

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

Ecole Doctorale n°258, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire,

EA4021, IFR 145 GEIST

N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Le Docteur Yasser BAAJ

Le 29 Septembre 2008

Mise au point d'une méthode utilisant des biopuces
pour le diagnostic de Neuropathies Héréditaires

Directeur de Thèse : Pr Franck STURTZ

COMPOSITION DU JURY

Mme le Professeur Véronique DAVID
Mme le Docteur Marie-Claude POTIER
Mr le Docteur Benoît FUNALOT
Mr le Professeur Franck STURTZ
Mr le Professeur Jean-Michel VALLAT
Mr le Docteur Christophe VALAT

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Membre invité

*A mes parents et mes frères,
qui ont su m'apporter affection, soutien et réconfort.
Jamais je n'aurais pu devenir ce que je suis sans leur aide,
leur confiance, leur patience et leur amour.*

*A mon épouse,
qui a toujours répondu présente quand j'avais besoin. Qui
m'a soutenu ces dernières années. Pour ses
encouragements.*

A mes enfants : Ala-Eddin, Leith,.....

A tous mes amis.

Remerciements

Je voudrais adresser mes remerciements à Madame le Professeur Véronique DAVID, Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire, Membre du Conseil National des Universités, pour avoir eu la gentillesse de bien vouloir juger ce travail. Vos connaissances et votre expertise dans le domaine de la génétique moléculaire font de votre présence un grand honneur pour nous.

Madame le Docteur Marie-Claude POTIER, Directeur de Recherche CNRS (DR2), Docteur en Pharmacie et Docteur en Sciences, HDR, soyez remerciée pour la disponibilité que vous avez bien voulu prendre pour évaluer ce travail. Les travaux que vous avez menés au sein de l'ESPCI font de vous un expert dans le domaine que nous présentons. Sachez que nous sommes conscients de l'honneur que vous nous faites en jugeant ce travail.

Mes très sincères remerciements vont à Monsieur le Professeur Jean-Michel VALLAT, Professeur de Neurologie, Médecin des Hôpitaux, Chef de Service de Neurologie, Membre du Conseil National des Universités, qui me fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Vos connaissances dans le domaine des neuropathies périphériques héréditaires honorent grandement ce jury de thèse.

A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Franck STURTZ, Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire, Praticien Hospitalier, Chef du Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, pour sa grande disponibilité et ses précieux conseils. Veuillez croire en ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Docteur Benoît FUNALOT, MCU-PH de Biochimie et Biologie Moléculaire, Praticien Hospitalier, soyez chaleureusement remercié d'avoir bien voulu participer au jury de ma thèse.

Merci à Monsieur le Docteur Christophe VALAT, Docteur en Sciences, Directeur Général de Serial Genetics (Evry, France) qui malgré la lourde tâche de guider une jeune entreprise, a pris de le temps de me guider sur mes expériences à Evry et de participer à mon jury de thèse.

Mes remerciements vont aussi à Madame le Docteur Corinne MAGDELAINE, Praticien Hospitalier. Je vous remercie pour l'enseignement de Biologie Moléculaire, que vous m'avez prodigué avec patience et compréhension. Que cette thèse soit le témoin de ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Michel RIGAUD, Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire, vous m'avez accueilli avec gentillesse dans votre service, et vous m'avez offert votre aide avec simplicité et ouverture d'esprit. Recevez mes sincères remerciements.

Madame le Docteur Hélène CHABLE, MCU-PH, je vous remercie pour vos conseils avisés et votre écoute. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération.

Madame le Docteur Jeanne COOK-MOREAU, Maître de Conférence des Universités d'Immunologie, votre délicatesse, vos compétences et vos connaissances scientifiques sont reconnues de tous. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Yoanne MOUSSEAU, Assistant Hospitalo-Universitaire, pour ton aide précieuse, ta disponibilité et surtout pour ton amitié. Reçois ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

Madame le Docteur Karine DURAND, je voudrais te remercier pour ton aide et les nombreuses discussions qui ont enrichi ce travail. Mon amitié t'est toute offerte.

Monsieur le Docteur Dany LECLERS, je te remercie pour ta compréhension, ta gentillesse et ton humour. Je te souhaite plein de réussite dans ta vie professionnelle.

Mademoiselle le Docteur Guislaine BARRIERE, je te remercie pour ta gentillesse, ton écoute et toutes tes qualités humaines. Reçois l'expression de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Hao QIU, j'apprécie toujours ta simplicité et ta compétence. Je suis convaincu que tes efforts de réussite seront récompensés comme il se doit.

Madame Hélène DZUGAN, je te remercie pour ta gentillesse et ton expertise en biologie moléculaire. Sois assurée des mes meilleurs sentiments.

A l'ensemble des techniciens et des techniciennes du laboratoire de Biochimie et Génétique Moléculaire de Limoges, pour leur gentillesse, la rapidité et la qualité de leur travail. Une mention spéciale pour Martine, Monique, Patrice et Philippe, qui ont guidé mes premiers pas devant une paillasse de Biologie Moléculaire avec patience et attention.

Table des matières

Remerciements	3
Introduction	9
Première Partie :	11
I - Etude bibliographique et situation du sujet.....	12
I - 1 - Les méthodes actuelles de diagnostic des mutations en routine	12
I - 1 - 1 - Réaction de séquence et séquençage automatisé.....	13
I - 1 - 2 - La technologie de chromatographie liquide à hautes performances en conditions dénaturantes (d-HPLC ; denaturing High-Performance Liquid Chromatography)	14
I - 1 - 3 - La méthode HRM.....	18
I - 2 - Puces à ADN.....	18
I - 2 - 1 - Historique et évolution	18
I - 2 - 2 - Principe et fonctionnement des puces à ADN	21
I - 2 - 3 - Confection des puces à ADN.....	24
I - 2 - 4 - Marquage (fluorescence et fluorochromes)	34
I - 2 - 5 - Hybridation et lavage.....	37
I - 2 - 6 - Lecture	38
I - 3 – Exemples représentatifs de méthode de détection de variant nucléotidique par des sondes fixées sur un support – « Puces à ADN »	46
I - 3 - 1 - Technologie d’extension d’une base unique ; SBE-TAGS (<i>Single Base Extension – TAGS array</i>).....	46
I - 3 - 2 - Technologie d’extension d’amorce spottée : APEX (<i>Arrayed Primer Extension</i>)	48
I - 3 - 3 - Technologie d’extension ‘allèle-spécifique’ d’amorce (<i>Allele-specific primer extension</i>)	50
I - 3 - 4 - Les méthodes basées sur des billes " <i>Bead Arrays</i> " ou " <i>BeadChip</i> "	52
I - 3 - 5 - Technologie CSH (<i>Contiguous Stacking Hybridization</i>)	54
I - 3 - 6 - Technologie " <i>hairpin</i> " (Serial Genetics®)	57
I - 3 - 7 - Technologie " <i>hairpin</i> non-ouvrable" (<i>Coaxial Stacking Interactions</i>)	59
I - 4 - Séquençage par des sondes libres (en solution) – « <i>Molecular Beacons</i> »	60
I - 5 - Applications principales des puces à ADN.....	63

I - 5 - 1 - L'analyse des profils d'expression génique : l'analyse des transcriptomes	63
I - 5 - 2 - La détection du nombre de copies d'ADN par CGH-array	64
I - 5 - 3 - La détection et le génotypage de mutations et de polymorphismes : le reséquençage	65
I - 5 - 4 - La validation des mécanismes d'action de médicaments	67
I - 5 - 5 - L'agro-alimentaire, l'agriculture et l'environnement	68
I - 5 - 6 - Le diagnostic des maladies	68
I - 6 - La maladie de Charcot Marie Tooth et les neuropathies périphériques apparentées	69
I - 6 - 1 - Aspects cliniques du CMT	69
I - 6 - 2 - La myéline	71
I - 6 - 3 - Les cellules de Schwann	75
I - 6 - 4 - Classification et mutations impliquées	77
I - 7 - Présentation générale du travail	80
Deuxième Partie	82
II - Partie expérimentale	83
II - 1 - Validation de la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT (vérification des sondes spottées)	83
II - 1 - 1 - Matériels et Méthodes	83
II - 1 - 2 - Résultats	94
II - 2 - Validation de la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT en utilisant des produits de PCR multiplexe	169
II - 2 - 1 - Matériels et Méthodes	169
II - 2 - 2 - Résultats	173
II - 2 - 3 - Conclusion finale de l'hybridation des produits de PCR multiplexe	189
II - 3 - Hybridation de produits d'amplification de l'ADN génomique total (AGT) pour la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT	189
II - 3 - 1 - Matériels et Méthodes	190
II - 3 - 2 - Résultats	192
II - 3 - 3 - Conclusion	195
Troisième Partie	196
III - Discussion et perspectives	197
III - 1 - Evaluation des résultats	197

III - 2 - Quelles sont les causes d'un échec éventuel lors du génotypage par la méthode " <i>hairpin</i> " et quelles sont les mesures à prendre afin de les éviter ?.....	201
III - 3 - Utilisation de la méthode " <i>hairpin</i> " pour le diagnostic de 49 mutations de la Mucoviscidose	202
III - 4 - Comparaison avec d'autres méthodes de génotypage	205
III - 5 - Comment pouvons nous augmenter la sensibilité de la méthode ?	208
Conclusion.....	210
IV - Conclusion.....	211
Bibliographie	212
Annexes.....	229
Annexe 1.....	230
Annexe 2.....	238
Annexe 3.....	246
Liste des abréviations.....	248

Introduction

Introduction

Le séquençage des génomes et, notamment celui du génome humain, ont permis de réaliser des progrès considérables dans la connaissance des pathologies héréditaires et permettent raisonnablement d'espérer une amélioration de la prise en charge thérapeutique.

Pour le diagnostic moléculaire des maladies génétiques, deux types d'approche peuvent être envisagés en routine dans les services hospitaliers. La méthode, utilisée jusqu'à présent, est une réaction de séquençage automatisée correspondant à la détermination base après base de la séquence des différents gènes susceptibles d'être impliqués dans l'affection. Cette méthode se révèle souvent longue et coûteuse. L'autre méthode consiste à effectuer un balayage rapide des différentes parties d'un gène à la recherche de variations de séquence, suivi du seul séquençage de la région repérée. Cette deuxième approche ne peut être évidemment envisagée que si la méthode est suffisamment sensible et détecte effectivement toutes les variations de séquence. Ceci semble être le cas pour la méthode de chromatographie liquide à hautes performances en conditions dénaturantes (dHPLC) et probablement aussi pour la Fusion à Haute Résolution (HRM, High Resolution Melting).

Cependant, de nouvelles méthodes dites à haut rendement ("*High-throughput methods*") sont en cours d'expérimentation en génétique humaine. Ces méthodes à haut rendement sont déjà très utilisées pour comprendre la distribution des variations génétiques dans les populations ou pour localiser les gènes responsables de maladies génétiques. Les puces à ADN pourraient donc constituer une réponse élégante et efficace à un long processus de diagnostic car elles permettent de tester des milliers de séquences possibles en une seule étape. Des puces à ADN peuvent être utilisées pour détecter et déterminer l'identité d'une séquence cible, pour mesurer sa quantité, et pour distinguer les différences entre séquence cible et séquence de référence. Parallèlement elles peuvent analyser un grand nombre de séquence d'ADN en se basant sur le principe d'hybridation. Des puces à ADN dédiées à des pathologies particulières, telles que certains cancers (Liotta and Petricoin 2000), la dystrophie musculaire (Chen et al. 2000), le diabète (Wilson et al. 2000), ou le vieillissement (Lee et al. 1999; Ly et al. 2000) ont été conçues. Cependant,

malgré leurs qualités, les biopuces restent peu utilisées pour le diagnostic moléculaire individuel car elles ne sont pas toujours absolument fiables.

Le but de notre travail de thèse a été de réaliser et de valider une méthode basée sur les puces à ADN pour permettre un diagnostic moléculaire sûr, et ceci, pour des neuropathies périphériques héréditaires qui correspondent au tableau clinique appelé « Maladie de Charcot-Marie-Tooth » (CMT) ou aux tableaux apparentés (Maladie de Déjerine-Sottas, neuropathie liée à la pression,...), qu'elles soient autosomiques dominantes ou récessives, ou liées au chromosome X. A ce jour, plus de 865 mutations différentes (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>) ont été recensées pouvant causer une maladie de CMT ou un tableau clinique apparenté et ce chiffre devrait encore augmenter dans les années qui viennent.

La détection des anomalies moléculaires responsables de la maladie de CMT nécessite actuellement dans les services hospitaliers, en particulier celui de Limoges, plusieurs étapes (PCR, Séquençage) réalisées de façon séquentielle et qui occupent un technicien pendant plusieurs heures voire plusieurs jours. Ces étapes multiples sont onéreuses et ne sont pour l'instant pas ou peu automatisées. De plus, elles consomment de nombreux réactifs qu'il faut conserver dans des conditions particulières et qu'il faut renouveler fréquemment. Le très grand nombre des anomalies moléculaires possibles rend les méthodes actuellement employées lourdes à réaliser en routine. La réalisation d'un diagnostic en une seule étape de manipulation serait donc un progrès considérable tant du point de vue médical que du point de vue pharmaco-économique.

Nous aborderons donc dans la première partie de cet ouvrage les méthodes diagnostiques actuelles et nous présenterons brièvement la Maladie CMT. Puis nous présenterons, dans la deuxième partie, nos travaux expérimentaux et les publications qui ont été faites ou sont en cours de l'être. Enfin nous évoquerons la pertinence, les limites et les perspectives du système de diagnostic moléculaire que nous proposons, dans la troisième partie.

Première Partie :

Etude Bibliographique et
situation du sujet

I - Etude bibliographique et situation du sujet

Dans cette partie, nous allons présenter les méthodes de diagnostic moléculaire utilisées en routine ainsi que de façon plus expérimentale.

I - 1 - Les méthodes actuelles de diagnostic des mutations en routine

Des stratégies et des outils innovants se sont développés afin de répondre aux besoins d'une exploration à l'échelle de la totalité du génome. Les méthodes utilisées pour l'analyse des variations de séquence génomique, peuvent être récapitulées en trois catégories principales:

i) des méthodes de séparation, comme l'électrophorèse sur gel (Mashal et al. 1995; Myers et al. 1985; Orita et al. 1989; Pogue et al. 1998) et l'électrophorèse capillaire (CE) (Ansorge et al. 1989; Dovichi 1997; Sanger et al. 1977; Smith et al. 1986), la spectrométrie de masse (MS) (Haff and Smirnov 1997; Higgins et al. 1997; Little et al. 1997; Ragoussis et al. 2006; Sauer 2006; Tost and Gut 2005) ou la séparation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Giordano et al. 1999) (O'Donovan et al. 1998; Underhill et al. 1997)

ii) des analyses homogènes (en solution), comme le "5' *nuclease assay*" (Livak 1999; Livak et al. 1995), *Invader* (Keller 2005; Lyamichev et al. 1999; Mein et al. 2000), et les sondes "*molecular beacons*" (Bonnet et al. 1999; Marras et al. 1999; Tyagi et al. 1998)

iii) les analyses en phase solide, par exemple les puces à ADN ou "*microarrays*".

I - 1 - 1 - Réaction de séquence et séquençage automatisé

Le principe général de la réaction de séquençage ressemble à celui de la méthode PCR. Le but est donc de synthétiser un brin complémentaire à l'un de deux brins matrice d'un fragment d'ADN double brin (Sanger et al. 1977).

La réaction de séquençage comporte 3 étapes essentielles :

- La première étape consiste à dénaturer le fragment d'ADN double brin à étudier. On obtient ainsi deux brins matrice.

- La deuxième étape est la fixation spécifique de l'amorce sur le brin matrice. A la différence de la réaction PCR, une seule amorce est utilisée par réaction de séquence.

- La troisième étape est l'élongation ou la synthèse du brin complémentaire. Cette élongation se fait par extension de l'amorce dans le sens 5' vers 3'. La réaction de séquençage utilise un mélange de dNTPs et de ddNTPs. Lorsqu'un dNTP complémentaire de celui du brin matrice se présente, celui-ci est accroché au nucléotide précédent et peut fixer le nucléotide suivant. A la différence de dNTPs, les ddNTPs sont dépourvus de la fonction OH en 3', et par conséquent, quand un ddNTP s'incorpore dans la chaîne en cours d'élongation, aucun autre nucléotide ne pourra ensuite s'accrocher à lui. La réaction de synthèse du brin matrice complémentaire est donc interrompue.

Les quatre types de ddNTPs sont marqués par des fluorophores de couleurs différentes. (ddATP = vert, ddCTP = bleu, ddGTP = noir, dd TTP = rouge).

A la fin de l'étape de synthèse, on obtient un produit d'élongation fluorescent, dont la fluorescence est donnée par le ddNTP incorporé, et dont la longueur est fonction de la position de ddNTP sur le brin complémentaire. Celui-ci est donc plus ou moins long suivant que l'incorporation du ddNTP s'est effectuée précocement ou non. La proportion dNTPs/ddNTPs est fixée par le fabricant. Elle doit permettre, en théorie, la synthèse de brins complémentaires de toutes longueurs ; c'est-à-dire : d'une paire de base à la longueur totale du brin matrice, par incorporation d'un ddNTP en dernière position (Sanger et al., 1977).

A la fin de la réaction de séquençage, il est nécessaire de procéder à une étape de purification afin d'éliminer les ddNTPs fluorescents n'ayant pas été incorporés, et qui

pourraient s'accrocher de façon non spécifique aux fragments d'ADN néosynthétisés et donc fausser la lecture de la fluorescence.

Finalement, on obtient un mélange de brins d'ADN simple brin fluorescent, de longueurs variables, qui seront soumis à une évaporation du solvant, puis à une dénaturation en présence de formamide. Ces brins seront ensuite séparés par migration électrophorétique sur un capillaire d'acrylamide hautement résolutif.

En fin de migration, une caméra enregistre la fluorescence émise par chaque brin lors de son passage au niveau de la chambre de lecture. La couleur enregistrée permet de définir la nature du ddNTP incorporé. Le temps de migration définit la position du ddNTP concerné sur le brin synthétisé. L'utilisation d'un logiciel d'analyse permet de visualiser la totalité de l'électrophorégramme, sous la forme d'une succession de pics des quatre couleurs possibles. Cette succession représente l'alternance des nucléotides sur le brin complémentaire du brin matrice.

En pratique courante, le séquençage d'un fragment d'ADN s'effectue en double sens : dans un sens avec l'amorce sens "*Forward*" et, dans l'autre avec l'amorce anti-sens "*Reverse*". Enfin la technique utilisée permet de déterminer la séquence de fragments dont la longueur peut atteindre 600 paires de bases.

I - 1 - 2 - La technologie de chromatographie liquide à hautes performances en conditions dénaturantes (d-HPLC ; denaturing High-Performance Liquid Chromatography)

I - 1 - 2 - 1 - Les différents éléments de la dHPLC

La dHPLC est une méthode chromatographique qui permet la détection de variations au niveau de la séquence d'ADN et qui comprend les éléments suivants :

- une colonne capillaire qui accroche sélectivement les brins d'ADN à analyser,
- un four dans lequel est placée la colonne,
- une pompe à haute pression qui assure le passage des solvants le long de la colonne et l'éluion progressive des substances accrochées à celle-ci,
- un module de détection UV,

- un support informatique de pilotage de l'appareil et de traitement des données,
- un échantillonneur.

I - 1 - 2 - 2 - Le principe d'analyse par dHPLC

La dHPLC permet la détection de variations de la séquence d'ADN (O'Donovan et al. 1998). Il peut s'agir de substitutions de bases, de petites délétions ou d'insertions de séquences d'ADN.

En pratique, l'analyse commence par une PCR classique (amplification en chaîne du fragment à analyser) afin d'augmenter la quantité du fragment génomique à analyser. Si la région amplifiée présente une variation à l'état hétérozygote, deux types de fragments, correspondant à la séquence normale et à la séquence variante, seront présents dans le produit de PCR. Cette première étape est suivie d'une phase de dénaturation-renaturation destinée à réassocier différemment les brins normaux et variants synthétisés lors de la première étape de PCR. On obtient non seulement des appariements parfaits entre deux brins normaux ou deux brins variants (les homoduplexes) mais aussi des appariements imparfaits entre brins normaux et mutés (les hétéroduplexes) (figure 1). Pour rechercher une variation homozygote, il faut procéder de la même manière en mélangeant au préalable une population d'ADN normal à une population d'ADN variant ou susceptible de l'être.

Les appariements imparfaits, présents au niveau des hétéroduplexes, sont à la base de la détection des variants par la dHPLC. En effet, les hétéroduplexes sont thermiquement moins stables que les homoduplexes correspondants. Lorsque l'ADN est chauffé à une température adéquate, cette instabilité entraîne une dissociation des deux brins d'ADN dans la région de l'appariement imparfait. Cela provoque une diminution de l'interaction avec la colonne; dont résulte un temps de rétention réduit par rapport aux homoduplexes lors de la séparation chromatographique.

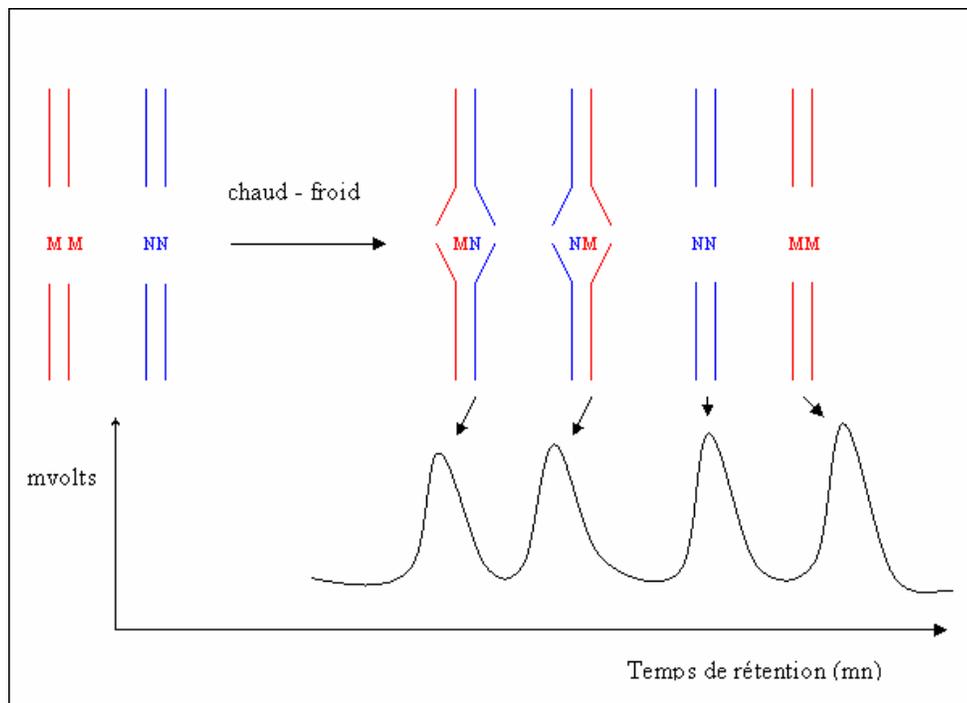


Figure 1 : Exemple de séparation d'homo-duplexes (appariements parfaits entre deux brins normaux : NN, ou deux brins variants : MM) et hétéro-duplexes (appariements imparfaits entre brins normaux et mutés : MN, ou des appariements entre leurs deux brins complémentaires NM).

Pour observer ce phénomène de séparation, la dHPLC utilise une colonne greffée d'une phase stationnaire non poreuse composée de « polystyrène-divinylbenzène » alkylé. Cette phase stationnaire est électriquement neutre et hydrophobe. L'ADN, lui, est chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates et ne peut donc s'adsorber de lui-même au niveau de la colonne. Afin de rendre l'adsorption possible, on utilise de l'acétate de tri-éthylammonium (TEAA). Les ions ammoniums de ces molécules, chargés positivement, interagissent avec l'ADN et les chaînes alkyl, avec la surface hydrophobe de la phase solide. Ainsi, lorsque les hétéroduplexes sont partiellement dénaturés par chauffage, leurs charges négatives subissent une délocalisation partielle et la force d'interaction entre l'ADN des hétéroduplexes et la colonne diminue en comparaison avec la force d'interaction des homoduplexes. Ces derniers seront alors élués moins rapidement par la phase mobile, composée d'acétonitrile, que les hétéroduplexes qui passeront ainsi les premiers devant le détecteur UV.

I - 1 - 2 - 3 - Performances de la dHPLC

L'application majeure de la dHPLC sera tout d'abord la recherche de variants génomiques. Cette nouvelle technologie présente trois atouts majeurs par rapport à la technique de séquençage actuellement utilisée:

- sa rapidité, puisque après l'étape de PCR, également réalisée lors d'un séquençage, les échantillons sont injectés directement dans l'appareil sans passer par les étapes d'électrophorèse contrôle ou de purification.

- son moindre coût : suppression des réactifs fluorescents et des étapes de purification sur colonnes individuelles à usage unique.

- sa sensibilité supérieure à celle même du séquençage, puisque toutes les équipes qui utilisent en routine la technologie dHPLC, rapportent qu'elles ont pu, par cette technologie, identifier des mutations qui n'avaient pas été décelées par séquençage. C'est le cas des mosaïques dans lesquelles la mutation n'est présente qu'à un faible pourcentage au niveau des cellules somatiques du patient analysé (Jones et al. 2001). A l'heure actuelle on peut recenser plus de 800 références bibliographiques relatives à cette technologie (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/).

I - 1 - 2 - 4 - Place de la dHPLC au sein d'une plateforme de biologie moléculaire

Dans la recherche de variants génomiques, cette technologie est destinée à être utilisée en première intention afin de déterminer rapidement et à moindre coût quel gène est impliqué dans une pathologie donnée (Takashima et al. 2001). La dHPLC doit être utilisée en amont du séquençage systématique, lequel reste alors dédié:

- à l'identification précise du variant révélé par la dHPLC. En effet, cette technique permet de révéler la présence d'un ADN anormal par rapport à la séquence normale mais ne permet pas d'identifier précisément la nature de la mutation.

- à l'exploration des régions génomiques riches en variants naturels (polymorphismes non impliqués dans la genèse d'une affection).

Outre la recherche de variants génomiques, de nombreuses autres applications sont également possibles: l'analyse des polymorphismes de répétition (microsatellites), la quantification ou dosage génique et la vérification de la qualité des oligonucléotides. Enfin, de multiples domaines de biologie moléculaire sont susceptibles de bénéficier de cette technologie : génétique humaine, cancérologie, virologie, infectiologie...

I - 1 - 3 - La méthode HRM

Il existe d'autres méthodes pour la détection de mutation et le génotypage de polymorphismes mononucléotidiques qui sont en cours de développement telles que la méthode HRM ("*High Resolution Melt*"). Le HRM caractérise les échantillons d'acides nucléiques pour leur comportement à la dissociation ("*melting*"). Leur température de fusion (T_m) dépend du pourcentage en GC, de la taille et la force ionique du milieu, elle est spécifique de chaque fragment de PCR. Si deux génotypes diffèrent par la mutation d'une seule base, le T_m de ces deux amplicons sera différent (Krypuy et al. 2007; Liew et al. 2004). De même, chaque hétéroduplexe aura un point de fusion spécifique. La détection se fait par dénaturation de produits de PCR à l'aide d'un appareil qui mesure, en temps réel, la quantité de fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN bicaténaire. L'utilisation de fluorochromes intercalant tels que SYTO[®], EvaGreen[®] et LC Green[®] fournit de meilleurs résultats puisqu'ils peuvent être employés à des concentrations plus élevées pour obtenir une résolution plus importante que celle obtenue avec les colorants traditionnels comme SYBR Green[®] (Herrmann et al. 2006). Cette méthode nécessite un système de détection optique de sensibilité élevée, une vitesse accrue d'acquisition de données et l'utilisation d'un logiciel spécifiquement conçu pour l'analyse de données de HRM.

I - 2 - Puces à ADN

I - 2 - 1 - Historique et évolution

En 1975, Southern (Southern 1975) a décrit la possibilité de séparer et identifier des séquences d'oligonucléotides par hybridation moléculaire. Cette technique reste, à ce jour, à la base de nombreuses techniques en biologie moléculaire dont les puces à ADN font partie.

L'hybridation de cibles d'acides nucléiques avec des sondes fixées de désoxyoligonucléotides est donc l'événement central de la détection et de l'identification de ces cibles. Selon ce principe, deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la

concentration saline du milieu (Maskos and Southern 1992). Différentes techniques de détection de séquences nucléotidiques basées sur le principe de l'hybridation moléculaire ont été développées sur support solide (Kiseleva et al. 1992; Meinkoth and Wahl 1984). L'hybridation différentielle avec des sondes oligonucléotidiques (séquence-spécifiques) était une technique largement répandue pour la détection de mutations ou de polymorphismes génétiques, avec des sondes radioactives (Bos et al. 1984; Conner et al. 1983; Pirastu et al. 1983) ou non (Saiki et al. 1989). Les sondes marquées étaient fixées sur différents supports tels que des filtres comprenant une membrane de nylon (Saiki et al. 1989), des supports de gel d'agarose (Bos et al. 1984) ou transmises directement après hybridation d'un gel d'agarose sur une feuille de nitrocellulose (Conner et al. 1983). Ces techniques étaient les précurseurs des véritables puces à ADN ("*microarray*") aussi appelées « biopuces ».

A l'origine, les "*macroarrays*" (appelées ainsi afin de les distinguer de "*microarrays*"), utilisaient des sondes ADN complémentaire (ADNc) disposées sur des membranes poreuses de nylon avec un espacement important de l'ordre du millimètre en association avec des cibles radioactives. Selon le même principe, et presque à la même période, une miniaturisation plus importante du système classique, dit "*reverse dot blot*" (Khrapko et al. 1989; Lennon and Lehrach 1991), a été développée. Cette avancée s'est faite grâce à une technologie multidisciplinaire intégrant l'électronique (techniques de dépôt), la chimie (greffage des oligonucléotides sur des supports), l'analyse des images et l'informatique (analyse des données). Donc, une méthode de séquençage a été proposée (Bains et al. 1988). Cette dernière est basée sur l'hybridation à un ensemble complet d'oligonucléotides de longueur constante immobilisés individuellement comme points ["*dots*" ; unités d'hybridation ou UH ; "*spots*"] sur une matrice bidimensionnelle. On a discuté la possibilité que la séquence d'acides nucléiques puisse être déduite par l'hybridation d'une cible inconnue à une matrice portant des sondes d'oligonucléotides. Des séquences sont ici analysées par l'hybridation à un ensemble d'oligonucléotides représentant toutes les séquences possibles (Bains and Smith 1988; Drmanac et al. 1992; Drmanac et al. 1989; Khrapko et al. 1991; Lysov Iu et al. 1988; Southern et al. 1992; Strezoska et al. 1991). Dans un deuxième temps, on a proposé une approche plus ciblée pour l'analyse des mutations impliquées dans les maladies génétiques. Dans ce cas, des sondes d'oligonucléotides spécifiques sont hybridées sur la puce à ADN. Ces sondes sont conçues pour correspondre à des séquences normales ou porteuses des mutations

recherchées. De cette façon le sous-ensemble ("*subset*") de sondes le plus instructif est employé (Chee et al. 1996; Conner et al. 1983; Zhang et al. 1991).

Afin d'augmenter l'utilité et le nombre de sondes sur une puce à ADN, et donc d'améliorer le criblage à grande échelle de mutations, on a proposé une synthèse chimique dirigée par la lumière et adressable dans l'espace ("*light directed and spatially addressable parallel chemical synthesis*") ou "synthèse *in situ*" sur un support solide pour la fabrication des puces à ADN à haute densité (Chee et al. 1996; Fodor et al. 1991). Ces puces à ADN à haute densité étaient une réponse au besoin de haut multiplexage et au greffage à grande vitesse d'un grand nombre de sondes.

L'utilisation des surfaces solides miniaturisées pour l'analyse d'hybridation est alors devenue de plus en plus attrayante pour la détection et l'identification d'acides nucléiques (de Saizieu et al. 1998; Hacia 1999; Lipshutz et al. 1995; O'Donnell-Maloney et al. 1996; Southern et al. 1999; Southern 1996). De nombreuses plateformes ont utilisé des sondes de désoxyoligonucleotides attachées à un support solide pour hybrider, et de ce fait capturer et étudier des cibles simples-brins. La technologie des puces à ADN a également été utilisée pour analyser les niveaux d'expression de milliers de gènes par une simple expérience (Brown and Botstein 1999; Iyer et al. 1999). D'autres études ont, dans un premier temps, décrit l'analyse sur des puces à ADN de polymorphismes mononucléotidiques humains prédéfinis ou des mutations prédéfinies impliquées dans des maladies. Cependant, même dans la plus grande de ces études, soit le nombre d'échantillons analysés (Hacia et al. 1999; Hacia et al. 1998; Wang et al. 1998; Wang et al. 1996) soit le nombre de polymorphismes mononucléotidiques analysés (Pastinen et al. 1998; Pastinen et al. 1998) restait petit et, par conséquent, seul un nombre limité de génotypes ont été produits dans chaque étude. Ainsi, des améliorations du procédé apparaissaient nécessaires. Plus récemment, l'utilisation des puces d'*Affymetrix* à très haute densité (10000 "*SNPs*" : 10 Kb (Matsuzaki et al. 2004a), 100000 "*SNPs*" : 100 Kb (Matsuzaki et al. 2004b) voir 500000 "*SNPs*" : 500 Kb (Roberts et al. 2007)) ont permis d'augmenter considérablement le nombre de polymorphismes mononucléotidiques recherchés. Les dernières puces d'*Affymetrix* allant jusqu'à la détection de plus de 906,600 "*SNPs*" (www.affymetrix.com/products/arrays).

Des enzymes pouvant modifier l'ADN ont alors été employées pour augmenter le multiplexage et la spécificité de séquençage sur des puces à ADN. Une grande variété de

technologies enzymatiques a été employée pour génotyper des polymorphismes mononucléotidiques. C'est le cas de l'extension d'une base unique ou SBE technologie ["*Single Base Extension*"] également appelée "*minisequencing*", "*template-directed incorporation*" (Dubiley et al. 1999; Head et al. 1997; Pastinen et al. 1997; Shumaker et al. 1996; Syvanen et al. 1990) ou APEX technologie "*Arrayed Primer Extension*" (Kurg et al. 2000; Le Calvez et al. 2005; Schrijver et al. 2005), de SBE-tags technologie (Hirschhorn et al. 2000; Lindroos et al. 2002), et de la technologie de l'extension d'allèle spécifique "*Allele-Specific Primer Extension*" (Pastinen et al. 2000). Ces technologies emploient une enzyme appelée ADN polymérase. Une autre technique peut également être employée ; la ligation d'oligonucléotides avec des enzymes appelées ADN ligases (Gerry et al. 1999; Gunderson et al. 1998; Tobe et al. 1996).

La majorité des puces à ADN utilisent des sondes simples-brins linéaires de désoxyoligonucléotides afin de capter leurs cibles dans des réactions d'hybridation (Duggan et al. 1999; Marshall and Hodgson 1998; Southern et al. 1999). D'autres méthodes impliquant des structures contraignant la flexibilité des sondes sur les puces à ADN ont également été employées, afin d'augmenter la spécificité des procédures et mieux distinguer les mutations hétérozygotes et homozygotes. Plusieurs études ont montré que l'emploi de sondes en forme d'épingle à cheveux ou "*Hairpin*", comprenant une boucle et une tige, était une méthode efficace de détection des polymorphismes mononucléotidiques. Ces études ont employé des formes modifiées des sondes "*molecular beacons*" fixées sur un support solide au lieu de les employer dans des solutions. Ces supports peuvent être des surfaces de fibre optique (Stemers et al. 2000), des lames de verre (Ramachandran et al. 2004) ou des supports en or (Du et al. 2005).

I - 2 - 2 - Principe et fonctionnement des puces à ADN

Les puces à ADN constituent des supports miniatures de quelques centimètres carrés sur lesquels sont fixés des fragments d'acides nucléiques (ADN ou ARN), nommées sondes moléculaires, espacées de quelques micromètres. De très nombreuses sondes sont immobilisées selon une disposition ordonnée donc sur un minuscule support dont la base peut être composée de plusieurs types de substances (voir page 25). Ce support est constitué d'un réseau dense et régulier de micro-surfaces « les unités d'hybridation ou

UH » ; "spots" sur lesquelles sont greffées des dizaines de milliers de sondes oligonucléotidiques dont les séquences sont quelconques ou correspondent aux gènes recherchés (Ramsay 1998; Rockett and Dix 2000). Chaque "spot" possède une adresse connue et correspond à une séquence spécifique. Les dimensions et le nombre des "spots" conditionnent à la fois la capacité de la puce et sa diversité (nombre de gènes ciblés).

Le principe de fonctionnement des puces à ADN se base sur l'hybridation moléculaire. Il s'agit ici d'une forte miniaturisation de la technique du "reverse dot-blot". Les sondes immobilisées sur le support vont s'hybrider avec l'acide nucléique "cible" à étudier (produits de PCR, ADN génomique, ADNc, ADN plasmidique, ARN).

I - 2 - 2 - 1 - L'hybridation moléculaire

L'hybridation est à la base de nombreuses techniques de biologie moléculaire telles que le *Southern blot* ou le *northern blot*. Elle a lieu entre deux acides nucléiques simples brins de séquences complémentaires. Cette association conduit à la formation d'un double brin ou duplex. Elle résulte de l'établissement de liaisons hydrogène : deux entre l'adénine (A) et la thymine (T) ou l'uracile (U) et trois entre la cytosine (C) et la guanine (G). La stabilité de ces duplex dépend essentiellement de leurs compositions en bases, de leurs longueurs et de la complexité de leurs séquences.

Chaque brin d'ADN a la capacité d'identifier une séquence complémentaire par l'appariement des bases nucléotidiques. Le processus d'identification, ou hybridation, est fortement parallèle à chaque base car chaque nucléotide de la séquence cible est exploré simultanément. Ainsi, l'hybridation peut être employée pour analyser efficacement de grandes quantités de séquences nucléiques (Chee et al. 1996). La confection des puces à ADN a permis d'étendre ce principe à la détection simultanée de milliers de séquences en parallèle.

L'hybridation implique la mise en place d'au moins deux brins d'acides nucléiques dans des conditions précises. On désigne par sonde, le brin dont on connaît la séquence, et par cible celui que l'on souhaite caractériser (figure 2). L'un des deux brins est marqué par couplage chimique avec une molécule pouvant générer un signal. Ce dernier peut être un fluorochrome ou un isotope. Sur le plan terminologique, l'utilisation des termes : « sonde » ("*probe*") qui correspond aux acides nucléiques fixés sur la puce, et « cible » ("*target*") qui correspond à l'ensemble des acides nucléiques libres étudiés, a été

recommandée afin d'éviter une confusion et semble aujourd'hui bien respectée (Phimister 1999).

Après la formation de duplex par hybridation entre une sonde et une cible (en général préalablement amplifiée par PCR, on passe par une étape de lavage permettant d'éliminer les cibles non hybridées.

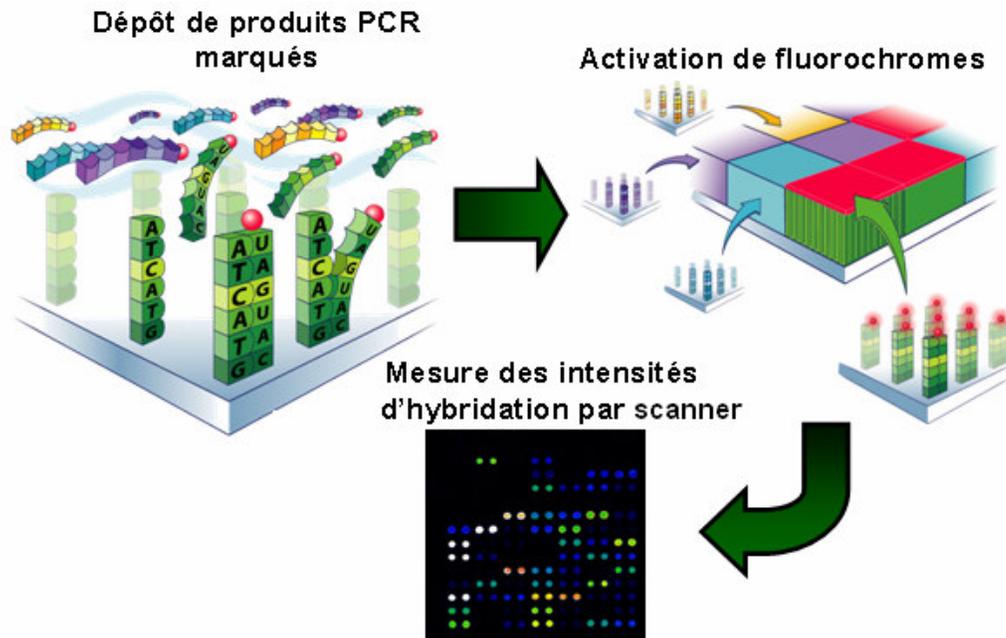


Image modifiée d'après Affymetrix (www.affymetrix.com)

Figure 2 : Principe et fonctionnement des puces à ADN.

I - 2 - 2 - 2 - Traitement des données

L'analyse de la surface de la puce permet le repérage des hybridations effectives. Celui-ci s'effectue grâce aux signaux émis par les marqueurs étiquetant la cible, par l'intermédiaire d'un scanner pour la fluorescence ou d'un compteur pour la radioactivité. Le signal moyen de chaque "spot" est donc enregistré. En fluorescence un laser ou une source de lumière excite chaque fluorochrome, puis une cellule photosensible (associée à un photomultiplicateur) ou une camera CCD capte la lumière émise. L'image obtenue sera analysée à l'aide d'un système informatique. Un traitement informatique adéquat permet l'accès à des informations plus ou moins complexes et complètes telles que la détermination des séquences et leur quantité, la présence de fragments particuliers dans l'échantillon et l'étude des mutations.

I - 2 - 3 - Confection des puces à ADN

Il existe différentes technologies de confection et d'utilisation des puces à ADN (Freeman et al. 2000). Elles sont fonction de la taille des sondes d'ADN constituant la base de la puce, du type de surface, de la méthode et de la chimie utilisées pour immobiliser l'ADN sur la puce, et enfin, des méthodes d'hybridation et de détection (Beaucage 2001). Le but de cette partie n'est pas de présenter l'ensemble des techniques existantes mais plutôt de décrire certains des aspects parmi les plus essentiels et courants.

Plusieurs types de supports ont été utilisés pour la fixation des oligonucléotides au cours de l'évolution des puces à ADN. Ces différents supports impliquent différentes méthodes de couplage des sondes. La combinaison de processus chimiques (traitement de la surface des supports et fixation des sondes) et mécaniques (dépôt des sondes) est indispensable pour la fabrication des puces à ADN.

I - 2 - 3 - 1 - Sondes

La sonde est donc un fragment d'acides nucléiques (oligonucléotide), ADN ou ARN, greffé ou synthétisé directement sur le support. Chaque sonde possède une séquence distincte connue et une adresse spécifique sur le support comme précédemment indiqué. Des milliers de sondes identiques sont présentées sur le support dans une conformation de "spot". La taille de la sonde est conditionnée par la méthode de synthèse employée et par l'utilisation éventuelle de la puce. La détection de mutations et le génotypage de polymorphismes mononucléotidiques requièrent des sondes courtes (15-25 bases) (Lindblad-Toh et al. 2000a; Lindblad-Toh et al. 2000b; Matsuzaki et al. 2004a; Matsuzaki et al. 2004b). Elles doivent être suffisamment spécifiques afin de discriminer des séquences différant d'un seul nucléotide. Cependant ces sondes se caractérisent par une sensibilité faible. La synthèse de ces sondes est réalisée par un synthétiseur automatique. D'un autre côté, pour l'analyse de l'expression transcriptionnelle de gènes, deux types de sondes plus longues sont employés. Les premières, d'une taille moyenne (30-70 pb), rassemblent à la fois des caractéristiques de spécificité et de sensibilité. Les deuxièmes, d'une taille de 100-500 pb jusqu'à un gène entier, ont une sensibilité optimale, mais disposent une spécificité moins importante que les précédentes. Ces sondes sont des fragments d'ADN complémentaires obtenus par amplification PCR. Le procédé *Affymetrix*

(par exemple) permet de réaliser l'analyse de l'expression transcriptionnelle de gènes en employant des sondes courtes par multiplication du nombre de sondes consacrées pour chaque gène.

Les sondes sont déposées en excès par rapport à la concentration en cibles utilisée. Lemieux et coll. (Lemieux et al. 1998) ont montré que le signal d'hybridation est corrélé de façon linéaire avec la quantité de cibles détectée seulement si la concentration en sondes est au moins dix fois plus importante que celle en cible. Par ailleurs, pour chaque méthode, une optimisation de la concentration en sondes et en cibles doit être réalisée.

