé à l'imprimé taille réel de la lecture des marquages radioactifs. Cette méthode permet de localiser les bandes d'oligomères radioactifs (non visibles à l'oeil nu) pour pouvoir les découper et en extraire les oligomères à purifier. Le bon alignement de l'imprimé de la lecture des marquages radioactifs avec le gel se fait grâce aux repères radioactifs qui sont également visibles à l'oeil nu (tâches bleues sur papier), avant son exposition dans la cassette de plaque de phosphore (cf. Fig. 29). Les sections du gel prélevées pour extraction sont encadrées en noir. Les positions des fronts de migration du xylène de cyanol (XC) et du bleu de bromophénol (BPB) sont également représentées. On observe également au bas du gel des bandes radioactives qui correspondent au $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ en excès utilisé pour faire le marquage. Cette procédure de purification est d'ailleurs faite dans l'objectif de se défaire de cet excès de AT^{32}P . En ii), se trouve au point de croisement des lignes en pointillé les positions hypothétiques des fragments d'oligonucléotides simples brins de 31, 49 et 50 nt de long (tailles des différents oligomères purifiés dans ce gel) dans un gel de 12%, relativement aux position du XC et BPB. Ces positions correspondent à ce qui est observé en i).

Le principe du test effectué a consisté, comme représenté en **figure 29-a**, à premièrement faire sur lame de verre activée au TESPSA les dépôts séparément des oligomères d'intérêt et de contrôles. Après incubation, les surfaces de lame de verre ont été lavées afin de se défaire des oligomères non immobilisés sur la surface. Ensuite la révélation de la radioactivité émise par les oligomères (d'intérêt ou de contrôle) aux niveaux des zones de dépôt a permis de mettre en évidence l'immobilisation de ces derniers. Le but était de comparer le signal radioactif obtenu aux zones d'immobilisation des oligomères testés avec les signaux obtenus avec divers oligomères contrôles n'ayant pas de modification amine à leurs extrémités (divers types de contrôles: sans modification, modification thiol, de tailles et séquences variés).

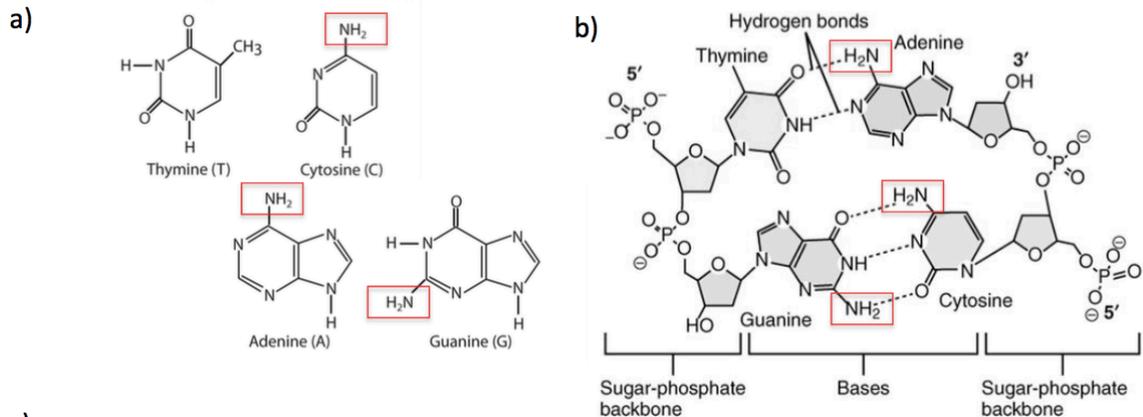
Les résultats obtenus (**Fig. 29-b**) ont montré qu'un signal significatif était obtenu systématiquement avec l'oligomère EY063 lors de chacun des tests effectués, suggérant que l'immobilisation de ces oligomères sur la surface de silice activée avec le TESPSA est effective. Cependant, différents oligomères contrôles n'ayant pas de modification amine à leur extrémité ont également donné des résultats semblables. D'un autre côté, l'absence de signaux avec les autres contrôles, notamment les contrôles où le mix de marquage contenant du [γ -³²P]-ATP a été déposé sur les surfaces de silice activées, indiquent que les signaux observés impliquent la présence d'oligomères marqués. Également, l'absence de signal au niveau des contrôles où les oligomères EY063 sont déposés subséquentement à une incubation au H₂O de la surface active, indique que les signaux positifs observés au niveau de certains essais sont vraisemblablement le produit d'une réaction impliquant le groupement anhydride succinique (**Fig. 25**) de la surface activée, dont la passivation survient au contact de l'eau [63]. Ensembles, ces données suggèrent que l'immobilisation fonctionne efficacement, mais en impliquant également d'autres groupements chimiques présents dans les oligomères en plus des modifications amino-terminales. Les groupements aminés présents sur les bases azotées peuvent être à l'origine de ces interactions de la chaîne latérale des oligomères avec la surface. Basée sur le fait que diverses publications utilisent des oligonucléotides modifiés avec un groupement amino-terminal lors de procédés semblables d'immobilisation sur des surfaces activées par des fonctions silanes, notre présomption, selon laquelle seul le groupement NH₂ de la modification amino-terminale au bout d'une longue chaîne carbonée serait actif et que les NH₂ des bases azotées ne le seraient pas, semble fautive. Les groupements aminés des bases azotées (**Fig.30**) semblent interagir fortement au vu des résultats avec les surfaces silice activées, comme représenté dans les schémas d'interprétation de la **figure 29**.

Figure 29 : Test d'immobilisation d'oligomères simple brin par la méthode du TESPSA.