I - 2 - 3 - 2 - Supports

Plusieurs techniques de diagnostic en biologie moléculaire ont utilisé des sondes fixées sur des supports (Bos et al. 1984; Conner et al. 1983; Pirastu et al. 1983; Saiki et al. 1989) bien avant la création des puces à ADN. Cependant, la miniaturisation apportée par les puces ADN a exigé de disposer de supports de plus grande capacité. Les propriétés physicochimiques de chaque support conditionnent son utilisation éventuelle, ou plus précisément, les impératifs de manipulations tels que la compatibilité des réactifs et des solutions avec la chimie du support (Beaucage 2001). Il est donc nécessaire, avant de faire le choix d'un type de support particulier, de prendre en compte certaines caractéristiques comme la résistance physique à une température élevée, la stabilité au pH, ou la stabilité chimique ainsi que la capacité à fixer de façon non spécifique les acides nucléiques (Matson et al. 1994). Après l'activation du support, une première étape de fonctionnalisation est effectuée par fixation d'une molécule dite « espaceur » (ex : PEG ; poly-ethylene-glycole). Les espaceurs sont de taille variable et ils servent comme intermédiaires entre la surface et la sonde. Le rôle majeur de ces molécules est de s'affranchir de certaines propriétés gênantes de la surface des supports. Lors de la fixation et de l'hybridation des sondes, certains supports empêchent les sondes de se replier sur elles même ou de s'accrocher avec la surface traitée créant une liaison irréversible. Deux grandes catégories de supports sont utilisées pour les puces à ADN : les supports neutres et les supports actifs.

I - 2 - 3 - 2 - 1 - Les supports neutres

Les supports neutres ne jouent pas d'autre rôle que celui de permettre une fixation optimale des sondes. Dans cette catégorie, nous pouvons citer :

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 1 - La lame de verre

Elle est le support le plus couramment utilisé aujourd'hui et correspond souvent à de simples lames de microscope. Une activation préalable de la surface des lames est indispensable pour pouvoir fixer les sondes. Cela est réalisé par le traitement de surface des lames avec des substances ayant des groupements actifs capables de générer des liaisons covalentes avec des nucléotides modifiés situés à l'extrémité des sondes. L'époxyxilane (Kurg et al. 2000) est parmi les substances les plus souvent utilisées dans ce but. Des robots, capables de réaliser le dépôt des sondes sur ces lames, sont aujourd'hui commercialisés.

C'est un support idéal qui permet l'immobilisation efficace de la sonde sur la surface et l'hybridation robuste de la cible avec la sonde. Il a également, en plus de son faible coût, des avantages spécifiques. Premièrement, les sondes d'ADN peuvent être liées par covalence sur une surface de verre traitée. Deuxièmement, le verre est un matériel durable supportant températures et concentrations ioniques élevées. Troisièmement, il est non poreux ce qui permet d'employer un volume minimal de solution d'hybridation. Quatrièmement, compte tenu de sa basse fluorescence, sa contribution au « bruit de fond » n'est pas significative et sa transparence facilite la lecture après hybridation. En conclusion, deux cibles différentes peuvent être marquées par différents fluorochromes, et être simultanément hybridées dans une seule réaction (Cheung et al. 1999).

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 2 - Les gels

Différents types de gels de polyacrylamide ou de polydiméthylacrylamide ont été utilisés pour l'immobilisation de courts oligonucléotides pré-synthétisés dans la fabrication de puces à ADN. Ces supports contiennent des groupes aminés ou des groupes aldéhydes permettant l'accouplement avec des oligonucléotides. Le support de gel aldéhyde a montré une capacité d'immobilisation plus élevée que le gel aminé (Timofeev et al. 1996). D'autres supports sont basés sur un gel d'acrylamide activé avec du glutaraldéhyde ou fonctionnalisé ("*functionalized*") par hydroxyalkyl et traité avec du chlorure de mésyl. Toutes ces méthodes d'immobilisation permettent de hauts rendements reproductibles, assurent de longues périodes de stockage du support activé et fournissent une stabilité élevée de l'attachement spécifique (Timofeev et al. 1996). En plus, le support gel est un support stable et ne génère qu'un faible « bruit de fond » pour la détection par fluorescence (Yershov et al. 1996). D'autres avantages de ces supports sont : la capacité élevée

d'immobilisation du support tridimensionnel et la possibilité d'immobiliser différentes quantités d'oligonucléotides ou des oligonucléotides de longueur différente dans différentes cellules de gel (Khrapko et al. 1991). Ces dispositifs permettent en particulier de concevoir une puce normalisée ("*normalized*") qui rapporte les signaux égaux d'hybridation pour des séquences à contenu différent en G+C en ajustant les concentrations des oligonucléotides immobilisés (Livshits et al. 1994). Dans des conditions particulières d'immobilisation, plus de 70% des oligonucléotides peuvent participer à l'hybridation, tout en gardant les uns par rapport aux autres, une distance nécessaire à leur caractérisation. Ceci empêche l'interférence entre les différentes molécules d'oligonucléotides et l'ADN durant l'hybridation et augmente le pouvoir discriminatif entre les duplex parfaitement complémentaires et ceux qui sont mal appariés "*mismatched*" (Yershov et al. 1996). La stabilité à température effective des duplex formés avec des oligonucléotides immobilisés sur gel dépend de leur concentration. La concentration peut donc être ajustée pour égaliser la stabilité des duplex riches en AT ou en GC (Khrapko et al. 1991).

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 3 - La plaque de microtitration

La fixation des sondes sur ce support se réalise par le traitement des surfaces des puits de la plaque par des solutions d'avidine préparées et diluées dans une solution tampon de carbonate. Ensuite, des sondes contenant un uracile biotinylé à une extrémité spécifique sont couplées à la surface des puits de cette plaque enduite par l'avidine (Riccelli et al. 2001). Une autre méthode de fixation peut aussi être utilisée : les puits sont carboxylés et l'ADN qui va servir de sondes est aminé. Il peut ainsi se fixer au fond des puits de façon covalente par une liaison peptidique sous l'effet d'un agent couplant.

L'inconvénient majeur de ce type de support est la limitation du nombre de puits sur une plaque de microtitration. Cela limite la diversité des sondes fixées sur les puits mais aussi le rendement des informations obtenues lors de l'analyse. De plus, la quantité de réactifs nécessaires à l'opération est très importante.

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 4 - Le polypropylène

La fixation des sondes sur ce support chimiquement neutre peut se faire par une synthèse *in situ*. Des puces à ADN à haute densité peuvent alors être réalisées avec des supports de polypropylène (Beier and Hoheisel 1999; Tang et al. 2005). La construction de

puces par intégration d'ensembles pre-définis d'oligonucléotides précédemment synthétisés sur un support aminé de polypropylène est également possible (Matson et al. 1995).

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 5 - Le silicium

Les surfaces de ces supports sont créées de façon à ce que les sondes d'oligonucléotides soient liées de manière covalente sur des puces comportant une couche mince de SiO₂ enduite sur des couches de silicium. L'acide nucléique cible marqué au P32 est alors hybridé avec les sondes dans des conditions de stringence élevée. L'affaiblissement ("*decay*") du P32 fixé aux molécules cible hybridées est alors détecté à l'aide du dispositif de couplage de charge (CCD) "*charge coupled device*". Les sondes oligonucléotidiques sont couplées à la surface de SiO₂ par la formation d'amines secondaires entre une monocouche d'époxyde et le ligand aminé en 3' qui a été synthétisé sur l'oligonucléotide (Lamture et al. 1994).

1 - 2 - 3 - 2 - 1 - 6 - Le nylon

Les supports en nylon constituent un substrat approprié pour les hybridations sur phase solide. Ils sont faciles à manipuler, durables et conviennent aux procédures d'hybridation et de détection. La fixation des sondes est basée sur la formation d'une liaison amide covalente entre les groupes carboxyl présents sur les membranes et les ligands aminés ajoutés sur l'extrémité 5' des oligonucléotides. L'attachement unique à l'extrémité 5' des oligonucléotides qui assure la fixation sur la surface des membranes, laisse la sonde libre d'interagir avec les séquences complémentaires (Zhang et al. 1991). D'autres méthodes ont utilisé la fixation de produits de PCR sur lesquels sont incorporées des séquences génériques « *tags* » en 5' au cours de l'amplification. Ces séquences s'hybrident avec des séquences « *tags* »-complémentaires greffées sur les supports (Macdonald et al. 2005). La fabrication des puces à ADN à haute densité sur un support de nylon a été également décrite (Yoneda et al. 2003).

I - 2 - 3 - 2 - 2 - Les supports actifs

Les supports actifs permettent la fixation des sondes ainsi que l'hybridation des séquences cibles. Mais ces supports jouent aussi un rôle dans l'acquisition et la transduction du signal. Dans cette catégorie, nous pouvons citer :

1 - 2 - 3 - 2 - 2 - 1 - Les électrodes de carbone

Le système se base sur l'immobilisation et l'hybridation des oligonucléotides simples-brins sur une électrode de pâte de carbone. L'hybridation entre les séquences complémentaires est mise en évidence par l'accroissement d'un indicateur électrochimique ; le pic "*chronopotentiométrique*" du Co(phen)^{33+} accumulé sur la surface de l'électrode par l'association entre cet indicateur et l'hybride nouvellement formé. Cela correspond à la mesure du changement soudain du potentiel électrique après l'application d'un courant électrique. La fixation des sondes sur ce support est réalisée par adsorption cumulative (Wang et al. 1996).

1 - 2 - 3 - 2 - 2 - 2 - Les fibres optiques

Un avantage majeur lié à ce support est la possibilité de constituer une puce à haute densité de sondes (Lee and Walt 2000). La fixation des sondes à l'extrémité de la fibre peut se faire par la polymérisation d'un gel de polyacrylamide contenant les oligonucléotides succinimidylés.

1 - 2 - 3 - 2 - 2 - 3 - Les métaux précieux : or et argent

Ces supports peuvent être utilisés pour les puces à ADN et les puces à protéine. Ces métaux, par leur capacités de conduction, peuvent intervenir dans la transduction électrique du signal (Beattie et al. 1993). Les puces à protéine utilisent des monocouches auto assemblées (SAMs ; "*Self-assembled monolayers*") d'alkanethiolates terminalement substituables ($\text{R(CH}_2\text{)}_{11-15}\text{S-}$) adsorbés sur des films optiquement transparents d'or ou d'argent. Les SAMs se terminent par des groupes méthyles qui adsorbent les protéines. Cette méthodologie emploie l'impression de microcontact ("*microcontact printing*"), processus non photolithographique, comme modèle de formation des SAMs à l'échelle du micromètre. Les atomes de soufre sont proposés comme intermédiaire de fixation à la surface du support (Mrksich et al. 1997). Cependant, d'autres études ont utilisé des supports en or comme supports neutres qui ne servent qu'à la fixation des sondes linéaires (Ho-Pun-Cheung et al. 2006; Livache et al. 1994) ou des sondes "*molecular beacons*" (Du et al. 2005).

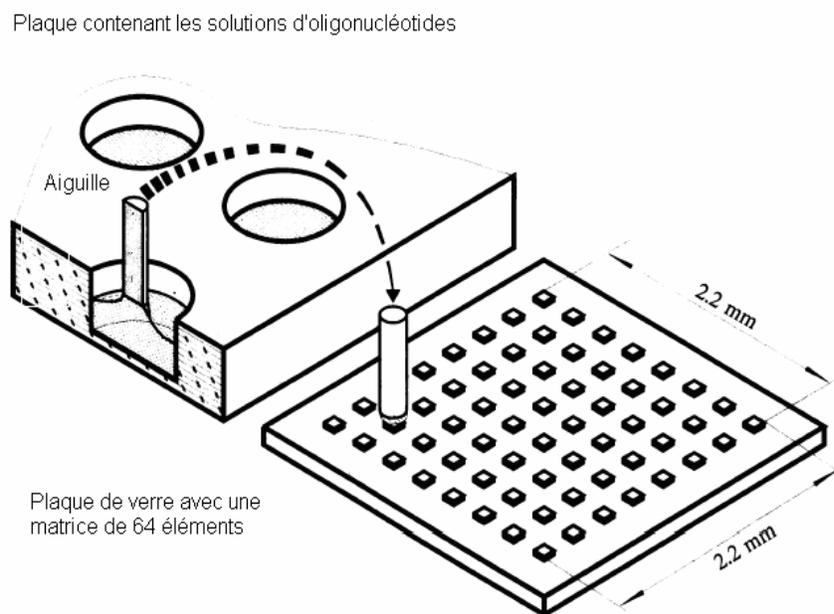
I - 2 - 3 - 3 - L'adressage des sondes sur le support

La stratégie de fixation des sondes sur les puces à ADN est très variable selon la nature du support utilisé. La problématique biologique, les contraintes expérimentales et les moyens disponibles dans les laboratoires conditionnent le choix du support utilisé et

donc, la méthode de greffage. On peut noter deux principaux types de greffage des sondes selon la composition de support et l'appareillage employé:

I - 2 - 3 - 3 - 1 - Le transfert d'oligonucléotides sur gel

Une matrice est préparée par polymérisation du gel de polyacrylamide (par exemple de 20 μm d'épaisseur) sur une surface de verre traitée par Bind-Silane. Des bandes du gel sont enlevées dans des directions x-y avec une machine de traçage ("*scribing*") ou par photolithographie et évaporation par laser (Khrapko et al. 1991; Yershov et al. 1996), formant des puces aux tailles différentes. L'espace de verre entre les fragments de gel est rendu hydrophobe par traitement par Repel-Silane. La solution d'oligonucléotides activés est transférée sur le gel ainsi activé par un robot particulier dont une aiguille est déplacée et dirigée par ordinateur (figure 3). La reproductibilité du transfert est de $\pm 8\%$. La température de l'aiguille est maintenue de manière à ce que le taux d'humidité empêche l'évaporation de goutte ou la condensation de l'eau sur l'aiguille. Après le transfert, la température de la matrice est diminuée et l'eau est donc condensée sur le gel. La matrice du gel est couverte par de l'huile (huile minérale de Nujol) et maintenue à 20°C pendant 48 h. L'huile est ensuite enlevée par de l'éthanol et de l'eau distillée. Les puces sont séchées et peuvent être conservées à 4°C pendant 1 année avant utilisation (Yershov et al. 1996).



D'après Yershov et coll., 1996

Figure 3 : Principe du transfert d'oligonucléotides sur gel.

I - 2 - 3 - 3 - 2 - La confection des sondes sur un support solide

Il existe principalement deux techniques pour la conception des sondes en un site donné sur un support solide. Pour la première, on réalise un dépôt robotisé d'oligonucléotides préalablement synthétisés par un synthétiseur automatique. Ces oligonucléotides sont des fragments d'ADN complémentaire ou des produits de PCR amplifiés. Cette technique est employée afin de produire les puces dites « spottées » ou "*spotted microarrays*". La deuxième technique ne peut être mise en oeuvre que par des sociétés industrielles spécialisées. Là, l'ADN servant de sonde est synthétisé directement sur la puce ("*synthèse in situ*").

1 - 2 - 3 - 3 - 2 - 1 - Le transfert d'oligonucléotides sur un support solide

Des solutions de sondes préalablement synthétisées sont préparées et transférées mécaniquement sur la puce au moyen d'aiguilles pilotées par des robots : « spotteur ». Des micro-gouttelettes de ces solutions sont donc déposées, selon une matrice pré-définie à un endroit précis, sur un support traité chimiquement afin de pouvoir fixer les sondes. Cette technique a été mise au point par l'équipe de DeRisi et coll. (du laboratoire de P.O. Brown) à l'Université de Stanford, aux Etats-Unis (DeRisi et al. 1997). Actuellement, il existe plusieurs modèles commerciaux de robots permettant d'obtenir des rendements allant jusqu'à plusieurs centaines de lames en une seule série de production de quelques heures. Dans ce procédé, soit l'aiguille touche le support et délivre une goutte de solution à un endroit précis où le transfert s'effectue par capillarité, soit la micro-gouttelette est délivrée au moyen d'un dispositif de type jet d'encre (éjection d'une goutte de volume contrôlée) (figure 4). Leur inconvénient majeur est la perte en sondes occasionnée par des volumes morts importants. En outre, la mise au point est délicate, et le coût de tels équipements est important. Dans les deux cas, la taille de la goutte et par conséquent la taille de l'unité d'hybridation "*spot*", peut être ajustée en prenant en considération le diamètre de l'aiguille et la viscosité de la solution. En plus, la taille du "*spot*", dans la première approche, est inversement proportionnelle au taux d'accélération de l'aiguille vers le support (Cheung et al. 1999). Le couplage des sondes sur des supports solides est très variable selon la nature du support employé. Il est basé sur la formation d'une liaison covalente entre les groupes réactifs ajoutés à la sonde (au cours de la synthèse) et la surface du support. Les oligonucléotides peuvent être activés en ajoutant sur leur extrémité 5' des groupements amines primaires, hydroxyles ou thiols qui sont réactifs avec la surface du support. Les supports doivent alors posséder une forte densité de groupes actifs. Plusieurs espèces

chimiques ont été proposées pour ce couplage [cités par (Beaucage 2001)]. Ces méthodes ont montré un très faible niveau de liaisons non spécifiques (Beaucage 2001).

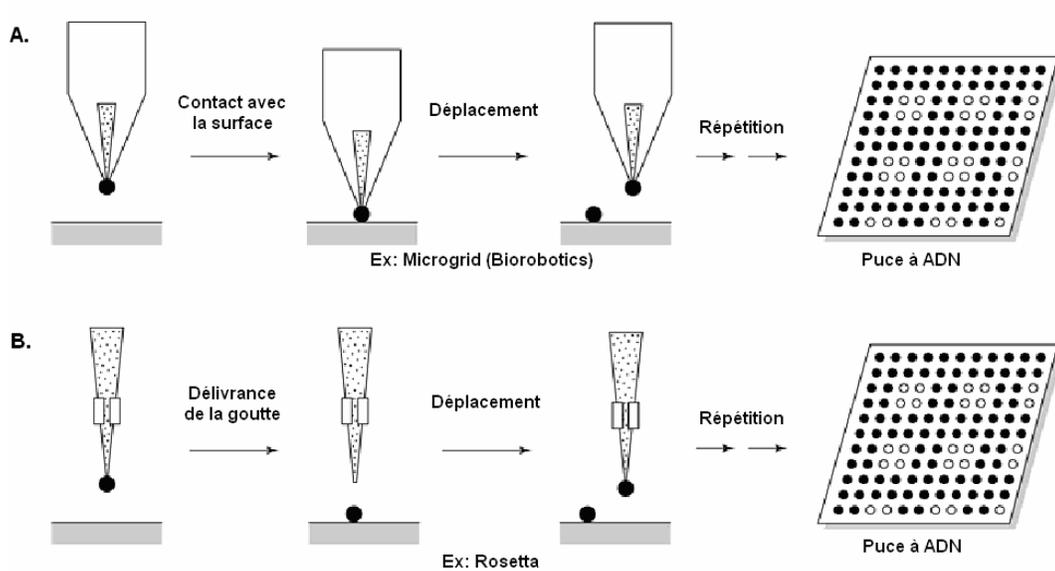


Figure 4 : Les deux principes du transfert d'oligonucléotides sur un support solide. A) Dispositif de transfert par touche d'une aiguille sur un support solide. B) Dispositif de type jet d'encre.

1 - 2 - 3 - 3 - 2 - 2 - Synthèse *in situ*

Il existe deux types de technologies pour réaliser la synthèse *in situ*. La première est la photolithographie (Lipshutz et al. 1999) (« GeneChips » de la société *Affymetrix*). La sonde est synthétisée directement sur un support solide (souvent en verre) par dépôt de couches successives des quatre bases de l'ADN permettant d'obtenir une grande diversité de séquences d'oligonucléotides. Dans un premier temps, les groupements réactifs à la surface de la puce sont recouverts d'un composé photolabile ; puis un masque photolithographique est placé au-dessus ; le système est alors soumis à une illumination dirigée. Cette illumination de régions spécifiques à travers le premier masque libère les groupements réactifs. Les groupes réactifs ainsi déprotégés, sont maintenant accessibles pour le couplage d'un premier nucléotide après le déplacement du masque (Heller 2002).

De ce fait, la réaction ne se produit qu'au niveau des régions qui ont été exposées. Le groupement photolabile situé à l'extrémité 5' du premier nucléotide fixé va pouvoir, après illumination au travers d'un deuxième masque, permettre la fixation du deuxième nucléotide également protégé par un groupement photolabile. D'autres masques peuvent être employés pour photoactiver différentes régions du substrat. La déprotection sélective de multiples secteurs contenant une séquence distincte d'oligonucléotides permet la synthèse simultanée de plusieurs types d'oligonucléotides (Chee et al. 1996; Fodor et al. 1991; Hacia et al. 1996). Des cycles additionnels de photo-déprotection et de couplage peuvent être réalisés autant de fois que nécessaire pour obtenir la chaîne d'ADN synthétique désirée (figure 5). Le nombre total de cycles est donc égal à $4 \times l$ (l = la longueur de la sonde).

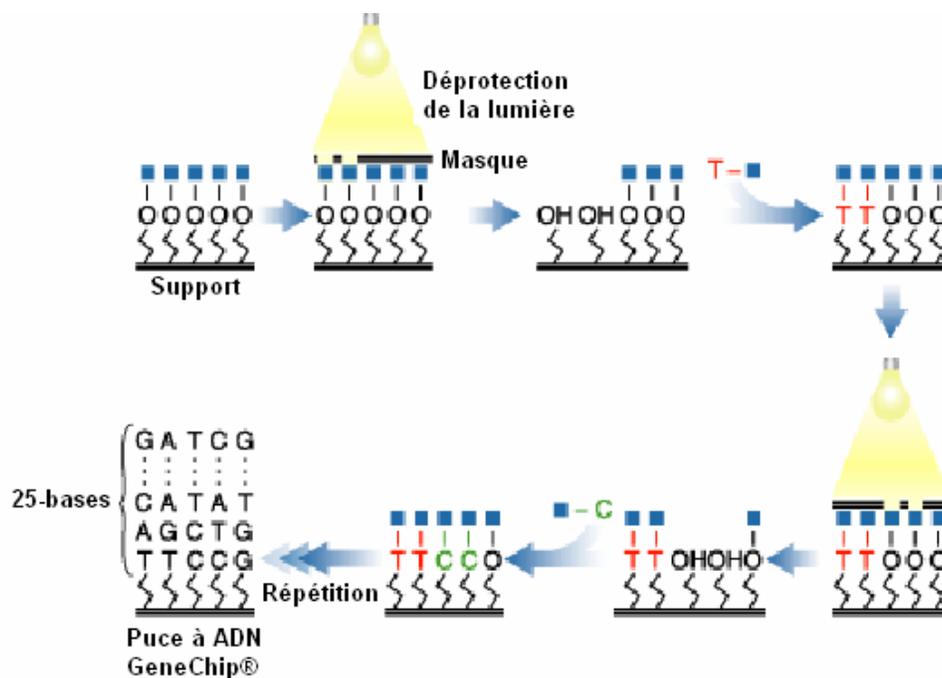


Figure 5 : Fabrication de puce à ADN d'Affymetrix (GeneChip®) par synthèse *in situ*.

Ce procédé a pour avantage de pouvoir obtenir plusieurs dizaines de milliers de "spots" sur le support en un nombre limité d'étapes (Jacobs and Fodor 1994) et de fabriquer des puces à ADN comprenant des sondes d'oligonucléotides à haute densité sur des supports solides (Fodor et al. 1991; Pease et al. 1994). En revanche, avec ce procédé,

les sondes comportent au maximum 30 bases afin d'éviter des erreurs éventuelles de synthèse. Le nombre de sondes qui peuvent être synthétisées par cette technique est seulement limité par le nombre de sites de synthèse qui peuvent être adressés avec une résolution appropriée (Fodor et al. 1991). Le problème majeur de la synthèse in situ reste l'incapacité à analyser et à corriger les éventuelles erreurs introduites lors de la synthèse in situ sur le support (McGall et al. 1996). La seconde technique est "l'impression" de type « jet d'encre » (Hughes et al. 2001) (Agilent Technologies / Rosetta Inpharmaceutics). Elle repose sur la propulsion (impulsion) de micro-gouttelettes de solution contenant des nucléotides différents et dont le volume est inférieur au nanolitre (Religio et al. 2002).

I - 2 - 4 - Marquage (fluorescence et fluorochromes)

Nous abordons dans cette partie le marquage par un fluorochrome, actuellement le plus couramment utilisé dans la méthode de puce à ADN. Ce marquage des cibles peut être réalisé avec des protocoles différents. Le marquage direct est réalisé par utilisation d'amorces marquées par un fluorochrome ou incorporation de nucléotides marqués au cours de l'amplification. Dans une deuxième approche, le marquage indirect, un nucléotide modifié est incorporé dans les amplicons au cours de l'amplification, puis les amplicons sont mis en contact avec les molécules fluorescentes qui se fixent de façon spécifique aux nucléotides modifiés. L'utilisation de fluorochromes qui réagissent avec le N7 des guanines pour fournir un complexe stable entre l'acide nucléique et le fluorochrome (ULYSIS[®] Nucleic Acid Labeling Kit) après amplification peut également être envisagée pour le marquage indirect.

I - 2 - 4 - 1 - Définitions et principe de la fluorescence

La fluorescence est un processus particulier de luminescence que peut émettre une substance. Elle correspond à l'émission de radiations électromagnétiques, généralement sous forme de lumière visible. Une substance qui émet de la fluorescence contient des molécules dites fluorescentes, également appelées fluorophores ou fluorochromes. Les fluorochromes sont en général des molécules polyaromatiques ou hétérocycliques qui possèdent la propriété d'absorber l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) générée par des radiations à faibles longueur d'onde telles que les rayons X ou les ultraviolets et de la restituer sous forme de lumière visible fluorescente (lumière d'émission) à une longueur

d'onde égale ou plus grande. Le phénomène de fluorescence est en fait le résultat d'un processus en trois phases, illustré par un diagramme d'état électronique appelé diagramme de Jablonski (figure 6) :

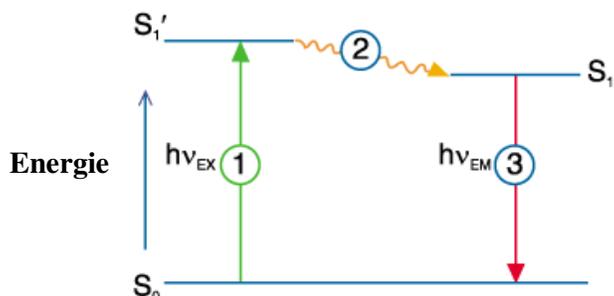


Figure 6 : Diagramme de Jablonski. Ce diagramme illustre le processus intervenant dans la création d'un état excité d'électron singulet par absorption optique et l'émission de fluorescence qui en découle. $h\nu_{EX}$: énergie du photon d'excitation ; $h\nu_{EM}$: énergie du photon d'émission ; S_0 : état stable du fluorochrome ; S_1' : état excité du fluorochrome ; S_1 : état excité précédant la relaxation de l'électron singulet ; les chiffres 1, 2 et 3 représentent les trois phases du processus de fluorescence.

- La première phase, ou phase d'excitation se produit lorsqu'une source externe telle qu'une lampe à incandescence ou un laser émet un photon d'énergie $h\nu_{EX}$ qui va être absorbé par le fluorochrome. Ce dernier se retrouve alors à l'état excité puisqu'il possède un électron supplémentaire, appelé électron singulet (S_1') qu'il va être obligé d'éjecter pour se stabiliser.
- La seconde phase, est la période de temps, extrêmement courte (de 1 à 10 nanosecondes) au cours de laquelle le fluorochrome subit des changements conformationnels qui entraînent une dissipation de l'énergie de S_1' , conduisant à un état d'excitation moindre (S_1) directement à l'origine de l'émission du photon. Ce phénomène explique pourquoi l'énergie d'émission ($h\nu_{EM}$) n'est pas, la plupart du temps, rigoureusement égale à l'énergie d'excitation ($h\nu_{EX}$).
- La troisième phase est l'émission de la fluorescence. Un photon d'énergie $h\nu_{EM}$ est émis, permettant le retour du fluorochrome à son état stable (S_0). A cause de la perte d'énergie engendrée lors de la deuxième phase, l'énergie du photon émis est plus faible et donc de longueur d'onde plus élevée que celle du photon d'excitation. Il arrive également que la longueur d'onde du photon réémis par le fluorochrome

soit de même longueur d'onde que celle du photon d'excitation, on parle alors de fluorescence de résonance.

Le phénomène de fluorescence s'arrête lorsque la source d'excitation du fluorochrome se tarit, contrairement à un autre phénomène bien connu, la phosphorescence.

I - 2 - 4 - 2 - Propriétés des fluorochromes.

Un fluorochrome est donc défini par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Ainsi, à chaque fluorochrome est attribué un spectre d'excitation qui comprend les longueurs d'onde pour lesquelles il est excité. Ce spectre est centré sur un pic correspondant à la longueur d'onde optimale pour l'excitation. Un autre paramètre important permettant de définir un fluorochrome est son coefficient d'extinction molaire qui relie la quantité de lumière absorbée pour une longueur d'onde donnée à la concentration du fluorochrome en solution. Le coefficient d'extinction molaire ou d'absorption molaire est exprimé en $M^{-1}.cm^{-1}$.

Il existe un grand choix de fluorochromes, chacun pouvant être caractérisé par ses spectres et les longueurs d'onde optimales d'excitation et d'émission (tableau 1).

Fluorochrome	Excitation(nm)	Emission(nm)
Aminomethylcoumarin, AMCA	350	450
Cyanin, Cy2	492	510
Fluorescein, FITC	492	520
Alexa Fluor 488	495	519
Indocarbocyanine, Cy 3	550	570
Alexa Fluor 555	555	568
Tetramethyl Rhodamine, TRITC	550	570
Rhodamine Red-X, RRX	570	590
Alexa Fluor 594	591	618
Texas Red, TR	596	620
Indodicarbocyanine, Cy5	650	670

Tableau 1 : Longueurs d'onde optimales d'absorption et de fluorescence pour les fluorochromes les plus couramment utilisés.

Le choix du fluorochrome s'effectue en fonction des besoins spécifiques de l'utilisateur et de la manipulation :

- certains fluorochromes sont ainsi spécifiquement utilisés pour leurs propriétés d'intercalant de l'ADN : c'est par exemple le DAPI, le Hoechst 33258 et le Bromure d'Ethidium, dont les longueurs d'ondes d'émission respectives sont 420 nm, 470 nm et 622 nm.
- les fluorophores les plus couramment utilisés pour la mise en évidence des protéines, en général couplés à des anticorps, sont le FITC (Isothiocyanate de Fluorescéine), le Texas Red ou encore Cy5, aux longueurs d'onde d'émission respectives de 525 nm, 604 nm, et 663 nm
- les sondes et amorces marquées couramment utilisées en Biologie Moléculaire (FISH, PCR quantitative, puces à ADN) sont la plupart du temps couplées à un fluorochrome tel que le Cy3, le Cy5 et le 6-FAM (dérivé de la fluorescéine).

I - 2 - 5 - Hybridation et lavage

Plusieurs éléments peuvent jouer un rôle dans la formation et la stabilité du duplex formé (Maskos and Southern 1992). Cependant peu d'études ont été faites sur des sondes couplées par leur extrémité sur un support solide. La séquence de la sonde, son taux de GC et même la localisation de la sonde sur la séquence de la cible sont parmi les facteurs essentiels pour déterminer la formation et la stabilité du duplex d'hybridation (Barczak et al. 2003). Un autre facteur important à prendre en considération est la température d'hybridation (Religio et al. 2002) et sa relation avec la température de fusion (T_m) du duplex formé. En solution, lorsque la sonde et la cible sont libres, cette relation est bien établie. La température optimale de la réaction d'hybridation se situe généralement entre 5 et 10 °C au-dessous de la valeur de T_m (Rychlik and Rhoads 1989). Cependant, il semble que les sondes immobilisées sur un support subissent une contrainte qui limite leur aptitude à former un hybride avec les cibles. Ceci entraîne une diminution du T_m de 7 à 8 °C par rapport au T_m calculé pour l'hybride en solution (Wallace et al. 1979). Une étude plus récente a montré qu'il est possible d'utiliser la valeur du T_m de l'hybridation en solution pour prévoir la stabilité de l'hybridation sur une matrice de gel (Kunitsyn et al. 1996).

La solution d'hybridation peut contenir différents composants qui vont également influencer sur le choix de la température d'hybridation. Normalement, les cibles sont placées

dans un tampon à force ionique élevée (concentration élevée en cations monovalentes : Na^+ par exemple), comme le SSC, afin de faciliter l'appariement des brins complémentaires. Dans une solution standard d'hybridation, le formamide, agent dénaturant, constitue un élément essentiel (typiquement 50 % de la solution). Le rôle du formamide est de réduire la température nécessaire pour la réassociation des acides nucléiques complémentaires. Pour 1% de formamide ajouté, la température d'hybridation diminue de 0,63 °C. Des détergents, comme le SDS et des agents bloquants, permettant aussi de réduire l'hybridation non spécifiques, sont ajoutés afin de réduire le bruit de fond.

Le lavage d'un support après hybridation peut être réalisé par différents protocoles selon la nature du support et des sondes fixées. Ce lavage se fait sous des conditions plus ou moins stringentes (la stringence : conditions expérimentales de température, de PH et force ionique permettant l'hybridation moléculaire) afin d'éliminer de la surface du support, les cibles non hybridées et toutes les hybridations croisées non-spécifiques. Seules les séquences parfaitement complémentaires doivent rester hybridées aux sondes concernées après lavage. Il est donc très important d'optimiser la température et le temps de lavage selon la taille et la séquence du duplex formé lors de l'hybridation. De plus, l'agitation augmente aussi de manière importante la stringence du lavage. Le protocole de lavage est le plus souvent fourni par le fabricant des lames utilisées pour l'hybridation.

I - 2 - 6 - Lecture

I - 2 - 6 - 1 - Les différents systèmes de lecture

Les nouvelles applications de la technologie des puces à ADN entraînent le développement de l'instrumentation utilisée pour la lecture ainsi que celui des logiciels de capture d'image, d'analyse du signal et d'interprétation des données.

Plusieurs facteurs déterminent la performance d'un lecteur de puces à ADN : la sensibilité (limite de détection), la résolution minimale, la gamme dynamique ("*dynamic range*") où la détection est linéaire, la superficie maximale de zone de scan, le temps de scan, la reproductibilité et l'uniformité du système. La description comparative détaillée des différents lecteurs des puces à ADN figure dans le tableau 2.

La haute définition, la variété des fluorochromes utilisables et le rapport coût/efficacité du lecteur sont des facteurs importants pour le choix de l'appareil. Ces

qualités sont indispensables pour une bonne exploitation de la technologie des puces à ADN et pour une analyse multiplexe précise et complète.

Un des dispositifs essentiels du lecteur est constitué par son système d'excitation et d'enregistrement. Le choix de ces composants est basé sur les applications potentielles de l'instrument et définit l'efficacité et les possibilités d'utilisation. La plupart des lecteurs de puces à ADN contiennent deux lasers 535 nm et 635 nm afin de détecter les deux fluorochromes Cy3 et Cy5 et possèdent un système fermé d'excitation. Mais les applications d'analyse utilisant de multiples fluorochromes deviennent de plus en plus fréquentes. Pour de telles approches et afin d'éviter l'extinction ou le transfert d'énergie de fluorescence entre les molécules des différents fluorochromes, la différence entre le spectre d'excitation d'un fluorochrome et celui d'émission d'un autre fluorochrome doit être au moins de 30 nm (Khomyakova et al. 2004).

Il y a deux manières d'élargir le spectre d'excitation: l'addition de plusieurs lasers comprenant les lasers bleus (Graves et al. 2002), ou bien l'utilisation d'une source lumineuse excitatrice à large spectre telle que une lampe halogène ou à mercure. L'utilisation d'une source de lumière à large spectre pour l'excitation fournit une flexibilité plus élevée dans le choix du type et du nombre de fluorochromes.

Un autre composant important déterminant l'efficacité de l'instrument est le système d'enregistrement. Deux systèmes généraux sont employés actuellement dans les lecteurs de puces à ADN. Dans la plupart des lecteurs, l'enregistrement du signal fluorescent est effectué par un détecteur avec un tube photomultiplicateur (PMT ; *photo-multiplier tube*). Les tubes photomultiplicateurs sont des détecteurs qui sont utiles dans des applications de basse intensité telles que la spectroscopie de fluorescence. En raison du gain interne élevé, les PMTs sont des détecteurs très sensibles. Ils se composent d'une photocathode et de séries de dynodes dans un tube de verre ("*vacuum*"). Quand les photons frappent la cathode photoémissive, elle émet des électrons sous l'effet photoélectrique. Au lieu de rassembler ces quelques électrons (il ne devrait pas y en avoir beaucoup, puisque l'utilisation principale des PMT est pour le signal très bas) à une anode (collecteurs d'électrons), les électrons sont accélérés vers une série d'électrodes additionnelles appelées les dynodes. Chacune de ces électrodes est maintenue à un potentiel plus élevé (positif) que la précédente. Des électrons additionnels sont donc produits à chaque dynode. Cet effet de cascade crée 10^5 à 10^7 électrons pour chaque photon frappant la première cathode

selon le nombre de dynodes et le voltage utilisé. Ce signal amplifié est finalement rassemblé à l'anode où il peut être mesuré. Les PMTs, qui détectent les photons simples, ont un « bruit » très bas et un gain extrêmement élevé. Ainsi l'énergie minimale d'un photon peut être réellement mesurée.

Une autre approche, de plus en plus fréquente pour les lecteurs des puces à ADN est l'enregistrement de signaux avec un capteur CCD "*charge-coupled device camera*". Cet appareil photo est construit avec une technologie de semi-conducteur où la cellule photo-électrique est sensibilisée en lui donnant une charge électrique avant l'exposition. Son circuit intégré, sensible à la lumière, stocke et fournit les données pour une image de telle manière que chaque pixel est converti en charge électrique, dont l'intensité est liée à une couleur dans le spectre lumineux. Le système « excitation par laser-enregistrement basé sur PMT » a une limite majeure. Le temps de scan (acquisition de l'image), ligne par ligne, est très important pour des images à haute résolution. Au contraire, le scan, champ par champ, des instruments à capteur CCD réduit fortement la période d'acquisition des images à haute résolution.

La possibilité d'acquisition rapide et d'analyse détaillée des images haute résolution ouvre des perspectives prometteuses concernant l'augmentation du nombre de "*spot*" sur les puces à ADN par diminution de leur taille. Il est important de mentionner que la vitesse de scan dépend de la résolution de l'image et du temps d'acquisition de chaque ligne ou champ. Une des caractéristiques les plus importantes d'un système de lecture est sa sensibilité ou limite de détection. Celle-ci indique le plus bas signal qui peut être exactement mesuré, elle s'exprime par molécules/ μm^2 .

Compagnie	produit	résolution	Système confocal?	système de détection	Sensibilité	Zone maximum de scan	Taux maximum de scan	Format d'image	Détection de plus de 2 canaux?	Longueurs d'onde de laser / nm	Peut on employer des fluorophores autres que Cy3 ou Cy5?	Changez les paramètres pendant le scan?	publications représentatives
Affymetrix Inc. #	Affymetrix 428 scanner	10µm (maximum)	Oui	PMT	<1 fluor/µm ² (cy3)	22mm × 75mm	50 lignes par second à 10µm	tif (16 bit), bmp	*	532, 635 d'autres disponibles	Oui	*	*
	Affymetrix GeneChip Scanner 3000 7G	0.51 µm à 2.5 µm	*	PMT	<0.5 fluor/µm ²		10.5 mins à 1.56 µm	tif (16 bit)	*	532 nm	*	*	*
Agilent	Agilent DNA Microarray Scanner	2, 3, 5, or 10 µm	*	PMT	0.05 fluor/µm ²	21.6mm × 71mm	20 mins à 2 µm 15 mins à 3 µm	*	*	532, 633	Oui	*	*
Applied Precision Inc.	ArrayWoRx Biochip Reader	3.25µm à 26µm	*	CCD; 14-bit	0.1 fluor/µm ² (Cy3 & Cy5)	22mm × 60mm	5.5 mins à 10µm	tif (16 bit), softWoRx (24bit propriété industrielle)	Oui (facultatif)	Lumière source avec filtres	Oui 3	*	1. Brown C. et al. PNAS 98:8944-8949 2. MacBeath G. et al. Science 289:1760-1763
	ArrayWoRx Microarray Scanner				*	22mm × 60mm	*		Oui	Lumière source avec filtres	*	*	
Axon Instruments Inc.	GenePix 4000B	5µm à 100µm	Non	PMT	0.1 fluor/µm ² (Cy3 & Cy5)	22mm × 75mm	12 mins à 5µm	tif (16 bit), jpg	Non	409, 473, 532, 594, 635, 670, 690	Oui 3	Oui (PMT voltage & focus plane)	1. Takizawa PA. et al. Science 290:341-344 2. Perou CM. et al. Nature 406:747-752 3. Gregory AK. et al. J. Am. Chem. Soc. 123:361-362
GeneFocus #	DNAscope IV & V	5µm à 30µm	Oui	PMT	*	22mm × 70mm	*	*	Oui	532, 635, d'autres disponibles	Oui	*	*
	Open Frame Research DNAscope	2µm ou 10µm	Oui	*	*	22mm x 70mm	*	*	*	532, 635, d'autres disponibles	Oui	*	*
	Microscope / MACROscope	0.2 et 2 µm	Oui	PMT	*	20mm x 20mm à résolution optique de 2 microns		8 ou 16-bit TIFF	OUI	*		*	*

Genomic Solutions Inc.	GeneTAC 2000	28µm (fixé)	Non	CCD; 12-bit	0.02 fluor/µm2 (Cy5)	25mm × 38mm	0.1 sec à 5 mins par canal	tif (16 bit)	Oui		Oui 3	Non	*
	GeneTAC LS IV	1µm à > 100µm	Non	PMT	0.02 fluor/µm2 (Cy5)	25mm × 65mm	4 mins à 10µm	tif (16 bit)	Oui		Oui 3	Oui (PMT gain & offset)	
	GeneTAC UC-4	1µm à > 100µm	Non	PMT	0.02 fluor/µm2 (Cy5; estimé)	25mm × 75mm	10 mins à 5µm (estimé)	tif (16 bit)	Non		Oui 3	Oui (PMT gain & offset)	
Imstar	OSA Reader	- 0.69µm (10×) - 1.1µm (6.5×) - 2.8µm (2.6×)		CCD; 12-bit	Cy3: 12 fluor/µm2 Cy5: 25 fluor/µm2 TexasRed: 9 fluor/µm2	25mm × 77mm En option; jusqu'à 6 lames en un seul batch	- 25 sec/cm2 à 2.8µm/pixel - 350 sec/cm2 à 0.7µm/pixel	Tif.	Oui (facultatif)	Lumière source avec filtres	Oui 3	Non	1- E.B. Khomyakova et al. Cellular and Molecular Biology 50(1) - 2004
Packard Bioscience #	ScanArray Lite	5µm à 50µm	Oui	PMT	0.1 fluor/µm2	22mm × 73mm	> 10 mins à 5µm (estimé)	Tif (16 bit), (propriété industrielle)	Non	543, 594, 612, 633	Oui	Non	1. Zhao R. et al. Genes Dev 14:981-993 2. Gracey AY. et al. PNAS 98:1993-1998 3. Yarwood SJ. et al. PNAS 98:4472-4477
	ScanArray 4000	5µm à 50µm	Oui	PMT	0.1 fluor/µm2	22mm × 73mm			Non	488, 514, 532, 543, 594, 612, 633	Oui	Non	
	ScanArray 4000XL	5µm à 50µm	Oui	PMT	0.1 fluor/µm2	22mm × 73mm			Oui	543, 594, 612, 633	Oui	Non	
	ScanArray 5000	5µm à 50µm	Oui	PMT	0.1 fluor/µm2	22mm × 73mm			Oui	488, 543, 594, 633	Oui	Non	
	ScanArray 5000XL	5µm à 50µm	Oui	PMT	0.1 fluor/µm2	22mm × 73mm			Oui	488, 514, 543, 594, 633	Oui	Non	
Perkin Elmer	Scan Array Express HT	5, 10, 20, 30 et 50µm	Oui	PMT	0,05 fluor/µm2	22mm x 73mm	20 lignes par second à 10µm	TIF, BMP, JPEG ou Raw	Oui	Jusqu'à 5 de: 488nm, 514nm, 543nm, 594nm, 612nm et 633nm	Oui 3	*	*

Virtek Vision International Inc.	ChipReader	10µm à 80µm (tout les 10µM)	Oui	2 PMT	*	22mm × 65mm	*	tif (16 bit)	Non		Oui 3	Oui	1. Chen et al. J. Clin. Microbiol. 39:696-704
	ChipReader High Resolution	5µm à 40µm (tout les 5µM)	Oui	2 PMT	*	22mm × 65mm	*	tif (16 bit)	Non		Oui 3	Oui	
	ChipReader Extreme	3µm à 24 µm (tout les 3µM)	Oui	2 PMT	*	22mm × 65mm	20 lignes par second à 3µm	tif (16 bit)	Non		Oui 3	Oui	

L'information non fournie mais disponible sur leur website

* L'information non fournie et n'est pas disponible sur leur website

1. Système de détection – PhotoMultiplier Tube (PMT); Charge Coupled Device (CCD)

2. Taux maximum de scan d'une image sous le balayage de résolution le plus élevé

3. Fluorochromes autre que Cy3 et Cy5:

a. Applied Precision - Alexa 488, Alexa350

b. Axon - Alexa 400, Cy2, 5-FAM, Fluor X, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, POPO-3, PO-PRO-3, Cy3.5, Alexa 568, Alexa 594, BIODIPY 600/650-X, Cy5.5, Cy7

c. Genomic Solutions

i. GeneTAC 2000: tous les fluorochromes dans les longueurs d'onde de lumière visible, y compris FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Alexas, BODIPYs etc...

ii. GeneTAC LS IV: tous les fluorochromes dans les longueurs d'onde de lumière visible, y compris FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Alexas, BODIPYs etc...

iii. GeneTAC Uc-4: tous les colorants excitants verts, et tout teint spectralement semblable à Cy5

d. Imstar - : tous les fluorochromes dans les longueurs d'onde de lumière visible, y compris FITC, Cy3, Texas Red, Cy5, Alexas, BODIPYs ; excités dans des longueurs d'onde de 370 nm à 635 nm

I. Perkin Elmer - Scan Array Express HT: Extensible avec des longueurs d'onde de presque 70 fluorochromes alternatifs

F. Virtek - Cy3 et Cy5 semblables

Tableau 2 : Description comparative des différents lecteurs des puces à ADN les plus couramment utilisés.