Légende figure 29 : a) Schéma récapitulatif du principe expérimental employé, illustrant la déposition sur lame de verre activée au TESPSPA séparément des oligomères d'intérêt et de contrôles, la mise en cassette d'exposition de cette préparation, le marquage par les irradiations β de la plaque phosphore et finalement la lecture de cette plaque dans un scanner adapté. b) Résultats obtenus par le procédé schématisé en a), lors de cinq expériences différentes où les marquages obtenus par les dépôts des oligomères d'intérêt EY063 et EY057 (EY057 utilisé uniquement pour l'expérience i)) ont été comparées à ceux obtenus au niveaux de dépôts de différents oligomères contrôles, dont les particularités sont indiquées en légende de figure. Les histogrammes représentent l'intensité du signal, calculée par le logiciel ImageJ, qui correspond à chaque marquage. Les barres en gris foncées représentent l'intensité obtenue pour les oligomères d'intérêt et les barres en gris clair l'intensité obtenue pour les oligomères contrôles. Par ailleurs, ayant pu voir lors de l'expérience i) avec le contrôle 'mix de marquage' contenant l'enzyme T4 PNK, son tampon et l' $AT^{32}P$, qu'il n'y avait de radioactivité et donc pas d'immobilisation de l' $AT^{32}P$, nous avons décidé pour le restant des expériences (de ii) à v)) de ne pas faire de purification post-marquage radioactif. c) Représentation des interprétations des résultats obtenus. Le schéma du haut illustre un oligomère contrôle n'ayant pas de modification amino-terminale, mais tout de même immobilisé sur la surface de silice via les bases azotées. Le schéma du bas représente les oligomères d'intérêt ayant une modification amino-terminale par laquelle une conjugaison avec la surface de silice serait établie en plus de celles dues aux bases azotées. Ces dernières conjugaisons via les bases azotées confèrent à l'oligomère une position 'couchée' sur la surface de silice au lieu d'une position debout comme envisagée (cf. Fig. 24) risquant de limiter la capacité de l'oligomère à interagir avec sa cible

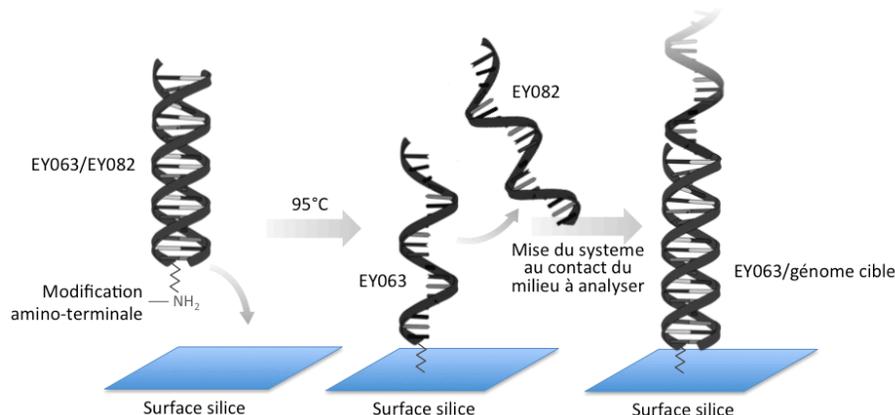
Figure 30 : Groupements amines des bases azotées



7.2.1 En utilisant des oligomères double brin

Pour remédier à l'apparente interaction (au vue des résultats décrits précédemment) des bases azotées avec la surface de silice activée, nous avons essayé d'immobiliser des oligomères double brin où les groupements amines des bases, suspectés d'être à l'origine de ces interactions, seraient obstrués par le brin complémentaire. Théoriquement, l'implication de ces groupements amines des bases azotées dans des liaisons hydrogène avec les bases azotées du brin complémentaire (**Fig.30**) devrait réduire leur capacité à entrer en réaction avec la surface de silice activée. Nous espérons ainsi empêcher ces interactions entre les bases azotées et la surface de silice qui provoquerait une posture de nos oligomères non-adaptée à la fonction souhaitée de capture. En fait, l'immobilisation observée précédemment des oligomères contrôles n'est pas un problème en soit, puisque la surface est inactivée lors l'immobilisation de l'oligomère en solution aqueuse (**Fig.25**). Il suffit de s'assurer d'avoir une solution d'oligomère pure pour garantir une immobilisation exclusive de la surface par un oligomère donné. Toutefois, les résultats obtenus avec les oligomères contrôles sont problématiques car ils suggèrent que les bases azotés par leur capacité d'interagir avec la surface provoqueraient une "posture couchée" de l'oligomère ainsi figé, se traduisant par une inaccessibilité de l'oligomère pour sa cible. Ceci signifie que l'oligomère ainsi immobilisé ne sera pas capable d'interagir avec sa cible puisque les bases nucléotidiques censées opérer dans la reconnaissance par complémentarité avec la cible sont déjà prises dans des interactions avec la surface de silice.

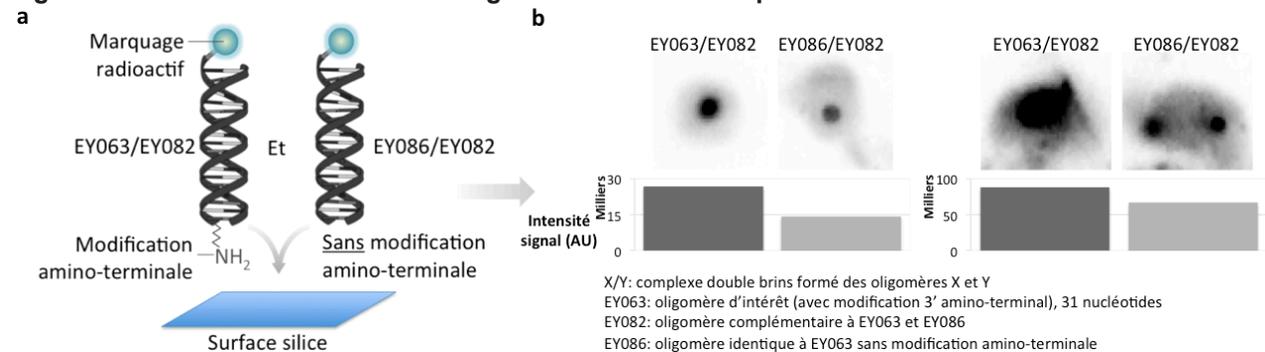
Figure 31 : Schématisation des étapes nécessaires à l'obtention d'un système capable de détection par l'approche d'immobilisation d'oligomères double brin