I - 2 - 6 - 2 - Le lecteur OSA Imstar Reader

Nous avons choisi le lecteur OSA Imstar Reader afin de réaliser le scan pour la validation finale de notre travail de recherche. Pour cela, les caractéristiques du lecteur OSA Imstar Reader vont être d'avantage détaillées. Ce lecteur a été développé à partir d'un microscope fluorescent (Nikon...), afin de scanner des puces à ADN pour la recherche en biologie moléculaire, en biotechnologie et pour le diagnostic moléculaire. La validation de l'instrument a été basée sur la caractérisation comparative des paramètres significatifs tels que la sensibilité et la linéarité de la gamme dynamique, qui ont défini sa performance, ainsi que la variété des fluorochromes qui peuvent être détectés par ce système

Le système combiné d'excitation (lampe à mercure – laser, 635 nm), utilisé dans ce lecteur, permet l'excitation efficace des fluorochromes bleus, verts et rouges. Les longueurs d'onde d'excitation sont choisies par des filtres d'interférence avec une bande de 30 à 65 nm selon les fluorochromes utilisés. Le système optique adapté et la sensibilité élevée du capteur CCD dans les longueurs d'ondes entre 370 et 730 nm fournissent un enregistrement efficace de la fluorescence émise.

La résolution d'image la plus élevée fournie par l'instrument est de 0,69 μm . Par ailleurs, le logiciel spécifique du lecteur Imstar-OSA reader fournit une flexibilité élevée en sauvegardant les images acquises à toute résolution.

Le lecteur possède les caractéristiques suivantes :

- Résolution minimale 0,69 μm
- Deux grossissements sélectionnables
- Zone utile de scan : 25×77 mm (1 lame standard)
- Taille de chaque champ de capture : 3600×2700 μm
- Mise au point automatique permanente
- Dynamique d'acquisition : 12 bits
- Vitesse de scan (avec temps d'exposition moyen) : 25 sec/ cm^2 à une résolution de 2,8 μm /pixel ; 350 sec/ cm^2 à 0,7 μm /pixel

Le lecteur Imstar OSA Reader comporte un system de capture et d'analyse d'image qui se compose de :

- Matériel :

1. Microscope motorisé pour scan multi-résolution ; autofocus en continu ; capteur CCD digital haute résolution ; système d'excitation multi-couleurs pour tous les filtres interférentiels de 330 nm à 600 nm (correspondant au FITC, Cy3, Texas Red, Rhodamine, Alexas, BODIPYs)

2. Un système de contrôle de température ; un contrôleur de mouvement 3D ; un contrôleur de filtres.

- Logiciel : où les principales fonctionnalités sont :

1. Pilotage de toutes les motorisations des composants matériels
2. Capture de tout ou partie pré-définie d'une lame
3. Analyse d'un microarray ou de multiples arrays
4. Positionnement automatique de grille avec ajustement bidirectionnel interactif
5. Détection automatique des "*spots*" et de leur morphologie (contrôle qualité)
6. Evaluation et correction automatiques de bruit de fond
7. Analyse des images acquises ainsi que des images importées au format TIF.
8. Edition, gestion et présentation à l'écran des paramètres des études (LabBook)
9. Affichage et analyse de groupes de "*spots*" pour comparaison
10. Outils de transformation et traitement d'image
11. Zoom haute résolution

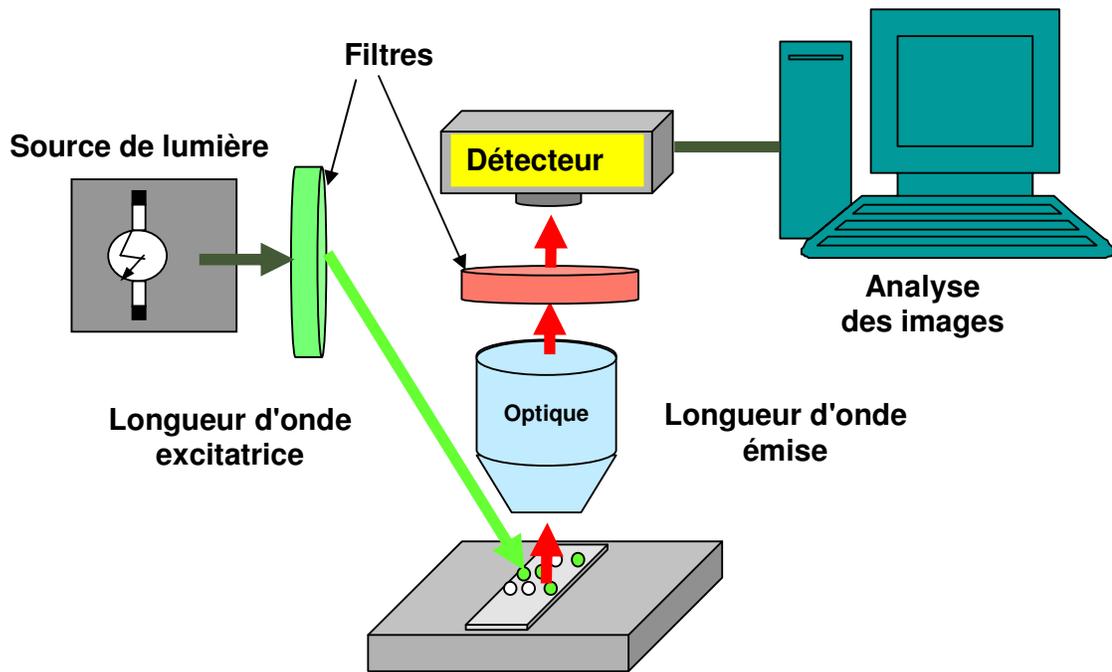


Figure 7 : Système de lecture des puces à ADN : «IMSTAR OSA Reader».

I - 3 – Exemples représentatifs de méthode de détection de variant nucléotidique par des sondes fixées sur un support – « Puces à ADN »

I - 3 - 1 - Technologie d'extension d'une base unique ; SBE-TAGS (*Single Base Extension – TAGS array*)

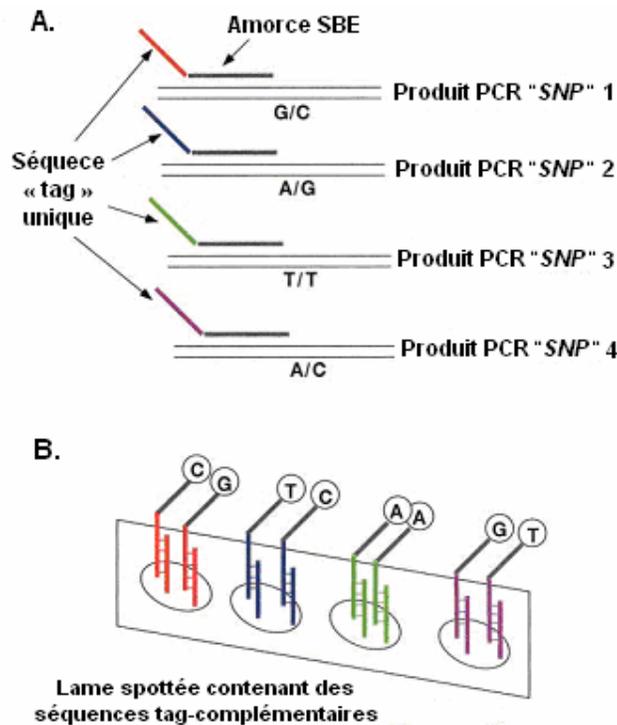
Les polymorphismes mononucléotidiques peuvent être identifiés par cette méthode d'extension d'une base unique à l'aide d'amorces bifonctionnelles contenant en 5' une séquence générique « tag », également appelé code barre ou zip-code, suivi d'une séquence locus-spécifique. La base en 3' de ces amorces est hybridée de façon adjacente au "SNP" analysé sur la cible. Chaque amorce est marquée par un « tag » différent et unique (figure 8).

Les amorces de SBE sont conçues normalement pour mesurer 16–25 bases. Les « *tags* » sont d'environ 15 nucléotides situés à l'extrémité 5' des amorces SBE pour faciliter l'attachement au support et n'interfèrent pas dans l'hybridation avec la cible (Hirschhorn et al. 2000). Cet attachement est réalisé par l'hybridation des « *tags* » avec des séquences « *tags* »-complémentaires greffées sur la puce. Ces séquences sont souvent couplées sur une lame de verre (van Moorsel et al. 2004).

Après une première étape d'amplification PCR de la séquence à analyser, des réactions de SBE sont réalisées en solution à l'aide de différentes amorces-« *tags* » simultanément. Ces amorces, après hybridation avec la séquence analysée appropriée, sont allongées avec un seul didésoxyoligonucléotide fluorescent complémentaire en utilisant l'ADN polymérase en présence des quatre didésoxyoligonucléotides (A, T, C, G), chacun marqué par un fluorochrome différent. Pour enlever l'excès de ddNTPs et d'amorces, un mélange de phosphatase alcaline de crevette (*Pandalus borealis*) pour déphosphoryler les nucléotides et d'exonuclease doit être ensuite ajouté.

Après hybridation sur la puce et lavage, les signaux des "*spots*" sont acquis par un lecteur de puces. Le fluorochrome détecté définit le nucléotide supplémentaire et par conséquent le nucléotide complémentaire analysé de la cible.

Puisque chaque "*spot*" (unité d'hybridation) comporte un « *tag* » distinct, les réactions de génotypage peuvent être exécutées de manière multiplexée, et le produit résultant peut alors être « démultiplexé » par l'hybridation sur une puce générique comportant l'ensemble des séquences « *tags* »-complémentaires. Cependant, une telle analyse exige la conception soigneuse d'amorces et « *tags* » afin d'éviter les hybridations croisées entre les amorces, les « *tags* », les séquences « *tags* »-complémentaires et les cibles (Kaderali 2007).



D'après Hirschhorn et coll., 2000

Figure 8 : Principe de la technologie d'extension d'une base unique. A) réactions de SBE réalisées en solution à l'aide de différentes amorces-« tags » simultanément. B) hybridation des « tags » avec leurs séquences complémentaires sur la puce.

I - 3 - 2 - Technologie d'extension d'amorce spottée : APEX (*Arrayed Primer Extension*)

La méthode Apex est basée sur l'immobilisation bidimensionnelle des sondes oligonucléotidiques sur une puce. Ces oligonucléotides sont immobilisés par l'intermédiaire de leur extrémité 5' sur une surface de verre. Des centaines de milliers de sondes (amorces) déjà conçues peuvent être employées. En effet, outre leur implication dans la fixation des cibles, les sondes greffées jouent aussi le rôle d'amorce pour leurs cibles hybridées. Ces sondes sont alors allongées chacune par un seul didésoxynucléotide marqué par un fluorochrome après hybridation de leurs cibles complémentaires. L'ADN du

patient est d'abord amplifié par PCR et ensuite purifié. Puis, les produits amplifiés subissent une digestion enzymatique (fragmentation). Les dNTPs restants sont ensuite désactivés par une phosphatase alcaline (*Pandalus borealis*). Après hybridation de l'ADN cible, une élongation cible-dépendante des sondes est effectuée par une ADN polymérase pour incorporer le seul didésoxynucléotide marqué complémentaire (A, T, C, G portent chacun un marquage spécifiques) (Head et al. 1997). Après lavage, le signal est acquis par un lecteur de puces à ADN (figure 9). Le fluorochrome détecté définit le nucléotide ajouté et par conséquent le nucléotide complémentaire de la cible analysée (Kurg et al. 2000; Schrijver et al. 2007; Schrijver et al. 2005).

Un paramètre essentiel de la méthode APEX est la fidélité de la réaction d'élongation qui dépend de la polymérase utilisée. L'enzyme est dotée d'une activité correctrice ("*proof reading*") évitant les mésappariements de l'extrémité 3' de la sonde (Kurg et al. 2000).

Par ailleurs, en employant cette élongation d'amorce, chaque position sur la puce, où des amorces spécifiques sont greffées, identifie une base unique de la séquence à étudier suite à la concurrence des quatre terminateurs marqués pour le même "*spot*". De ce fait, la complexité est au moins réduite d'un facteur quatre.

La fragmentation des produits de PCR offre plusieurs avantages : réduire les effets des structures secondaires, réduire les températures d'hybridation et permettre l'analyse des deux brins simultanément (sens et anti-sens). La fragmentation favorise également une mobilité plus importante de la cible et augmente sa concentration efficace.

La méthode APEX peut être employée pour analyser des mutations ponctuelles, des délétions, ou des insertions connues et peut également identifier la présence de polymorphismes inconnus.

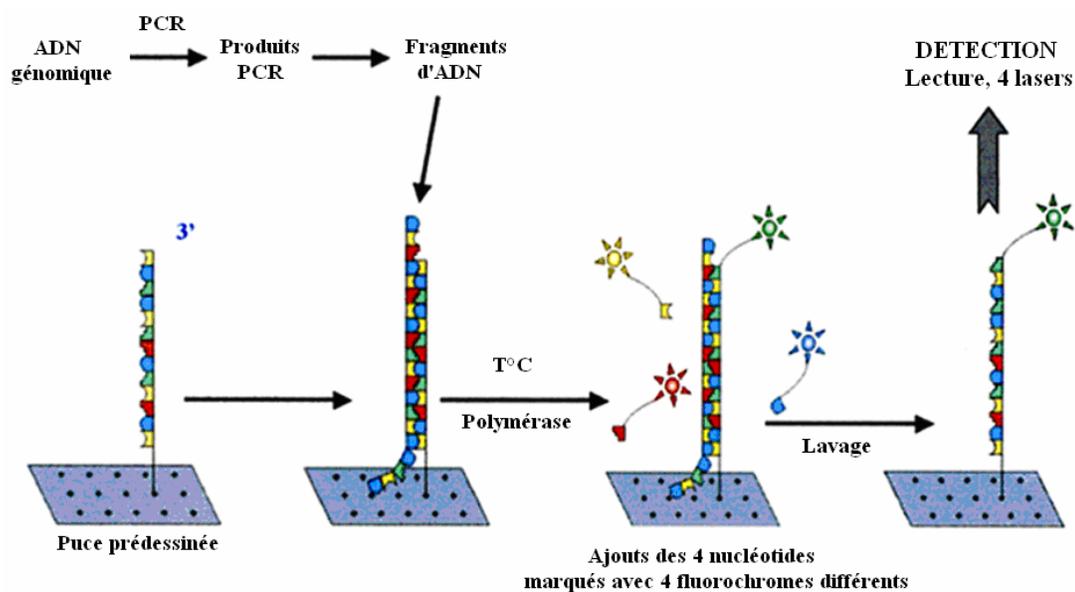


Figure 9 : Principe de la technologie d'extension d'amorce spottée (Apex).

I - 3 - 3 - Technologie d'extension 'allèle-spécifique' d'amorce (*Allele-specific primer extension*)

Le principe de cette méthode est basé sur une élongation 'allèle-spécifique' éventuelle des amorces (sondes) immobilisées afin de détecter les deux variants d'un "SNP". Deux sondes, différant par un seul nucléotide à leurs extrémités 3', sont greffées pour chaque "SNP" (figure 10). En effet, elles définissent chacune le variant d'un allèle, la base en 3' de chaque sonde étant complémentaire de l'un des deux allèles du "SNP". Ces sondes sont couplées par leurs extrémités 5' sur un support solide.

D'abord, des PCR multiplexes, sont effectuées en utilisant des amorces sens incluant la séquence de reconnaissance de la polymérase T7 en 5'. Cette amplification produit des amplicons portant la séquence promotrice de l'ARN polymérase T7. Ensuite, ces produits de PCR sont déposés sur la puce dans une solution contenant :

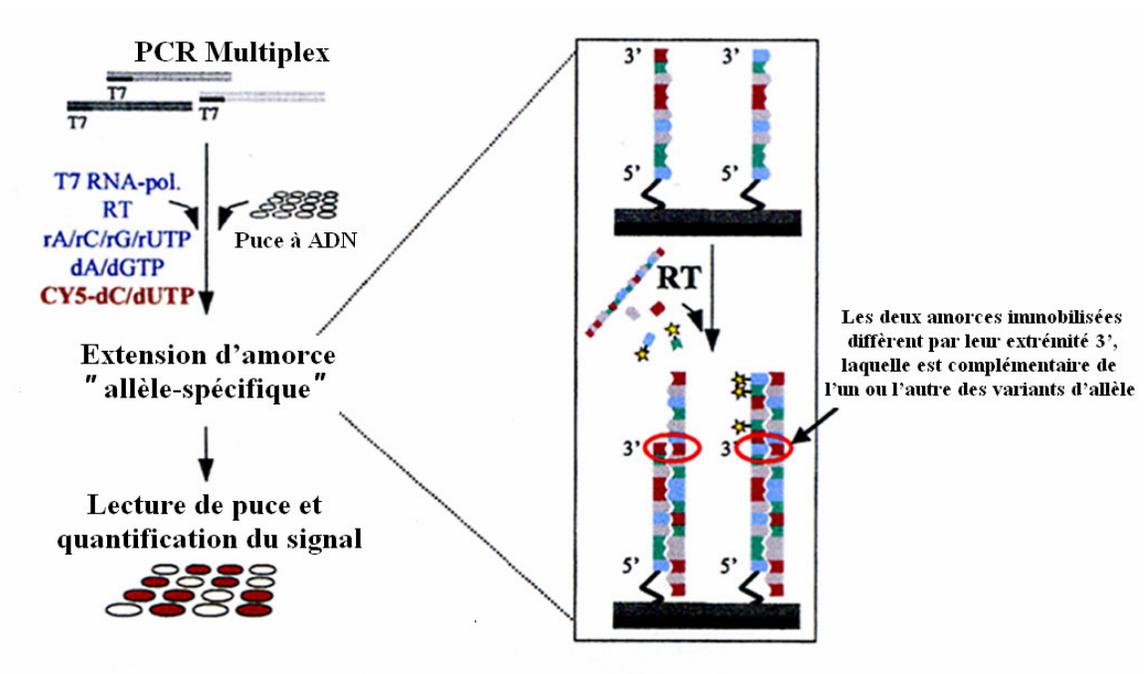
- une ARN polymérase T7 et des rNTPs, afin de produire des cibles ARN dans un premier temps.

- une Transcriptase Inverse (RT ; "*Reverse Transcriptase*") et des dNTPs pour réaliser la réaction de génotypage "allèle-spécifique" dans un deuxième temps. Un ou deux analogues de nucléotides (A, T, C, G) fluorescents sont employés dans cette étape comme marqueurs (Pastinen et al. 2000).

Les réactions de transcription et d'élongation sont réalisées sur une puce composée d'une lame de verre possédant des puits de réaction miniaturisés. Sur deux puits adjacents, les deux types de sondes sont greffés pour le génotypage de chaque "*SNP*". Cela rend possible l'analyse parallèle d'un grand nombre de "*SNP*".

La RT allonge les amorces immobilisées après l'hybridation de leur cible complémentaire. Elle permet d'ajouter les désoxynucléotides complémentaires de l'ARN hybridé de la sonde à partir de l'extrémité 3'. Cette extension se produit seulement si le nucléotide à l'extrémité 3' de l'amorce est complémentaire à la séquence cible. Les signaux de fluorescence de chaque paire d'amorces sont comparés, et l'intensité des signaux définit le génotype à chaque site. Des signaux élevés sont donc détectés dans les amorces que la RT a allongées, alors qu'aucun signal n'est détecté quand il n'y a pas de complémentarité entre l'extrémité 3' de l'amorce et de la cible (aucune extension n'ayant pu se faire).

L'utilisation des cibles d'ARN a été recommandées étant donné le meilleurs rapport signal/bruit de fond, en comparaison à des cibles d'ADN (Pastinen et al. 2000). Cependant, d'autres études ont décrit l'hybridation de produits d'amplification d'ADN génomique total sur des puces de type "*BeadChips*". Les sondes employées dans ces études étaient plus longues de l'ordre de 50 bases (Gunderson et al. 2006).



D'après Pastinen et coll., 2000

Figure 10 : Principe de la technologie d'extension 'allèle-spécifique' d'amorce.

I - 3 - 4 - Les méthodes basées sur des billes "Bead Arrays" ou "BeadChip" :

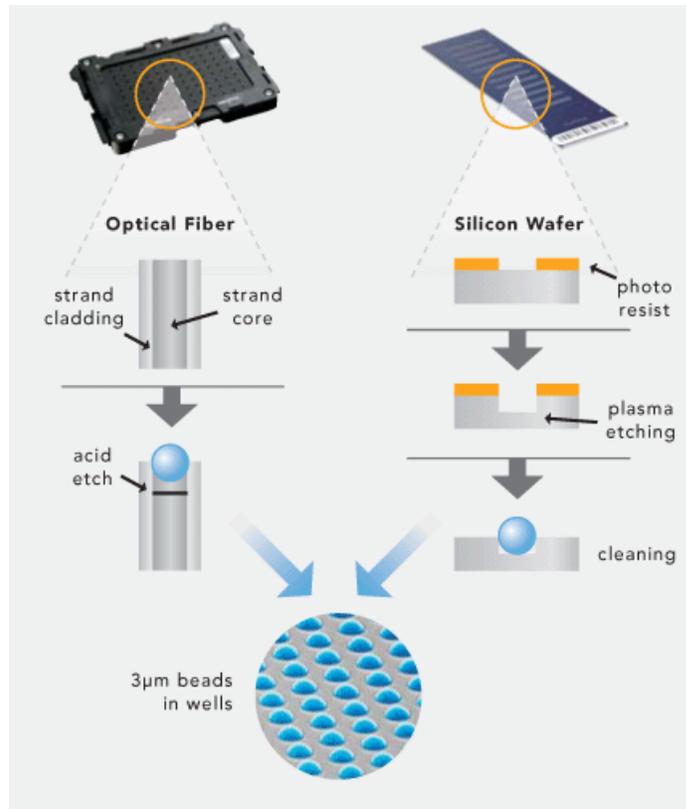
Ces méthodes font partie des techniques utilisant des puces à ADN portant des sondes linéaires. Elles sont basées sur l'utilisation de billes de silice de l'ordre de 3 microns. Chaque bille est couverte de centaines de milliers de copies d'un oligonucléotide (sonde) spécifique qui agissent en tant que séquence de capture au cours de l'analyse sur la puce à ADN. Ces billes sont réparties de façon aléatoire sur un de ces deux types de support : des faisceaux de fibres optiques ou des supports en silice (figure 11). Une fois fixées sur un de ces deux supports, les billes ont un espacement uniforme d'environ 5,7 microns.

Les deux principes majeurs de la détection par ces puces sont :

- l'extension allèle-spécifique en employant le génotypage avec la technologie "Infinium" (Illumina) (Gunderson et al. 2006) ou la technologie "BeadChip" (BioArray

Solutions) (Edelmann et al. 2004 ; Li et al. 2004). La réaction consiste en une amplification d'ADN suivie d'une fragmentation. Le produit est ensuite hybridé sur un réseau de billes sur lesquelles sont attachées des amorces (sondes) spécifiques et où chaque type différent de billes est présenté de nombreuses fois pour augmenter la précision. Le produit hybridé est ensuite allongé avec des désoxynucléotides marqués puis détecté par un scanner. Une polymérase permet d'ajouter les désoxynucléotides complémentaires de l'ADN hybridé de la sonde à partir de l'extrémité 3'. Cette extension se produit seulement si le nucléotide à l'extrémité 3' de l'amorce est complémentaire de la séquence cible. Des signaux élevés sont donc détectés dans les amorces que la polymérase a allongées, alors qu'aucun signal n'est détecté quand il n'y a pas de complémentarité entre l'extrémité 3' de l'amorce et la cible (aucune extension n'ayant pu se faire).

- la technologie "GoldenGate assay" (Illumina) (Oliphant et al. 2002; Fan et al. 2003) consiste en une réaction d'extension allèle-spécifique suivie d'une amplification par PCR. Les produits sont par la suite hybridés sur un réseau de billes sur lesquelles est attaché un certain type de séquences "tags". L'analyse de chaque SNP nécessite deux oligonucléotides (sondes) contenant chacun une séquence complémentaire d'une région adjacente de la position du SNP sur la cible. Ces oligonucléotides sont employés pour l'identification de l'ADN cible flanquant le SNP étudié de deux côtés. Des séquences complémentaires à des amorces universelles et des séquences génériques "tags" sont insérées au moyen de ces oligonucléotides. Après hybridation de ces deux oligonucléotides sur la cible, une réaction de génotypage peut être réalisée. Il s'agit d'une extension allèle-spécifique de la sonde sens qui est employée pour distinguer le variant de SNP. Cette réaction est suivie par une ligation de la sonde allongée avec l'autre sonde anti-sens flanquant le SNP de l'autre côté. Ces réactions de génotypage produisent des matrices qui peuvent être amplifiées par PCR en utilisant des amorces universelles pour lesquelles les séquences complémentaires ont déjà été insérées au moyen des deux sondes dans la première réaction de génotypage. Un marquage allèle-spécifique est réalisé en utilisant les amorces de PCR. Les produits finaux de ces réactions sont ensuite capturés par des séquences "tags"-complémentaires greffées de manière spécifique sur les billes de la puce à ADN. Chacune de ces billes est représentée de nombreuses fois afin d'augmenter la précision.



D'après Illumina (www.illumina.com)

Figure 11 : Les deux types de supports utilisés pour la technologie BeadArrays

I - 3 - 5 - Technologie CSH (*Contiguous Stacking Hybridization*)

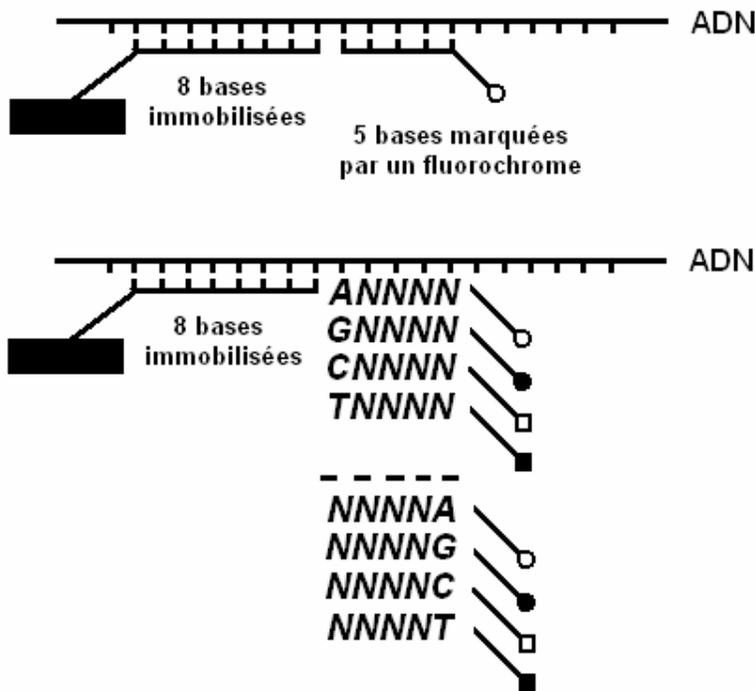
La technologie CSH (*Contiguous Stacking Hybridization*) a été développée pour simplifier la conception des puces à ADN et augmenter la spécificité de l'hybridation grâce à des sondes courtes et en nombre limité. La CSH exploite les propriétés des interactions d'"empilement" (*Stacking Interactions*) qui s'exercent entre les bases adjacentes de deux sondes hybridées l'une à côté de l'autre à leur cible. Ces interactions d'"empilement" stabilisent de manière réciproque les duplexes que ces sondes forment avec l'ADN (Parinov et al. 1996).

La CSH utilise deux types de sondes. La première est courte (huit bases), immobilisée dans un gel de polyacrylamide et conçue pour s'hybrider avec sa cible, juste à côté de la base à analyser. La deuxième sonde est elle aussi de petite taille (cinq bases), et marquée par un fluorochrome. Elle est conçue pour s'hybrider dans le prolongement de la première sonde, au niveau de la base à analyser (figure 12). La présence d'interactions d'"empilements" entre les deux sondes permet leur stabilisation réciproque, même en l'absence de liaison phosphodiester entre elles (Khrapko et al. 1991; Parinov et al. 1996). Ainsi, les duplex 'sonde pentamérique/cible', plutôt faibles par eux-mêmes, voient leur fixation et leur spécificité renforcées par la présence de la sonde octamérique. Un duplex de treize nucléotides est formé, sans liaison phosphodiester entre les deux sondes. Le support du gel, dans lequel sont immobilisées les sondes octamériques, possède une très grande capacité d'immobilisation tridimensionnelle. C'est un élément important de la CSH.

Si la sonde octamérique est unique, la CSH utilise en fait cinq jeux de quatre sondes pentamériques différentes. Le premier jeu comprend quatre sondes dont la première base varie et dont les séquences sont les suivantes : A-NNNN, T-NNNN, C-NNNN et G-NNNN, où N correspond soit à des bases complémentaires de la cible, soit à des bases universelles de spécificité multiple (5-nitroindole, par exemple). Les sondes sont marquées par des fluorochromes différents pour chacune des quatre premières bases. Après la mise en présence de l'ADN cible et des deux types de sondes, puis un lavage, la lecture est effectuée grâce à un microscope à fluorescence à quatre canaux couplé à un capteur CCD. Ce dispositif permet de distinguer les quatre fluorochromes. Lors du "*run*" suivant, un autre jeu de sondes pentamériques sera employé : cette fois-ci, la deuxième base des sondes variera comme suit : N-A-NNN, N-T-NNN, N-C-NNN, N-G-NNN. Ces quatre sondes seront aussi marquées par des fluorochromes différents. Trois *runs* supplémentaires seront nécessaires pour mener à bien l'analyse de la séquence d'intérêt, en faisant varier la troisième, la quatrième puis la cinquième base des sondes pentamériques. Aucune synthèse supplémentaire de nucléotides n'est par ailleurs nécessaire.

Comparé au séquençage par hybridation classique, la CSH offre une très grande exactitude de séquençage grâce à l'utilisation des interactions d'"empilement" et des sondes pentamériques (Parinov et al. 1996). La CSH permet de différencier de manière

fiable les duplexes parfaits des hybrides contenant des mésappariements, en particulier terminaux. La présence d'un mésappariement semble déstabiliser de manière plus importante une sonde pentamérique que les oligonucléotides plus longs (sonde octamérique, par exemple). Un mésappariement dans le duplex 'sonde pentamérique/cible' bloque habituellement toute hybridation, tandis qu'un mésappariement dans le duplex 'sonde octamérique/cible' semble simplement diminuer l'importance de l'hybridation. Même un mésappariement de type G-T en position 5'-terminale de la sonde pentamérique diminue de manière significative le signal d'hybridation. La présence d'un mésappariement affaiblit donc très nettement l'interaction de la sonde pentamérique avec le couple 'cible/sonde octamérique' (Yershov et al. 1996).



D'après Parinov et coll., 1996

Figure 12 : Principe de la technologie CSH.

I - 3 - 6 - Technologie " *hairpin* " (Serial Genetics[®])

Les "*hairpins*" sont des sondes dites « en épingle à cheveux » dont la structure présente une tige et une boucle. L'élément qui distingue ces "*hairpins*" des sondes conventionnelles est la présence de la tige, générée grâce à la parfaite complémentarité des séquences des deux extrémités de la sonde, ou « bras », qui comptent chacun 5 à 7 bases (figure 13). Le reste de la sonde ne présente pas d'auto-appariement, créant ainsi la boucle (simple-brin), qui comprend quinze à dix-huit bases. Celle-ci constitue la véritable séquence sonde, utile à l'hybridation : elle est centrée autour de la base à analyser (position de mutation).

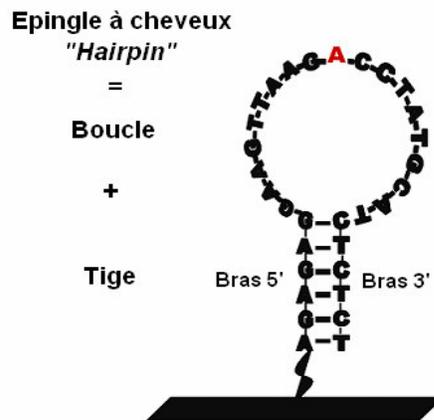


Figure 13: Structure de la sonde épingle à cheveux : "*hairpin*".

Quand la séquence de la cible ne correspond pas parfaitement à celle de la boucle, la tige reste « fermée ». Par contre, lors d'une hybridation avec une séquence cible parfaitement complémentaire à celle de la boucle (figure 14), la rigidité et la stabilité du duplex néoformé contraignent la tige à s'ouvrir (réorganisation conformationnelle). La longueur de la boucle et celle de la tige sont optimisées pour favoriser la détection d'une cible parfaitement complémentaire. En effet, avec une sonde trop longue, un mésappariement n'aura qu'un effet marginal sur la stabilité du duplex sonde – cible (Aboul-ela et al. 1985).

Ces sondes "hairpins" sont greffées sur une lame de verre activée selon un protocole qui sera expliqué ultérieurement (voir page 89). Deux "hairpins" sont dessinées par "SNP", définissant chacune le variant d'un allèle. Ils sont différents d'une seule base sur la boucle de la sonde. Après hybridation de la cible marquée par un fluorochrome au cours de l'amplification, une étape de lavage est effectuée. Le signal moyen de chaque "hairpin" est enregistré ensuite grâce à un scanner et analysé par un logiciel.

Puisque les "hairpins" sont des polymères contraints, après la formation du duplex sonde-cible, ils subissent une plus grande réorganisation que les sondes linéaires, ce qui explique leur sensibilité plus élevée pour détecter un mésappariement d'une base. D'après Bonnet *et al.* (Bonnet et al. 1999), les sondes contraintes devraient aussi montrer une spécificité plus élevée que les sondes non contraintes. Il serait même possible d'augmenter la spécificité de la technologie "hairpin" en choisissant la séquence de la sonde pour qu'un des deux bras de la tige s'hybride également à la cible.

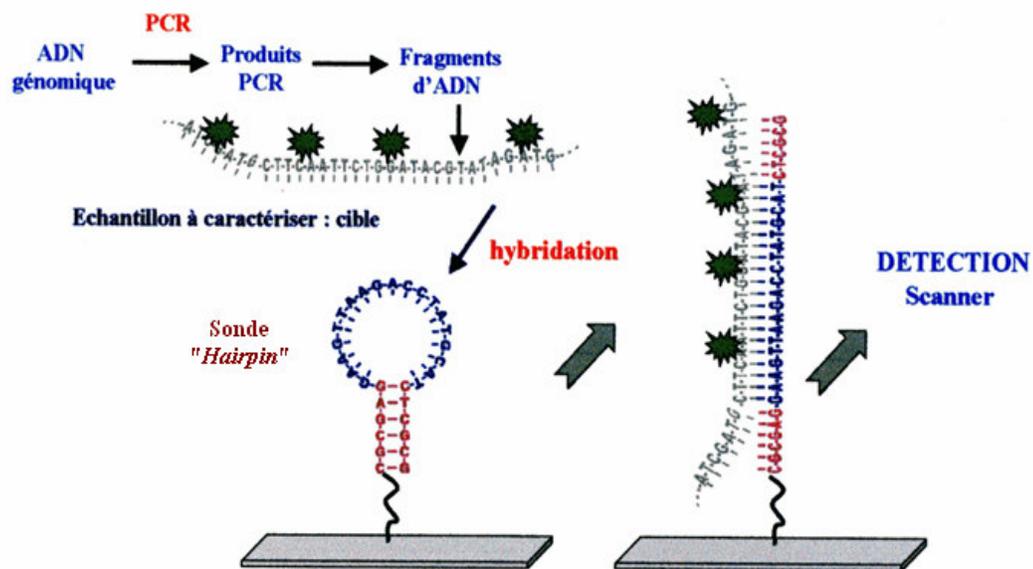
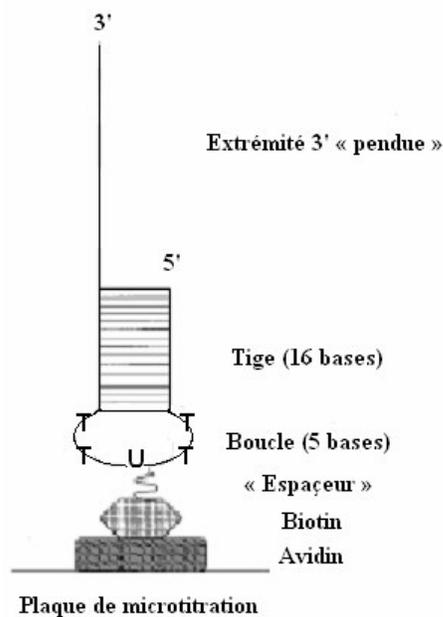


Figure 14: Principe de la technologie "hairpin" (Serial Genetics®).

I - 3 - 7 - Technologie " *hairpin* non-ouvrable " (*Coaxial Stacking Interactions*)

Il s'agit d'un système de microtitration qui utilise des sondes en épingle à cheveux ("*hairpin*" non-ouvrable) pour capter, détecter et caractériser leurs cibles d'ADN complémentaires marquées. Les séquences de l'épingle à cheveux sont conçues pour former des structures intramoléculaires : elles possèdent une tige et une boucle ainsi qu'une extrémité 3' libre. Cette séquence 3' libre, dite « pendue » (*dangling end*), est complémentaire à la séquence 3' de la cible. La boucle de l'épingle à cheveux est composée de cinq bases, dont la troisième est biotinylée pour permettre de la coupler à une plaque de microtitration recouverte d'avidine. La séquence simple brin de la boucle est T-T-U-T-T. La tige de l'épingle à cheveux est une séquence double brin de 16 bases, alors que la séquence 3' libre est constituée de 16 ou 32 bases (figure 15). Les séquences de la tige sont conçues avec une stabilité suffisante pour garantir la fidélité du duplex de la tige aux températures où les analyses sont exécutées (Riccelli et al. 2001). Les séquences de l'extrémité « pendue » sont conçues de sorte que l'extrémité 3' de la cible s'hybride de façon adjacente à l'extrémité 5' de la tige pour former une jonction « entaillée » ("*nicked*"). Cette hybridation a pour résultat l'"empilement" coaxial (*coaxial stacking*) du complexe sonde-cible. Une partie des avantages de cette technique peut être attribuée à la formation d'interactions d'"empilement" entre les bases en 5' terminal de la tige de la "*hairpin*" et les bases en 3' terminal de la cible hybridée (Lane et al. 1997). Cet "empilement" co-axial le long de l'axe hélicoïdal du duplex fournit un avantage thermodynamique lors de l'hybridation d'un brin linéaire d'ADN et forme des complexes "*hairpin*"-cible plus stables que les sondes linéaires (Riccelli et al. 2001). Après cette hybridation, un duplex « entaillée » ("*nicked*") est donc formé. Les cibles sont marquées par un fluorochrome et une fois capturées par les sondes de l'épingle à cheveux fixées sur le support, elles peuvent être détectés en utilisant un lecteur de puces à ADN (O'Meara et al. 1998).

L'immobilisation de ces sondes sur un support du gel a été également décrite (Broude et al. 2001).



D'après Riccelli et coll., 2000

Figure 15: Structure de la sonde " hairpin non-ouvrable ".

I - 4 - Séquençage par des sondes libres (en solution) – « *Molecular Beacons* »

Les "*molecular beacons*" sont des sondes ADN simple brin qui adoptent une conformation de type tige – boucle et qui possèdent un fluorochrome dont la fluorescence est éteinte (figure 16). Quand elles s'hybrident à une cible parfaitement complémentaire, elles subissent un changement de conformation spatiale qui révèle leur fluorescence. Elles identifient et rapportent la présence d'une cible spécifique dans des solutions homogènes (Bonnet et al. 1999). Ces sondes sont appelées "*molecular beacons*" parce qu'elles émettent un signal fluorescent après hybridation à leur cible seulement. Elles peuvent distinguer des séquences qui diffèrent par un seul nucléotide puisqu'elles ne présentent pas de fluorescence lorsqu'elles ne sont pas liées à leur cible. Elles peuvent être employées dans des réactions d'hybridation sans avoir à séparer les hybrides sondes/cibles des sondes non-hybridées (Marras et al. 1999).

Les "*molecular beacons*" sont particulièrement appropriées pour détecter une synthèse d'acides nucléiques en temps réel. Grâce à ces sondes, la détection des gènes cibles est homogène et sensible, et peut être effectuée en tube scellé (Tyagi and Kramer 1996).

Dans la structure tige/boucle des "*molecular beacons*", c'est la boucle qui est complémentaire de la séquence cible. La tige est constituée par l'hybridation de deux bras de séquences complémentaires, situés de chaque côté de la séquence « sonde ». Les séquences de bras sont indépendantes de la séquence « cible ». Un fluorochrome est lié par une liaison covalente à l'extrémité d'un bras et un "*quencher*", non fluorescent, est lié par une liaison covalente à l'extrémité de l'autre bras. Lorsque les sondes ne sont pas liées à leur cibles, le fluorochrome est situé près du "*quencher*" et sa fluorescence est éteinte par un phénomène de « transfert d'énergie entre molécules fluorescentes » ou « transfert d'énergie par résonance de type Förster » (*FRET; fluorescent resonance energy transfer*)(Stryer 1978). Par conséquent, la fluorescence n'est pas produite, même en excitant le fluorochrome. L'énergie absorbée par le fluorochrome est transférée au "*quencher*" et libérée ensuite sous forme de chaleur. Quand la boucle de la sonde s'hybride à sa séquence complémentaire sur la cible, la sonde subit un changement spontané de conformation et la rigidité de l'hybride sonde/cible force la structure en épingle à cheveux à se dérouler. Il en résulte la séparation du fluorochrome et du "*quencher*". Le fluorochrome peut alors être excité (Bonnet et al. 1999).

La longueur des sondes est choisie afin de maximiser la séparation entre le fluorochrome et le "*quencher*" quand les sondes sont hybridées à leurs cibles. Ceci se produit quand la longueur de la séquence sonde est comprise entre 15 et 35 nucléotides (Marras et al. 1999; Tyagi and Kramer 1996).

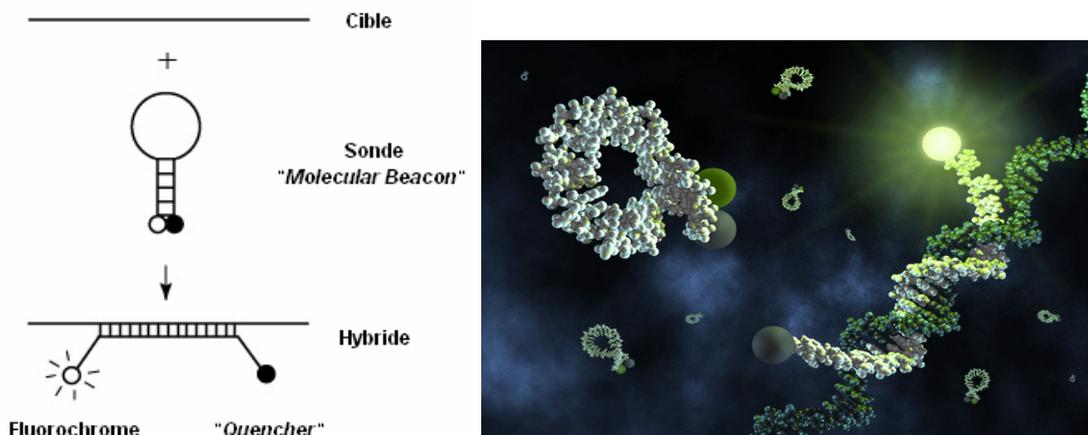


Figure 16: Structure et fonctionnement de la sonde "molecular beacon".

Un couple fluorochrome/quencher idéal ne doit pas produire de fluorescence quand ses deux composants sont proches. Plusieurs combinaisons de fluorochromes et de quenchers peuvent être employées. L'association du fluorochrome 5-(2'-aminoethyl) aminonaphthalene-1-sulfonic acid (EDANS) au "quencher" 4-(4'-dimethylaminophenylazo) benzoic acid (DABCYL), constitue un des meilleurs couples disponibles (Tyagi and Kramer 1996). Le DABCYL, non fluorescent, peut être utilisé comme "quencher" universel pour tous les fluorochromes (Marras et al. 1999) puisque le mode de transfert d'énergie n'impose aucune restriction au type de "quencher" employé. Parmi les couples appropriés, nous pouvons indiquer : fluorescéine/rhodamine, fluorescéine/pyrène butyrate (Morrison et al. 1989), fluorescéine/éosine (Cooper and Hagerman 1990), anthranilamide/nitrotyrosine (Meldal and Breddam 1991), coumarine/ethidium (Mergny et al. 1994), et plusieurs types de chélateurs de terbium associés à la tétraméthyl-rhodamine (Selvin and Hearst 1994).

L'utilisation de plusieurs fluorochromes permet la détection de plusieurs cibles différentes dans la même solution. Ceci peut être réalisé par l'utilisation simultanée de plusieurs "molecular beacons", dont chacun émet un signal de longueur d'onde différente, ou qui peuvent être excités par une longueur d'onde différente.