Nous avons donc voulu voir si en immobilisant des oligomères sous une forme double brin nous étions capables de remédier à ce problème. Une fois l'immobilisation réalisée, il sera ensuite possible de se défaire du brin complémentaire dans le but d'avoir un oligomère capable d'interagir avec les oligonucléotides du milieu qu'il est supposé détecter (**Fig.31**). Pour vérifier si

cette approche permet d'avoir une immobilisation comme souhaitée (impliquant seulement les modifications amino-terminales) nous avons effectué des tests comparant des oligomères double brin ayant un de leur brin possédant une modification amino-terminale avec des oligomères double brin contrôles sans aucune modifications. L'oligomère EY063 a encore été le principal modèle utilisé. Nous avons hybridé EY063 avec un oligomère, EY082, complémentaire à la totalité de sa séquence (y compris la queue poly[A]). Pour constituer l'oligomère double brin contrôle nous avons hybridé EY082 avec une version de EY063 sans modification amino-terminale, EY086. Les résultats obtenus (**Fig.32**) ont permis de mettre en évidence une certaine différence reproductible, avec un marquage radioactif inférieur au niveau des dépôts des oligomères double brin contrôles en comparaison aux dépôt des oligomères double brin ayant une modification amino-terminale. Cela suggère que l'approche a permis dans une certaine mesure de diminuer l'interaction des bases azotées avec la surface de silice activée, sans pour autant pouvoir la prévenir entièrement.

Figure 32 : Test d'immobilisation d'oligomères double brin par la méthode du TESPSA



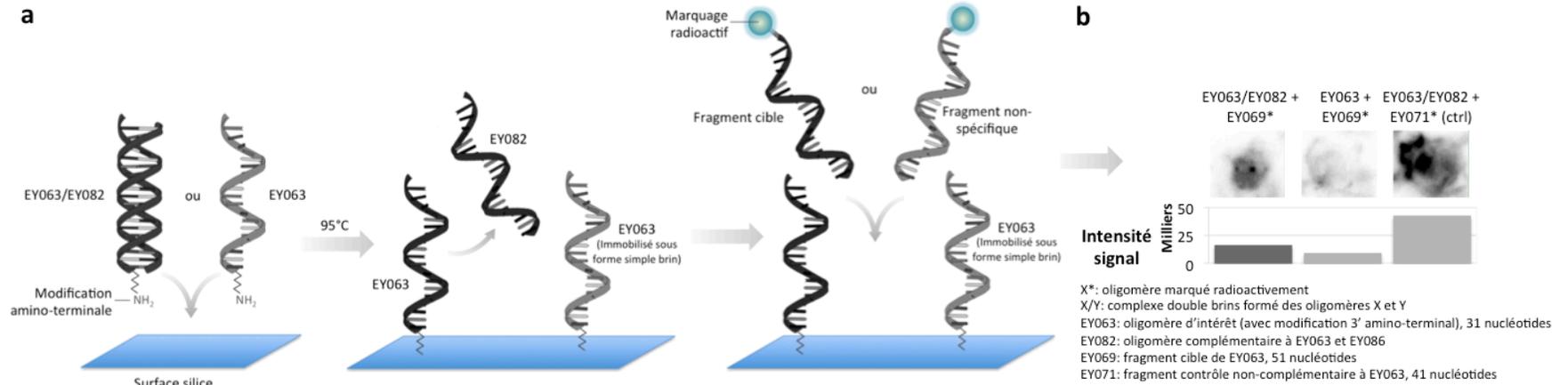
a) Schéma récapitulatif du principe expérimental employé. b) Résultats obtenus par le procédé schématisé en a), lors de deux expériences différentes où les marquages obtenus par les dépôts des oligomères double brin d'intérêt EY063/EY082 ont été comparés à ceux obtenus pour les dépôts des oligomères contrôles (EY086/EY082). Les histogrammes représentent l'intensité du signal, calculé par le logiciel ImageJ, qui correspond à chaque marquage. Les barres en gris foncé représentent l'intensité obtenue pour les oligomères d'intérêt et les barres en gris clair l'intensité obtenue pour les oligomères contrôles.

7.3. TEST DE FONCTIONNALITÉ DES OLIGOMÈRES IMMOBILISÉS AVEC LA MÉTHODE TESPSA

En ayant vu précédemment que l'utilisation des oligomères double brin semble réduire l'interaction des bases azotées avec la surface de silice, nous avons décidé qu'il valait la peine de tester la capacité des oligomères immobilisés sous forme double brin (défait ensuite du brin complémentaire comme schématisé **figure 33**) à capturer leur cible. Pour cela nous avons utilisé des surfaces de silice où préalablement des oligomères double brin non marqués (froids) ont été immobilisés et ensuite défait du brin complémentaire. Nous avons déposé des solutions d'ADN simple brin cible marqué radioactivement sur ces surfaces (**Fig.33-a**). Nous avons ensuite évalué les taux d'oligomères cibles capturés par ces préparations. Nous avons utilisé des contrôles où des oligomères ont été immobilisés sous forme simple brin et des contrôles où les incubations ont été faites avec des fragments non spécifiques marqués.

Les résultats obtenus (**Fig.33-b**) appuient ce qui a été suggéré par les résultats de l'expérience précédente, à savoir qu'il y a une réduction de l'interaction des bases azotées avec la surface lorsque l'oligomère est immobilisé sous forme double brin. Ceci se traduit dans cette expérience par une capture nettement plus efficace des fragments cibles par EY063 immobilisé sous sa forme double brin (puis défait du brin complémentaire) en comparaison avec EY063 immobilisé sous sa forme simple brin. Par contre, on observe un marquage toujours très prononcé suite à l'incubation avec le fragment contrôle non-complémentaire à EY063. Il semblerait donc que les conditions employées sont hautement propices à des hybridations non-spécifiques. En effet cette étape étant effectuée à température ambiante, il y a de forte probabilité d'avoir des hybridations non-spécifiques. Toutefois l'hybridation au niveau des essais où la complémentarité entre les oligonucléotides est totale devrait être supérieure à celle observée au niveau des contrôles où la complémentarité entre les brins est très limitée. Pourtant on observe un signal très similaire (voire plus fort) au niveau du contrôle négatif lors de cette expérience. L'explication à ceci peut résider dans le fait que l'intensité des marquages radioactifs soient différents pour les séquences EY071 et EY069 et que cela affecte la comparaison sur une base quantitative puisqu'il n'y a pas de contrôle interne pour normaliser.

Figure 33 : Test de fonctionnalité sur oligomères immobilisés sous forme double brin par la méthode du TESPSPA

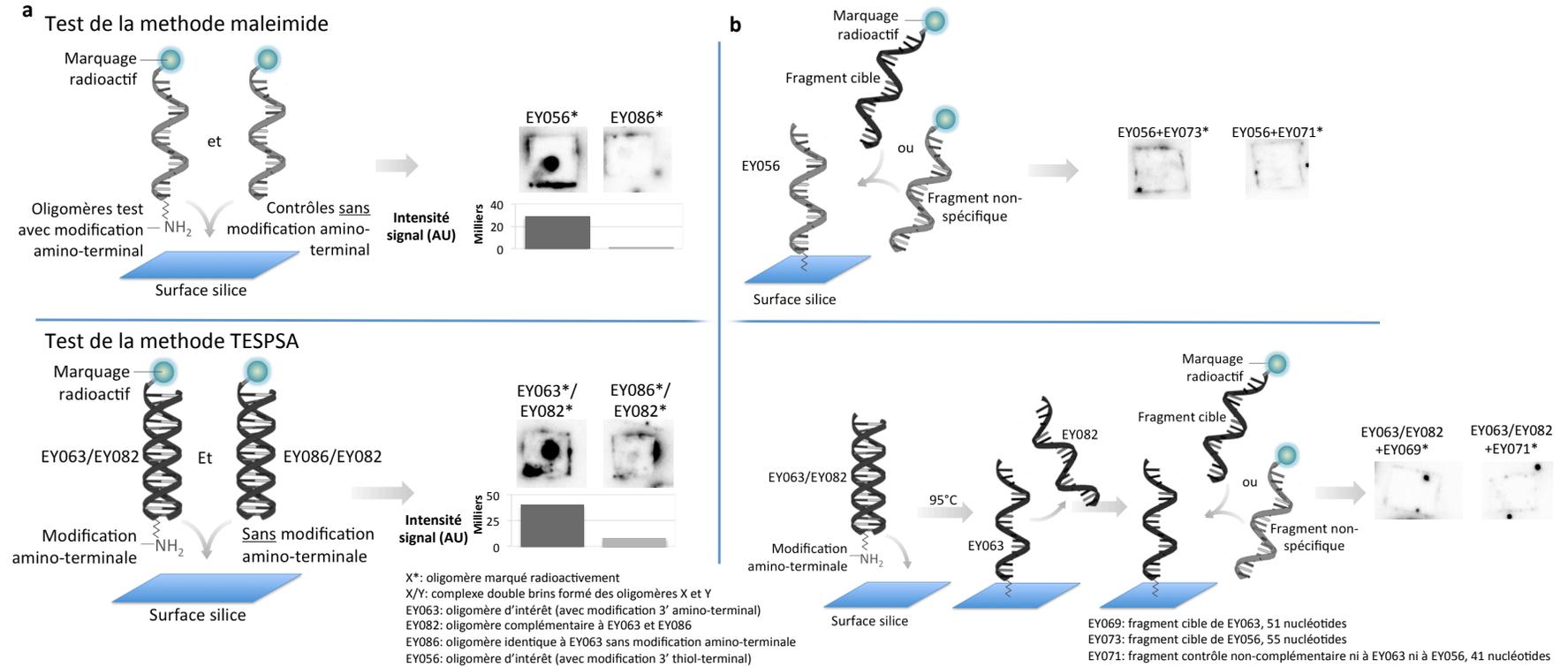


a) Schéma récapitulatif du principe expérimental employé. b) Résultats obtenus par le procédé schématisé en a). Les histogrammes représentent l'intensité du signal, calculé par le logiciel ImageJ, qui correspond à chaque marquage. Les barres en gris foncé représentent l'intensité obtenue pour les oligomères d'intérêt et les barres en gris clair l'intensité obtenue pour les oligomères contrôles.