Les "*molecular beacons*" peuvent aussi être utilisés dans les réactions de PCR en temps réel. L'amplification d'une cible parfaitement complémentaire engendre une augmentation de fluorescence des "*molecular beacons*" correspondantes, qui sont ouvertes lors de l'hybridation avec leurs cibles. Pour une position donnée dans une séquence, chacune des quatre substitutions d'un nucléotide peut être distinguée par une réaction de PCR en temps réel utilisant quatre sondes différemment colorées. Ces quatre sondes sont différentes d'une seule base dans la position à étudier. Les signaux produits par les sondes "*molecular beacons*" parfaitement hybridées aux cibles, sont distinguables du bruit de fond car les sondes non complémentaires ne forment pas d'hybrides et restent donc fermées sans émission de fluorescence (Marras et al. 1999; Tyagi and Kramer 1996).

Certaines études ont utilisé des "*molecular beacons*" couplées à la surface d'un support solide, surfaces de fibre optique (Steemers et al. 2000), lames de verre (Ramachandran et al. 2004). Dans ces études, les supports ont seulement servi de moyen de fixation. La fonction et la structure de la sonde restent inchangées par rapport à la technique en solution.

Récemment, d'autres études ont démontré qu'il était pertinent d'employer le support d'immobilisation des sondes "*molecular beacons*" comme agent d'extinction de ces mêmes sondes. En utilisant des sondes fixées sur une fine couche d'or en l'absence de la cible complémentaire, le fluorochrome situé à l'extrémité 3' de la sonde est en contact étroit avec l'or. L'or fait office de « quencher » et éteint la fluorescence par « transfert d'énergie entre molécules fluorescentes » (procédé d'extinction par contact). Lors de l'hybridation à une séquence complémentaire, la tige de la sonde s'ouvre et le fluorochrome est éloigné du support, avec une restauration de sa fluorescence (Du et al. 2005).

I - 5 - Applications principales des puces à ADN

I - 5 - 1 - L'analyse des profils d'expression génique : l'analyse des transcriptomes

L'étude de l'expression génique a été parmi les premières applications de la technologie de puces à ADN développées avec succès. Elle constitue encore l'application

dominante aujourd'hui. Les premières puces ont servi à évaluer l'expression simultanée de milliers de gènes dans des systèmes biologiques bien connus, tel que le métabolisme respiratoire, la fermentation et le cycle cellulaire chez la levure (Cho et al. 1998; DeRisi et al. 1997; Spellman et al. 1998), la sporulation (Chu et al. 1998) et la stimulation de fibroblastes par le sérum (Iyer et al. 1999). La puce d'expression génique interroge chaque transcrite à des positions multiples et peut maintenant étudier l'expression de la quasi-totalité des gènes d'un organisme. Deux sondes sont employées pour chaque cible : une sonde parfaitement complémentaire ("*perfect match probe*") et une sonde avec un mésappariement d'une seule base à la position centrale ("*mismatch probe*"). La sonde mésappariée est employée pour estimer et corriger le bruit de fond et le signal issu de l'hybridation non-spécifique. Les sondes sont habituellement de 25 bases. L'hybridation sur une puce d'ADNc marqué, synthétisé à partir d'ARN messager, devrait permettre d'identifier tous les gènes exprimés par les cellules étudiées. La mesure de l'intensité du signal fluorescent acquise sur chaque "*spot*" permet ainsi d'estimer le niveau d'expression du gène correspondant en fonction d'un témoin de référence (Bowtell 1999; Wang et al. 2007). Les deux échantillons, cellules étudiées et référence, sont marqués par des fluorochromes à spectres d'émissions différents (le plus souvent les carbocyanines Cy3 et Cy5). Grâce aux puces à ADN, de très nombreux nouveaux gènes s'exprimant spécifiquement dans un tissu, ou apparaissant associés à des pathologies ont été mis en évidence. La comparaison des résultats des études d'expression génique obtenus par les puces à ADN avec ceux préalablement obtenus par d'autres techniques a démontré une concordance pour les gènes dont l'expression était déjà connue dans ces systèmes biologiques. Des puces d'expression peuvent être actuellement employées pour balayer des milliers de gènes dans les maladies humaines telles que le cancer (Liotta and Petricoin 2000), la dystrophie musculaire (Chen et al. 2000), le diabète (Wilson et al. 2000), ou le vieillissement (Lee et al. 1999; Ly et al. 2000).

I - 5 - 2 - La détection du nombre de copies d'ADN par CGH-array

La technique d'hybridation génomique comparative (CGH ; "*Comparative Genomic Hybridization*") (Kallioniemi et al. 1992) sur une puce à ADN a pour objectif de caractériser des déséquilibres chromosomiques (variations du nombre de copies d'ADN)

sur un très grand nombre de loci dans le génome de façon simultanée. Elle peut ainsi permettre de détecter l'ensemble des amplifications et délétions des régions chromosomiques métaphasiques et de les situer relativement et précisément sur des puces à ADN représentant des portions connues du génome. Cette technique permet d'étudier des régions chromosomiques fréquemment altérées au cours de pathologies du développement (retard mental, anomalies congénitales...) (Sanlaville et al. 2005) ainsi que des loci impliqués dans la cancérogenèse. Après extraction et marquage de l'ADN, une hybridation compétitive est donc réalisée entre l'ADN étudié (tissu tumoral par exemple) et l'ADN de référence (tissu normal), sur des sondes portant la séquence normale. Chacun de deux ADN est marqué par un fluorochrome à spectre d'émission différent. Dans le tissu tumoral, les régions génomiques amplifiées sont révélées sur la puce par une augmentation de fluorescence du fluorochrome marquant l'ADN tumoral par rapport à celui de l'ADN normal. D'autre part, les zones délétées entraînent une prédominance de la fluorescence du fluorochrome marquant l'ADN normal (Davidsson et al. 2007; Erickson et al. 2007; Mantripragada et al. 2004).

I - 5 - 3 - La détection et le génotypage de mutations et de polymorphismes : le reséquençage

Les applications des puces à ADN dans le domaine du génotypage et du reséquençage se sont beaucoup développées au cours de la dernière décennie. Les puces à ADN permettent ainsi d'identifier des acides nucléiques dans un échantillon d'ADN. Elles apportent une solution innovante au problème ancien de la détection, de l'identification et du typage d'un seul nucléotide. Les progrès dans la manufacture des puces (miniaturisation des "spots" jusqu'à 8 μm ; Synthèse *in situ*) (Matsuzaki et al. 2004b) permettent actuellement à certaines compagnies comme *Affymetrix* de produire des puces contenant des millions d'oligonucléotides. Des puces à ADN à haute densité (ex : puces GeneChip® d'*Affymetrix*) peuvent répondre simultanément au génotypage de milliers de sites de "SNP" en une seule étape. La fabrication de ces puces développée par Fodor et coll. (Fodor et al. 1991), permet de produire une puce à ADN destinée à identifier un grand nombre de fragments d'ADN marqués par fluorescence, grâce à leur hybridation avec des sondes oligonucléotidiques. Des sondes linéaires courtes de 25 nucléotides, complémentaires aux

sites de "SNP" et aux séquences flanquantes, sont synthétisées directement sur la surface de la puce par synthèse *in situ*. Ces sondes sont suffisamment spécifiques pour détecter un seul nucléotide. Le 13^{ème} nucléotide (position centrale) constitue la position interrogative où la séquence de la sonde est parfaitement complémentaire (*perfectly matched* ; PM) ou mésappariée (*mismatched* ; MM) à un des deux allèles du "SNP". La séquence de ces sondes diffère seulement par un seul nucléotide dans la position interrogative. L'ensemble de ces quatre sondes différentes s'appelle "*Quartet*" (figure 17). Les sondes PM et MM fournissent une base pour les mesures du signal contre le bruit de fond. Pour fournir la redondance de données, huit "*Quartets*" de sondes additionnelles sont greffées où le site de "SNP" est décalé par un à quatre nucléotides dans l'une ou l'autre direction. Chaque "SNP" est donc représenté par un total d'environ 40 sondes oligonucléotidiques (Matsuzaki et al. 2004a). Le choix plus précis des sondes spécifiques et le développement des logiciels plus performants d'analyse du signal ont permis de baisser le nombre des sondes jusqu'à environ 20 sondes par "SNP" (Lamy et al. 2006). L'analyse du signal est réalisé par des logiciels spécifiques (ex : GDAS, DM, PBG,....).

L'autre grand type de génotypage exécuté par des puces à ADN est le reséquençage. La puce destinée au reséquençage est employée pour examiner et identifier successivement l'ensemble des nucléotides dans une séquence. Le principe de ces puces repose sur l'utilisation d'un ensemble de sondes chevauchantes d'un seul nucléotide. Quatre sondes, différant seulement à leur position centrale et chacune contenant une séquence de référence (normal) à toutes autres positions, sont faites pour interroger chaque nucléotide de la séquence référence. La séquence cible s'hybride plus fortement à son complément parfait sur la puce. Cette séquence sera, dans la plupart des cas, la sonde correspondant à la séquence de référence. Dans le cas d'une substitution de nucléotide, la cible s'hybride préférentiellement avec une des trois autres sondes. Des séquences allant jusqu'à 50 Kb de longueur peuvent être reséquencées à l'aide de 200.000 sondes (ou 400.000 sondes si les deux brins d'ADN sont interrogés). La détection et l'analyse des sondes hybridées permettent ainsi de séquencer par 'petits blocs' et de reconstituer le brin d'ADN après un traitement informatique des résultats obtenus.

levure afin de montrer l'existence d'une relation significative entre le profil obtenu lors d'une stimulation médicamenteuse microbienne et le profil d'expression d'une levure portant un gène muté et impliqué dans le métabolisme d'action de ce médicament. Ce principe peut être exploité pour la création d'une base de données contenant un grand nombre de profils d'expression, provenant à la fois de cellules stimulées par des médicaments et de souches contenant différentes mutations. Ces données offre un moyen de décoder les profils complexes d'expression de groupes de gènes modulés par différentes classes de médicaments. D'un autre côté, l'utilisation des puces à ADN permet aussi d'identifier les effets secondaires d'un produits et, lors des essais cliniques, de faire des mesures de toxicité en déterminant si les gènes dont l'activité est modulée sous l'action du médicament sont essentiels à la bonne marche de la cellule ou à une fonction physiologique essentielle.

I - 5 - 5 - L'agro-alimentaire, l'agriculture et l'environnement

Le secteur agro-alimentaire peut aussi être intéressé par l'utilisation de puces à ADN pour suivre les microorganismes utilisés dans certaines fabrications (ferments lactiques, levures, mycélium, etc...) ou pour détecter des séquences provenant d'organismes génétiquement modifiés dans les semences ou dans certains aliments (Kuiper et al. 2001). D'autres applications environnementales concernent l'analyse microbiologique de l'eau de consommation, ou plus généralement le contrôle qualité en milieu industriel, pour renforcer la sécurité des procédés et des produits (détection d'agents infectieux dans l'alimentation, comme la Salmonelle ou la Listeria ...).

I - 5 - 6 - Le diagnostic des maladies

Le diagnostic sur puce à ADN offre une grande rapidité d'intervention pour les pathologies dont les méthodes de diagnostic traditionnelles sont limitées. Les puces à ADN permettent ainsi des tests plus rapides, plus sensibles et plus spécifiques. En évitant certaines étapes préliminaires telle que la culture cellulaire, elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures là où plusieurs jours étaient nécessaires. En microbiologie par

exemple, on peut détecter rapidement la présence d'un microorganisme, définir son type, analyser ses mutations, sa capacité à résister à certains antibiotiques ou à des inhibiteurs d'enzymes pour certains virus pathogènes. Le diagnostic du cancer (Golub et al. 1999) peut également être favorisé, voire réalisé, par des puces à ADN, permettant d'étudier l'expression d'oncogènes spécifiques ou des gènes de prédisposition à certains cancer. L'analyse par puces à ADN a donc une application immédiate en clinique, et offre la possibilité d'identifier de nouvelles classes de phénotypes pathologiques.

I - 6 - La maladie de Charcot Marie Tooth et les neuropathies périphériques apparentées

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est une neuropathie sensitivo-motrice chronique et évolutive. Elle constitue la plus fréquente pathologie héréditaire du système nerveux périphérique. Elle est à l'origine d'une atteinte des nerfs moteurs et sensitifs. Le taux de prévalence de la maladie est estimé à 1/2500 (Skre 1974; Suter and Snipes 1995; Triggs et al. 2006) : en France, environ 30 000 personnes en sont atteintes, tout âge et sexe confondus.

I - 6 - 1 - Aspects cliniques de la maladie de CMT

La maladie de CMT est caractérisée par une dysfonction des nerfs périphériques d'origine dégénérative et une diminution progressive de la force musculaire débutant par les pieds, puis les jambes et atteignant plus tard les mains.

L'âge d'apparition des symptômes est très variable. Le CMT a été diagnostiqué chez des patients âgés de 1 à 60 ans. La maladie est souvent familiale.

Les premiers symptômes prédominants sont au niveau des membres inférieurs avec une rétraction tendineuse des orteils leur donnant la forme de « griffes », et une amyotrophie des jambes qui leur donne un aspect caractéristique « en mollet de coq ». Ces atteintes sont le plus souvent bilatérales et symétriques. Elles engendrent une instabilité progressive de la posture provoquant des chutes, une difficulté à courir et un rétrécissement

du périmètre de marche. L'atteinte des mains n'est pas systématique et apparaît généralement après plusieurs années d'évolution. Les mouvements fins sont difficiles à exécuter, les doigts peuvent prendre la forme de « griffes » avec perte de fonction de la pince pollicidigitale. Les crampes sont fréquentes. Les déformations et l'amyotrophie observées sont variables d'un patient à l'autre.

Dans certains types de CMT, 10 à 20% des patients ne présentent aucun symptôme subjectif. Toutefois, ces derniers présentent des examens cliniques neurologiques ou des électromyogrammes anormaux. Il arrive que le diagnostic soit suspecté par hasard, par exemple à l'occasion d'un électromyogramme pratiqué pour d'autres raisons.

L'examen clinique repose sur la réalisation de tests de la fonction musculaire et des réactions sensorielles. Le médecin recherche par exemple la présence de pieds creux, de troubles de la marche, d'une amyotrophie accrue au niveau des mollets, cuisses, avant-bras et mains, d'une scoliose éventuelle, ou d'une aréflexie ostéo-tendineuse. Ce dernier signe est souvent évocateur, on le retrouve même chez les personnes sans symptôme subjectif. Les troubles sensitifs sont généralement plus discrets. Cependant chez certains sujets, il a été décrit des paresthésies à type de sensation de brûlure invalidantes pour le patient.

Des troubles végétatifs à type de froideur et de cyanose des extrémités ont été aussi décrits. Le plus souvent, l'évolution est lente et progressive sur plusieurs années. Certains malades peuvent observer des exacerbations de la pathologie, souvent à l'occasion d'un problème de santé intercurrent (grippe, opération chirurgicale,...). Les exacerbations peuvent être entrecoupées par de longues périodes de stabilisation ou de faible évolutivité de la maladie.

Les biopsies nerveuses peuvent montrer diverses anomalies. Dans les formes démyélinisante, on observe une perte des fibres myélinisées et la présence de bulbes d'oignons. Ces derniers sont constitués par des cellules de Schwann et leurs prolongements. La faible taille et le surnombre des cellules de Schwann sont caractéristiques de ces structures en bulbe d'oignons. Par ailleurs, les prolongements des ces cellules de Schwann entourent des axones démyélinisés ou ayant une très fine gaine de myéline. Enfin, l'hypothèse de la présence en surnombre de ces cellules serait que la dégénérescence de la myéline engendrerait une prolifération anormale des cellules de

Schwann immatures. Dans les formes axonales, la perte en fibres de gros diamètre est nette, sans diminution du nombre des fibres de petit diamètre. Il existe de nombreux bouquets de régénérescence ("*clusters*") de fibres de petit calibre. La raréfaction de fibres myélinisées est discrète. Il n'y a pas de fibres présentant des bulbes d'oignon.

I - 6 - 2 - La myéline

I - 6 - 2 - 1 - La myéline périphérique

Chez la majorité des vertébrés, de nombreux axones du système nerveux périphérique et du système nerveux central sont entourés d'une gaine. En 1854, cette gaine fut identifiée par l'anatomopathologiste Rudolf Virchow qui lui donna l'appellation de myéline (Virchow 1854). En 1878, Louis-Antoine Ranvier compara la myéline au fourreau protecteur des câbles télégraphique (Ranvier 1878). Il lui attribua un rôle d'isolant.

La myéline est synthétisée par l'oligodendrocyte dans le système nerveux central et par la cellule de Schwann dans le système nerveux périphérique.

I - 6 - 2 - 2 - Organisation et composition de la myéline

I - 6 - 2 - 2 - 1 - Organisation de la myéline

La myéline est une structure membranaire multilamellaire compactée. Elle est constituée par l'allongement et l'enroulement en spirale du mésaxone autour d'un segment d'axone. La membrane de la cellule de Schwann s'aplatit pour former un mince feuillet qui s'enroule plusieurs fois autour de l'axone. L'enroulement est initié par une extension formée par la membrane plasmique de la cellule de Schwann (figure 18). Cet enroulement autour de l'axone respecte un espace périaxonale. Cette extension s'allonge, puis glisse sous la couche nouvellement formée et s'enroule en spirale.

La dernière étape de la myélinisation, est la compaction des différentes couches. Celle-ci se fait par l'extrusion du cytoplasme hors des enroulements de la membrane.

Les segments de myéline, ou internodes, alternent avec de courtes régions, appelées noeuds de Ranvier, où l'axolemme n'est pas myélinisé (figure 18). De part et d'autre des noeuds de Ranvier se trouve l'espace paranodal où la myéline est moins compactée. Dans

cet espace paranodal, chaque enroulement de myéline forme une languette membranaire appelée boucle latérale ou paranodale. Les boucles latérales les plus externes des internodes adjacents s'entrecroisent et recouvrent le noeud de Ranvier. Dans le système nerveux central, les internodes sont plus courts que dans le système nerveux périphérique.

Dans le système nerveux périphérique, une cellule de Schwann myélinise un unique segment d'axone. Dans le système nerveux central, l'oligodendrocyte émet généralement plusieurs prolongements membranaires (jusqu'à 50). Chaque prolongement forme un segment de myéline autour d'un même et/ou différents axones ((Remahl and Hildebrand 1990). Le diamètre des axones varie de 3 à 18 μm , l'internode présente une longueur de 400 à 1500 μm et la spirale de myéline (environ 4 μm d'épaisseur) peut comprendre jusqu'à 100 couches.

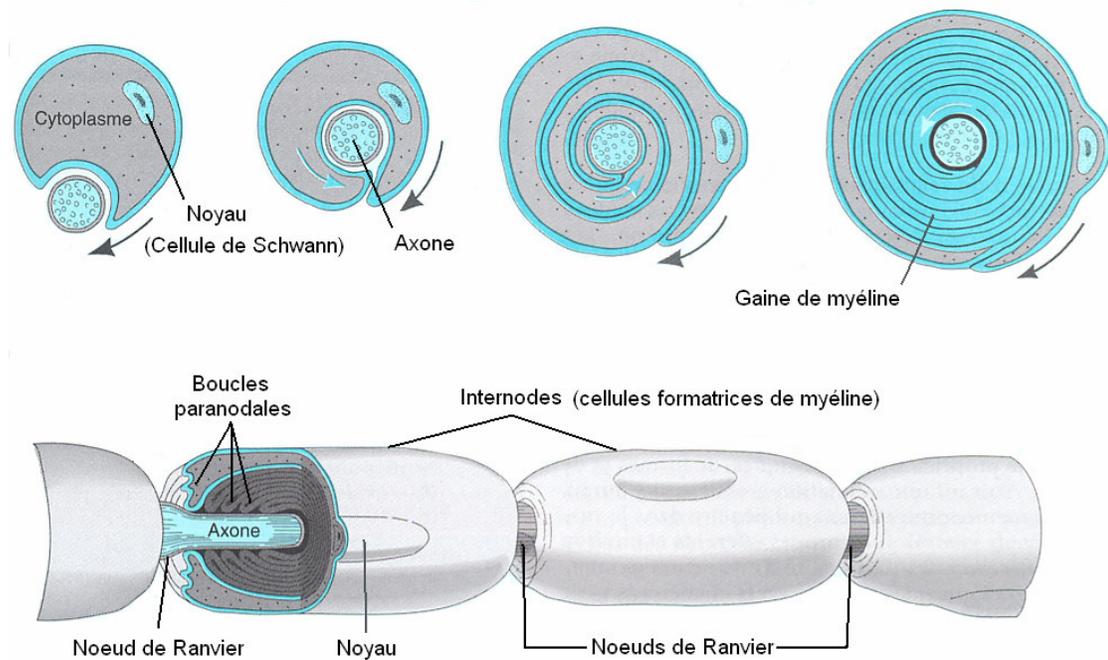


Figure 18: Formation de la myéline par cellules de Schwann, organisation et structuration de la myéline.

Au microscope électronique, la gaine de myéline compacte apparaît formée par l'alternance de « lignes denses majeures » correspondant à l'accolement des faces cytoplasmiques de la membrane plasmique, et de « doubles lignes intrapériodiques » correspondant à l'adhérence des faces externes de 2 couches adjacentes (Peters 1960; Peters 1960). Cette structure maintient une gaine de myéline compacte à travers laquelle seuls des « bourrelets » remplis de cytoplasme constituent des régions non compactées comme le collet périaxonal, les boucles paranodales et les incisures de Schmidt-Lanterman. Ces incisures sont peu présentes au niveau de la myéline dans le système nerveux central.

L'isolation myélinique et la concentration élevée de canaux sodiques dans la région de l'axolemmes, permet la propagation de l'influx nerveux produit au noeud de Ranvier par "bonds" de noeud en noeud : c'est la conduction saltatoire. Cette conduction est en général très rapide, de l'ordre de 50 mètres par seconde.

Plus le diamètre de l'axone est grand, plus il comporte de couches de myéline, et plus la conduction nerveuse est rapide. Chez un homme adulte, le potentiel d'action peut ainsi se propager de la moelle épinière au bout du pied (une distance de plus d'un mètre) en moins de 25 millisecondes.

I - 6 - 2 - 2 - 2 - Composition de la myéline

La myéline est une membrane contenant 70% de lipides et 30% de protéines. Ce rapport est complètement inversé comparé à celui que l'on trouve dans les autres membranes.

Les lipides de la myéline sont constitués de trois composants : le cholestérol (27%), les phospholipides (42%) et les glycolipides (30%); parmi ces derniers le galactocérobroside (GalC) joue un rôle structural lié en partie à ses très longues chaînes d'acides gras qui confèrent à la myéline une stabilité et une rigidité accrues (Rumsby 1978).

La composition de la myéline en protéines est caractéristique. En effet, contrairement aux autres membranes cellulaires constituées d'un ensemble hétérogène de protéines dont aucune n'est prédominante, la myéline contient un nombre limité de familles protéiques majoritaires dont les protéolipides majeurs de la myéline (PLP) et les

protéines basiques de la myéline (MBP; "*Myelin Basic Protein*") dans le système nerveux central, et la protéine P zéro (P0) et les MBP au niveau du nerf périphérique (Lemke 1988). Elles représentent 70 à 80% du contenu protéique total de la myéline.

La composition protéique n'est pas la même dans la myéline compacte et la myéline non compacte.

Parmi les différentes protéines, certaines jouent un rôle dans l'induction de la myélinisation (récepteurs pour des signaux de différenciation des cellules gliales), d'autres dans la reconnaissance de l'axone par la cellule gliale (molécules d'adhérence), et/ou dans l'enroulement ou la compaction de la myéline mature (protéines de structure).

Les protéines majoritaires présentent des caractéristiques différentes entre elles : les MBP sont associées à la face interne de la membrane plasmique de la cellule myélinisante et participent à la formation de la ligne dense majeure de la myéline (Roth et al. 1987) ; PLP et son isoforme DM20 sont transmembranaires, associées à la ligne intrapériodique de la myéline (Kronquist et al. 1987) ; P0 est une protéine d'adhérence, également transmembranaire, elle est impliquée dans l'accolement des faces internes et externes de la myéline compacte dans le système nerveux périphérique (Lemke and Axel 1985).

Le groupe des protéines minoritaires (qui constitue 20% des protéines myéliniques) comprend des enzymes, comme la CGaT (UDP-galactose: céramide galactosyltransférase) impliquée dans la synthèse du galactocérébroside ou la CNPase (2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphohydrolase). Parmi les protéines qui jouent un rôle fondamental dans le phénomène de reconnaissance de l'axone par les cellules gliales, il est important de mentionner la MAG "*Myelin Associated Glycoprotein*" (DeBellard et al. 1996). La MOG "*Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein*" est présente uniquement dans le système nerveux central. Elle aurait un rôle dans le contrôle et le maintien de la myéline (Slavin et al. 1997). D'autres protéines ont un rôle important aussi: PMP22 ("*Peripheral Myelin Protein*", 22KDa), transmembranaire, a vraisemblablement à la fois un rôle structural dans la myéline et régulateur de la croissance des cellules de Schwann (Bosse et al. 1994; Suter and Snipes 1995) ; la Cx32 ("*connexine32*", 32KDa) fait partie des protéines qui constituent les canaux intercellulaires des jonctions communicantes. Dans la myéline périphérique, on trouve également la E-cadhérine, molécule d'adhésion cellulaire

dépendante du calcium (Fannon et al. 1995) et la périaxine, qui pourrait avoir un rôle dans la maintenance des enroulements de myéline (Scherer et al. 1995).

Dans la myéline compacte, on retrouve donc P0, PMP22 (uniquement dans le système nerveux périphérique), PLP/DM20, MOG (spécifiques du système nerveux central) et les MBP.

Dans la myéline non compacte périphérique, on trouve la MAG et la Cx32 mais aussi l'E-cadhérine et la périaxine.

I - 6 - 3 - Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann sont responsables de la formation et du maintien de la myéline dans le système nerveux périphérique. La myélinisation commence chez l'homme dans le système nerveux central, vers le quatrième mois de la gestation, et se poursuit jusqu'au sixième ou le septième mois.

Les cellules de Schwann, d'origine neurectodermique, migrent de la crête neurale vers la périphérie au cours du développement (Mirsky and Jessen 1996). Au fur et à mesure que les axones émergent du système nerveux central pour entrer dans le système nerveux périphérique, ils sont accompagnés par la migration des cellules de Schwann. Le développement de ces cellules, incluant la myélinisation, nécessite des interactions avec la matrice extracellulaire et avec les axones. Des signaux de différenciation d'origine axonale conduisent les cellules de Schwann immatures à se différencier en cellules myélinisantes, mais certaines restent non myélinisantes. Les cellules de Schwann non myélinisantes enveloppent dans leur cytoplasme plusieurs petits axones destinés à rester non myélinisés, chacun dans son fourreau ; l'ensemble axone/cellule de Schwann est lui-même entouré par une membrane basale. La myélinogénèse dans le système nerveux périphérique est régulée au cours du développement embryonnaire et implique l'expression des gènes codant des protéines de régulation et de structure, pour les enzymes impliquées dans les voies de synthèse des lipides spécifiques de la myéline ou pour des facteurs de transcription notamment Krox-20 (Topilko et al. 1994), Oct-6 (Mirsky and Jessen 1996) et SCIP (Zorick et al. 1996).

Les cellules de Schwann matures myélinisantes et non-myélinisantes proviennent du même type cellulaire embryonnaire. Cependant, ces deux types de cellules n'expriment pas les mêmes marqueurs antigéniques. En effet, seules les cellules myélinisantes expriment les protéines spécifiques de la myéline. Les cellules non-myélinisantes expriment un autre groupe de protéines telles que des molécules d'adhésion (N-CAM) qui sont également exprimées par l'astrocyte dans le système nerveux central. Les cellules de Schwann destinées à devenir non-myélinisantes prolifèrent durant la période de myélinisation et se différencient après le début de la myélinisation ; ces cellules sont associées à des axones de plus petits diamètres. Bien que les deux types de cellules de Schwann présentent des phénotypes distincts, ces différences phénotypiques sont réversibles. En effet, les cellules de Schwann myélinisantes développent une morphologie et expriment un groupe de protéines spécifiques leur permettant de remplir leur fonction de myélinisation ; ces cellules ne sont pas engagées totalement et définitivement dans cette tâche, puisqu'elles peuvent perdre leur structure complexe et leur patron d'expression moléculaire particulier, et exprimer un phénotype semblable à celui des cellules de Schwann immatures, spécifiques des stades précédant la myélinisation. En général, cette régression est déclenchée, *in vivo*, par une dégénérescence axonale, et *in vitro* en soustrayant les cellules de Schwann aux influences axonales. Quand ces cellules sont de nouveau placées au contact des axones, elles se redifférencient et expriment le phénotype de cellules de Schwann matures. De même, les cellules de Schwann non-myélinisantes matures régressent après une dégénérescence axonale mais peuvent réexprimer le phénotype mature de cellules myélinisantes ou non-myélinisantes, lorsqu'elles sont mises en contact avec les axones correspondants. Chez l'adulte, les cellules de Schwann non-myélinisantes sont capables de guider la repousse axonale après une lésion (Balice-Gordon 1996). Le phénotype des cellules de Schwann est donc interconvertible. Cette plasticité des cellules de Schwann contraste avec 'l'engagement' des cellules gliales myélinisantes du système nerveux central, les oligodendrocytes, moins 'plastiques' (Gogate et al. 1994). La myélinisation périphérique *in vitro* est strictement dépendante du contact axonal (Morgan et al. 1994), contrairement à l'oligodendrocyte qui peut se différencier et former de la myéline en culture pure *in vitro*. Ces caractéristiques cellulaires expliquent en partie la capacité de régénération du système nerveux périphérique après une lésion.

Les cellules de Schwann et les axones interagissent étroitement au cours du développement et de la régénération. Si l'axone contrôle, par des facteurs diffusibles, la prolifération et la migration des cellules de Schwann et induit, par contact cellulaire, la synthèse des protéines de la myéline, en retour, la cellule de Schwann, source de facteurs trophiques et de molécules d'adhésion, guide, assiste et régule la croissance axonale (Mirsky and Jessen 1996).

La cellule de Schwann et l'axone qu'elle myélinise constituent une unité fonctionnelle. Les dommages entraînés par des mutations de gènes s'exprimant dans la cellule myélinisantes sont à l'origine de différentes pathologies affectant la myéline. Dans la plupart de ces pathologies, on observe également une dégénérescence axonale secondaire et progressive, plus ou moins sévère, reflet de l'altération des interactions axone/myéline.

I - 6 - 4 - Classification et mutations impliquées

La classification des CMT prend en compte le mode de transmission de la maladie et les résultats de l'examen électroneuromyographique (ENMG). Le mode de transmission peut être autosomique dominant, dominant lié à l'X, ou autosomique récessif. L'ENMG permet de distinguer les formes démyélinisantes des formes axonales. Nous prenons également en compte la notion de CMT « intermédiaire ». Ainsi, les formes démyélinisantes sont définies par des vitesses de conduction motrice (VCM) du nerf médian inférieures ou égales à 30 m/s, les formes axonales par des VCM du nerf médian supérieures à 40 m/s, et les formes intermédiaires par des VCM du nerf médian comprises entre 30 et 40 m/s.

D'autre part, les différents tableaux cliniques ont conduit à la recherche de corrélations entre le phénotype et le génotype (Boerkoel et al. 2002). Ces corrélations restent imprécises car la même mutation peut être à l'origine de phénotypes variés d'une famille à l'autre ou au sein même d'une famille (Leal et al. 2003; Marques et al. 1999).

Le nombre de gènes en cause dans les CMT a considérablement augmenté au cours des dernières années, ce qui rend le diagnostic moléculaire plus complexe, mais rend

également passionnant le travail clinique destiné à une meilleure caractérisation du phénotype. On se rend compte, de plus en plus, que la synthèse des données cliniques, généalogiques, électrophysiologiques, et parfois morphologiques, permet d'approcher au plus près du génotype. Les différentes formes de CMT et les neuropathies apparentées, classées selon les données physiopathologiques et génétiques sont résumées dans le tableau 3. Les gènes impliqués dans la maladie de CMT et qui codent pour des protéines dont les abréviations sont les mêmes sont aussi indiqués.

La multiplicité des gènes et protéines impliqués dans la maladie de CMT et leurs fonctions très variables au sein de la myéline (protéines structurales et de régulation de la myélinisation comme PMP22 et P0, facteurs de transcription comme EGR2, protéines de type canal comme la Cx32...) ou de l'axone (protéine du cytosquelette axonal comme NEFL, protéines impliquées dans le transport vésiculaire comme RAB7 et KIF1B...) laissent entrevoir la difficulté d'approches thérapeutiques spécifiques qui viseraient à corriger « à la carte » chacun des dysfonctionnements.

Les mutations impliquées dans la maladie de CMT sont des mutations rares (très peu fréquentes). Les mutations ponctuelles concernant des régions codant pour le domaine extra-membranaire d'une protéine de la myéline sont responsables d'une perte de fonction de la protéine (via une perte de ses propriétés d'adhésion cellulaire). Les mutations affectant les domaines intracellulaire et transmembranaire sont responsables de tableaux cliniques plus complexes par leur sévérité ou leur richesse sémiologique (Senderek et al. 2001; Starr et al. 2003). En effet, à côté de la perte de fonction, un effet dominant négatif peut être observé surtout si l'acide aminé présent est une cystéine (Warner et al. 1996). Or, la présence d'une cystéine modifie l'organisation tridimensionnelle de la protéine.

Type de CMT	Physiologie	Transmission	Locus	Gène	Divers
CMT1A	Démyélinisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	type le plus commun de CMT
CMT1B	Démyélinisation	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT1C	Démyélinisation	Autosomique dominante	16p13.3-p12	<i>LITAF</i>	
CMT1D	Démyélinisation	Autosomique dominante	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>	
CMT1E	Démyélinisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	surdité
CMT1F	Démyélinisation	Autosomique dominante	8p21	<i>NEFL</i>	
CMT2A1	Axonale	Autosomique dominante	1p36.2	<i>KIF1B</i>	
CMT2A2	Axonale	Autosomique dominante	1p36.2	<i>MFN2</i>	
CMT2B	Axonale	Autosomique dominante	3q21	<i>RAB7</i>	ulcères communs de pied
CMT2B1	Axonale	Autosomique récessive	1q21.2	<i>LMNA</i>	
CMT2B2	Axonale	Autosomique récessive	19q13.3	Non Connu	
CMT2C	Axonale	Autosomique dominante	12q23-q24	Non Connu	atteinte de diaphragme et de cordes vocales
CMT2D	Axonale	Autosomique dominante	7p15	<i>GARS</i>	les mains sont affectées plus que des pieds
CMT2E	Axonale	Autosomique dominante	8p21	<i>NEFL</i>	
CMT2F	Axonale	Autosomique dominante	7q11-q21	<i>HSPB1</i>	
CMT2G	Axonale	Autosomique dominante	12q12-q13.3	Non Connu	
CMT2H	Axonale	Autosomique récessive	8q13-21.1	<i>GDAP1</i>	signes pyramidaux
CMT2I	Axonale	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT2J	Axonale	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	perte d'audition et anomalies de pupille
CMT2K	Axonale	Autosomique r�cessive ou dominante	8q13-q21.1	<i>GDAP1</i>	
CMT2L	Axonale	Autosomique dominante	12q24	<i>HSPB8</i>	
CMT3A	Démyélinisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	maladie de D�jerine-Sottas (hypomy�linisation cong�nitale s�v�re)
CMT3B	D�my�linisation	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT3C	D�my�linisation	Autosomique dominante	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>	
CMT4A	D�my�linisation	Autosomique r�cessive	8q13-21.1	<i>GDAP1</i>	
CMT4B1	D�my�linisation	Autosomique r�cessive	11q22	<i>MTMR2</i>	
CMT4B2	D�my�linisation	Autosomique r�cessive	11p15	<i>MTMR13</i>	
CMT4C	D�my�linisation	Autosomique r�cessive	5q32	<i>SH3TC2</i>	
CMT4D	Démyélinisation	Autosomique r�cessive	8q24.3	<i>NDRG1</i>	
CMT4E	Démyélinisation	Autosomique r�cessive	1q22-10q21.1-q22.1	<i>MPZ (P0)</i> ou <i>EGR2</i>	
CMT4F	Démyélinisation	Autosomique r�cessive	19q13	<i>PRX</i>	
CMT4G	Démyélinisation	Autosomique r�cessive	10q23.2	Non Connu	
CMT4H	Démyélinisation	Autosomique r�cessive	12p11.2	<i>FGD4</i>	
CMTX	Axonale ou Démyélinisation	Li�e � l'X	Xq13.1	<i>GJB1</i>	

Tableau 3 : Classification et mutations impliquées

PMP22 : Peripheral Myelin Protein 22, MPZ : Myelin Protein Zero, LITAF : Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis α , EGR2 : Early Growth Response2, NEFL : Neurofilament Light Chain, KIF1B : Kinesin Motor Protein 1B, MFN2 : Mitofusin 2, RAB7 : Small Guanosine Triphosphatase Late Endosomal Protein RAB7, LMNA : lamine A/C gene, GARS Glycyl-Transfer RNA Synthetase, HSPB1 : Heat-Shock Protein beta-1, GDAP1 : Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein 1, HSPB8 : Heat-Shock Protein beta-8, MTMR2 : Myotubularin-Related Protein 2, MTMR13 Myotubularin-Related Protein 13, SH3TC2 : SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2, NDRG1 N-myc Downstream-Regulated Gene 1, PRX Periaxin, FGD4 : actin-filament binding protein Frabin, GJB1 : Gap-Junction Beta-1 Protein (Connexin 32).

I - 7 - Présentation générale du travail

Ces dernières années, le nombre des gènes pathogènes est en augmentation constante. De très nombreuses anomalies géniques responsables ont été identifiées (mutations ponctuelles, délétions et duplications). La détection de toutes ces mutations avec les méthodes actuelles (PCR-Séquençage, dHPLC et HRM) nécessite de faire de nombreuses PCR suivies de séquençages ce qui implique un grand nombre de personnels, d'équipements voire l'obligation de travailler en réseau.

Le but de cette étude est de démontrer la faisabilité d'une méthode diagnostique (« Proof of concept ») de mutations par biopuces. Cela permet de concevoir, mettre au point et valider une puce à ADN ("*hairpins*") capable de détecter de façon spécifique des plusieurs mutations en une seule étape. Cette méthode est caractérisée par une détection rapide des mutations et une consommation raisonnable des réactifs en comparaison avec les autres méthodes actuelles de génotypage. Les gènes ciblés pour la mise en place de cette puce sont des gènes impliqués dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth : *PMP22*, *P0*, *Cx32*. Huit mutations (sept mutations ponctuelles et une délétion) ont été étudiées au cours de notre travail. Nous avons choisi ces mutations par ce que le Service de Biochimie et de Génétique Moléculaire à Limoges disposait de l'ADN de patients atteints de cette maladie. Ces mutations sont parmi les premières mutations décrites pour la maladie de CMT. Nous avons également choisi le système de détection de Serial Genetics ("*hairpin*") par ce qu'il permet d'augmenter la spécificité et de distinguer entre deux séquences nucléotidiques en une heure d'hybridation à température ambiante.

Notre travail a été effectué en trois temps :

Nous avons tout d'abord validé des sondes pour la détection de la séquence de référence ("wild type" : WT) et la séquence mutée ("mutant type" : MT) concernant les mutations étudiées. Cette partie du travail comporte plusieurs séries d'expériences utilisant comme cibles des oligonucléotides de synthèse ou des produits de PCR. L'optimisation de l'hybridation a d'abord été réalisée par hybridation d'oligonucléotides de synthèse complémentaires. Ensuite, les sondes conçues ont été testées par hybridation des produits des PCR individuelles. Il s'agit d'une amplification séparée des séquences comportant

chacune un des sites de mutation étudiés. Dans les deux parties suivantes, nous avons essayé de réaliser un multiplexage de la méthode "*hairpin*". Nous avons d'abord testé l'hybridation de produits de PCR multiplexe. Puis, nous avons hybridé des produits issus de l'amplification de l'ADN génomique total. Compte tenu des résultats obtenus, il semble que la méthode développée au cours de ce travail (biopuces + sondes "*hairpin*") pourrait rapidement être mise en œuvre pour le diagnostic moléculaire.

Deuxième Partie

Travail expérimental

II - Partie expérimentale

La majorité des résultats obtenus dans cette partie expérimentale est présentée de façon condensée dans 2 articles donnés en annexe (Baaj et al., 2008, Biotechniques ; Baaj et al., 2008, soumis à publication). Cette Partie Expérimentale est divisée en 3 grands chapitres: le premier porte sur la validation de notre concept de diagnostic moléculaire et correspond en partie au 1^{er} article (Annexe 1), le 2^e chapitre présente le multiplexage de la méthode et correspond au 2^e article (Annexe 2) et le troisième à des données non-publiées sur l'amplification génomique totale (résultats négatifs).

II - 1 - Validation de la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT (vérification des sondes spottées)

Pour valider notre stratégie de diagnostic moléculaire par Biopuces, nous avons bénéficié de contacts fréquents, au moins au début de l'étude, avec M. Luc Talini, à l'époque Directeur Général de Genescore qui nous a mis en contact avec M. Christophe Valat, chercheur et fondateur d'entreprise (Serial Genetics).

II - 1 - 1 - Matériels et Méthodes

II - 1 - 1 - 1 - Mutations de gène recherchées et extraction d'ADN génomique

Sept mutations ponctuelles et une délétion ont été choisies dans quatre gènes différents impliqués dans la maladie de CMT. Ces mutations ont été choisies parce que l'ADN de sujets normaux et celui de patients étaient disponibles pour l'amplification par PCR. Les deux premières mutations c.77C>T (p.S26L en terme protéique), que nous allons appeler S26L, et c.283G>A (p.V95M en terme protéique), que nous allons appeler V95M, sont localisées sur la première moitié de l'exon 2 du gène *GJBI* (*Cx32*) (NM_000166) (localisé en Xq13.1). La mutation c.658C>T (p.R220X en terme protéique), que nous allons appeler R220X, est localisée sur la deuxième moitié de cet exon. La délétion c.211delG est localisée sur l'exon 2 du gène *MPZ* (*P0*) (NM_000530) (localisé en 1q22) et

les deux mutations c.337G>T (p.V113F en terme protéique), que nous allons appeler V113F, et c.371C>T (p.T124M en terme protéique), que nous allons appeler T124M, sont localisées sur l'exon 3 de ce gène. Finalement, la mutation c.124T>C (p.C42R en terme protéique), que nous allons appeler C42R, est localisée sur l'exon 3 du gène *PMP22* (NM_000304) (localisé en 17p12-p11.2) et la mutation c.418T>C (p.W140R en terme protéique), que nous allons appeler W140R, est localisée sur l'exon 5 du même gène. Toutes ces altérations géniques (7 mutations ponctuelles "faux sens" et une délétion) sont hétérozygotes, chaque ADN muté est porteur d'une seule des ces altérations géniques. Les séquences des gènes ont été obtenues à partir de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Après l'obtention d'un consentement, l'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir de sang de sujets témoins et de patients atteints de CMT portant une mutation connue. Une extraction standard d'ADN a été exécutée en utilisant "Nucleon extraction and purification kit" (Amersham Biosciences). La pureté et la concentration d'ADN extrait ont été vérifiées par la spectrophotométrie à 260 nm. Toutes les mutations étudiées avaient été préalablement confirmées par séquençage direct.

II - 1 - 1 - 2 - Les amorces

Six paires d'amorces ont été conçues pour amplifier la région d'ADN génomique entourant les mutations ponctuelles ou la délétion. Ces amorces ont été utilisées pour amplifier les deux moitiés de l'exon 2, long, codant du gène *GJPI* (*Cx32*), les exons 2 et 3 du gène *MPZ* et les exons 3 et 5 du gène *PMP22*. Seules les amorces anti-sens (down) de chaque paire d'amorces ont été marquées à la Cyanine 3 (Cy3) à leurs extrémités 5' (tableau 4). Chacune de ces paires d'amorces a été employée dans une de six réactions d'amplification PCR séparées. La taille des différentes amorces est comprise entre 19 et 22 nucléotides. Le choix des amorces a été réalisé sur le site primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) selon les consignes suivantes :

- Eviter autant que possible la complémentarité de 2 ou 3 bases aux extrémités 3' des amorces de chaque paire pour réduire la formation de dimères d'amorces.
- Le taux en GC des amorces doit être compris entre 40–60%.
- Eviter autant que possible les séquences de 3 ou plus de G et/ou C à l'extrémité 3' des amorces.

II - 1 - 1 - 3 - Amplification de l'ADN génomique par réactions PCR

Les amplifications PCR utilisant les six paires d'amorces et les échantillons d'ADN double-brin à la concentration de 0,1 µg/µl ont été réalisées séparément en utilisant le kit "Expand High Fidelity PCR System Kit" (Roche). Nous avons utilisé un thermocycleur "GeneAmp-PCR System 9700" (Applied Biosystem). Une quantité égale d'ADN (200 ng) a été amplifiée pour chaque individu. Le volume réactionnel était de 50 µl. Les amorces, sens et anti-sens ont été utilisées à une concentration finale de 0,3 µM. La concentration finale de Taq était de 0,05 U/µl. Les conditions de PCR utilisées pour l'amplification des différents échantillons sont indiquées dans le tableau 4. Plusieurs amplifications de chaque échantillon ont été réalisées afin d'augmenter la quantité finale des produits de PCR. Pour l'analyse sur les puces à ADN, les produits de PCR du même individu ont été regroupés après purification. Tous les produits amplifiés ont été vérifiés sur gel d'agarose (1.5%) avant et après purification. La purification des produits de PCR a été réalisée en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen).

Finalement, les concentrations des produits obtenus ont été mesurées par spectrophotométrie (Shimadzu, UV-160A) et 2 µg de chaque amplicon ont été employés pour préparer la solution d'hybridation et le dépôt sur les lames.