7.4. NOUVELLE MÉTHODE CHIMIQUE POUR LA FONCTIONNALISATION DES SURFACES DE SILICE

Comme les réactions des bases azotées continuent apparemment à être un problème même en faisant l'immobilisation avec des oligomères double brin, nous avons décidé d'essayer d'autres méthodes chimiques qui permettraient éventuellement d'immobiliser nos oligomères spécifiquement par les groupements ajoutés à leur extrémité. Avec les conseils de Mehdi Haghdoost, nous avons adopté une méthode d'immobilisation en utilisant les maléimides pour fonctionnaliser les surfaces de silice pour les rendre réactives au groupement thiol. Mehdi a également préparé des lames de verre activées avec la méthode du TESPSA, en appliquant un protocole fidèle à celui de Gang *et al.* (auteur de la méthode) lequel nous avons dû adapter à l'équipement de notre laboratoire lors de nos essais. Les résultats des tests d'immobilisation fait avec les oligomères EY056 (ayant une modification thiol en 3', cf. **Fig.27**) avec la méthode du maléimide ont donné de bons résultats, avec un signal radioactif très net et supérieur au signal quasi nul observé au niveau du contrôle où un oligomère sans modification, EY086, a été déposé sur lame chimiquement activée (**Fig.34-a**). L'application par Mehdi de la méthode du TESPSA a également donné des résultats nettement améliorés en comparaison avec les expériences précédentes, le signal obtenu par l'immobilisation des oligomères double brin EY063/EY082 était également nettement supérieur à celui observé au niveau du dépôt contrôles d'oligomères double brin sans modification (EY086/EY082). Toutefois, les essais de capture d'ADN cible n'ont été un succès pour aucune des deux méthodes (**Fig.34-b**)

Figure 34 : Essai de la méthode maléimide et comparaison avec la méthode TESPSA



a) Tests d'immobilisation en haut avec la méthode maléimide et en bas la méthode TESPSA. b) Tests de fonctionnalité des oligomères immobilisés en haut avec la méthode maléimide et en bas la méthode TESPSA. Aussi bien pour a) que pour b) figurent les schémas récapitulatifs des principes expérimentaux employés et les résultats obtenus par les procédés schématisés. Les histogrammes représentent l'intensité du signal, calculé par le logiciel ImageJ, qui correspond à chaque marquage. Les barres en gris foncé représentent l'intensité obtenue pour les oligomères d'intérêt et les barres en gris clair l'intensité obtenue pour les oligomères contrôles.

8 DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Plus que le choix de la méthode, la façon dont celle-ci a été appliquée semble avoir affecté les résultats obtenus puisque la même méthode du TESPSA employée par la suite de manière plus fidèle à l'article d'origine (Gang *et al.*) a donné des résultats très différents de ceux obtenus initialement. Les modifications apportées au protocole de Gang *et al.* par Fatma Khalfaoui, qui avait produit des résultats prometteurs sur lesquels nous nous sommes basés pour continuer sur la même stratégie, semblent affecter la chimie de l'immobilisation. La différence flagrante des résultats obtenus par Mehdi Haghdoost, et ceux issus de notre protocole initial modifié selon nos moyens techniques indiquent que le protocole modifié [68] est la raison des réactions non-voulues entre certains groupements des oligomères et la surface de silice, comme vus dans les résultats. En effet, la différence de marquage observé entre les contrôles et les essais est nettement supérieure avec les lames fonctionnalisées par la procédure de Mehdi en comparaison à nos expériences précédentes. Sur les lames fonctionnalisées au TESPSA par Mehdi, on observe une quasi absence d'interactions pour les essais contrôles lors de l'utilisation d'oligonucléotides double brins. Ce qui suggère que les interactions observées pour les mêmes contrôles lors de l'utilisation des lames fonctionnalisées par la procédure préalable sont peut-être dues aux formations d'autres complexes réactifs (dus notamment à l'utilisation du TESPSA en solution avec l'acide acétique et l'éthanol, à la différence du protocole de Gang *et al.* où du TESPSA pur est utilisé) capable d'interagir avec divers groupements présents dans les oligonucléotides.

Le cheminement de recherche de solutions aux problèmes vraisemblablement engendrés par la version du protocole que nous avons initialement appliquée, nous a permis au final de disposer de deux méthodes différentes efficaces pour l'immobilisation d'oligomères sur surface de silice. Qu'il s'agisse de la méthode du TESPSA ou du maléimide, les résultats finaux ont montré que nous sommes capables avec ces méthodes de fixer efficacement les oligomères sur des surfaces représentatives des fibres optiques. Plus important, les résultats obtenus avec les contrôles, lors des dernières expériences, montrent que les immobilisations sont réalisées spécifiquement via les groupements des modifications ajoutées aux extrémités des oligomères. Ceci est primordial pour que les oligomères immobilisés puissent avoir la capacité d'interagir avec leur cible, puisque que cette interaction se base sur la complémentarité des bases azotées de cet oligomère de capture et de sa cible et exige la disponibilité de l'ensemble des bases azotées. Autrement dit, comme vue avec les expériences initiales, l'implication de ces bases

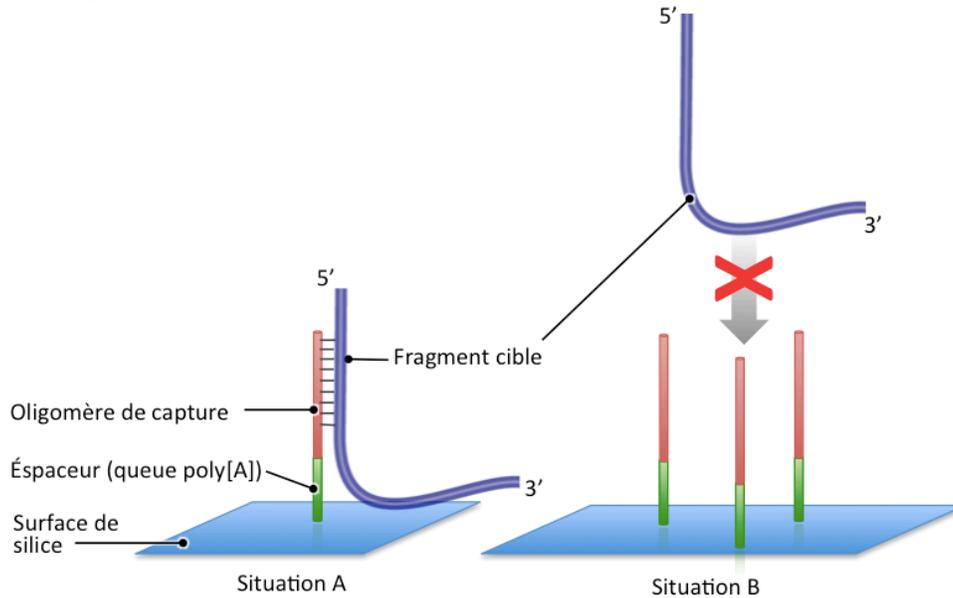
azotées dans des interactions avec la surface nuit au déroulement de la capture de l'ADN cible par l'oligomère capture ou risque de réduire la spécificité de cet évènement.

En dépit des résultats répondant parfaitement aux attentes pour les tests d'immobilisation, les derniers tests concernant la fonctionnalité des oligomères immobilisés avec les deux méthodes chimiques, n'ont pas donné les résultats attendus. Des calculs effectués, en considérant le diamètre d'un oligomère [70] et l'espace sur lequel ces oligomères ont été déposés, montrent que si les réactions d'immobilisation ont une efficacité élevée, les concentrations d'oligomères utilisées mèneraient à une saturation de la surface de silice qui pourrait expliquer les résultats obtenus. Un recouvrement de la surface avec des oligomères très rapprochés les uns aux autres pourrait provoquer un encombrement stérique empêchant les interactions avec les fragments cibles. De nouvelles préparations pour effectuer des tests avec des concentrations réduites d'oligomères immobilisés sont en cours de préparation actuellement. Cette éventualité d'une saturation de la surface par les oligomères ramène la question de comment des résultats suggérant une capture des fragments cibles ont tout de même été observés avec les premiers tests de la méthode du TESPSA où des concentrations identiques d'oligomères ont été utilisés. La réponse à cette question pourrait résider dans l'imperfection évoquée précédemment du protocole appliqué initialement qui aurait pu mener à une immobilisation hétérogène de la surface, créant des zones moins 'encombrées'.

Les tests à venir prendront en considération également le fait que l'absence d'une concentration élevée en sels dans le tampon d'hybridation ait pu être la raison des résultats observés lors des derniers tests de fonctionnalité. En effet, Traeger. *et al.* [71] ont montré que l'influence de la concentration en sel lors de réaction d'hybridation entre oligonucléotides est d'autant plus importante lorsque l'une des deux parties est immobilisée (en notant que la présence de sel dans le milieu d'hybridation dans un contexte où aucun des oligonucléotides est immobilisé est également important). Cette étude a montré qu'avec une concentration en PBS augmentée 5 et 10 fois, les probabilités d'hybridation entre oligomères de 15 nt et sondes immobilisées étaient doublées et triplées respectivement.

Le schéma d'interaction est également un point sur lequel nous devons nous concentrer, puisque l'interaction entre l'oligomère EY056 et l'ADN cible EY073, que nous avons tenté d'établir dans nos tests de fonctionnalité, se heurte à certaines contraintes de design. La partie non complémentaire du fragment EY073 ne rentrant pas en interaction avec EY056 se retrouve en cas d'hybridation positionnée vers la surface de silice (**Fig.35**). Ceci provoque peut-être un autre type d'encombrement nuisant également à la capture du fragment.

Figure 35 : Représentation de l'encombrement stérique que peut créer l'existence d'une section non-hybridée dirigée vers la surface



La situation A représente le cas où l'espacement entre les oligomères immobilisés permet une interaction avec le fragment cible sans encombrement stérique. La situation B représente le cas où le rapprochement des oligomères immobilisés complique l'accession du fragment cible, notamment en raison de la non possibilité de la région 3' qui ne s'hybridera pas de trouver une place sans se heurter à une situation d'encombrement stérique.

Finalement, il serait utile de vérifier l'efficacité de la méthode utilisée pour se débarrasser du brin complémentaire lorsque les oligomères sont immobilisés sous leur forme double brin avec la méthode du TESPSA. Cette étape est cruciale pour le bon fonctionnement subséquent de la capture de la cible. Pour tester cela, au lieu de faire un marquage radioactif sur les deux brins des oligomères, on pourrait obtenir des complexes double brin marqués seulement sur le brin n'ayant pas la modification amino-terminale (brin duquel l'on souhaite se débarrasser), pour vérifier si la méthode employée permet de dénaturer le complexe qui se traduirait dans ce cas par la perte du signal radioactif.

D'autre part, la nécessité de l'utilisation d'oligomères double brin avec la dernière manière d'appliquer de la méthode du TESPSA est également à vérifier.

Répondre à ces quelques questions en suspens, permettra probablement de passer aux étapes suivantes consistant à :

- Valider et optimiser les conditions d'hybridation de la sonde signal pour l'obtention du schéma d'interaction en sandwich (**Fig. 24**).
- Mettre en épreuve la fonctionnalité du système et la détectabilité du signal sur plateforme fibre optique LPFG.

Ainsi cela permettra de finaliser la preuve de concept de la fonctionnalité de ce système de reconnaissance d'oligonucléotides sur surface de silice. Grâce à notre collaboration avec le Centre de Recherche en Photonique de l'UQO, nous espérons que dans un avenir proche ces travaux permettront le développement d'un outil de détection de génomes viraux et bactériens sur plateforme fibre optique.