Gène	Mutation	Position de nucléotide	Séquences utilisées	5' --> 3' séquences	nom court de séquence	mfold Tm (°C)	Longueur de pds PCR (bp)	Conditions PCR
<i>GJB1</i> (Cx32) RefSeq NM_000166	S26L	77	Amorce sens	TGACAGCTTGCTTCATGGCT				94°C 5 mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	CACTTGACCAGCCGCACCAT				94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	GTATGGCTCTCGGTCATCTTC			552	63°C 45 sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	GTATGGCTCTTGGTCATCTTC				72°C 2 mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCAACGGGCTCTCGGTCATCTCGTTGC	S26L-W	73.9		72°C 10 mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCAACGGGCTCTTGGTCATCTCGTTGC	S26L-M	73.9		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	ATGAAGATGACCGAGAGCCATACTCGGCCA	CiS26LW			
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	ATGAAGATGACCAAGAGCCATACTCGGCCA	CiS26LM			
<i>GJB1</i> (Cx32) RefSeq NM_000166	V95M	283	Amorce sens	TGACAGCTTGCTTCATGGCT				94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	CACTTGACCAGCCGCACCAT				94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	GGCCATGCACGTGGCTCACCA			552	63°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	GGCCATGCACATGGCTCACCA				72°C 2mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCGCCGATGCACGTGGCTCACGGCGC	V95M-W	75.8		72°C 10mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCGCCGATGCACATGGCTCACGGCGC	V95M-M	75.8		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	TTGCTGGTGAGCCACGTGCATGGCCACG	CiV95MW			
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	TTGCTGGTGAGCCATGTGCATGGCCACG	CiV95MM			
<i>GJB1</i> (Cx32) RefSeq NM_000166	R220X	658	Amorce sens	CACTGTGGTGGACCTATGTCAT				94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	GTGCACCGGCAGGGGAGAA				94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	CTGTGCCCGCCGAGCCAGCG			544	56°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	CTGTGCCCGCTGAGCCAGCG				72°C 2mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	CGAGCCCCGCGAGCCCCGCTCG	R220X-W	63.7		72°C 10mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	CGCAGCTGCCCGCTGAGCCGCTGCG	R220X-M	63.7		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	CGGCGCTGGGCTCGGCGGCACAGGCC	CiR220XW			
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	CGGCGCTGGGCTCAGCGGCACAGGCC	CiR220XM			

MPZ (P0) RefSeq NM_000530	211DelG	211	Amorce sens	TCACTTCTCTGTATCCCTT			94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	GACTGTCATTTACCTTGCCA			94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	CTACCAGCCC G AAGGGGGCAG	370		56°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	CTACCAGCCCAAGGGGGCAG			72°C 2mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GTCACGACCAGCCC G AAGGGGGCGTGAC	211DelG-W	78	72°C 7mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	CAGTGCACCAGCCCAAGGGGGGCACTG	211DelG-M	84.9	
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	ATCTCTGCCCCCTTCGGGCTGGTAGCG	Ci211DelGW		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	CATCTCTGCCCCCTTCGGGCTGGTAGCG	Ci211DelGM		
MPZ (P0) RefSeq NM_000530	V113F	337	Amorce sens	GGAGCTAAGCTTTGACAGCT			94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	ACCTGTCAGTCCTCCCTGAT			94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	TGGCTCCATT G TCATACACAA	350		51°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	TGGCTCCATT T TCATACACAA			72°C 1mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCGAGCGCTCCATT G TCATACACAAGCTCGC	V113F-W	69.1	72°C 10mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCGAGCGCTCCATT T TCATACACAAGCTCGC	V113F-M	72	
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	TCTAGGTTGTGTATGACAATGGAGCCATCC	CiV113FW		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	TCTAGGTTGTGTATGAAAATGGAGCCATCC	CiV113FM		
MPZ (P0) RefSeq NM_000530	T124M	371	Amorce sens	GGAGCTAAGCTTTGACAGCT			94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	ACCTGTCAGTCCTCCCTGAT			94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	GACAATGGCA C GTTCACTTGT	350		51°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	GACAATGGCA T GTTCACTTGT			72°C 1mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCGAGCCAATGGCA C GTTCACTTGCTCGC	T124M-W	72.6	72°C 10mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCGAGCCAATGGCA T GTTCACTTGCTCGC	T124M-M	72.6	
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	CGTCACAAGTGAACGTGCCATTGTCACCTGT	CiT124MW		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	CGTCACAAGTGAACATGCCATTGTCACCTGT	CiT124MM		

PMP22 RefSeq NM_000304	C42R	124	Amorce sens	TTTCCTTCACTCCTCCCTCC			94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	GTCTGAGGACAAGCTCACGG			94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	CTGGCAGAAC T GTAGCACCTC	200		62°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	CTGGCAGAAC C GTAGCACCTC			72°C 1mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCGAGCCAGAAC T GTAGCACCGCTCGC	C42R-W	72.7	72°C 7mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCGAGCCAGAAC C GTAGCACCGCTCGC	C42R-M	75.1	
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	GAAGAGGTGCTACAGTTCTGCCAGAG	CiC42RW		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	GAAGAGGTGCTACGGTTCTGCCAGAG	CiC42RM		
PMP22 RefSeq NM_000304	W140R	418	Amorce sens	CCAGCAATTGTCAGCATCC			94°C 5mn 1 fois
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	CTGCTTTCTGTTTTCCCTTC			94°C 30 sec.
			Séq. Sauvage à détecter	CATCCTGGCCT T GGGTGGCCTT	321		62°C 45sec. } 30 cycles
			Séq. mutée à détecter	CATCCTGGC C GGGTGGCCTT			72°C 1mn
			Seq. oligonucléotides spotés (normale)	GCGACGTCCTGGC T GGGTGCGTCGC	W140R-W	71.6	72°C 7mn 1 fois
			Seq. oligonucléotides spotés (mutée)	GCGACGTCCTGGC C GGGTGCGTCGC	W140R-M	73.8	
			Seq. oligonucléotides de synthèse (normale)	GAAGGCCACCCAGGCCAGGATGTAGG	CiW140RW		
			Seq. oligonucléotides de synthèse (mutée)	GAAGGCCACCCGGGCCAGGATGTAGG	CiW140RM		

Tableau 4: Description des séquences à détecter et les séquences des oligonucléotides de synthèse hybridés, des sondes hairpins, et des amorces utilisées pour l'amplification de PCR.

II - 1 - 1 - 4 - Sondes et séquences d'oligonucléotides cibles

Les sondes ont été conçues en utilisant un logiciel spécifique développé pour l'analyse de mutation par *Serial Genetics*. Le procédé général de conception des sondes suit 4 étapes:

i) conception de la boucle: la séquence de la boucle est centrée sur la base sujet de l'analyse (position de la mutation), sa séquence ayant une longueur de 15 à 18 bases.

ii) conception de la tige : deux « bras » complémentaires de 5 à 7 bases ont été ajoutés à chaque extrémité de la boucle, flanquant ses extrémités 5' et 3' (voir page 57).

iii) calcul de la température de fusion (T_m) de chaque "*hairpin*", sonde entière comportant la tige et la boucle, par le logiciel *mfold* (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/dna/). La T_m moyenne des sondes était de 73.07°C. Toutes les sondes ont été contrôlées par *mfold* pour s'assurer de l'absence de structures secondaires stables dans leur séquence.

iv) alignements des séquences: en utilisant le logiciel Bioedit, les séquences de chaque "*hairpin*" ont été alignées contre toutes les séquences de tous les produits de PCR, afin de rechercher une homologie minimum entre les sondes et les cibles non-complémentaires.

Toutes les sondes ont été conçues pour s'hybrider avec le brin marqué anti-sens (inverse) des produits de PCR. Pour chaque mutation, nous avons dessiné deux "*hairpins*" : une porteuse de séquence mutée, l'autre porteuse de la séquence normale. Ces "*hairpins*" sont différentes d'une seule base sur la boucle de la sonde. Les sondes "*hairpins*" ont été commandées chez "Sigma Genosys" avec un éditeur de liens aminé "aminolinker" en 5' (5'C6-NH₂) afin de permettre l'immobilisation covalente sur des lames en verre.

Plusieurs modifications de structure des sondes ont été réalisées au cours de cette étude afin d'obtenir une hybridation spécifique, augmenter les signaux issus de cette hybridation, et enfin, discriminer entre les séquences sauvages et mutées. Chaque nouveau design d'une sonde "*hairpin*" est modulé par modification de la taille de la boucle et/ou celle de la tige. De plus, la modification de la séquence (contenu en GC) de la tige, qui ne participe pas à l'hybridation avec la cible, joue un rôle important pour optimiser ce

nouveau design. Le but de ces modifications est d'améliorer l'affinité de la cible étudiée avec la boucle de la sonde de telle façon qu'elle soit suffisante pour dépasser la force issue de l'hybridation de la séquence complémentaire de la tige. De ceci résulte une affinité cible-boucle suffisamment adéquate pour obliger la tige de la sonde à s'ouvrir en cas d'une complémentarité parfaite entre la cible et la boucle. Les séquences finales des sondes utilisées dans cette étude sont indiquées dans le tableau 4.

Un ensemble de 16 oligonucléotides de synthèse a été conçu pour s'hybrider à chacune des sondes (deux oligonucléotides ont été conçus par mutation, un par allèle). La longueur des oligonucléotides cibles est identique à celle de la conformation ouverte des sondes "*hairpins*" (c.-à-d. la longueur des bras plus celle de la boucle). Seule la séquence de la boucle des sondes est complémentaire à la cible d'oligonucléotides. Tous les oligonucléotides ont été commandés chez "Sigma Genosys" (purifiés par chromatographie liquide sous haute pression ; HPLC) avec un marqueur fluorescent Cy3 à leur extrémité 5'. Le tableau 4 donne les séquences des 16 cibles oligo-nucléotidiques de synthèses employées pour vérifier la spécificité des sondes "*hairpins*" conçues dans cette étude.

II - 1 - 1 - 5 - Fabrication et impression de puce à ADN : Microarray

Des lames en verre de 75 x 25 millimètres (Gold Seal, Erie Scientific) ont été nettoyées par immersion pendant 15 minutes dans une solution de "piranha" contenant 70% d'acide sulfurique concentré et de 30% de peroxyde d'hydrogène à température ambiante. Ensuite, les lames ont été complètement rincées trois fois avec de l'eau MilliQ-filtrée pendant 5 minutes à température ambiante. La silanisation de la surface du verre a été réalisée par l'immersion des lames de verre dans une solution méthanolique contenant 2% de (3-mercaptopropyl)-triméthoxysilane (Sigma Aldrich), 1% d'acide acétique et 4% d'eau MilliQ-filtrée pendant 2 heures à température ambiante et protégées de la lumière. Après déplacement du bain de silane, les lames de verre silanilisées ont été rincées au méthanol (grade HPLC) et agitées doucement pendant 5 minutes pour éliminer le réactif non couplé. Les lames de verre silanilisées ont ensuite été séchées par centrifugation pendant 3 minutes à 500 t/mn et la couche adsorbée de silane a été chauffée à 100°C pendant deux heures. Ces lames ont été stockées dans une boîte propre à température ambiante. Le couplage de molécules PEG hétérobifonctionnelles aux lames silanilisées a été réalisé en dissolvant 3,75 mg de N-hydroxysuccinimide-polyéthylèneglycol-vinylsulfone

(NHS-PEG-VS, PM = 3.4 kDa, Nektar, Huntsville, Alabama) dans 1 ml de PBS (1X, pH 7,4). Puis, 200 µl de cette solution a été appliqué sur une face des lames silanilisées afin de former un film liquide sur la lame. Après incubation 45 minutes à température ambiante, les lames traitées avec le PEG ont été rincées deux fois dans l'eau MilliQ-filtrée et séchées par centrifugation (3 minutes à 500 t/mn). Avant le greffage, les oligonucléotides ont été resuspendus dans un tampon phosphate (150 mM, pH 8,3) jusqu'à une concentration de 20 µM. Les différentes solutions d'oligonucléotides ont été appliquées sur les lames par l'impression de contact à l'aide d'un appareil Biorobotics Microgrid II (Genomic solutions, Ann Arbor, Michigan) et d'une aiguille BioRobotics MicroSpot 2500. Pendant l'étape de greffage (*spotting*), le niveau d'humidité relative était maintenu à 50%. Après greffage, les puces ont été conservées dans une chambre humide réglée à 60% d'humidité relative pendant une période de 10 à 24 h. L'excès des groupes amine-réactifs a ensuite été désactivé en maintenant les lames pendant 30 minutes à 50°C dans une solution de pH 9, contenant éthanamine (50 mM) et Tris-HCl (0,5 M). Les lames ont été lavées deux fois avec de l'eau MilliQ-filtrée, puis elles ont été incubées pendant 30 minutes dans une solution SSC (4X, 0.1% SDS) avant d'être chauffées à 50°C. Les lames ont été lavées deux fois avec de l'eau MilliQ-filtrée et finalement séchées par centrifugation pendant 3 minutes à 500 t/mn puis stockées dans une chambre desséchée à 20°C jusqu'à utilisation.

II - 1 - 1 - 6 - Description des lames (schéma de "*spotting*")

Les différentes sondes ont été greffées sur une lame de verre sous une forme de petits disques appelés unités d'hybridation ou "*spots*". Ces "*spots*" d'oligonucléotides ont un diamètre de 125 à 135 µm, et la distance de centre-à-centre entre deux "*spots*" adjacents est de l'ordre de 400 µm. Les "*spots*" WT et MT ont été gréffés en sous unités (blocs de "*spots*" ; cadrans) séparées. Des oligonucléotides marqués par Cy3 ont été greffés comme un repère de position sur la puce. Le schéma de "*spotting*" et le positionnement des "*spots*") seront illustrés dans chaque série d'expérience.

II - 1 - 1 - 7 - Protocole d'hybridation et lavage

L'hybridation sur les lames a été effectuée avec 15 µl d'une solution (mix) d'hybridation contenant 100 nM d'oligonucléotides de synthèse ou 2 µg des produits de PCR marqués par Cy3. La solution d'hybridation a été préparée comme suit :

- 7.5 μ L Formamide 100% (50% final)
- 4.5 μ L SSC 20X (6 X final)
- 3 μ L d'oligonucléotides de synthèse ou des produits de PCR

La solution a été dénaturée pendant 3 minutes à 98°C avant dépôt sur la puce. Chaque lame a été hybridée pendant une heure à température ambiante. L'hybridation a été effectuée sous une lamelle de 22x22 mm (hybri-slips, Size : 22-22 mm, Sigma-Aldrich). Après hybridation, les lames ont été lavées selon le protocole suivant (identique pour tout type d'hybridation) :

- SSC 1X / SDS 0.2%, 4 minutes
- SSC 1X, 3 minutes sous agitation
- SSC 0.1X, 3 minutes sous agitation

Séchage en centrifugeuse : 4 minutes à 800 tours /mn.

II - 1 - 1 - 8 - Lecture des puces à ADN et analyse du signal

Les signaux de fluorescence résultant de l'excitation du fluorochrome Cy-3 des oligonucléotides et des ADN hybridés ont été capturés en utilisant trois modules différents du scanner (lecteurs des puces à ADN). Les premiers essais ont été réalisés à *Genescore* (Paris) en utilisant le lecteur "Scanarray Lite" ou "Genepix 1000". Les essais de la deuxième série d'expériences ont été réalisés en utilisant le lecteur "Genepix 4000" de *Serial Genetics* (Evry). L'analyse du signal pour ces deux lecteurs a été réalisée en employant des logiciels couplés aux lecteurs. Finalement, les derniers essais ont été réalisés au CHRU de Limoges par le lecteur IMSTAR "OSA Reader" et analysés par le logiciel d'analyse d'image du lecteur.

Après acquisition des images, les trois paramètres : Signal (s), Signal "moins" Bruit de fond (S-B) et de Signal/Bruit de fond (S/B) ont été calculés par le logiciel pour chaque "spot" en utilisant une grille et un détecteur de "spots" ("*Spot finder software*"). Une grille correspondant au modèle de "spotting" (schéma de "spotting") sur la puce à ADN a été automatiquement positionnée par le logiciel sur l'image acquise. Pour un "spot" défini, le signal a alors été calculé comme l'intensité moyenne de fluorescence détectée à l'intérieur d'un cercle principal, appelé « cercle diamétral ». Ces cercles étaient centrés dans les carrés de la grille. Le diamètre de ces cercles a été convenu (adapté) au diamètre du "spot"

($D_{\text{spot}} = 135 \mu\text{m}$, vert: figure 19) par le trouveur de "spot" et était fixe pour tous les "spots" de la puce. Le bruit de fond (B) correspond à l'intensité moyenne de fluorescence mesurée à l'intérieur d'un secteur de couronne entourant chaque "spot". La couronne est constituée par deux cercles concentriques dont les diamètres étaient successivement $1.3 D_{\text{spot}}$ et $1.7 D_{\text{spot}}$ (entre les deux flèches blanches : figure 19). Le signal moyen du bruit de fond a été automatiquement soustrait du signal moyen de chaque "spot" par le logiciel. Ce paramètre (S-B) nous a permis de supprimer les erreurs dues à un bruit de fond local élevé. Les rapports S/B ont été également calculés pour chaque "spot" par le logiciel. Nous avons déterminé qu'un "spot" est détecté si son rapport S/B était supérieur à 1 (Khomyakova et al. 2004).

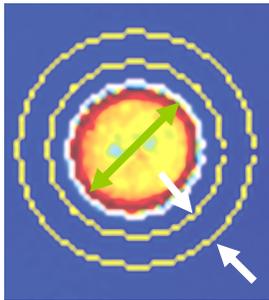


Figure 19 : Positionnement des couronnes autour d'un "spot" afin de calculer les paramètres Signal (S), Signal-Bruit de fond (S-B) et Signal/ Bruit de fond (S/B).

Les valeurs moyennes de S-B ont été calculées sur les 5 répliques verticales pour chaque "spot". Ces valeurs ont été rapportées en tant qu'unité relative de fluorescence et ultérieurement utilisées pour le calcul des taux de discrimination.

II - 1 - 1 - 9 - Taux d'hybridation croisée (CHR ; "cross hybridization rate"), taux de discrimination (DR, "discrimination rate")

Le taux d'hybridation croisée a été défini pour une sonde comme le rapport entre le signal mesuré lors de l'hybridation avec une cible non complémentaire et le signal mesuré lors de l'hybridation avec une cible parfaitement complémentaire. Ce taux d'hybridation

croisée indique la capacité d'une sonde à distinguer deux séquences totalement différentes. Le taux de discrimination (DR) a été défini pour chaque sonde comme le rapport entre le signal mesuré lors de l'hybridation avec une cible parfaitement complémentaire (cible WT / la sonde WT, ou cible MT / sonde MT) et le signal mesuré lors de l'hybridation avec une cible non parfaitement complémentaire "*mismatched*" d'une même mutation (cible MT / sonde WT, ou cible WT / sonde MT). Ce rapport indique la capacité d'une sonde donnée à distinguer deux séquences ne différant que d'un seul nucléotide.

Afin d'estimer le taux d'hybridation croisée, différents types d'oligonucléotides sauvages ou mutés ont été groupés par 3, et hybridés sur 2 répliques des puces. Les valeurs (S-B) des "*spots*" non complémentaires aux cibles hybridées ont alors été mesurées. Ces valeurs ont été rapportées comme des pourcentages des valeurs (S-B) des "*spots*" parfaitement complémentaires aux cibles hybridées. Le taux de discrimination (DR) a été déterminé pour chaque sonde en hybridant, soit toutes les cibles sauvages (100 nM chacune), soit toutes les cibles mutantes (100 nM chacune), soit un mélange des cibles sauvages et mutantes en concentration équimolaire (100 nM chacune). Pour ces expériences, 2 puces ont été employées par analyse, en utilisant le protocole standard d'hybridation. Pour une paire donnée de sonde, (c.-à-d. allèle sauvage et muté), les 3 expériences ont donné 4 DRs différents: DRs pour l'hybridation des cibles sauvages (type sauvage homozygote), DRs pour l'hybridation des cibles mutées (type mutant homozygote), 2 DRs ; un pour chaque hybridation des cibles sauvages et mutées (hétérozygote). D'autre part, l'hybridation d'un mélange de tous les oligonucléotides de synthèse complémentaires (sauvages et mutants) a été réalisée avant chaque série de manipulation afin de vérifier que le "*spotting*" était correct.

II - 1 - 2 - Résultats

II - 1 - 2 - 1 - Hybridation d'oligonucléotides de synthèse sur des puces "*hairpin*"

Les propriétés de la puce à ADN ont été d'abord évaluées par l'hybridation de mélanges d'oligonucléotides de synthèse correspondant aux allèles sauvages et mutés. Ces oligonucléotides étaient marqués à la Cy3 en 5' (tableau 4).

Dans cette série d'expériences, un lot de puces préparées selon le procédé *Genescore* a été spotté avec des sondes "*hairpins*" préparées à des concentrations

croissantes (schéma de "spotting", figure 20). Les sondes WT et MT ont été greffées chacune en sous-unité séparée en trois exemplaires sur chaque puce. Chaque lame contenait deux puces identiques.

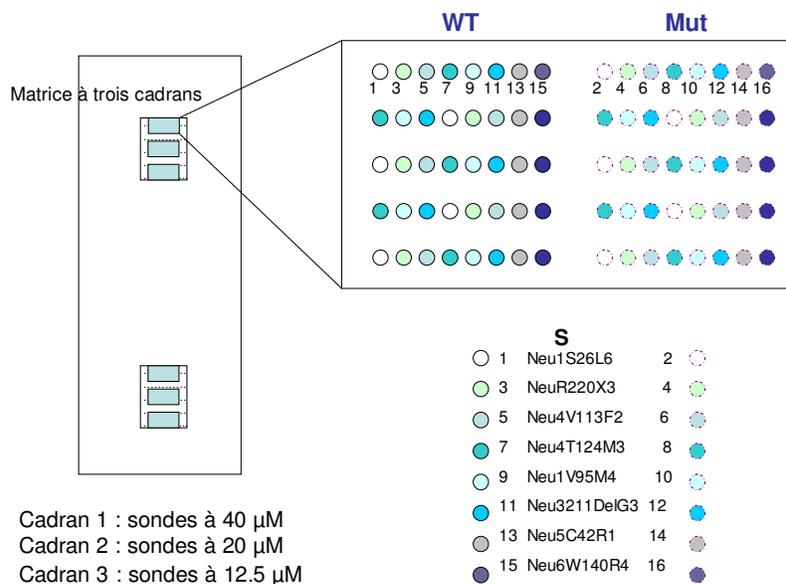


Figure 20: Schéma initial du "spotting".

Ces puces ont été hybridées selon le protocole *Serial Genetics* (page 90) avec des mélanges de cibles WT et MT à des concentrations variables de façon à évaluer à la fois les paramètres optimums de "spotting" et d'hybridation, et les paramètres de discrimination des sondes.

Chacune des 5 répliques de chaque type de "spot" a été analysée par la mesure de (S), (S-B) et (S/B). La valeur moyenne de (S-B) pour les 5 répliques a été calculée. La spécificité d'hybridation des sondes "hairpin" a été déterminée en calculant le taux d'hybridation croisée et le taux de discrimination pour chaque type de sonde comme décrit précédemment.

II - 1 - 2 - 1 - 1 - Effet de la concentration de sondes spottées

Pour chacun des résultats suivant trois expériences ont été prises en compte. Les cibles (sauvage, mutante ou mélange équimolaire des deux) sont hybridées à 100 nM dans le tampon d'hybridation préalablement spécifié.

Ces cibles sont hybridées sur des sondes spottées à 12.5 μM , 20 μM et 40 μM , à raison de 5 répliques par "*spot*" et par condition.

Il s'agit donc de déterminer la concentration optimale de sondes spottées en observant les effets sur les intensités moyennes du signal d'une part et sur les taux de discrimination d'autre part.

II - 1 - 2 - 1 - 1 - 1 - Effet de la concentration des sondes spottées sur l'intensité du signal

Chaque cible a été hybridée séparément, les sauvages (WT, figure 21), les mutantes (MT, figure 22), et enfin l'ensemble des deux populations (WT + MT, figure 23).

L'intensité du signal des cibles sauvages est maximale pour une concentration en "*hairpins*" de 40 μM (figure 21).

Les résultats obtenus avec les cibles mutées (figures 22) et le mélange sauvages/mutées (figures 23) montrent que l'intensité du signal est optimale pour une concentration de 20 μM .

Les profils obtenus révèlent une augmentation du signal avec la concentration mais avec une importante variation de l'intensité du signal obtenue à 40 μM . Effectivement l'intensité du signal semble plus élevée à 40 μM mais de façon très irrégulière. Nous observons un début de plateau pour la courbe du signal en fonction de la concentration, plus évident pour le graphique MT et MT+WT.

C'est pourquoi un "*spotting*" à 20 μM semble plus adapté, les signaux étant plus important qu'à 12.5 μM et plus réguliers qu'à 40 μM .

Afin de valider les observations précédentes, nous avons hybridé, une deuxième fois, un mélange de toutes les cibles sauvages et mutantes sur des sondes spottées à 12.5

μM , 20 μM et 40 μM (figure 24). Les intensités moyennes obtenues pour une concentration en sonde de 20 μM confirment que c'est la concentration optimale.

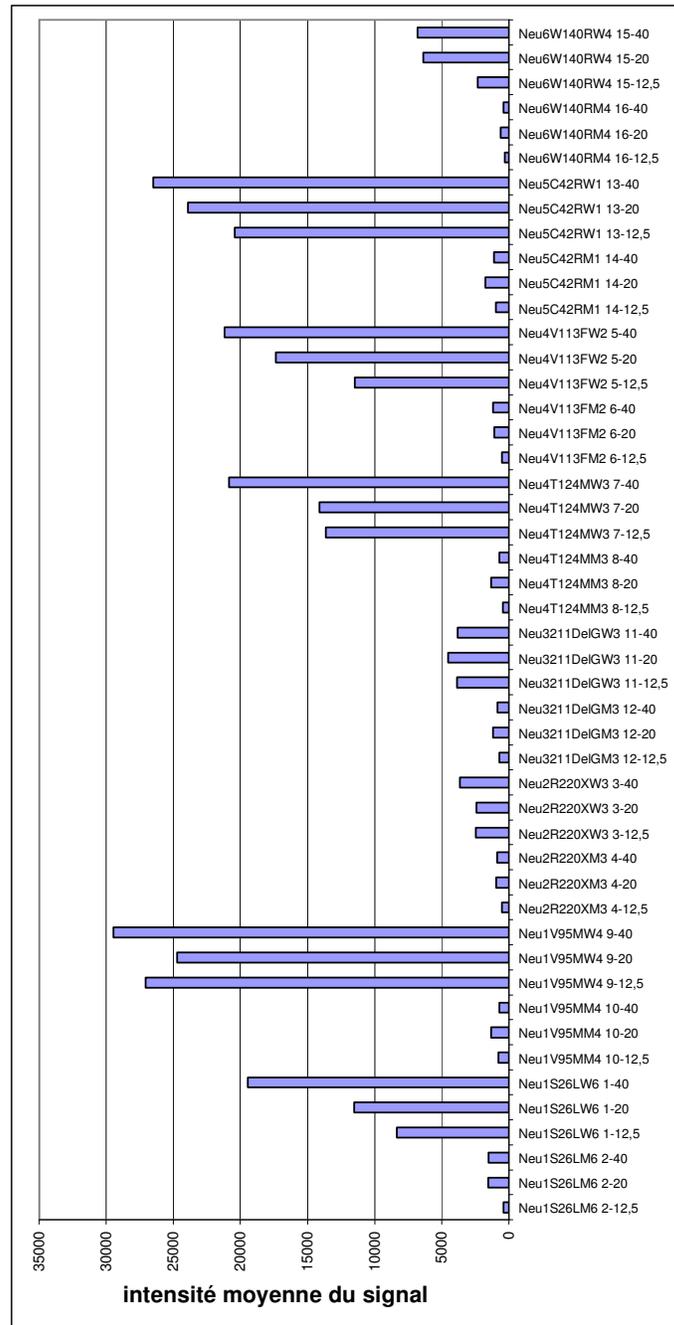


Figure 21: Hybridation des cibles WT - effet des concentrations en "hairpins" sur les intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μM).

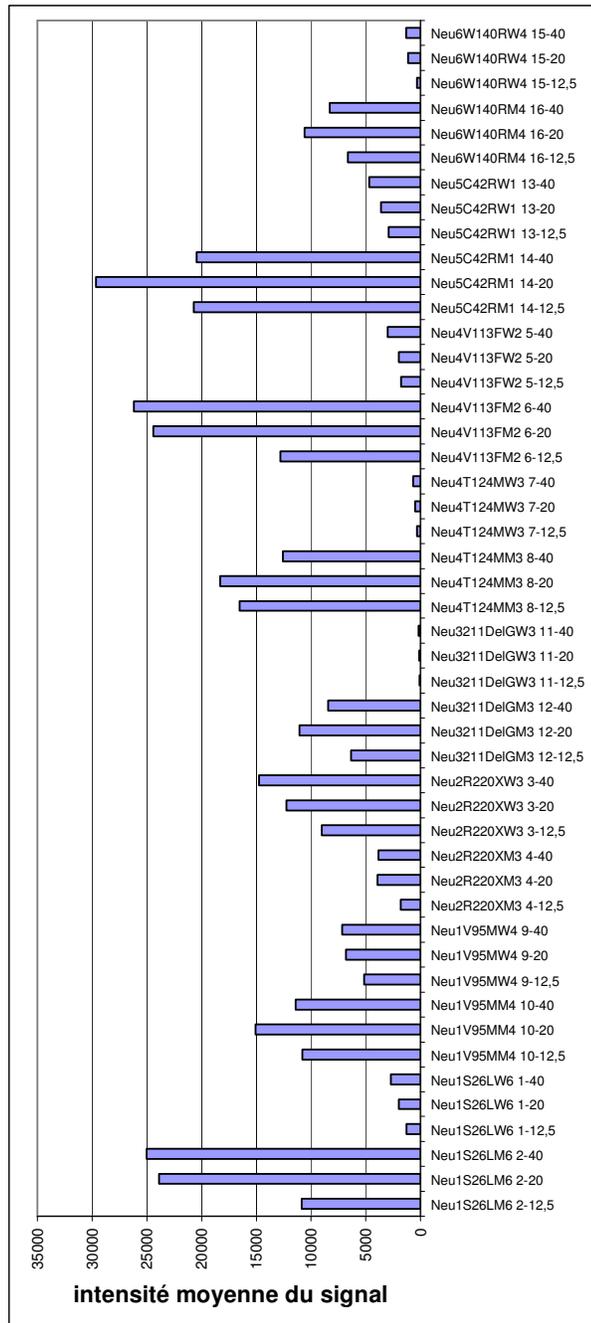


Figure 22: Hybridation des cibles MT- effet des concentrations en "hairpins" sur les intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

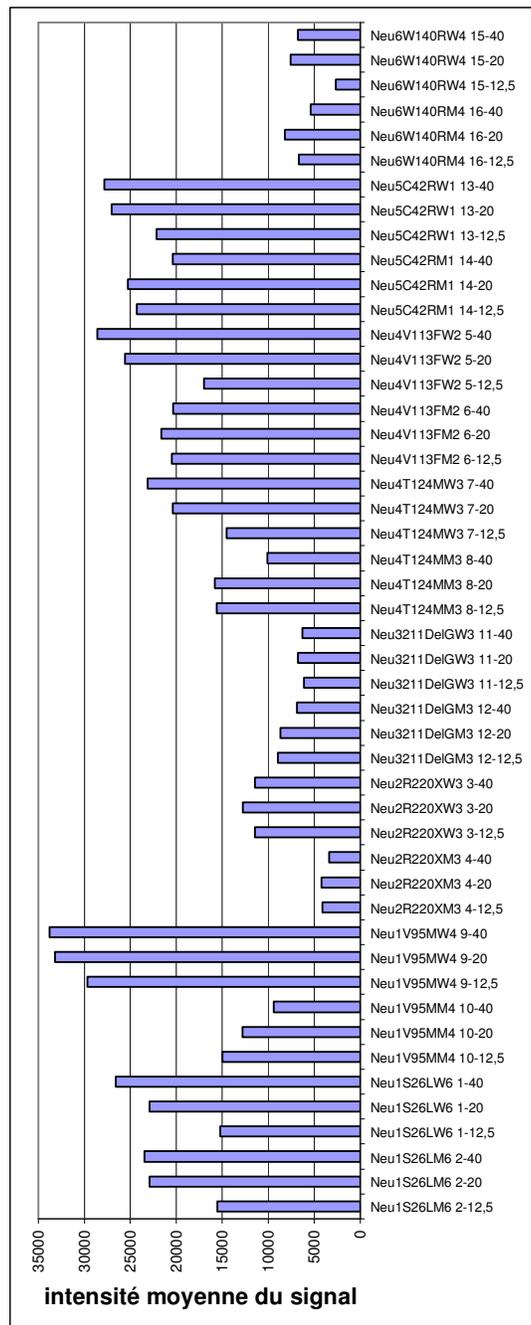


Figure 23: Hybridation des cibles MT et WT- effet des concentrations en "hairpins" sur les intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μM).

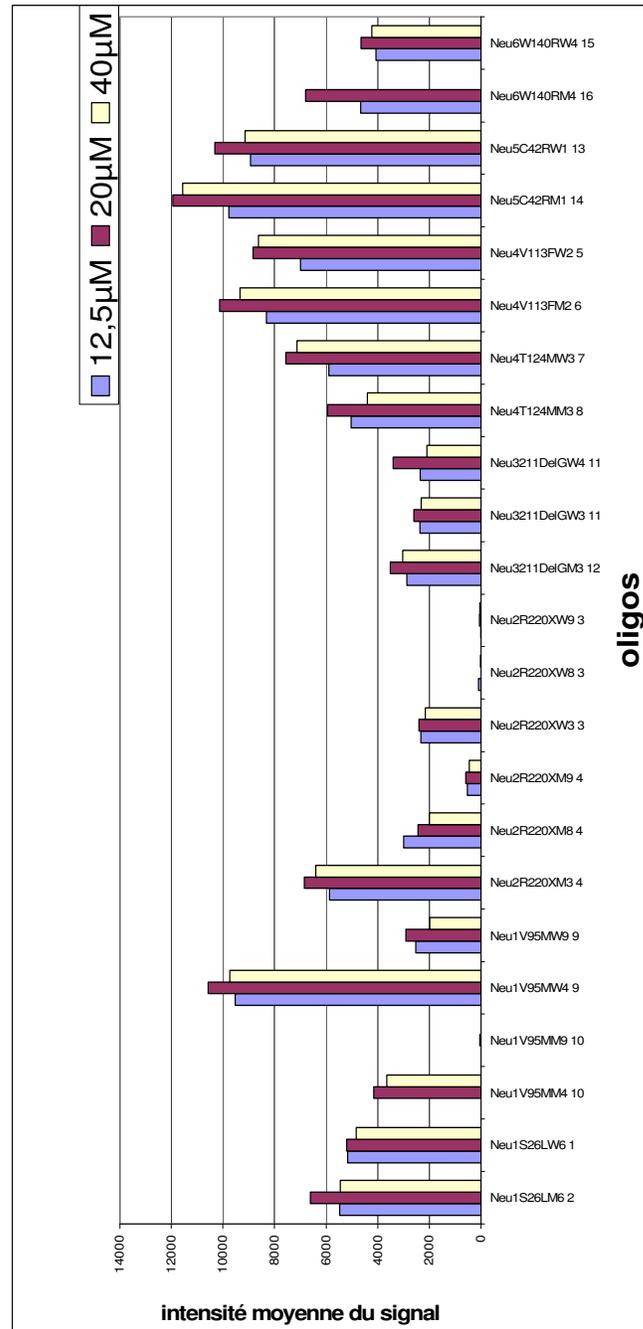


Figure 24: Confirmation des résultats de l'hybridation des cibles MT et WT- effet des concentrations en "hairpins" sur les intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...).

II - 1 - 2 - 1 - 1 - 2 - Effet de la concentration de sondes spottées sur les taux de discrimination

Nous appelons taux de discrimination le rapport du signal obtenu avec les sondes correspondant à la cible hybridée, sur le signal des sondes de l'autre allèle (c-à-d différent d'une base). Ainsi, pour la première expérience, où les cibles WT sont hybridées, le taux de discrimination sera :

A des concentrations en "*hairpins*" de 20 μM , le taux de discrimination paraît globalement satisfaisant (figure 25). En outre, il semble varier avec la concentration des sondes spottées, (taux moins importants à 20 μM).

Une deuxième expérience a été réalisée en hybridant l'ensemble des cibles correspondant au mutant. Le taux de discrimination est donc donné par :

$$R = \text{signal sondes MT} / \text{signal sondes WT}$$

Cette fois, certains taux sont inférieurs à 10 pour toutes les concentrations, mais le taux de discrimination reste satisfaisant pour certaines sondes aux concentrations en "*hairpins*" de 20 μM (figure 26).

Lors d'une dernière expérience, l'ensemble des oligonucléotides cibles (WT+MT) est hybridé sur la puce. Dans le cas idéal, nous devrions obtenir :

$$\text{signal "hairpin" WT} / \text{signal "hairpin" MT} = 1$$

La figure 27, représente le résultat de cette expérience. La plupart des taux sont proches de 1, toutefois certains taux sont largement différents de 1. Il est donc très difficile de conclure quant à un éventuel effet de la concentration de sondes spottées.

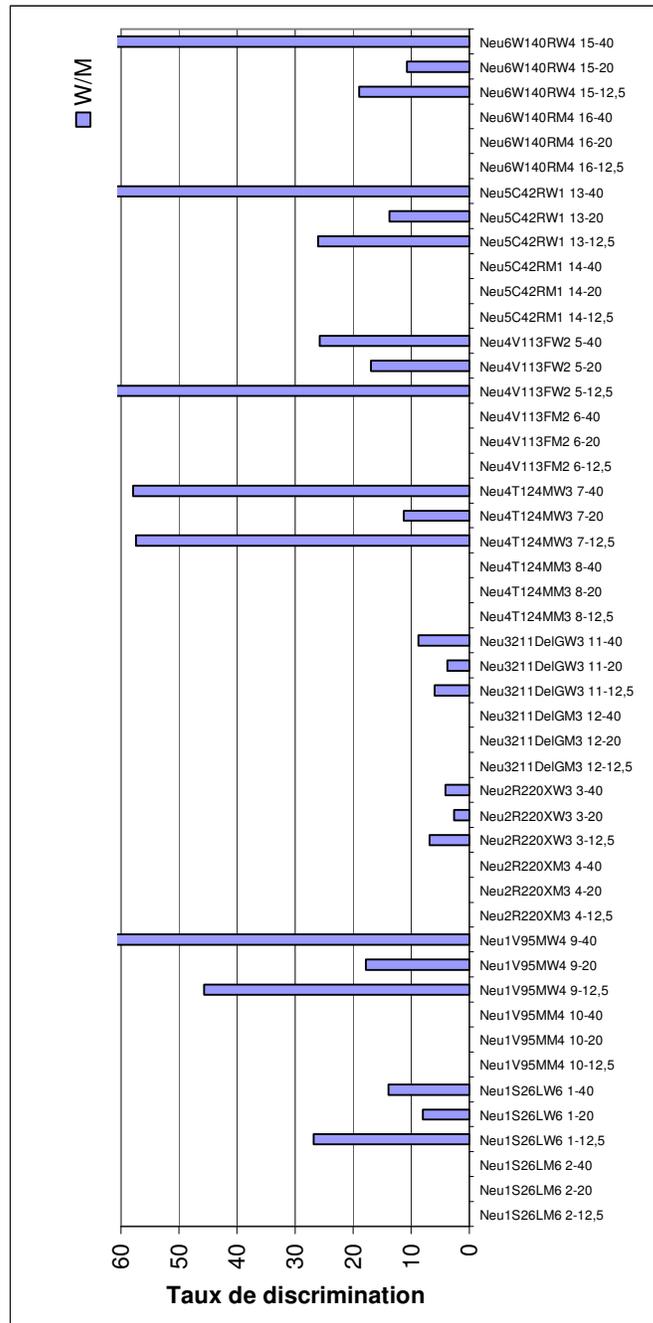


Figure 25: Hybridation des cibles WT - effet des concentrations en "hairpins" sur les taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

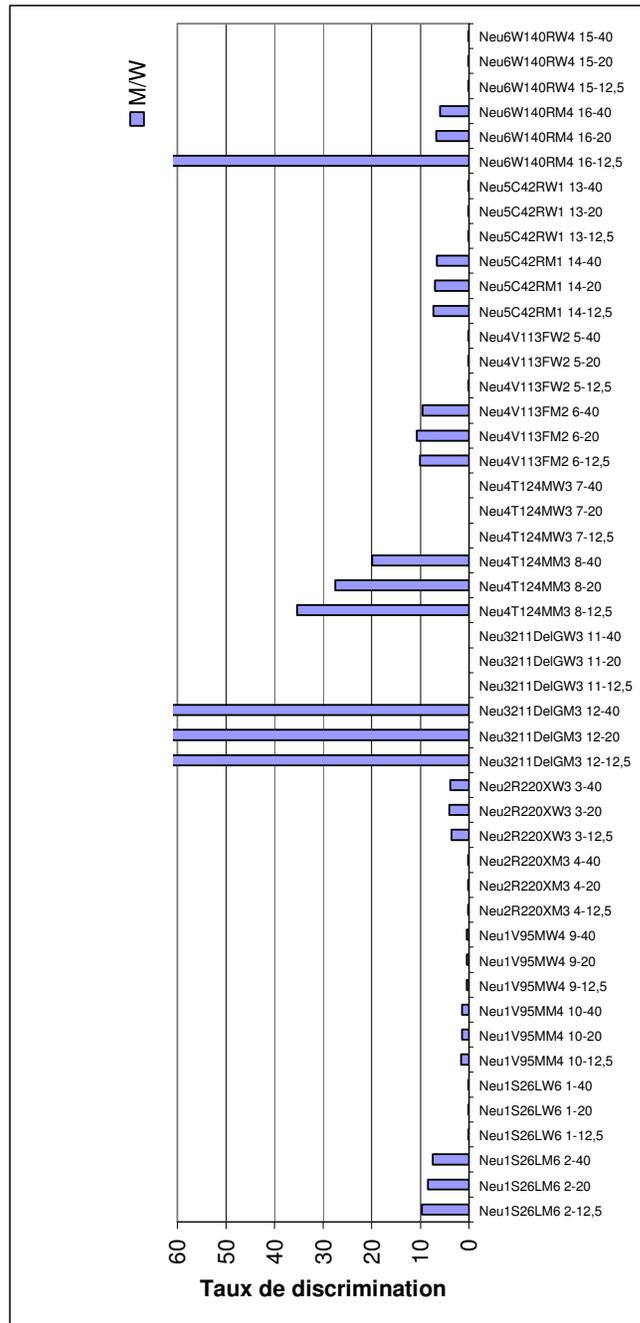


Figure 26: Hybridation des cibles MT - effet des concentrations en "hairpins" sur les taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

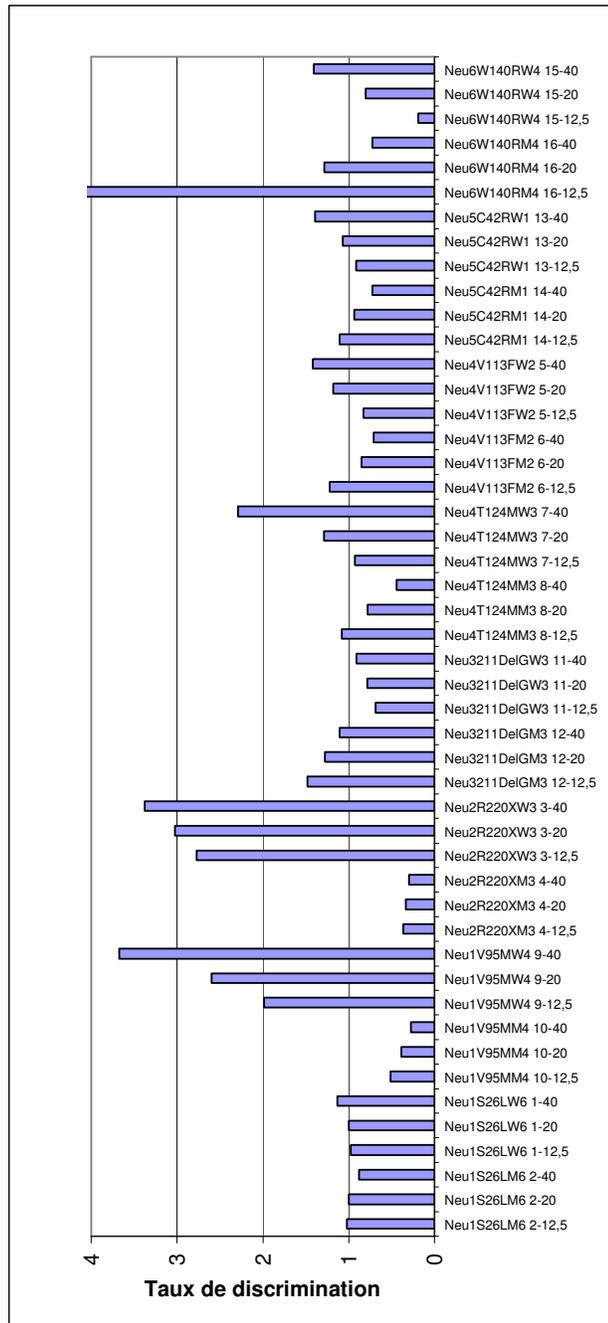


Figure 27: Hybridation des cibles MT et WT- effet des concentrations en "hairpins" sur les taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

II - 1 - 2 - 1 - 1 - 3 - Conclusion

On note clairement un effet d'augmentation de l'intensité du signal proportionnel à la concentration en sondes spottées. Ceci est probablement dû à une quantité plus importante de sondes disponibles pour l'hybridation. Cependant, cet accroissement ne s'accompagne pas d'une variation significative des taux de discrimination observés. Un compromis peut être trouvé entre coût de "spotting" et intensité élevée de signal pour une concentration de sondes spottées de 20 μ M. Les "hairpins" pour lesquelles le taux de discrimination était faible en hybridant des cible WT ou MT (homozygote), ainsi que celles dont le taux de discrimination était très différent de 1, ont été re-dessinés et spottées sur la puce.