9 RÉFÉRENCES

1. Québec, I.N.d.S.P.d. *Coliformes fécaux*. 2001-2018; Available from: <https://www.inspq.qc.ca/eau-potable/coliformes-fecaux>.
2. Mostafa, G.A.E., *Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides*. The Open Electrochemistry Journal, 2010. **2**(2): p. 22-42.
3. Cesarino, I., et al., *Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilised on a composite of polyaniline-carbon nanotubes*. Food Chem, 2012. **135**(3): p. 873-9.
4. Velasco-Garcia, M.N. and T. Mottram, *Biosensor Technology addressing Agricultural Problems*. Biosystems Engineering, 2003. **84**(1): p. 1-12.
5. Cock, L.S., A.M.Z. Arenas, and A.A. Aponte, *Use of Enzymatic Biosensors as Quality Indices: A Synopsis of Present and Future Trends in the Food Industry*. Chilean Journal of Agricultural Research, 2009. **69**(2): p. 270-280.
6. Long, F., A. Zhu, and H. Shi, *Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning*. Sensors (Basel), 2013. **13**(10): p. 13928-48.
7. Clark, L.C., Jr. and C. Lyons, *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*. Ann N Y Acad Sci, 1962. **102**: p. 29-45.
8. Lakhin, A.V., V.Z. Tarantul, and L.V. Gening, *Aptamers: Problems, Solutions and Prospects*. Acta Naturae, 2013. **5**(4): p. 34-43.
9. Ruigrok, V.J.B., et al., *Characterization of Aptamer-Protein Complexes by X-ray Crystallography and Alternative Approaches*. International Journal of Molecular Sciences, 2012. **13**(8): p. 10537-10552.
10. Pikovskaya, O., et al., *Structural principles of nucleoside selectivity in a 2'-deoxyguanosine riboswitch*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(10): p. 748-55.
11. Tuerk, C. and L. Gold, *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*. Science, 1990. **249**(4968): p. 505-10.
12. Hong, K.L. and L.J. Sooter, *Single-Stranded DNA Aptamers against Pathogens and Toxins: Identification and Biosensing Applications*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 419318.
13. Letsinger, R.I., et al., *Letter: Phosphite coupling procedure for generating internucleotide links*. J Am Chem Soc, 1975. **97**(11): p. 3278-9.
14. Tripathi, S.M., et al., *Long period grating based biosensor for the detection of Escherichia coli bacteria*. Biosens Bioelectron, 2012. **35**(1): p. 308-12.
15. Biraben, J.N., *Les hommes et la peste en France et dans les pays européens et méditerranéens: La peste dans l'histoire*. 1975: Mouton.
16. Persson, S., *Smallpox, Syphilis and Salvation: Medical Breakthroughs that Changed the World*. 2010: Exisle Publishing Pty Limited.
17. Evans, A.S. and P.S. Brachman, *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 2013: Springer US.
18. Anderson, L., *Global tuberculosis report 2015*. 2015, World Health Organization.
19. Gilles Delmas, N.J.d.S., Nathalie Pihier, François-Xavier Weill, Véronique Vaillant, Henriette de Valk, *Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008*, in *BEH (Bulletin épidémiologique hebdomadaire)*. 2010, Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France, Direction générale de l'alimentation, Paris, France, Centre national de référence des Salmonella, Institut Pasteur, Paris, France. p. 344-348.
20. MAPAQ, *BILAN - Toxi-infections alimentaires - 1er avril 2012 au 31 mars 2013*. 2013.
21. Forsstrom, B., et al., *Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121673.

22. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
23. Ku, T.H., et al., *Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing*. Sensors (Basel), 2015. **15**(7): p. 16281-313.
24. Davydova, A., et al., *Aptamers against pathogenic microorganisms*. Critical Reviews in Microbiology, 2016. **42**(6): p. 847-865.
25. Alizadeh, N., et al., *Aptamer-assisted novel technologies for detecting bacterial pathogens*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017. **93**: p. 737-745.
26. Baker, M., *1,500 scientists lift the lid on reproducibility*. Nature, 2016. **533**(7604): p. 452-4.
27. Begley, C.G. and L.M. Ellis, *Drug development: Raise standards for preclinical cancer research*. Nature, 2012. **483**(7391): p. 531-3.
28. Armstrong, G.L., J. Hollingsworth, and J.G. Morris, Jr., *Emerging foodborne pathogens: Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world*. Epidemiol Rev, 1996. **18**(1): p. 29-51.
29. Wadamori, Y., R. Gooneratne, and M.A. Hussain, *Outbreaks and factors influencing microbiological contamination of fresh produce*. J Sci Food Agric, 2017. **97**(5): p. 1396-1403.
30. Amraee, M., et al., *DNA aptamer identification and characterization for E. coli O157 detection using cell based SELEX method*. Anal Biochem, 2017. **536**: p. 36-44.
31. Burrs, S.L., et al., *A paper based graphene-nanocauliflower hybrid composite for point of care biosensing*. Biosens Bioelectron, 2016. **85**: p. 479-487.
32. Khang, J., et al., *Chemiluminescent aptasensor capable of rapidly quantifying Escherichia Coli O157:H7*. Talanta, 2016. **147**: p. 177-83.
33. Wu, W., et al., *A sensitive lateral flow biosensor for Escherichia coli O157:H7 detection based on aptamer mediated strand displacement amplification*. Anal Chim Acta, 2015. **861**: p. 62-8.
34. Bruno, J.G., *Application of DNA Aptamers and Quantum Dots to Lateral Flow Test Strips for Detection of Foodborne Pathogens with Improved Sensitivity versus Colloidal Gold*. Pathogens, 2014. **3**(2): p. 341-55.
35. Wu, W.H., et al., *Aptasensors for rapid detection of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium*. Nanoscale Res Lett, 2012. **7**(1): p. 658.
36. Wu, W., et al., *An aptamer-based biosensor for colorimetric detection of Escherichia coli O157:H7*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e48999.
37. Maeng, J.S., et al., *Rapid detection of food pathogens using RNA aptamers-immobilized slide*. J Nanosci Nanotechnol, 2012. **12**(7): p. 5138-42.
38. Lee, Y.J., et al., *In vitro selection of Escherichia coli O157:H7-specific RNA aptamer*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **417**(1): p. 414-20.
39. Kim, Y.S., et al., *Isolation and characterization of DNA aptamers against Escherichia coli using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach*. Anal Biochem, 2013. **436**(1): p. 22-8.
40. Turek, D., et al., *Molecular recognition of live methicillin-resistant staphylococcus aureus cells using DNA aptamers*. World J Transl Med, 2013. **2**(3): p. 67-74.
41. Chang, Y.C., et al., *Rapid single cell detection of Staphylococcus aureus by aptamer-conjugated gold nanoparticles*. Sci Rep, 2013. **3**: p. 1863.
42. Cao, X., et al., *Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(14): p. 4621-8.
43. !!! INVALID CITATION !!! [28].
44. Kim, B.C., et al., *UNIVERSAL NUCLEIC ACID APTAMERS FOR COMMONLY BINDING TO VARIOUS TYPES OF MICROORGANISMS AND METHOD OF PRODUCING THE SAME*, U.S.P. Application, Editor. 2015, KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

45. Wang, K.Y., et al., *Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011. **30**(2): p. 273-8.
46. White, R.J., A.A. Rowe, and K.W. Plaxco, *Re-engineering aptamers to support reagentless, self-reporting electrochemical sensors*. Analyst, 2010. **135**(3): p. 589-94.
47. Jin, B., et al., *Upconversion nanoparticles based FRET aptasensor for rapid and ultrasensitive bacteria detection*. Biosens Bioelectron, 2017. **90**: p. 525-533.
48. Guilbault, G.G. and J.G. Montalvo, Jr., *A urea-specific enzyme electrode*. J Am Chem Soc, 1969. **91**(8): p. 2164-5.
49. Yoo, E.H. and S.Y. Lee, *Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice*. Sensors, 2010. **10**(5): p. 4558-4576.
50. Schultz, J.S., *Optical sensor of plasma constituents*, U.S. Patent, Editor. 1982, The United States of America as represented by the Department of Health, (Washington, DC) USA.
51. Liedberg, B., C. Nylander, and I. Lundstrom, *Surface-Plasmon Resonance for Gas-Detection and Biosensing*. Sensors and Actuators, 1983. **4**(2): p. 299-304.
52. Vestergaard, M.C., et al., *Nanobiosensors and Nanobioanalyses*. 2015: Springer Japan.
53. Oh, B.K., et al., *The fabrication of protein chip based on surface plasmon resonance for detection of pathogens*. Biosens Bioelectron, 2005. **20**(9): p. 1847-50.
54. Taylor, A.D., et al., *Comparison of E. coli O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2005. **107**(1): p. 202-208.
55. Bae, Y.M., et al., *Detection of insulin-antibody binding on a solid surface using imaging ellipsometry*. Biosens Bioelectron, 2004. **20**(4): p. 895-902.
56. Kashyap, R., *Fiber Bragg Gratings*. 2009: Elsevier Science.
57. Sethi, D., et al., *Chemical strategies for immobilization of oligonucleotides*. Biotechnol J, 2009. **4**(11): p. 1513-29.
58. Vaijyanthi, B., et al., *Recent advances in oligonucleotide synthesis and their applications*. Indian J Biochem Biophys, 2003. **40**(6): p. 377-91.
59. Beaucage, S.L., *Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications*. Curr Med Chem, 2001. **8**(10): p. 1213-44.
60. Seliger, H., M. Hinz, and E. Happ, *Arrays of immobilized oligonucleotides--contributions to nucleic acids technology*. Curr Pharm Biotechnol, 2003. **4**(6): p. 379-95.
61. Pirrung, M.C., *How to make a DNA chip*. Angew Chem Int Ed Engl, 2002. **41**(8): p. 1276-89.
62. Dufva, M., *Fabrication of high quality microarrays*. Biomol Eng, 2005. **22**(5-6): p. 173-84.
63. Gang, A., et al., *A simple two-step silane-based (bio-) receptor molecule immobilization without additional binding site passivation*. Rsc Advances, 2015. **5**(45): p. 35631-35634.
64. Zheng, G., et al., *Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(10): p. 1294-301.
65. Escorihuela, J., et al., *Chemical silicon surface modification and bioreceptor attachment to develop competitive integrated photonic biosensors*. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(10): p. 2831-40.
66. Festag, G., et al., *Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays*. J Fluoresc, 2005. **15**(2): p. 161-70.
67. Zhang, Z., R. Hu, and Z. Liu, *Formation of a Porphyrin Monolayer Film by Axial Ligation of Protoporphyrin IX Zinc to an Amino-Terminated Silanized Glass Surface*. Langmuir, 2000. **16**(3): p. 1158-1162.
68. Khalfaoui, F., *Développement de biosenseurs pour la détection de virus d'intérêt et mise en place de protocoles d'étude d'aptamères ADN*, in *Microbiologie Appliquée*. 2016, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand Frappier.

69. Lu, Z.J. and D.H. Mathews, *Efficient siRNA selection using hybridization thermodynamics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(2): p. 640-7.
70. Ho, P.S., *The non-B-DNA structure of d(CA/TG)_n does not differ from that of Z-DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(20): p. 9549-53.
71. Traeger, J.C. and D.K. Schwartz, *Surface-Mediated DNA Hybridization: Effects of DNA Conformation, Surface Chemistry, and Electrostatics*. Langmuir, 2017. **33**(44): p. 12651-12659.