II - 1 - 2 - 1 - 2 - Effet de la concentration de la cible

Une fois la concentration optimale en sonde déterminée, il est important d'optimiser la concentration des cibles ainsi que les conditions d'hybridation de façon à obtenir le meilleur compromis entre sensibilité, spécificité et coût du produit.

II - 1 - 2 - 1 - 2 - 1 - Effet de la concentration de la cible sur les intensités du signal

Deux concentrations de cible (100 et 50 nM) ont été évaluées dans les expériences suivantes :

- Hybridation d'un mélange contenant les cibles sauvages WT à 50 nM : figure 28.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles sauvages WT à 100 nM : figure 21.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes MT à 50 nM : figure 29.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes MT à 100 nM : figure 22.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes+sauvages MT +WT à 50 nM : figure 30.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes+sauvages MT +WT à 100 nM : figure 23.

Lorsque nous comparons les expériences à 50 nM (figures 28, 29 et 30) et les expériences à 100 nM (figures 21, 22 et 23), il apparaît que les intensités sont en moyenne deux fois plus fortes à 100 nM qu'à 50 nM.

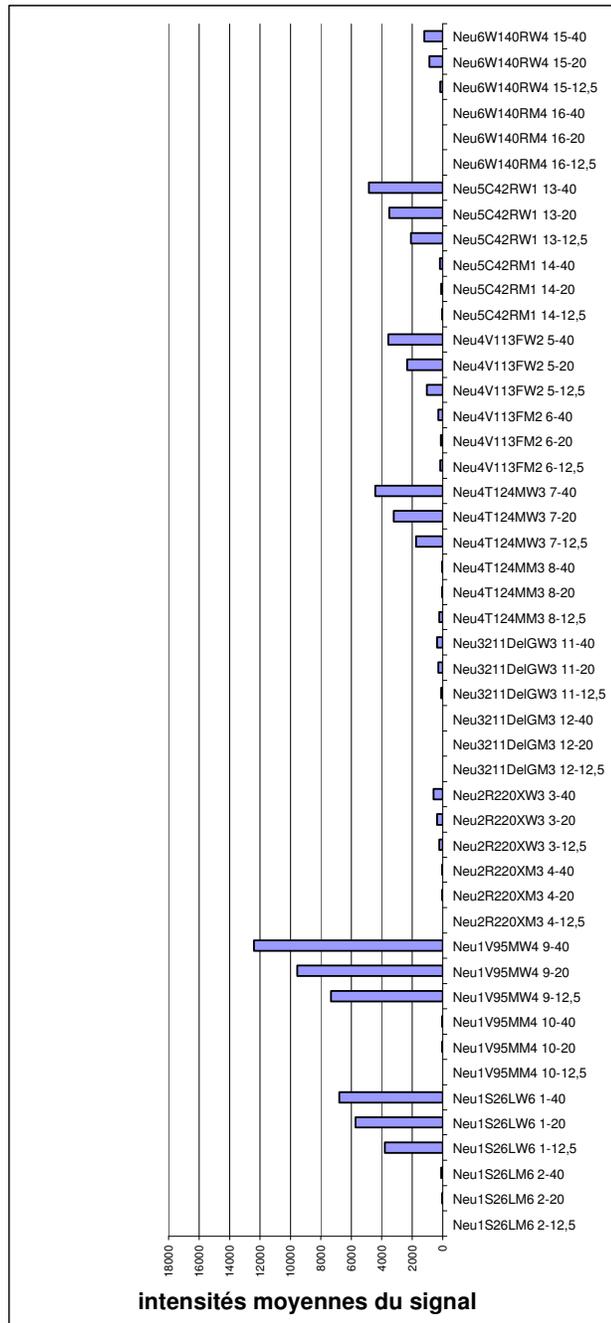


Figure 28: Intensités du signal des "hairpins" pour 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles WT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

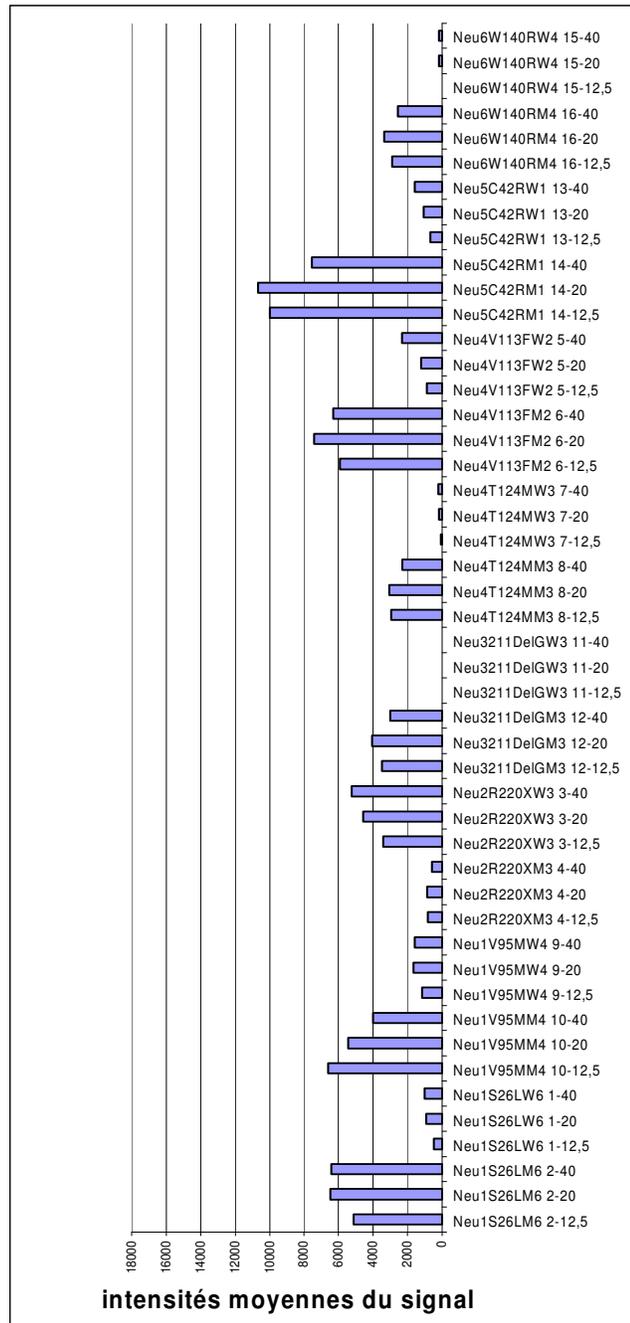


Figure 29: Intensités du signal des "hairpins" à 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles MT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

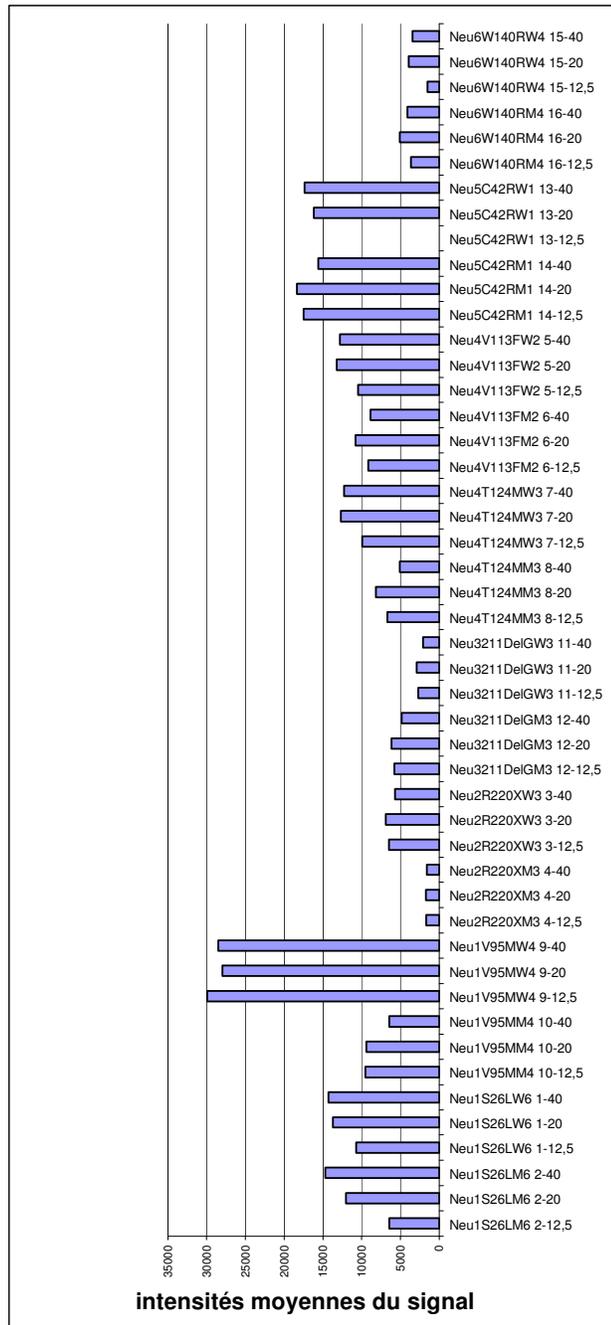


Figure 30: Intensités du signal des "hairpins" à 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles WT+MT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 µM).

II - 1 - 2 - 1 - 2 - 2 - Effet de la concentration de la cible sur les taux de discrimination

Les expériences précédentes ont été interprétées en fonction du taux de discrimination :

- Hybridation d'un mélange contenant les cibles sauvages WT à 50 nM : figure 31.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles sauvages WT à 100 nM : figure 25.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes MT à 50 nM : figure 32.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes MT à 100 nM : figure 26.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes+sauvages MT +WT à 50 nM : figure 33.
- Hybridation d'un mélange contenant les cibles mutantes+sauvages MT +WT à 100 nM : figure 27.

Ces expériences font apparaître que le taux de discrimination ne semble pas varier quand la concentration de la cible double (passant de 50 à 100 nM). Néanmoins pour les expériences d'hybridation des cibles WT, nous avons constaté que les taux de discrimination sont plus importants à 50 qu'à 100 nM.

II - 1 - 2 - 1 - 2 - 3 - Conclusion

Nous avons choisi de travailler à 100 nM de concentration de cibles pour la suite des expériences, les valeurs de signaux et les taux de discrimination étant suffisants à cette concentration.

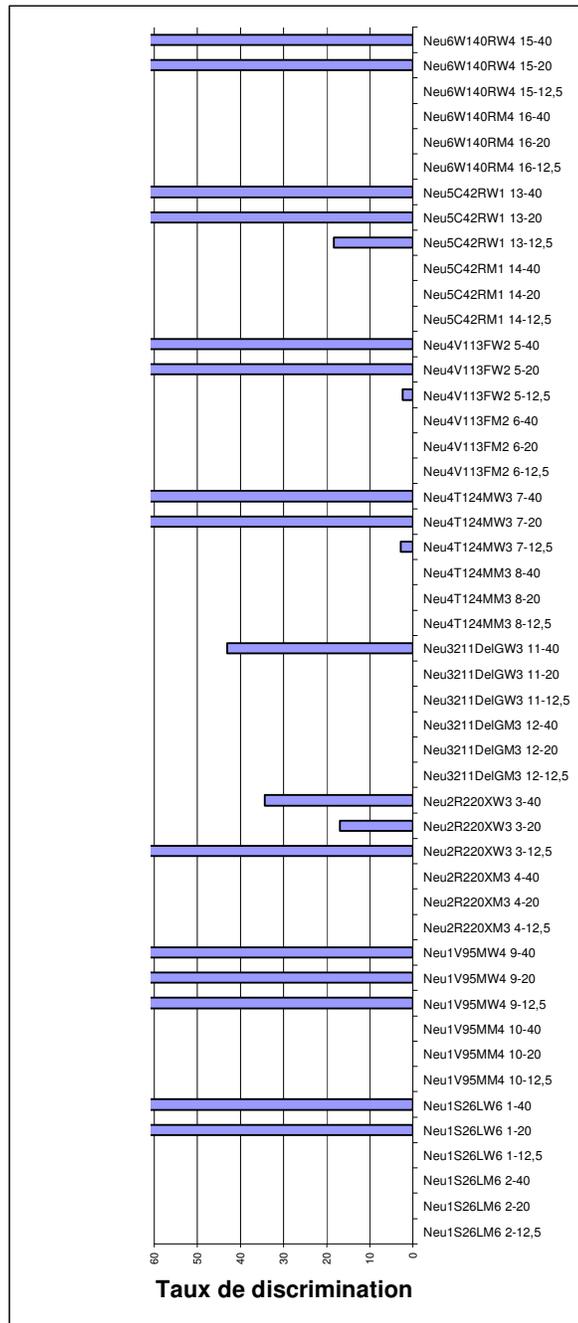


Figure 31: Test "hairpins" à 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles WT- Taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

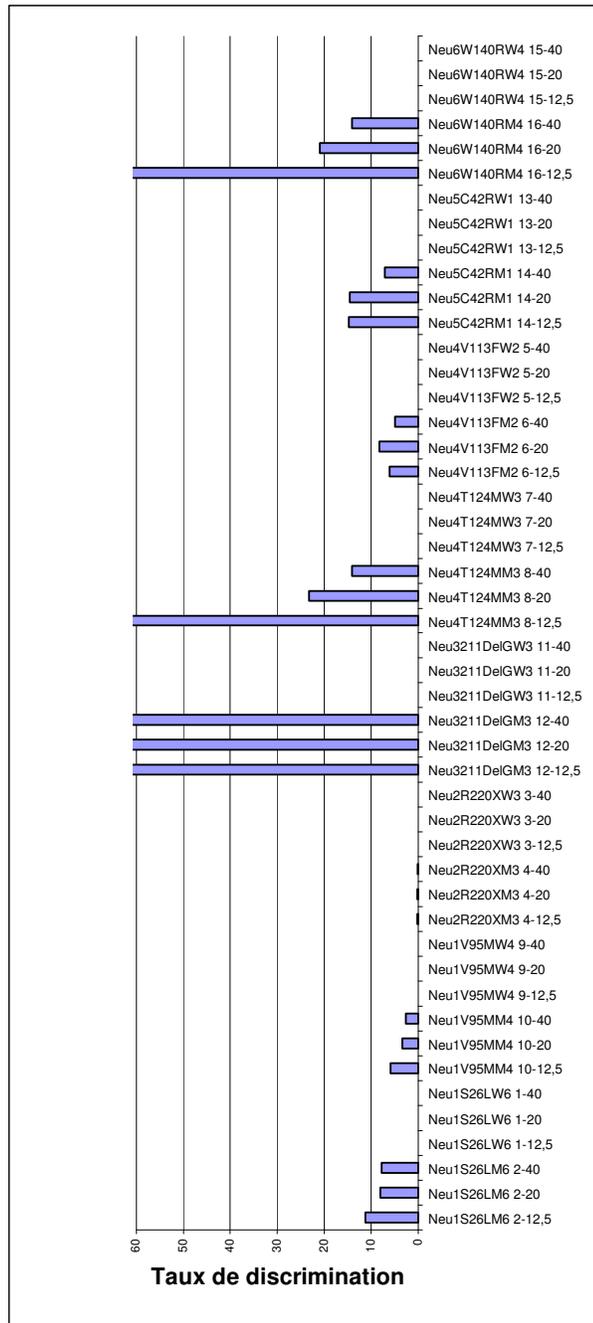


Figure 32: Test "hairpins" à 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles MT-Taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

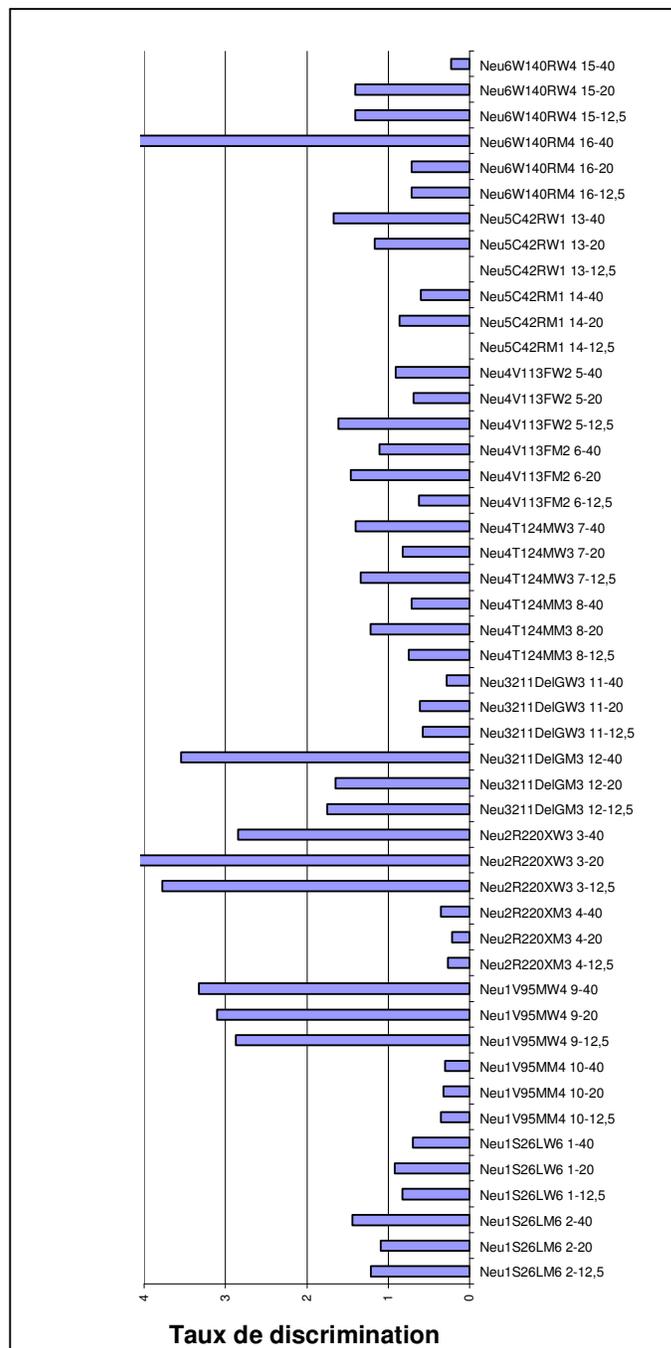


Figure 33: Test "hairpins" à 50 nM de cible hybridée - Hybridation des cibles WT+MT- Taux de discrimination. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

II - 1 - 2 - 1 - 3 - Effet de la dénaturation des cibles

II - 1 - 2 - 1 - 3 - 1 - Effet de la dénaturation des cibles sur les intensités du signal

Ces tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment en rajoutant une étape supplémentaire de dénaturation avant l'hybridation. Les échantillons d'oligonucléotides dans leur solution (mix) d'hybridation sont chauffés trois minutes à 98°C avant l'hybridation, puis refroidis à température ambiante, ceci dans le but d'éviter la formation de structures secondaires ou d'appariements entre les différentes séquences.

Quatre expériences ont été faites avec une concentration de cible de 100 nM :

- 1 - Hybridation des cibles sauvages WT non dénaturés (figure 34).
- 2 - Hybridation des cibles sauvages WT dénaturés (figure 35).
- 3 - Hybridation des cibles mutantes MT non dénaturées (figure 36).
- 4 - Hybridation des cibles mutantes MT dénaturées (figure 37).

Nous observons pour l'hybridation des oligonucléotides WT (figure 34 et 35) une légère différence des profils d'hybridation. C'est-à-dire que dans le cas de la dénaturation les résultats sont plus homogènes (augmentation de l'intensité du signal en fonction de la concentration des sondes spottées). Les signaux obtenus avec 20 μ M des sondes sont plus importants avec dénaturation que sans. Nous retrouvons pour la manipulation non dénaturée le profil obtenu avec les tests précédents.

Pour l'hybridation des oligonucléotides mutants (figure 36 et 37) les différences entre oligonucléotides dénaturés et non dénaturés sont moins évidentes, mais nous pouvons voir un profil plus régulier (après dénaturation) qui confirme l'observation faites avec les oligonucléotides sauvages.

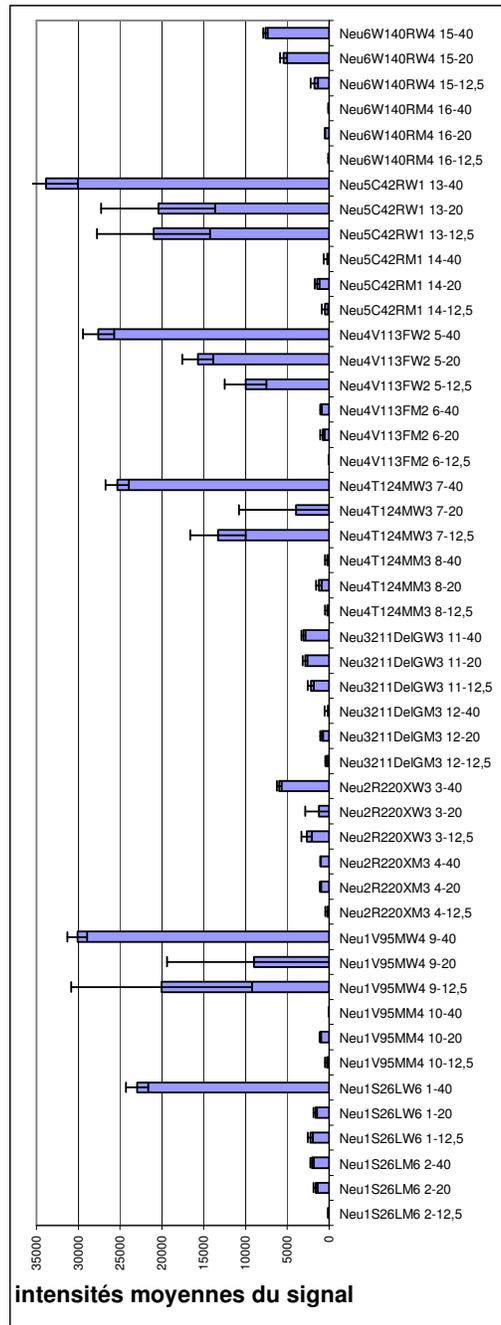


Figure 34: Hybridation des cibles WT non dénaturées - intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

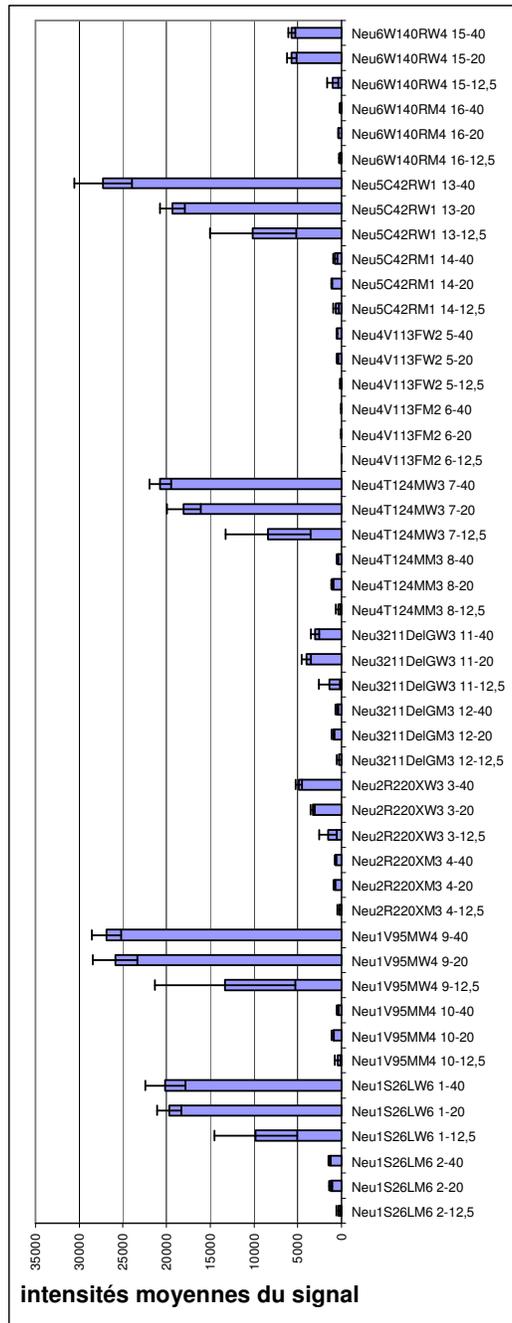


Figure 35: Hybridation des cibles WT dénaturées - intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μM).

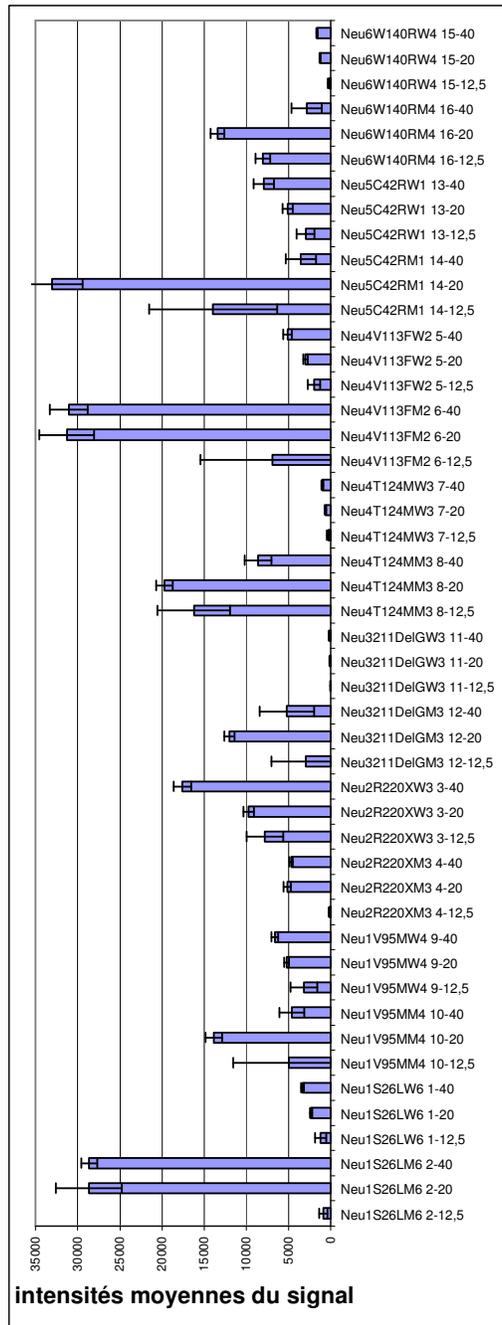


Figure 36: Hybridation des cibles MT non dénaturées - intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

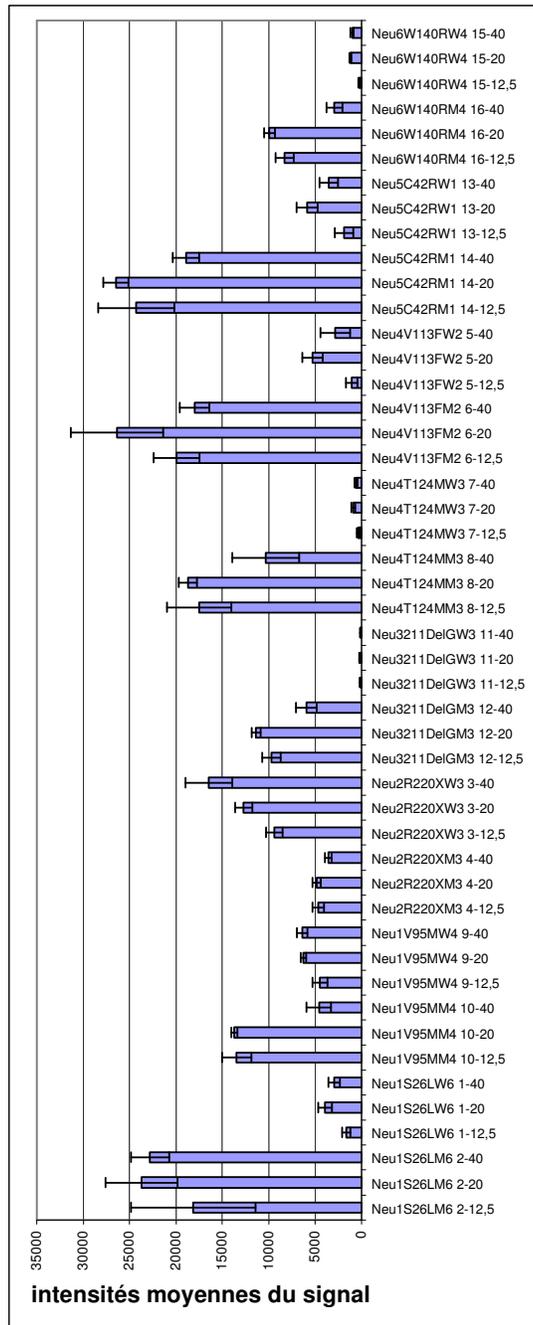


Figure 37: Hybridation des cibles MT dénaturées - intensités du signal. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

II - 1 - 2 - 1 - 3 - 2 - Effet de la dénaturation des cibles sur les taux de discrimination

Comme vu précédemment, la dénaturation semble homogénéiser les valeurs en diminuant les écarts observés dans les différentes conditions expérimentales (concentration des sondes en solution de spotting étudiée : 12.5, 20 et 40 μM).

Nous ne notons pas de différence importante des taux de discrimination avec et sans dénaturation, pour l'hybridation de ces cibles synthétiques (figure 38, 39, 40 et 41). En général, les taux de discrimination à 20 μM sont plus importants avec dénaturation que sans.

II - 1 - 2 - 1 - 3 - 3 - Conclusion

Nous pouvons penser d'après ces résultats que la dénaturation permet une hybridation plus homogène des cibles synthétiques sur leurs sondes. La mise en place de cette étape de dénaturation est importante car celle peut avoir une influence sur la cinétique d'hybridation des cibles double brin (produits de PCR), en rendant plus disponible les zones complémentaires des sondes "*hairpins*".

Cette étape supplémentaire sera utilisée pour les manipulations biologiques (produits de PCR).

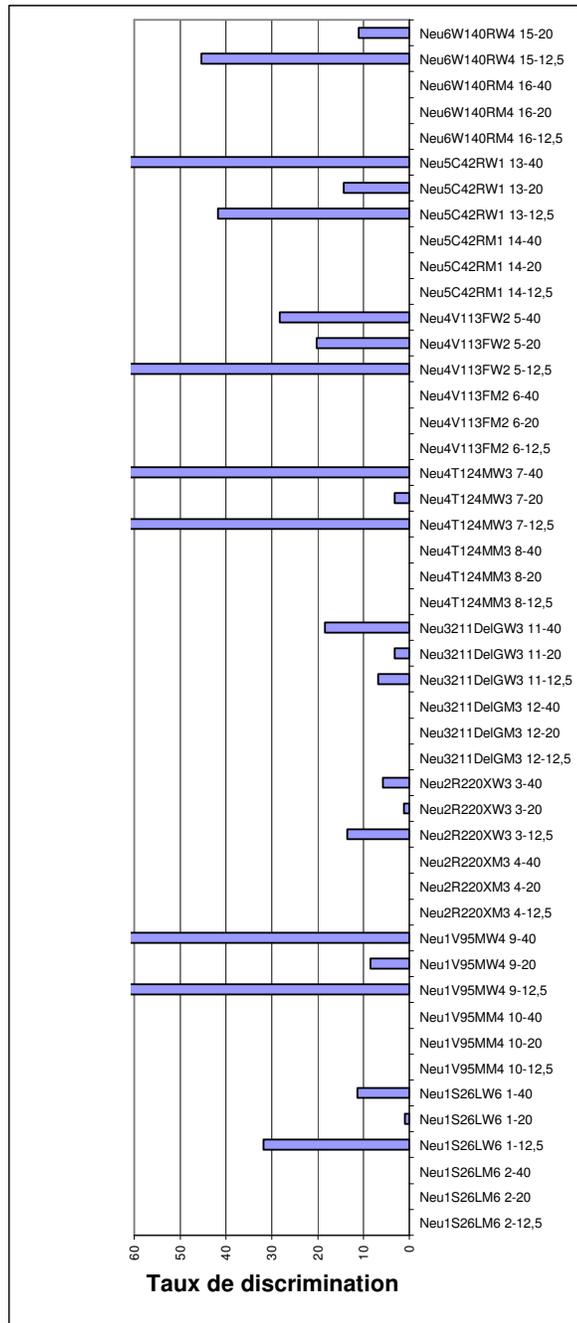


Figure 38: Hybridation des cibles WT non dénaturées – Rapport WT/MT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

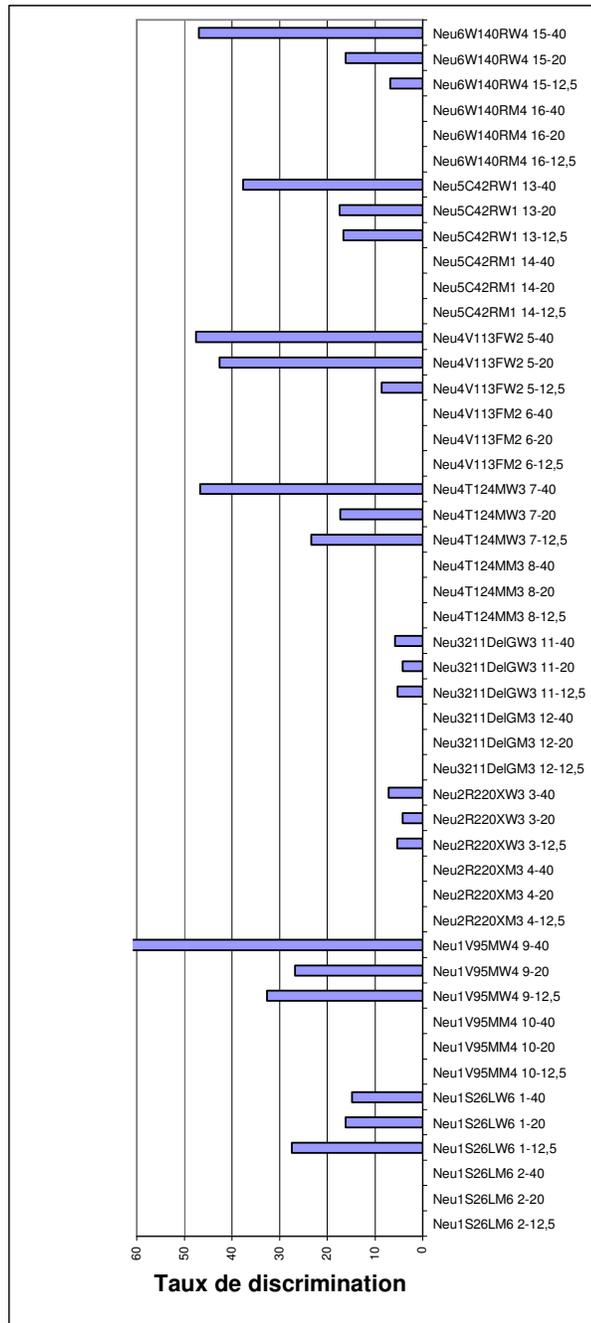


Figure 39: Hybridation des cibles WT dénaturées – Rapport WT/MT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

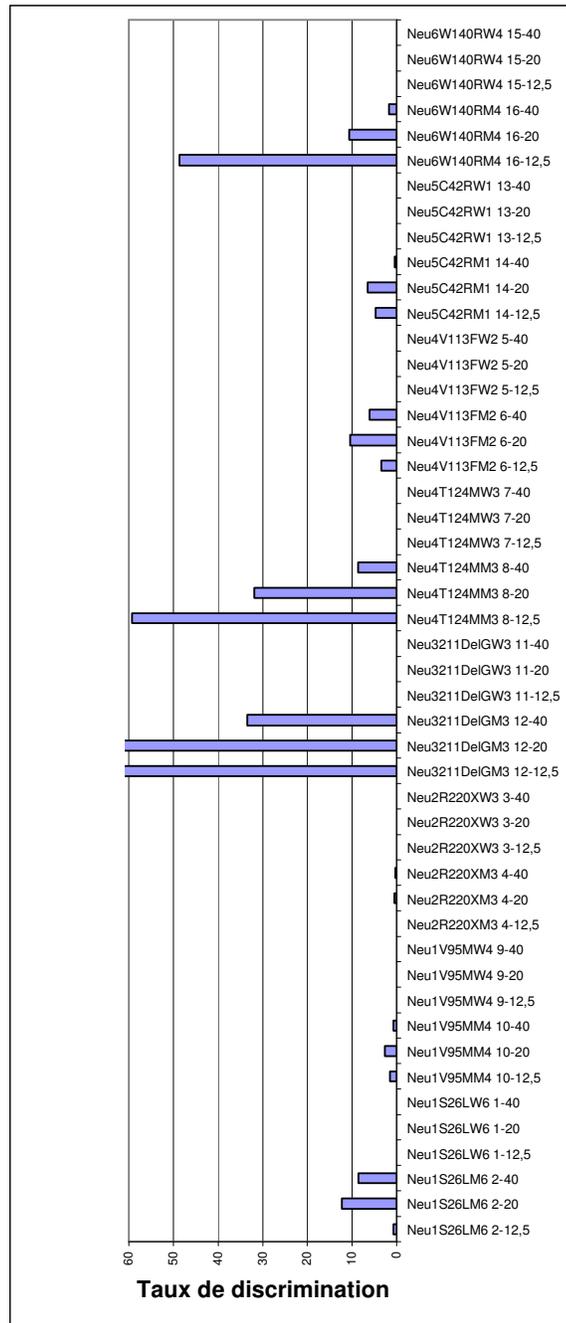


Figure 40: Hybridation des cibles MT non dénaturées – Rapport MT/WT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 µM).

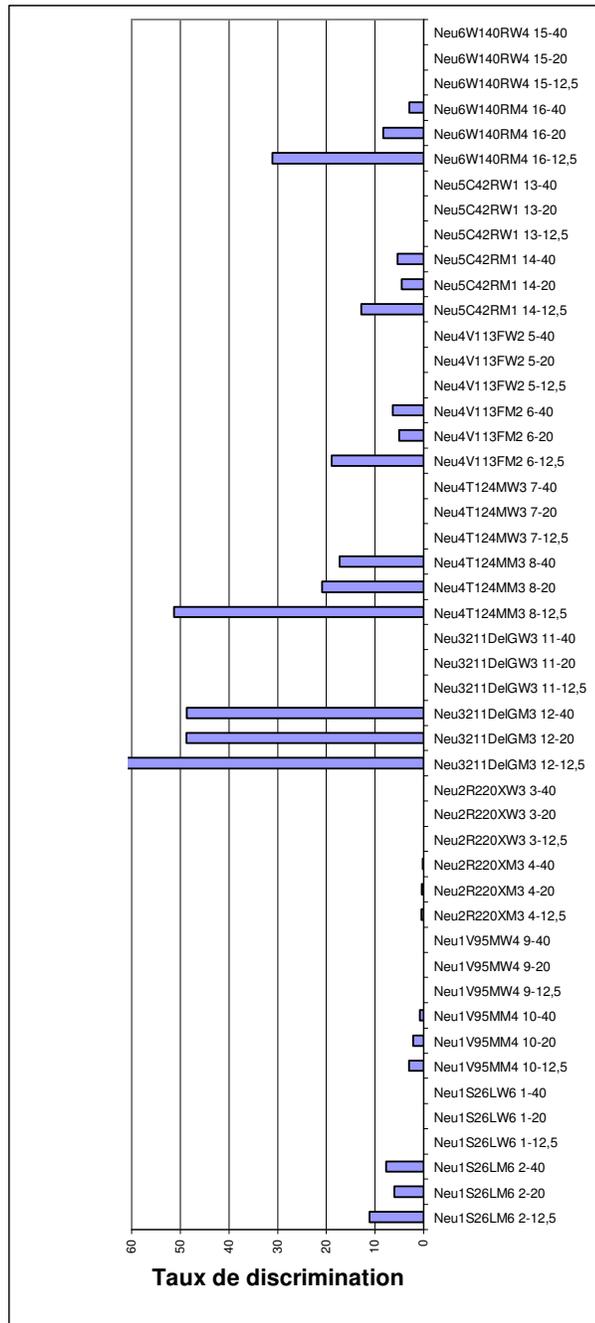


Figure 41: Hybridation des cibles MT dénaturées – Rapport MT/WT. En abscisse, chaque catégorie se définit comme suit : Neurochip (Neu), mutation (ex : V95M), numéro de design (1, 2, 3...), concentration de la sonde (12,5, 20 ou 40 μ M).

II - 1 - 2 - 1 - 4 - Spécificité d'hybridation des cibles sur leurs sondes

La spécificité d'hybridation des sondes "*hairpins*" a été évaluée en déterminant pour chaque sonde "*hairpin*" le taux d'hybridation croisée, et le taux de discrimination permettant de valider le bon fonctionnement des sondes. Cela a été réalisé dans un premier temps en hybridant les oligonucléotides de synthèse. Les taux de discrimination ont été calculés avec les produits de PCR afin de déterminer les caractéristiques de chaque couple des "*hairpins*". Ils serviront à normaliser les signaux, et à donner un génotype ainsi que la limite de sensibilité de détection du test pour des cibles homozygotes et hétérozygotes.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 1 - Taux d'hybridation croisée

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 1 - 1 - Protocole

Les cibles marquées mutantes et sauvages sont poolées par lot de 3 cibles, et hybridées à une concentration de 100 nM, dans du tampon SSC 6X, 50% formamide, sur 2 lames, pendant 1h à température ambiante. Les lames sont ensuite lavées en utilisant le protocole *Genescore* décrit auparavant, puis scannées.

Les mélanges de cibles hybridés sont les suivants :

Expérience 1 : cibles S26L MT, V113F WT, T124M MT.

Expérience 2 : cibles V95M WT, 211 delG WT, C42R MT.

Expérience 3 : cibles S26L WT, C42R WT, W140R MT.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 1 - 2 - Résultats

Les résultats obtenus dans ces expériences d'hybridation ont été calculés sur 10 répliques (5 "*spots*" indépendants par lame). Seules les valeurs correspondant aux "*hairpins*" spottés à 20 μ M ont été exploitées (correspondant à la meilleure concentration de sondes spottées). Nous avons noté que les "*hairpins*" parfaitement complémentaires de la cible, ou différant d'une base, s'hybrident préférentiellement avec celle-ci.

Le tableau 5 résume l'ensemble des valeurs d'hybridations non spécifiques obtenues lors de ces expériences, après normalisation des signaux. Cette normalisation s'effectue pour chacune des 3 expériences en calculant le pourcentage de signal des sondes

non complémentaires des cibles hybridées (sondes différentes de plus d'une base avec la cible hybridée).

Cibles Sondes	Moyenne des non spé %	± ET
Neu1S26LM6 2-20	0,00	0,00
Neu1S26LW6 1-20	0,07	0,12
Neu1V95MM4 10-20	3,33	2,49
Neu1V95MW4 9-20	5,88	6,60
Neu2R220XM3 4-20	0,47	0,75
Neu2R220XW3 3-20	2,14	3,77
Neu3211DelGM3 12-20	1,81	2,20
Neu3211DelGW3 11-20	2,97	3,75
Neu4T124MM3 8-20	1,13	0,77
Neu4T124MW3 7-20	0,31	0,26
Neu4V113FM2 6-20	0,27	0,26
Neu4V113FW2 5-20	0,15	0,24
Neu5C42RM1 14-20	4,93	2,97
Neu5C42RW1 13-20	8,73	5,26
Neu6W140RM4 16-20	1,19	1,36
Neu6W140RW4 15-20	3,07	3,44

Tableau 5 : Taux d'hybridation croisée des sondes "hairpins" après l'hybridation des oligonucléotides de synthèse.

La valeur moyenne des hybridations non spécifiques obtenues lors de cette série d'expérience, toutes sondes confondues, est de $2,28\% \pm 2,5$ du signal maximal. Cela signifie que quelque soit la sonde considérée, l'hybridation d'un mélange de 3 cibles synthétiques génèrera un signal non spécifique moyen compris entre 0 et 4,8%.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 1 - 3 - Conclusion

Les résultats obtenus ici montrent que les sondes "hairpins" permettent de reconnaître spécifiquement à température ambiante des cibles synthétiques (cibles parfaitement complémentaires ou différents d'une base avec la sonde), en maintenant les hybridations non spécifiques à des valeurs inférieures à 10% du signal spécifique.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 2 - Capacité de discrimination des sondes (taux de discrimination)

La capacité de discrimination des sondes est définie par le ratio entre les signaux WT/MT ou MT/WT lors de l'hybridation de cibles homozygotes pour chacun des allèles, ou d'un mélange équimolaire des deux cibles (simulation d'hétérozygotie).

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 2 - 1 - Protocole

6 puces ont été utilisées pour cette expérience qui consiste à hybrider un mélange de sondes WT ou MT à 100 nM ou un mélange des 2 sondes, 100 nM toutes les 2.

Le protocole d'hybridation est le même que celui décrit page 90.

- 2 puces sont hybridées avec 100 nM d'un mélange des cibles WT.
- 2 puces sont hybridées avec 100 nM d'un mélange des cibles MT.
- 2 puces sont hybridées avec 100 nM d'un mélange des cibles WT+MT.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 2 - 2 - Résultats

Les valeurs de taux de discrimination pour chaque sonde sont présentées dans le tableau ci-dessous et sont calculées à partir des moyennes de 10 valeurs (2 lames à 5 répliques par lame).

Ce tableau se lit de la façon suivante : pour le couple de sondes S26L M6 (sonde mutante) et S26L W6 (sonde sauvage) :

- L'hybridation d'une cible homozygote WT/WT générera un signal 11 fois plus important avec la sonde sauvage que mutante.
- L'hybridation d'une cible homozygote MT/MT générera un signal 12 fois plus important avec la sonde mutante que sauvage.
- L'hybridation d'une cible hétérozygote MT/WT générera un signal équivalent sur les sondes sauvages et mutantes.

Sondes	Cibles WT (homozygotes WT/WT)	Cibles MT (homozygotes MT/MT)	Cibles WT+MT Hétérozygotes WT/MT	
	ratio WT/MT	ratio MT/WT	ratio WT/MT	ratio MT/WT
Neu1S26LM6 2-20		11,95		1,00
Neu1S26LW6 1-20	10,99		1,00	
Neu1V95MM4 10-20		2,07		0,39
Neu1V95MW4 9-20	22,52		2,60	
Neu2R220XM3 4-20		0,25		0,33
Neu2R220XW3 3-20	3,30		3,02	
Neu3211DelGM3 12-20		88,26		1,28
Neu3211DelGW3 11-20	3,98		0,78	
Neu4T124MM3 8-20		39,89		0,78
Neu4T124MW3 7-20	14,07		1,29	
Neu4V113FM2 6-20		14,01		0,85
Neu4V113FW2 5-20	14,88		1,18	
Neu5C42RM1 14-20		9,83		0,93
Neu5C42RW1 13-20	13,61		1,07	
Neu6W140RM4 16-20		8,46		1,07
Neu6W140RW4 15-20	10,78		0,93	

Tableau 6 : Taux de discrimination des sondes "hairpins" après l'hybridation des oligonucléotides de synthèse.

II - 1 - 2 - 1 - 4 - 2 - 3 - Conclusion

Nous pouvons noter que la plus part des ratios pour une hybridation de cibles homozygotes sont supérieurs à 8,5, sauf pour les sondes R220X WT, 211 delG WT, et V95M MT, qui ont été re-dessinées. Concernant la sonde R220X MT, nous ne pouvons pas conclure à une mauvaise discrimination, car la cible complémentaire présente une erreur de séquence (re-dessinée).

Une sonde (211delG MT) présente un taux de discrimination extrêmement élevé correspondant à un cas particulier où un décalage de séquence existe au niveau de la boucle de la "hairpin" MT lors de l'hybridation de la séquence WT. Ceci crée une structure particulière de la "hairpin" qui déstabilise très fortement l'hybride formé.

Pour 5 couples de sondes, les taux de discrimination sont très satisfaisants à la fois pour les sondes sauvages et mutantes, et nous observons que les taux dans ces 5 cas sont voisins de 1 lorsqu'on simule l'hybridation d'une cible hétérozygote.

Pour les trois couples restant, la conception de nouvelles sondes a été faite et devrait permettre une amélioration de taux de discrimination.

II - 1 - 2 - 1 - 5 - Conclusion intermédiaire d'hybridation de cibles synthétiques sur la biopuce "*hairpin*"

L'ensemble des expériences présentées ici représente la toute première étape de notre étude, c'est-à-dire le contrôle de la qualité et la spécificité d'hybridation avec des sondes synthétiques et la validation du bon fonctionnement de la technologie exploitée, ainsi que la mise au point de quelques paramètres importants du protocole.

Les conclusions de chacune des parties ne sont pas définitives mais permettent de dégager des tendances et de démarrer les tests biologiques avec une meilleure idée des résultats attendus. Les paramètres étudiés ici seront à nouveaux optimisés en manipulation biologique avec les produits de PCR.

Le taux d'hybridation croisée moyen d'hybridation obtenu dans ces expériences était $2,28\% \pm 2,5$ du signal spécifique. Ce résultat signifie que l'hybridation d'un oligonucléotide non-concerné a produit en moyenne moins de 3% de signal non spécifique pour toutes les sondes utilisées dans cette étude.

Tous les taux de discrimination pour les mélanges des oligonucléotides représentant les allèles "homozygotes" étaient hauts ($>8,5$) (sauf pour les sondes R220X WT, 211 delG WT, et V95M MT, qui ont été re-dessinées). Ceci signifie que pour une sonde donnée, l'hybridation d'une cible de type sauvage ou mutée "homozygote" sera détectée sur la sonde parfaitement complémentaire avec la différence S-B au moins 8,5 fois plus importante que celle de la sonde correspondante à l'autre allèle différant qu'une seule base. Pour les mélanges des oligonucléotides représentant les allèles sauvages et mutés "hétérozygotes", les taux de discrimination étaient proche de 1, ce qui était la valeur prévue. Ceci indique que l'hybridation d'un mélange équimolaire d'oligonucléotides sauvages et mutés sera détectée avec approximativement la même intensité du signal sur

les deux sondes sauvages et mutées. Ces résultats ont justifié les mesures suivies avec les échantillons d'ADN des sujets témoins et des patients. Un nouveau design des certaines "*hairpins*" a été réalisée afin d'améliorer les taux de discrimination et sera utilisée dans les expériences suivantes. Ces "*hairpins*" avaient un taux de discrimination faible lors de l'hybridation des cible WT ou MT (homozygote), et, ou un taux de discrimination très différent de 1 lors de l'hybridation des cibles WT et MT (hétérozygotes).

D'après les données exploitées nous pouvons définir le protocole suivant :

- Oligonucléotides de synthèse à 100 nM en SSC 6X et Formamide 50%.
- Dénaturation trois minutes à 98°C des cibles.
- Hybridation sur des sondes spottedes à 20 µM en tampon phosphate 150 mM, pH 8,3.

Les prochains travaux seront réalisés sur des puces contenant toutes les sondes ainsi que leurs nouveaux "designs". De même, la cible Ci R220X M sera remplacée par la séquence du nouveau lot de synthèse Ci R220X M-2 pour les hybridations suivantes d'oligonucléotides de synthèse.

II - 1 - 2 - 2 - Analyse d'ADN de sujets normaux et de patients sur des puces "*hairpin*"

Des produits de PCR dérivés d'ADN des témoins et des patients atteints de CMT ont été analysés. Chaque produit de PCR a été amplifié indépendamment, et examiné pour détecter la présence ou l'absence de l'allèle mutant, par l'hybridation sur une puce à ADN. 2 µg des produits de PCR ont été hybridé par lame afin de simplifier et homogénéiser les procédures (~400 nM en solution d'hybridation à 15 µl de volume). Les puces à ADN porte chacune des sondes "*hairpins*" spécifiques pour chaque allèle. La sensibilité n'était pas le but primaire de l'étude. Comme pour les oligonucléotides de synthèse, la spécificité de la méthode a été évaluée en mesurant les taux de discrimination.

II - 1 - 2 - 2 - 1 - Résultats attendus

Six produits de PCR ont été testés dans cette série d'expériences. Quatre de ces produits de PCR portent chacun une seule des mutations étudiées (R220X, 211delG, C42R, W140R). Deux produits de PCR comportent chacun deux des mutations étudiées [les mutations S26L et V95M sont localisées sur le même produit de PCR issu de

l'amplification de la deuxième partie de l'exon 2 du gène *Cx32* ; les deux mutations V113F et T124M se trouvent sur le même produit de PCR issu de l'amplification de l'exon 3 du gène *MPZ (P0)*. Chaque produit de PCR amplifié comporte donc un ou deux sites de mutations et pour lequel, un ou deux couples de sondes WT et MT ont été dessinées.

Lors de l'hybridation d'un produit de PCR issu d'une amplification d'ADN normal, seules les sondes WT correspondantes doivent être allumées. Ce produit de PCR ne porte que les séquences normales qui vont s'hybrider sur un seul type de sondes WT totalement complémentaires. Si le produit de PCR comporte deux sites des mutations, les deux sondes WT ayant une séquence complémentaires aux ces sites doivent être allumées.

Les ADNs amplifiés à partir des malades portent chacun une seule mutation confirmée par le séquençage direct. Lors de l'hybridation d'un produit de PCR issu d'une amplification d'ADN muté, les sondes complémentaires des deux allèles (WT et MT) doivent être allumées puisque toutes les mutations étudiées sont hétérozygotes. L'allèle muté s'hybride sur les sondes mutées MT et l'allèle non muté sur les sondes normales WT. Si le produit de PCR comporte deux sites de mutation, les sondes WT ayant une séquence complémentaire du deuxième site qui se trouve sur le même exon doivent être allumées également.

II - 1 - 2 - 2 - 2 - Première série

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 1 - Architecture de "*spotting*" et conditions de l'expérience

Le "*spotting*" des lames *Genescore* dans cette série a été réalisé avec une nouvelle architecture (figure 42). Chaque puce est constituée d'une matrice centrale repérable par des oligonucléotides marqués par le Cyanine 3. Ces oligonucléotides marqués ont été greffés pour servir de repère de position sur la puce et sont présents aux quatre coins et au centre de chaque matrice. Ce repère de position a été ajouté afin de valider le "*spotting*" et de faciliter la lecture des lames après hybridation. Chaque matrice comporte deux cadrans (sous unités, blocs de "*spots*"), un pour les sondes WT et l'autre pour les sondes MT. Dans chaque cadran, l'ensemble des 8 sondes WT ou MT est présenté en forme des colonnes où chaque "*spot*" est présenté en 5 répliques verticales identiques. Pour les sondes R220X, 3 versions différentes sont utilisées, indiquées par un numéro différent. La concentration des sondes "*hairpins*" spottées était à 20 μ M.

"Hairpins" Sauvages

"Hairpins" Mutantes

Cy3																		Cy3
S26	V95	R22/8	R22/12	Del 4	V113	T124	C42	W140		S26	V95	R22/8	R22/10	Del 3	V113	T124	C42	W140
S26	V95	R22/8	R22/12	Del 4	V113	T124	C42	W140		S26	V95	R22/8	R22/10	Del 3	V113	T124	C42	W140
S26	V95	R22/8	R22/12	Del 4	V113	T124	C42	W140	Cy3	S26	V95	R22/8	R22/10	Del 3	V113	T124	C42	W140
S26	V95	R22/8	R22/12	Del 4	V113	T124	C42	W140		S26	V95	R22/8	R22/10	Del 3	V113	T124	C42	W140
S26	V95	R22/8	R22/12	Del 4	V113	T124	C42	W140		S26	V95	R22/8	R22/10	Del 3	V113	T124	C42	W140
Cy3																		Cy3

(Les spots sont espacés de 400 µm)

Figure 42 : Architecture de "spotting" pour la première série

Les protocoles d'hybridations et de lavage ont été précédemment décrits (Page 90) soit pour le contrôle du "spotting" avec cibles synthétiques ou bien pour l'hybridation des produits de PCR.

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 2 - Hybridation des oligonucléotides de synthèse (validation du "spotting")

Un mélange des oligonucléotides de synthèse à 100 nM a été hybridé afin de valider le "spotting" avec les nouveaux designs des sondes "hairpins". Les oligonucléotides correspondant aux séquences sauvages étaient marqués au Cy3, ceux des séquences mutantes au Cy5 (figure 43). Un double scan (Cy3 + Cy5) a été effectué, et les valeurs d'intensité sont reportées dans la figure 44.

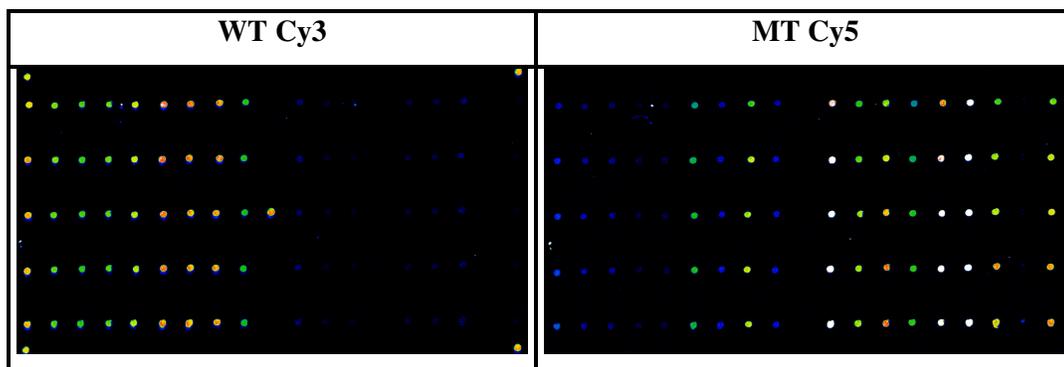


Figure 43 : hybridation de 100 nM d'oligonucléotides marqués au Cy3 ou Cy5 sur une biopuce "hairpins".

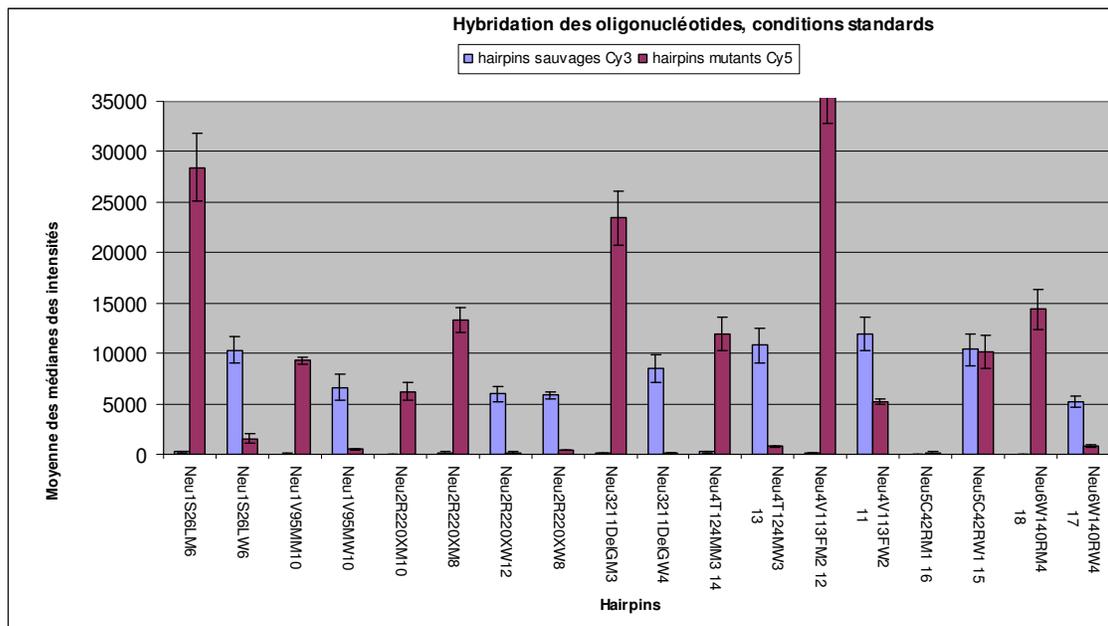


Figure 44 : Analyses quantitatives des puces "hairpin" après l'hybridation d'oligonucléotides (première série).

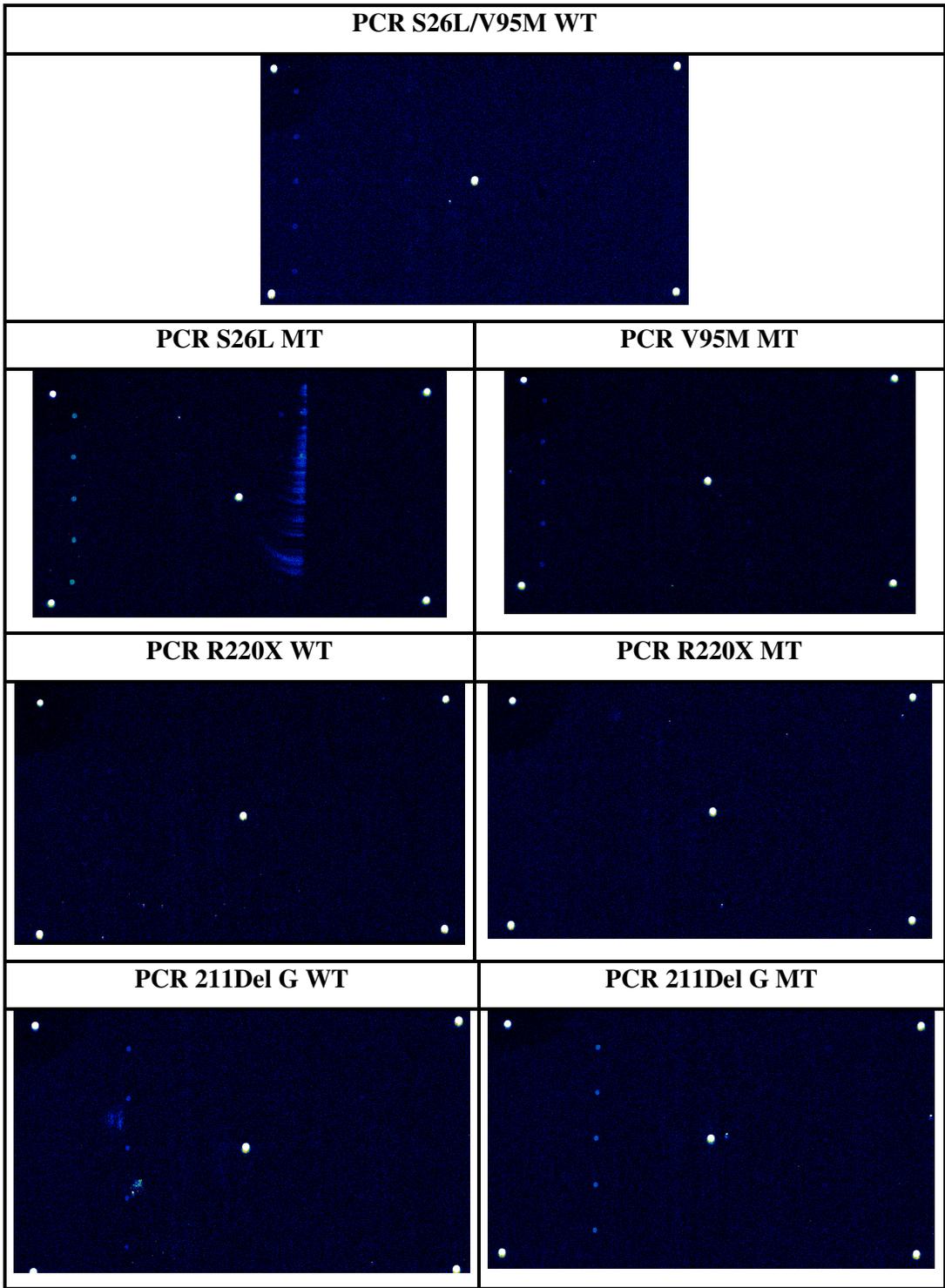
Après la lecture des lames et l'analyse quantitative des signaux, nous pouvons conclure que :

- L'ensemble des cibles s'hybride correctement sur les sondes qui leur sont parfaitement complémentaires. Les "spots" C42R MT mutants ne se sont pas allumés (erreur de "spotting"). Pour cela, les produits de PCR C42R WT et MT n'ont pas été testés.
- Peu de bruit de fond.
- Les taux de discrimination (WT/MT) sont compris entre 7 et 100 avec une moyenne autour de 30.

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 3 - Hybridation de produits de PCR issus d'ADNs amplifiés de sujets sains ou atteints par CMT

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 3 - 1 - Lecture des images

La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur "Scanarray Lite" :



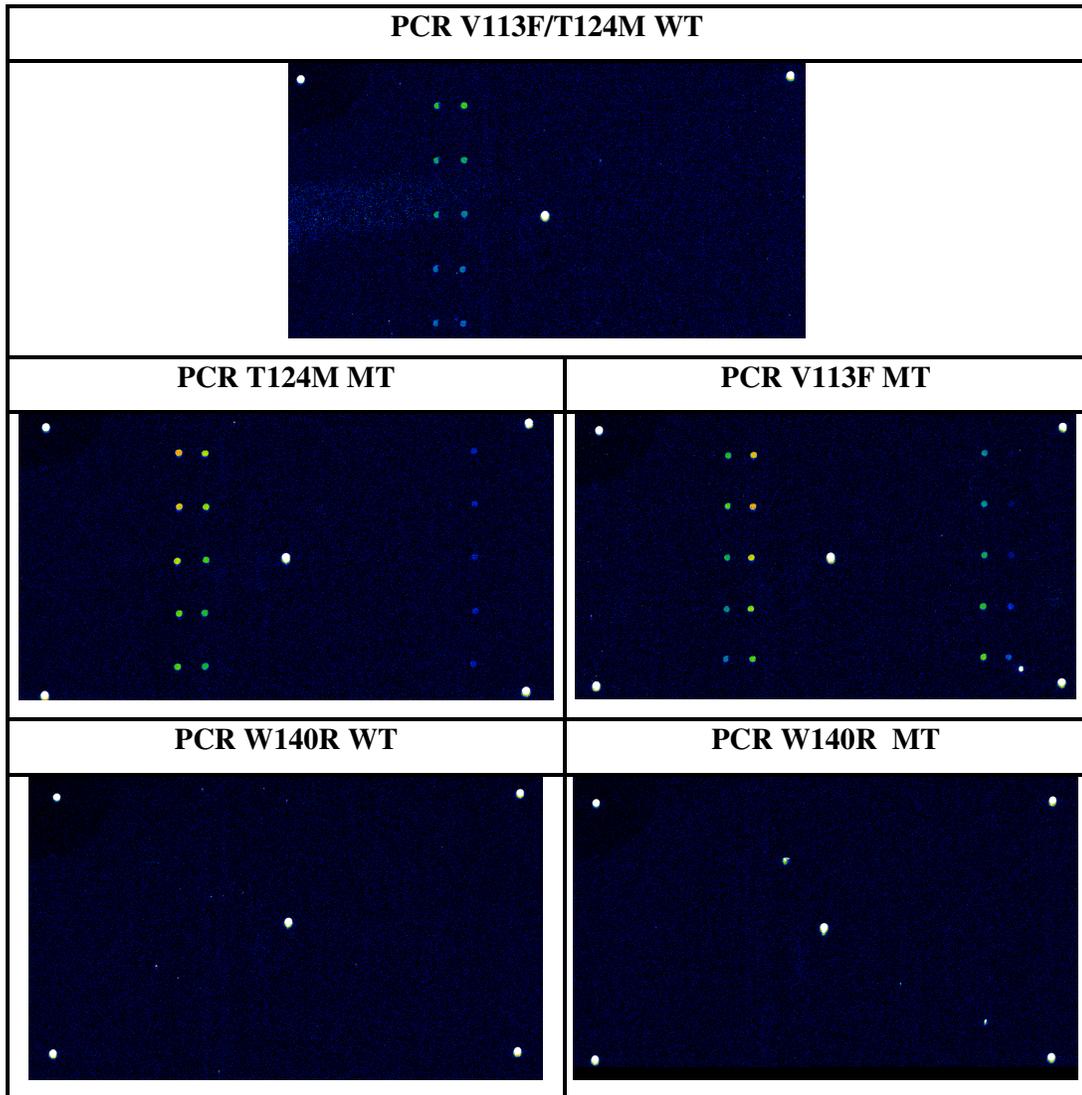
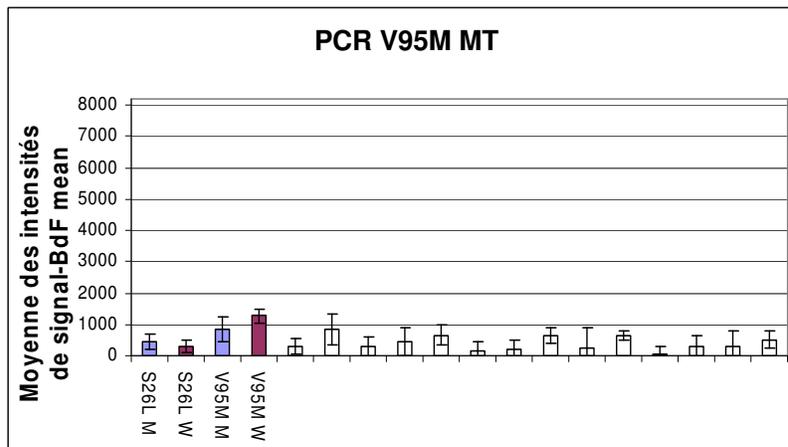
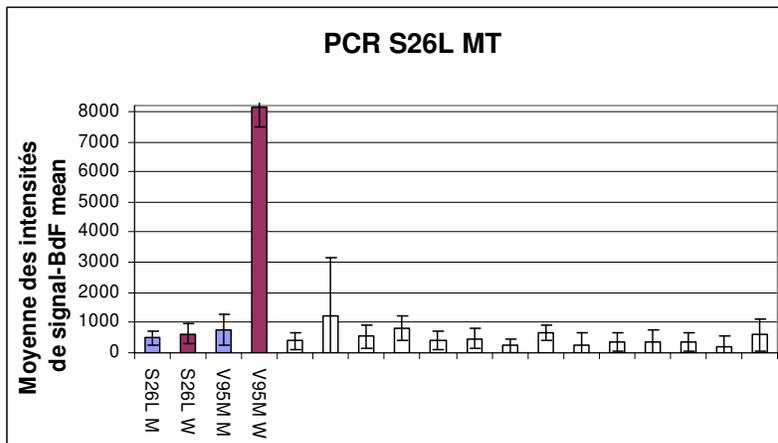
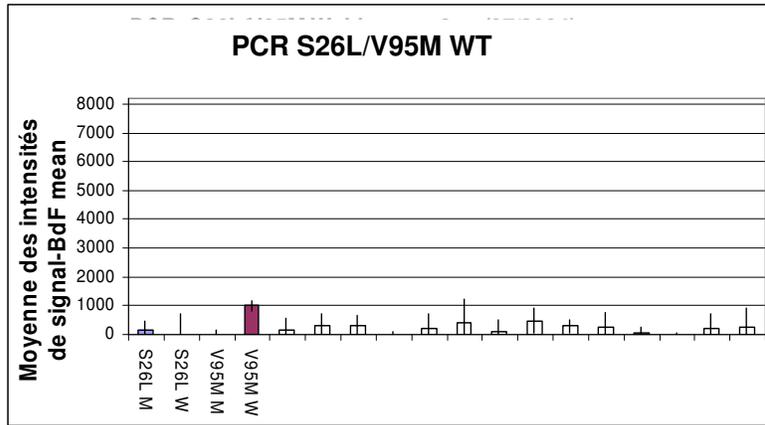
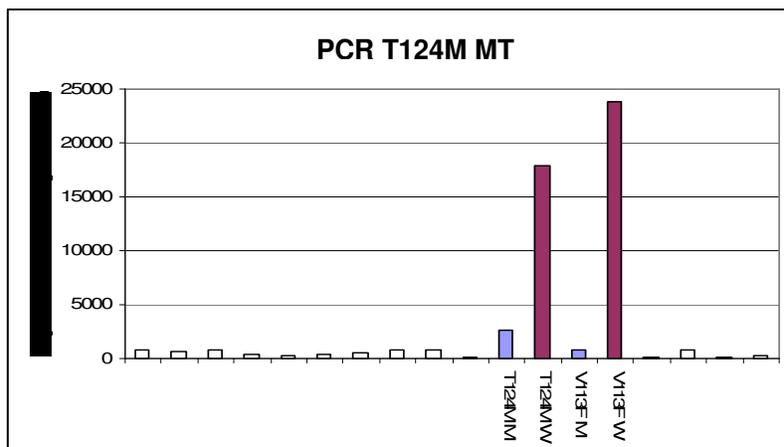
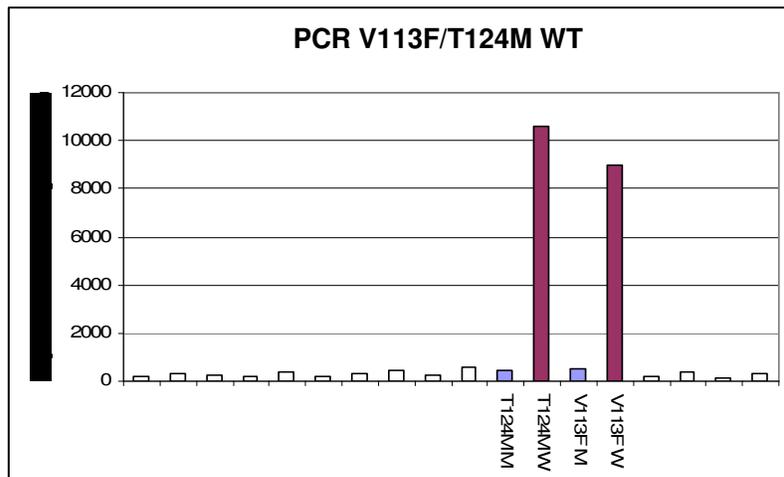
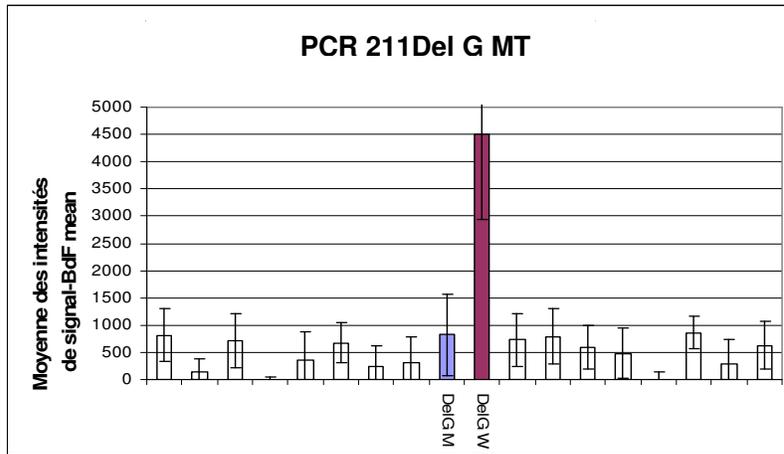


Figure 45 : Images des puces "hairpin" (première série)

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 3 - 2 - Analyses quantitatives des résultats d'hybridations des produits de PCR





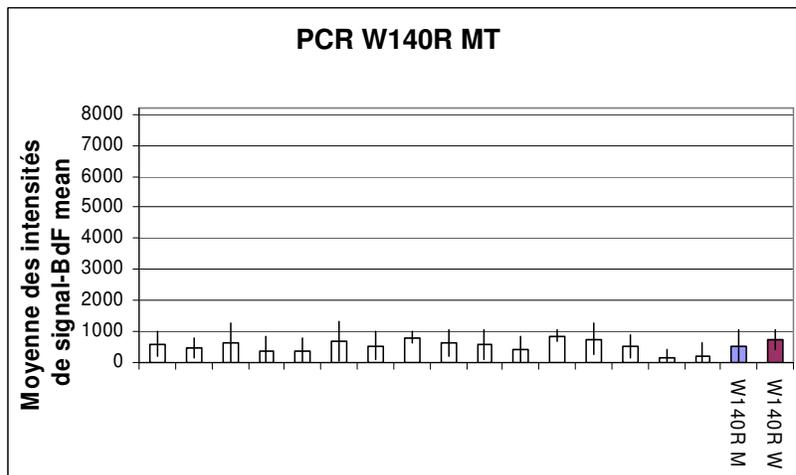
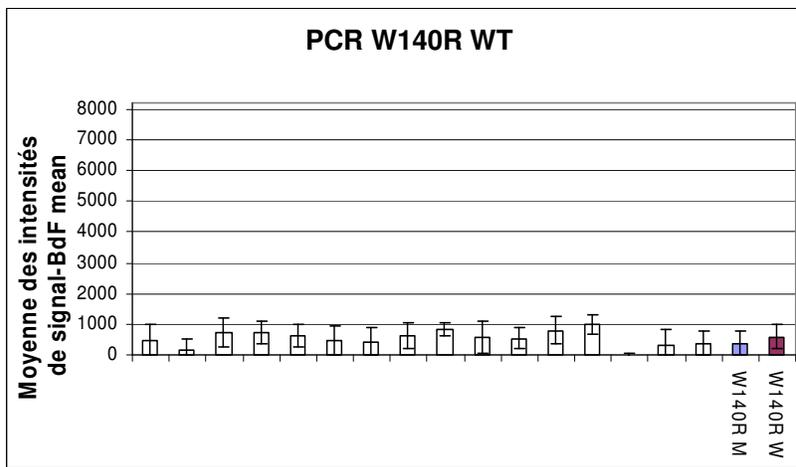
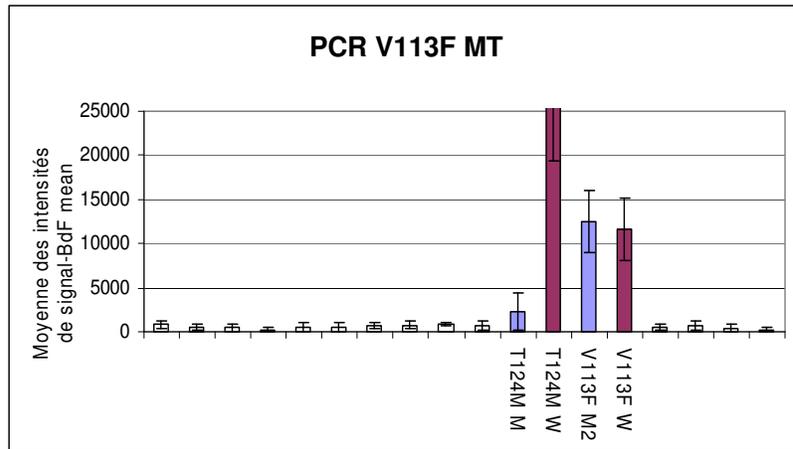


Figure 46 : Analyses quantitatives des signaux (première série) : Chaque valeur correspond à la moyenne des intensités moins la moyenne du bruit de fond sur 5 "spots" répliqués.

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 4 - Discussion et calcul de taux de discrimination

Les taux de discrimination n'ont pas été calculés que pour les couples des sondes allumés après scan (Tableau 7). Les "spots" détectés correspondent aux "hairpins" d'intérêt, c'est-à-dire aux produits de PCR hybridés pour les sondes T124M, V113F, WT et MT. Les taux de discrimination obtenus, pour les sondes sauvages WT et les sondes mutantes MT, pour les deux mutations T124M et V113F étaient très satisfaisants. Nous observons d'autre part que les taux pour les PCR mutants étaient voisins de 1 (cible hétérozygote) ; ce qui est normal. Les sondes T124M WT et V113F WT s'allument lors de l'hybridation des produits de PCR V113F MT ou T124M MT respectivement par ce que les sites de ces deux mutations se trouvent sur le même exon.

En ce qui concerne les mutations V95M et 211del G, les signaux détectés pour les sondes WT étaient faibles. En revanche, les sondes MT de ces deux mutations ne donnaient aucun signal. Les taux de discrimination calculés pour les sondes V95M et 211del G : WT lors de l'hybridation des PCR WT correspondant (cible homozygotes), apparaissent inférieurs à 5 ce qui est la limite que nous nous étions fixée arbitrairement. L'absence de signal des sondes MT lors du dépôt des produits de PCR MT ne permet pas de valider les sondes WT (même si les taux de discrimination étaient acceptables).

Nous n'avons pas détecté de signaux significatifs (signaux justes au dessus de la limite du bruit de fond) concernant les sondes S26L, R220X, et W140R ; WT et MT.

Sondes	Gène / exon	Ech. : Cible PCR	Génotype Echantillon	Génotype détecté	Taux de discrimination	Interprétation
T124M WT	<i>P0-Ex3</i>	T124M/V113F WT	WT/WT	WT/WT	22,96	+
T124M MT	<i>P0-Ex3</i>	T124M MT/V113F WT	WT/MT	WT/MT	0,15	+
V113F WT	<i>P0-Ex3</i>	V113F/ T124M WT	WT/WT	WT/WT	17,32	+
V113F MT	<i>P0-Ex3</i>	V113F MT/ T124M WT	WT/MT	WT/MT	1,07	+
V95M WT	<i>Cx 32-1</i>	V95M/S26L WT	WT/WT	-	4,1	-
211DelG WT	<i>P0-Ex2</i>	211DelG WT	WT/WT	-	1,62	-

Tableau 7 : Taux de discrimination des sondes "hairpins" (première série).

II - 1 - 2 - 2 - 2 - 5 - Conclusions

- Les résultats obtenus par hybridation de cibles synthétiques étaient homogènes et reproductibles en terme de génotype. Les taux de discrimination étaient encourageants.
- Les résultats d'hybridation de produits de PCR montrent que 4 mutations (V113F, V124M, V95M, 211del G). peuvent être maintenant analysées si une amélioration de la sensibilité est obtenue pour les sondes V95M, 211del G.
 - Les taux de discrimination pour les sondes V113F et V124M de première série étaient très satisfaisants.
 - Pour les mutations V95M et 211delG, les résultats suggèrent un problème de sonde mutante (une force sonde mutante/sonde sauvage incorrect), une erreur d'hybridation ou de "*spotting*".
 - En ce qui concerne les mutations S26L, R220X, et W140R, le signal est trop faible pour être interprété de façon fiable.
 - Afin d'éliminer une erreur de "*spotting*" ou d'hybridation pouvant expliquer les résultats négatifs, d'autres hybridations des produits de PCR seront faites. Les résultats obtenus ici ont besoin d'être confirmés par d'autres hybridations, que ce soit pour les résultats positifs ou pour les négatifs.

II - 1 - 2 - 2 - 3 - Deuxième série

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 1 - Architecture de "*spotting*" et conditions de l'expérience

Une nouvelle architecture de "*spotting*" des lames *Genescore* a été réalisée dans cette série (figure 47). Certains "*spots*" sont présentés dans un positionnement différent de celui trouvé dans les lames de la première série. De nouvelles sondes R220X WT et MT ont été spottées (nouveau design des sondes). La concentration des sondes "*hairpins*" spottées restait de 20 μ M.

Cy3	Sondes "hairpins" WT										Sondes "hairpins" MT									Cy3
S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		
S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		
S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140	Cy3	S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		
S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		
S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		S26	R22/8	R22/9	V113	T124	V95	Del 4	C42	W140		
Cy3																				Cy3

Figure 47 : Architecture de "spotting" pour la deuxième série

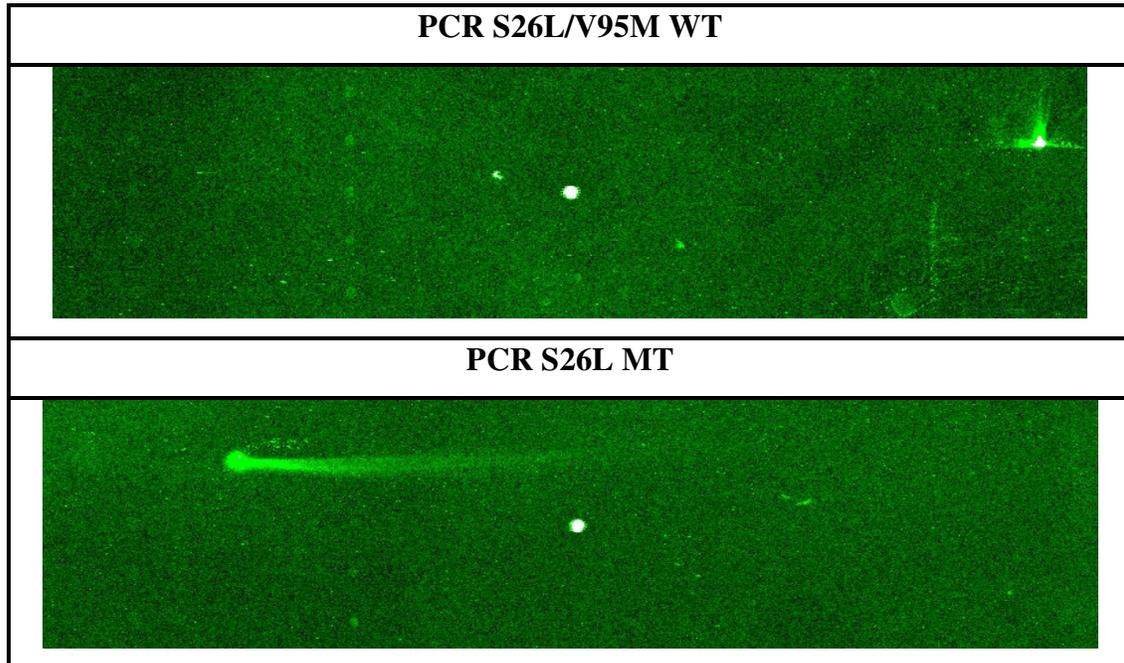
Les protocoles standards d'hybridations et de lavage ont été employés (Page 90).

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 2 - Hybridation de produits de PCR issus d'ADNs amplifiés de sujets sains ou atteints par CMT

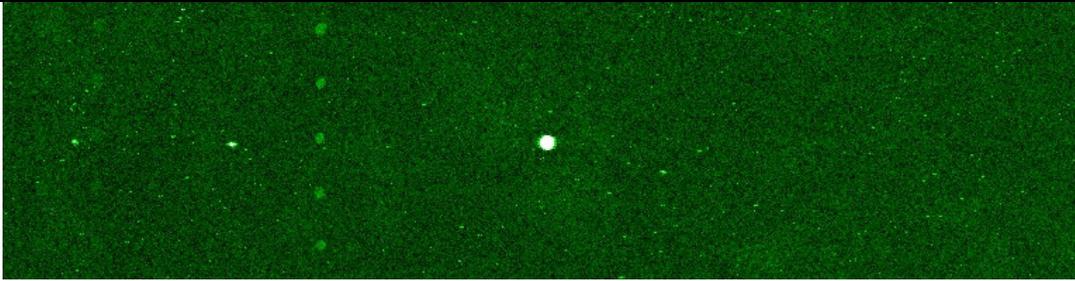
Au cours de cette série, tous les produits de PCR ont été testés. 2 µg de chaque type de produits de PCR a été hybridé par lame.

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 2 - 1 - Lecture des images

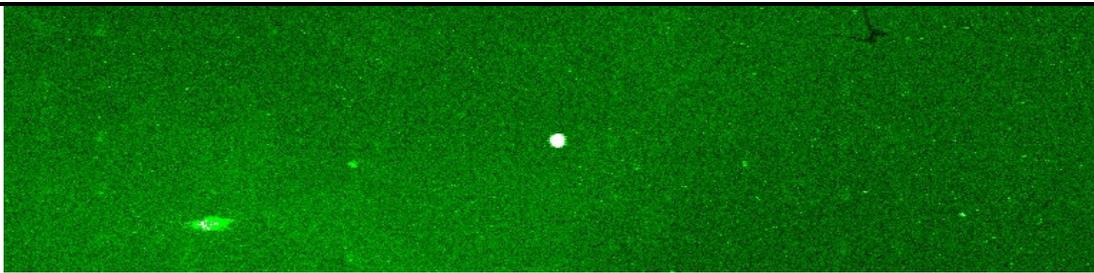
La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur "Genepix 4000" :



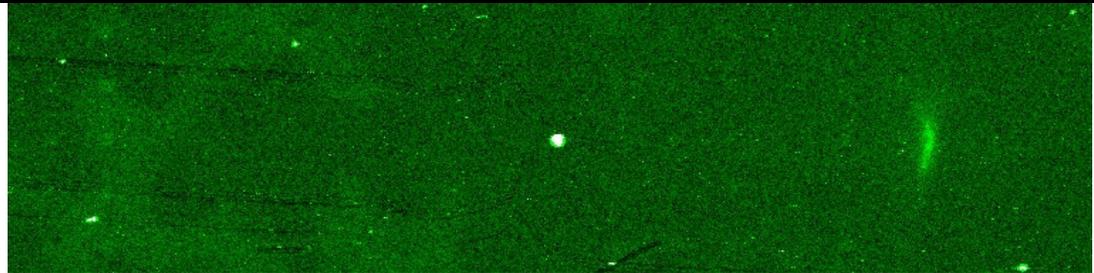
PCR V95M MT



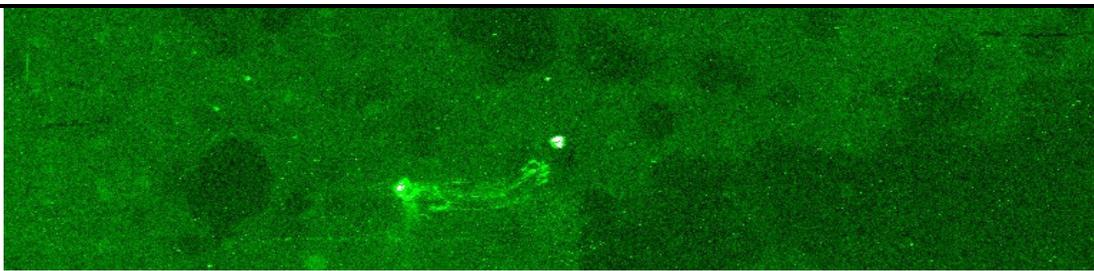
PCR R220X WT



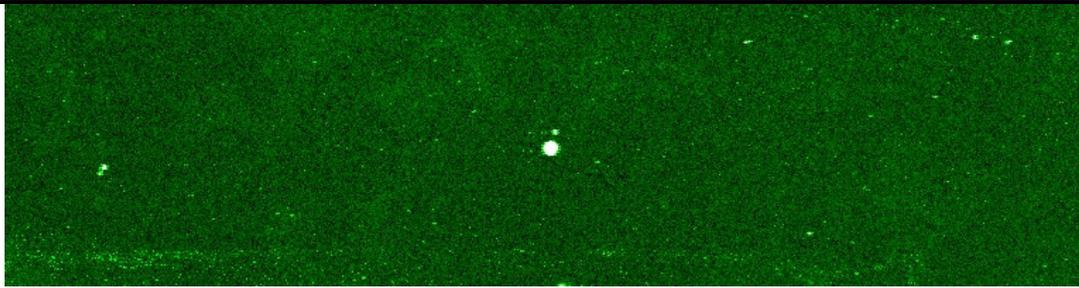
PCR R220X MT



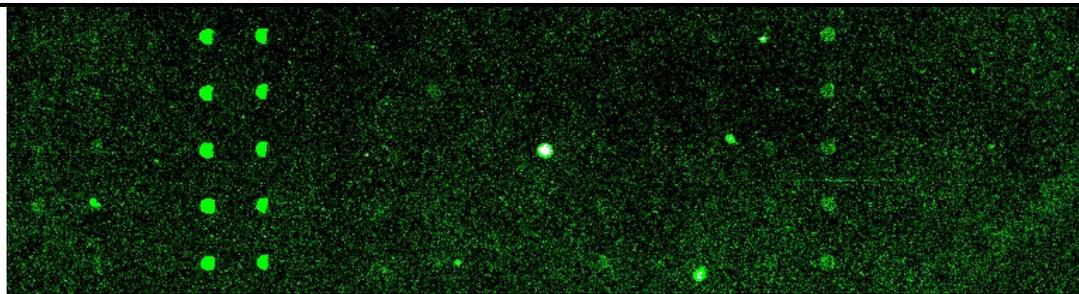
PCR 211Del G WT



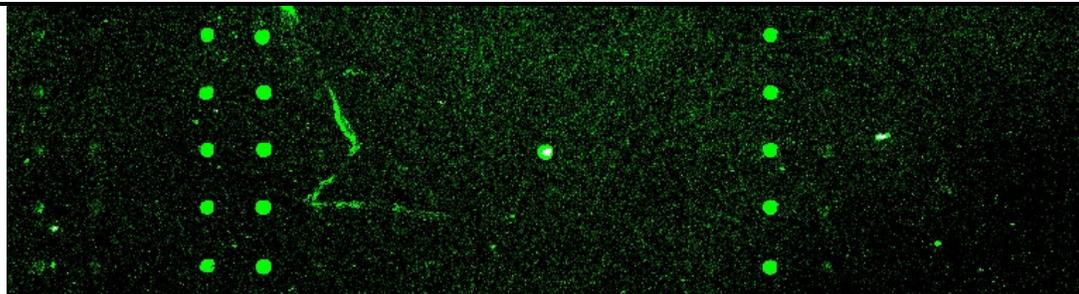
PCR 211Del G MT



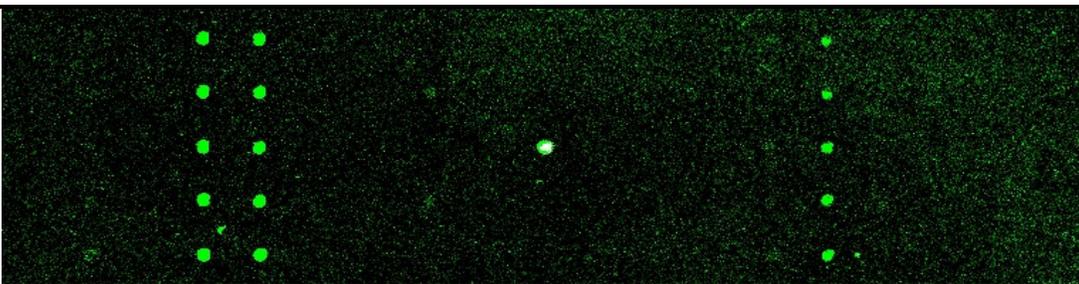
PCR V113F/T124M WT



PCR V113F MT



PCR T124M MT



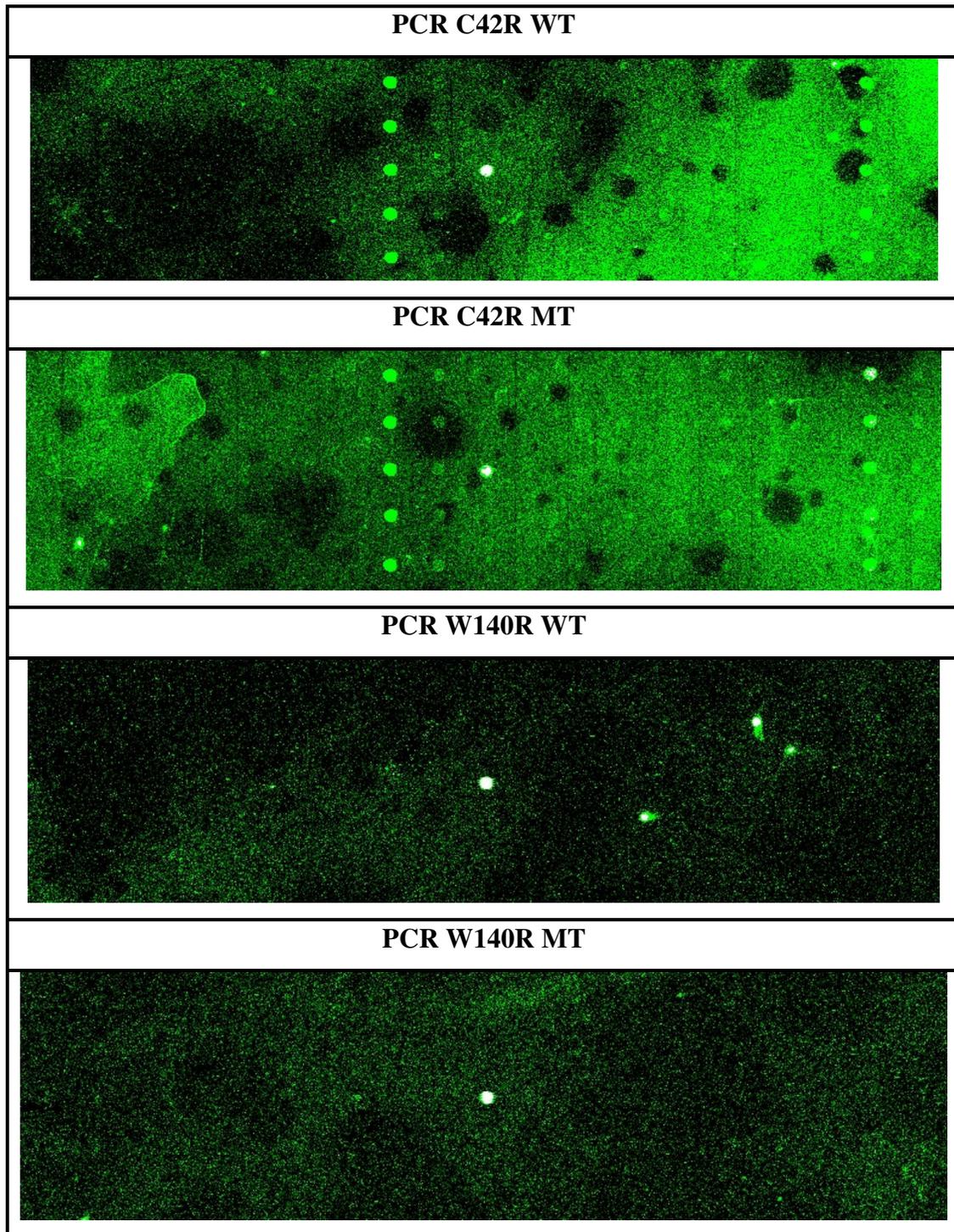
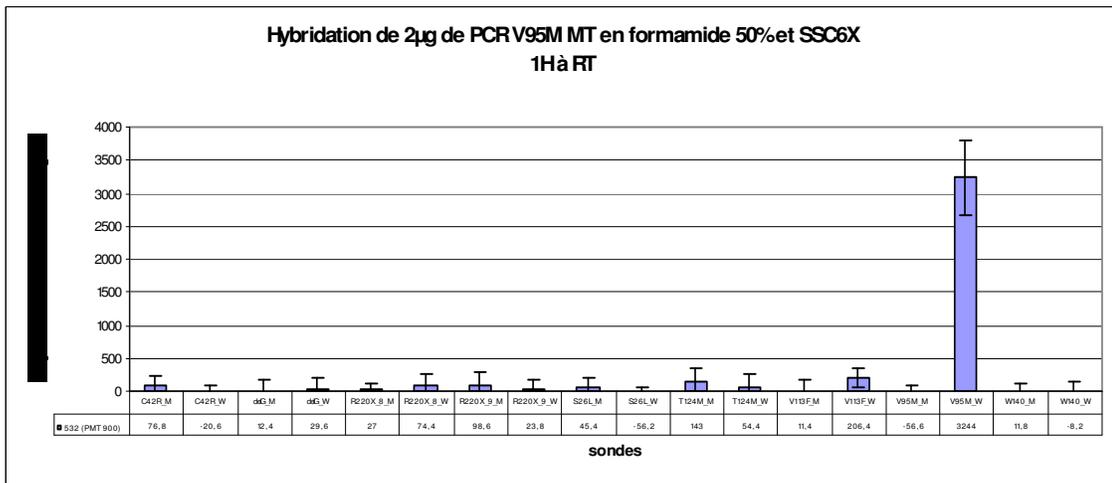
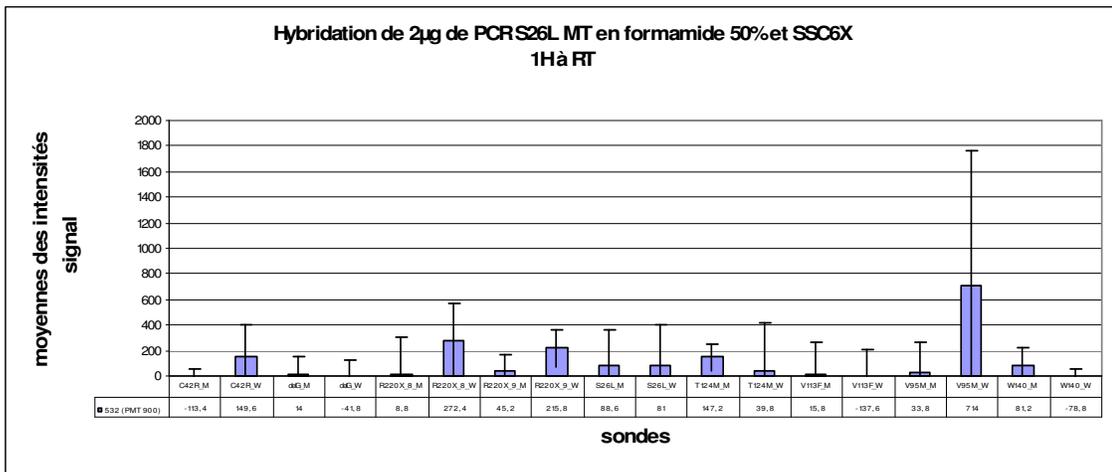
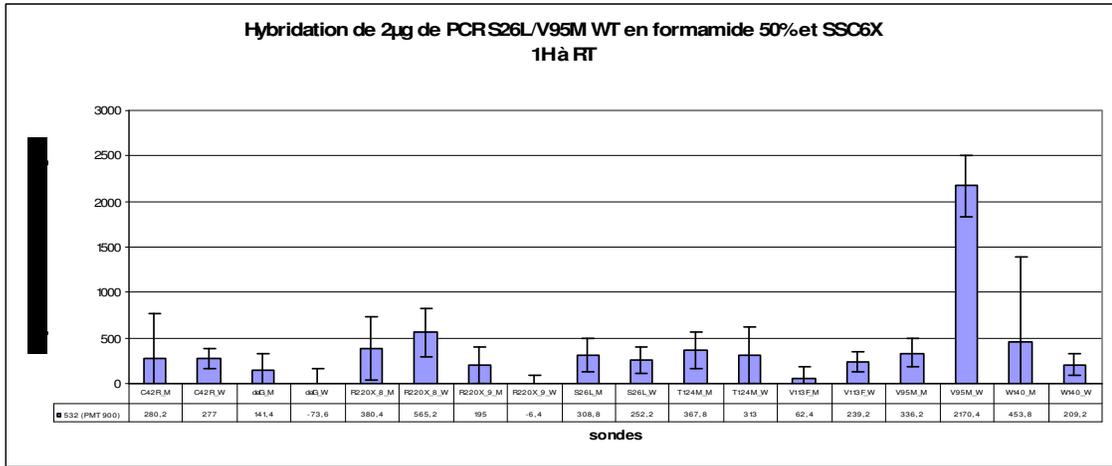
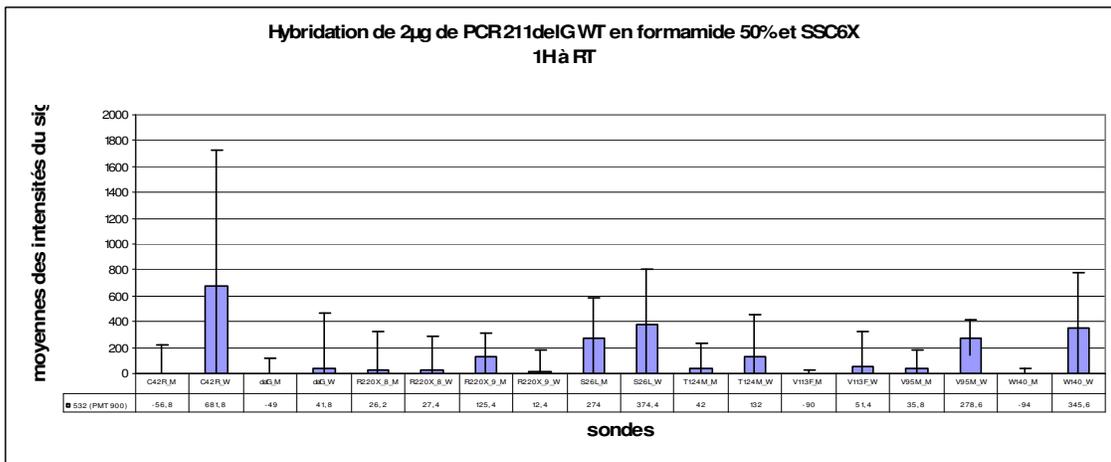
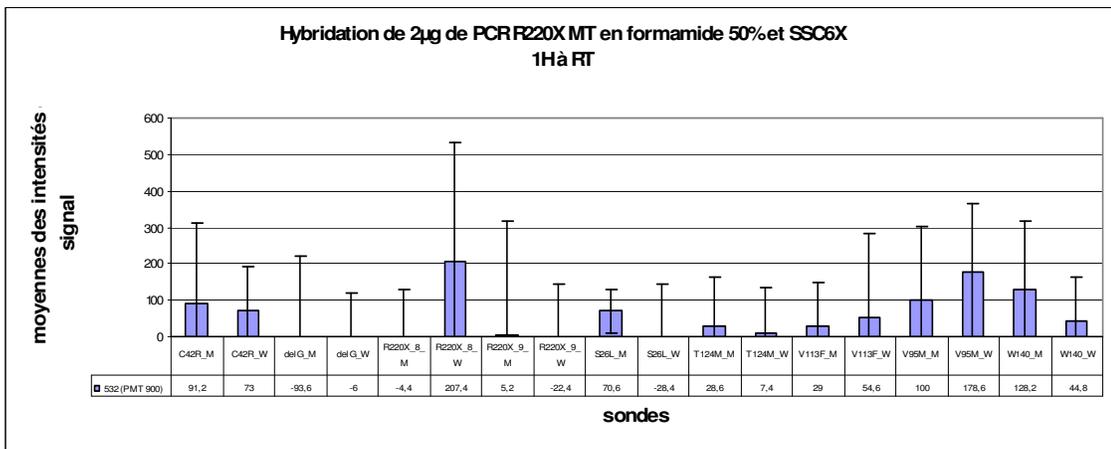
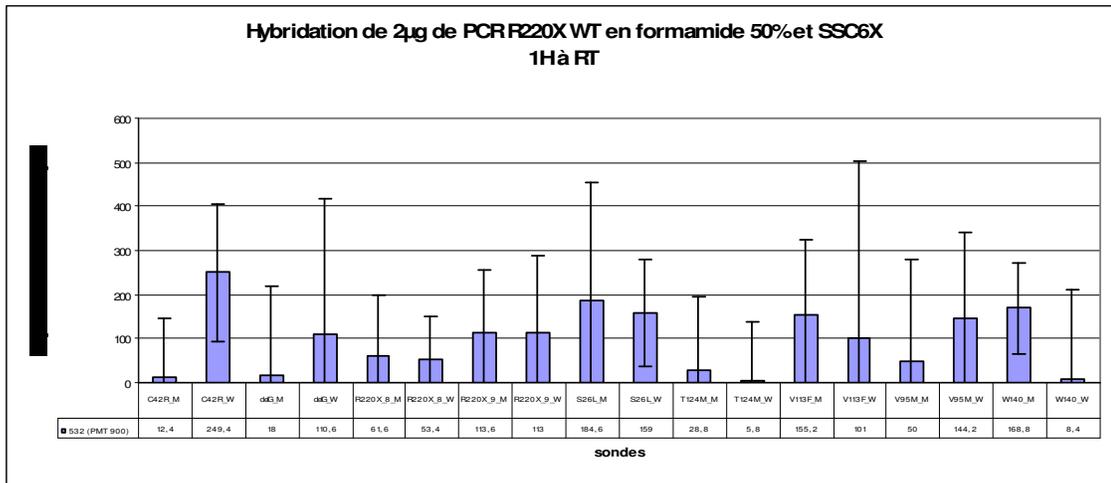
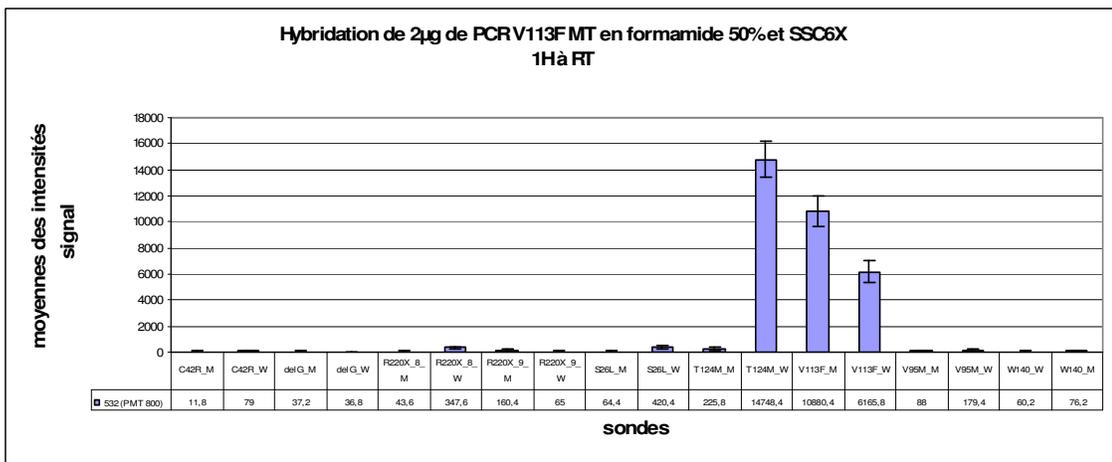
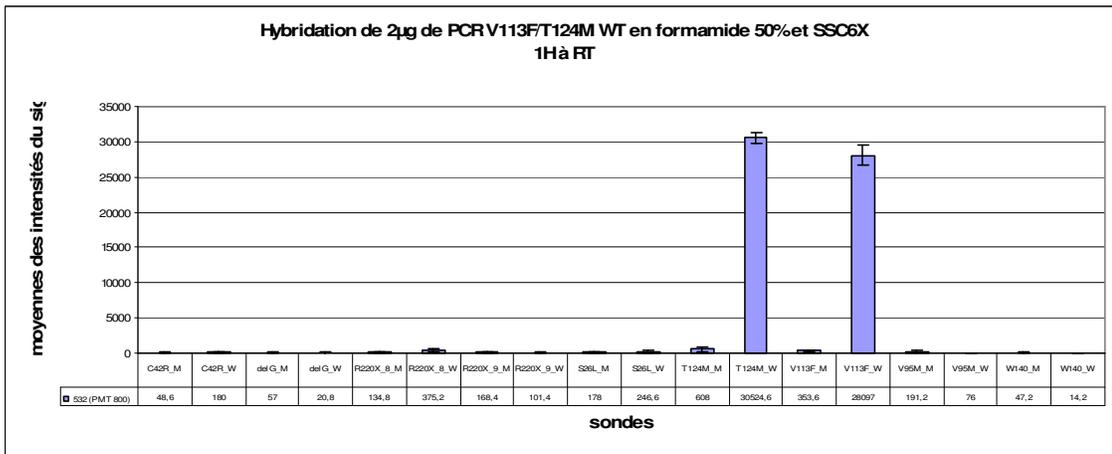
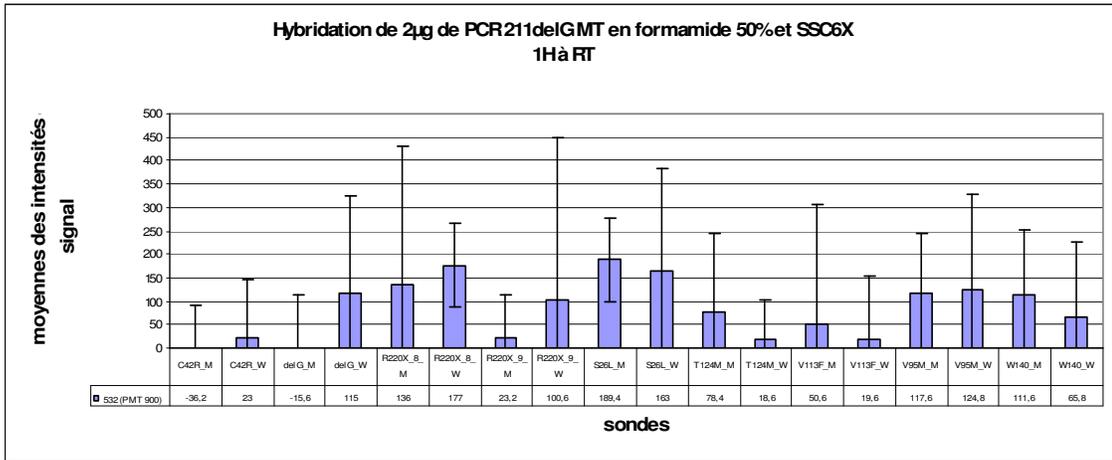


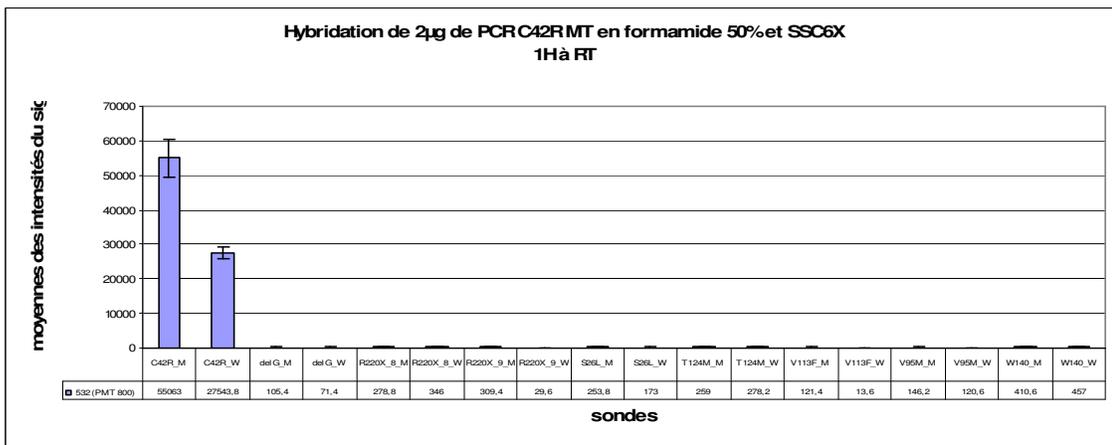
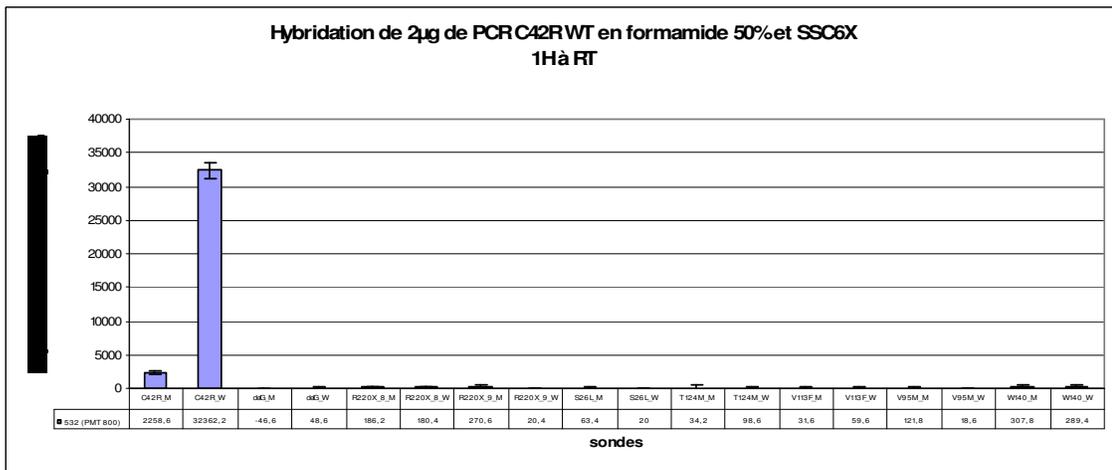
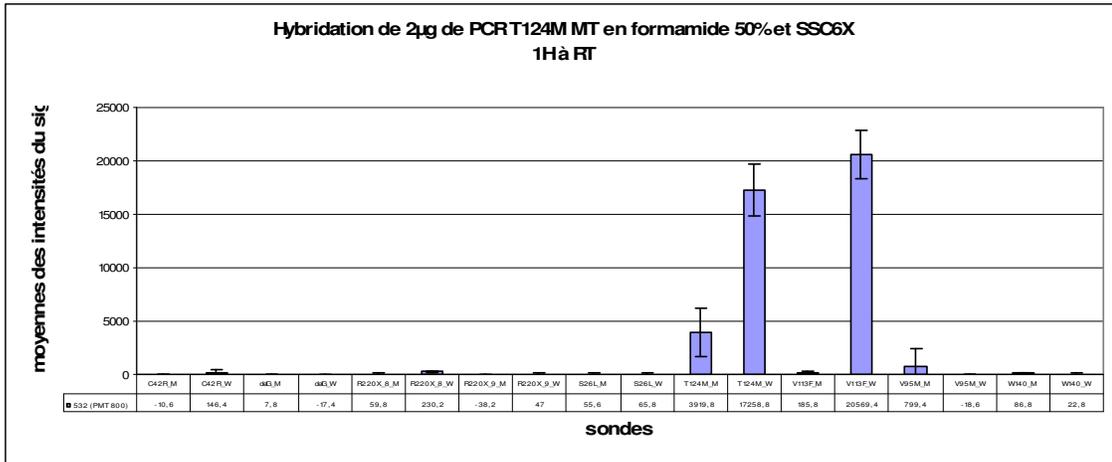
Figure 48 : Images des puces "hairpin" (deuxième série).

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 2 - 2 - Analyses quantitatives des résultats d'hybridations des produits de PCR









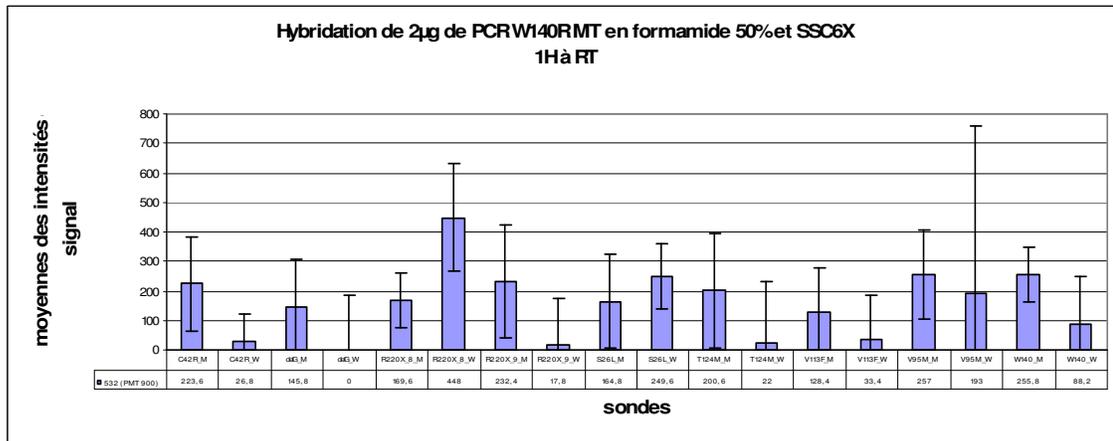
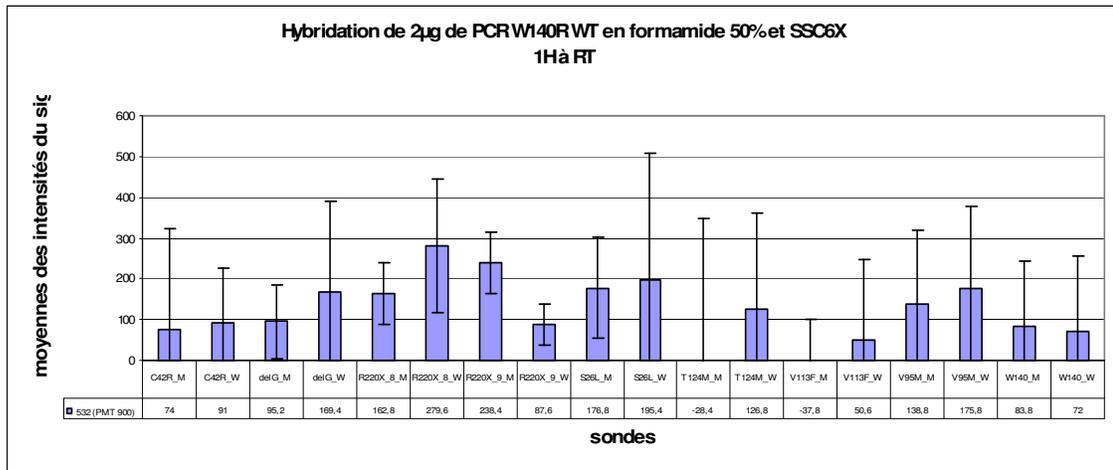


Figure 49 : Analyses quantitatives des signaux (deuxième série).

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 3 - Discussion et calcul de taux de discrimination

- Les résultats d'hybridation de produits de PCR montrent que pour 3 mutations (V113F, T124M, C42R), les sondes : V113F, T124M et C42R W ; WT et MT peuvent maintenant détecter leurs cibles de manière très spécifique. Ces sondes s'hybrident correctement avec leurs produits complémentaires. Les taux de discrimination pour ces trois mutations étaient très satisfaisants concernant les sondes WT et MT (Tableau 8).
- Les sondes V95M WT sont bien spécifiques de leur cible mais avec une faible fluorescence (confirmation des résultats de première série). D'autre part, les "spots" V95M MT ne donnent aucun signal. Le taux de discrimination des sondes V95M WT qui était égal à 6.45 (>5) est correct. Donc, nous pouvons valider ces sondes WT si la

sensibilité des sondes V95M MT est améliorée. Cette amélioration est indispensable pour la validation des sondes WT et MT.

- Nous n'avons pas détecté de signaux significatifs concernant les sondes S26L, R220X, W140R et 211del G : WT et MT. Sur presque toutes les lames hybridées, les "spots" R220X 9 WT donnent un faible signal non spécifique quelque soit le produit de PCR déposé. Donc elle capte les différents produits de PCR d'une manière non spécifique.

Sondes	Gène / exon	Ech. : Cible PCR	Génotype Echantillon	Génotype détecté	Taux de discrimination	Interprétation
T124M WT	P0-Ex3	T124M/V113F WT	WT/WT	WT/WT	50,2	+
T124M MT	P0-Ex3	T124M MT/V113F WT	WT/MT	WT/MT	0,23	+
V113F WT	P0-Ex3	V113F/T124M WT	WT/WT	WT/WT	79,45	+
V113F MT	P0-Ex3	V113F MT/ T124M WT	WT/MT	WT/MT	1,76	+
C42R WT	PMP22-Ex3	C42R WT	WT/WT	WT/WT	14,3	+
C42R MT	PMP22-Ex3	C42R MT	WT/MT	WT/MT	1,99	+
V95M WT	Cx 32-1	V95M/S26L WT	WT/WT	-	6,45	-

Tableau 8 : Taux de discrimination des sondes "hairpins" (deuxième série).

II - 1 - 2 - 2 - 3 - 4 - Conclusion

- Les taux de discrimination pour 3 mutations (V113F, T124M, C42R) de deuxième série étaient très satisfaisants. Nous pouvons parler d'une validation de leurs six sondes WT et MT.
- En ce qui concerne la mutation V95M, nous pouvons considérer le design des sondes V95M WT comme correct bien que le signal de ces sondes soit faible. D'autre part, les sondes V95M MT doivent être re-dessiner, car nous n'avons obtenu aucun signal pour ces sondes quand nous avons déposé un échantillon d'un patient porte la mutation V95M.
- Pour quatre mutations (S26L, DelG, R220X, W140R), le signal est trop faible pour être interprété de façon fiable. Les sondes R220X 9 WT qui ont donné des signaux non-spécifiques sont à éliminer ou modifier.
- Certaines sondes doivent être réétudier ou re-dessiner afin d'améliorer leurs spécificité.

II - 1 - 2 - 2 - 4 - Troisième série

Au vu des résultats obtenus lors des deux séries d'expérience précédentes, nous avons voulu optimiser l'hybridation en employant des produits de PCR plus courts. Donc, nous avons conçu des nouveaux jeux d'amorces afin de réduire la taille de produits de PCR hybridés. Cela nous a permis de juger le design des "hairpins" testés. En effet, nous pensions qu'un produit de PCR d'une plus petite taille puisse trouver plus facilement sa cible "hairpin" dans la solution (mix) d'hybridation. En plus, nous pouvons ainsi diminuer le risque maximum de la formation des structures secondaires. Donc, nous avons conçu trois jeux d'amorces pour amplifier des séquences qui entourent les sites des mutations : R220X, 211 delG et W140R qui sont localisés sur la deuxième partie de l'exon 2 codant du gène *GJBI* (*Cx32*), sur l'exon 2 du gène *MPZ* (*P0*), et sur l'exon 5 du gène *PMP22* successivement. Les séquences de ces amorces sont indiquées dans tableau 9.

Gène	Exon	Mutation	Séquences utilisées	5' --> 3' séquences	Longueur de pds PCR (bp)
<i>GJBI</i> (<i>Cx32</i>)	Exon-2	R220X	Amorce sens	CTTCATGCTAGCTGCCTCTG	181
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	CAGCAGCTTGTTGATCTCATTC	
<i>MPZ</i> (<i>P0</i>)	Exon-2	211DelG	Amorce sens	CGTGGTTACACCGACAGG	152
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	CACTCACCGAAATGGCATC	
<i>PMP22</i>	Exon-5	W140R	Amorce sens	GTCTGTGCGTGATGAGTGCT	158
			Amorce anti-sens (Cy3 en 5')	GCGTTTCCGAAGATCAC	

Tableau 9 : Séquences des nouveaux jeux d'amorces.

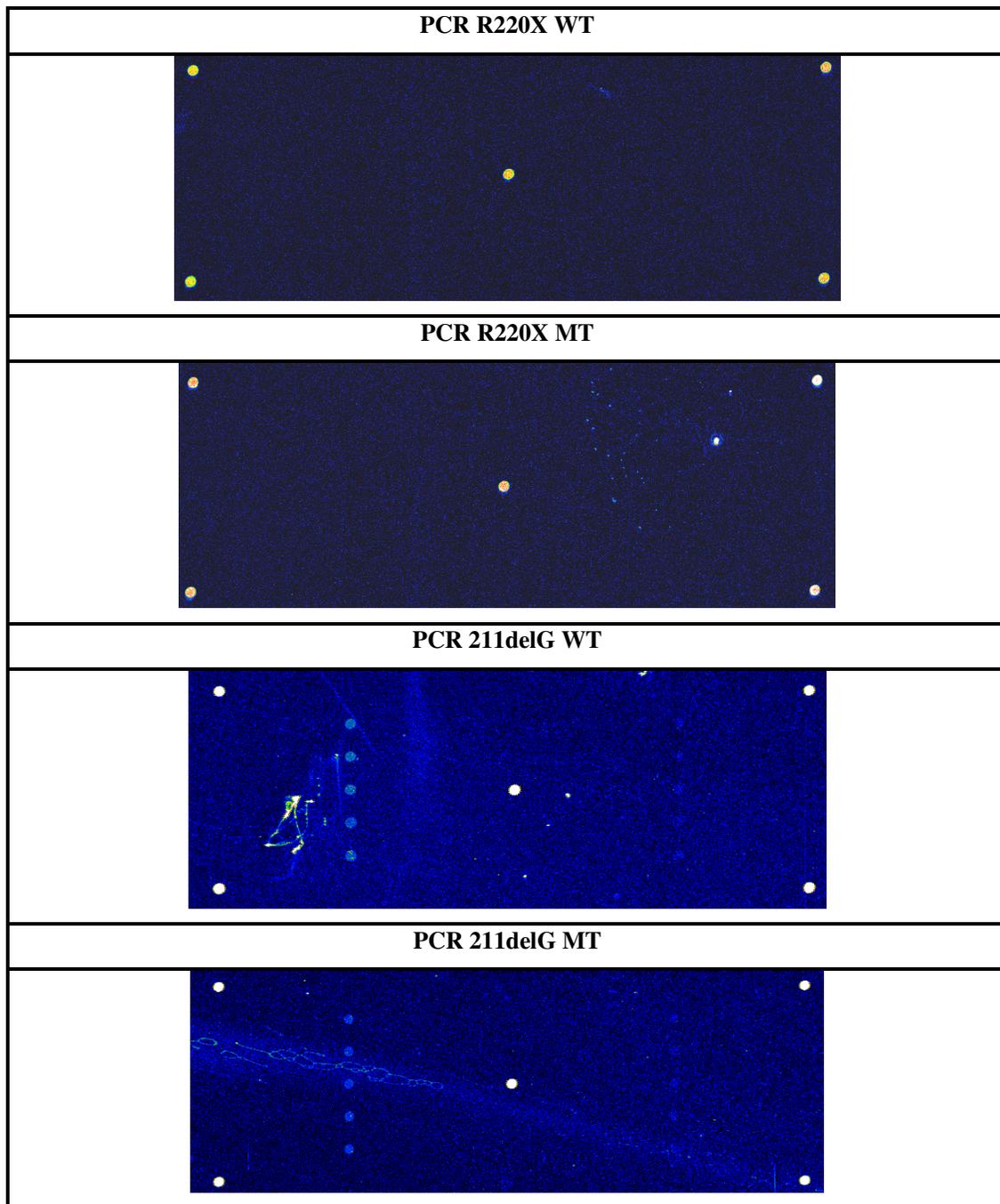
II - 1 - 2 - 2 - 4 - 1 - Architecture de "spotting" et conditions de l'expérience

Nous avons hybridé les produits de PCR dans cette série d'expérience sur des lames *Genescore* employées dans la première série. Nous avons choisi ces lames par ce que aucun des "spots" testés dans cette série a donné des signaux non-spécifiques (comme pour les "spots" R220X 9 WT dans la deuxième série). Le schéma de "spotting" de ces lames est indiqué dans la figure 42. Les protocoles d'hybridation et de lavage ont été précédemment décrits (Page 90). Hybridation d'un produit de PCR a été réalisée par puce, à raison de 2 µg d'échantillon.

II - 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - Hybridation de produits de PCR issus d'ADNs amplifiés de sujets sains ou atteints par CMT

II - 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - 1 - Lecture des images

La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur "Genepix 1000" :



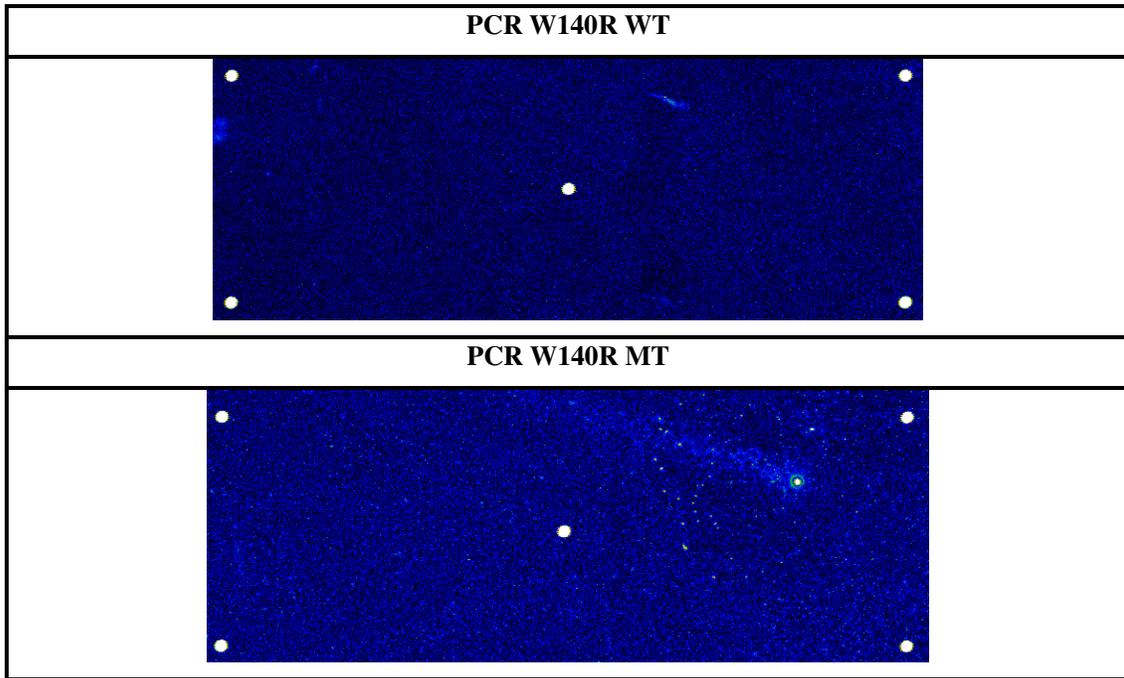
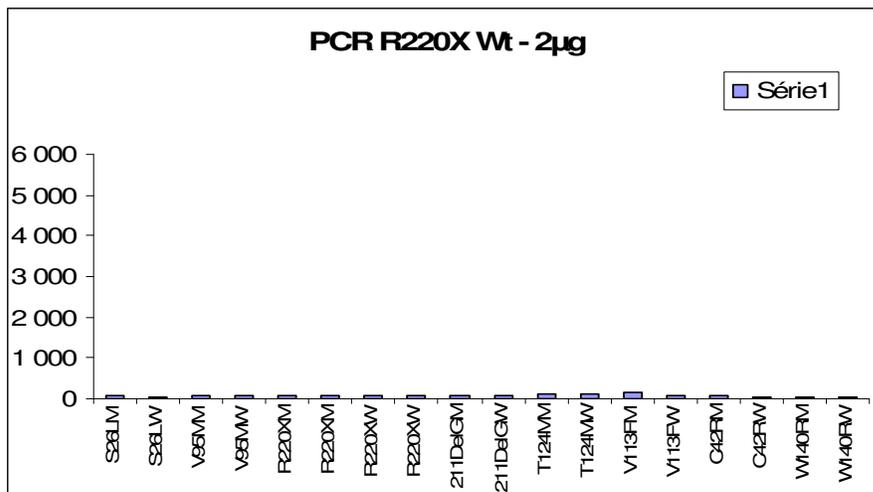
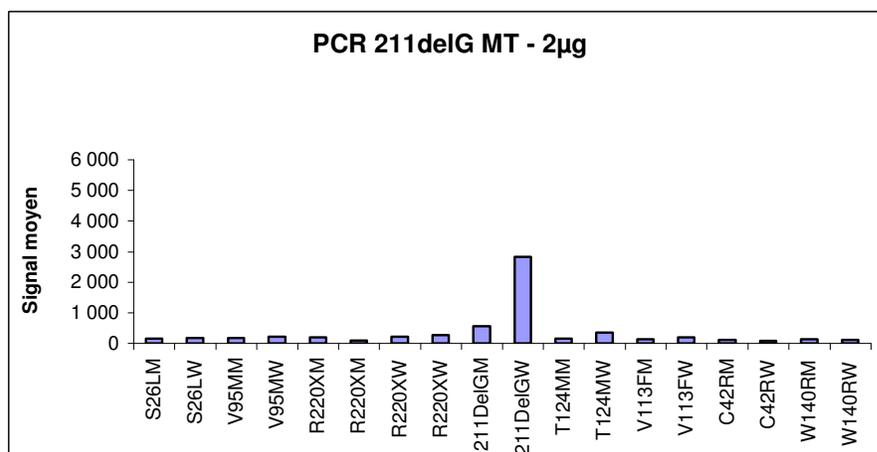
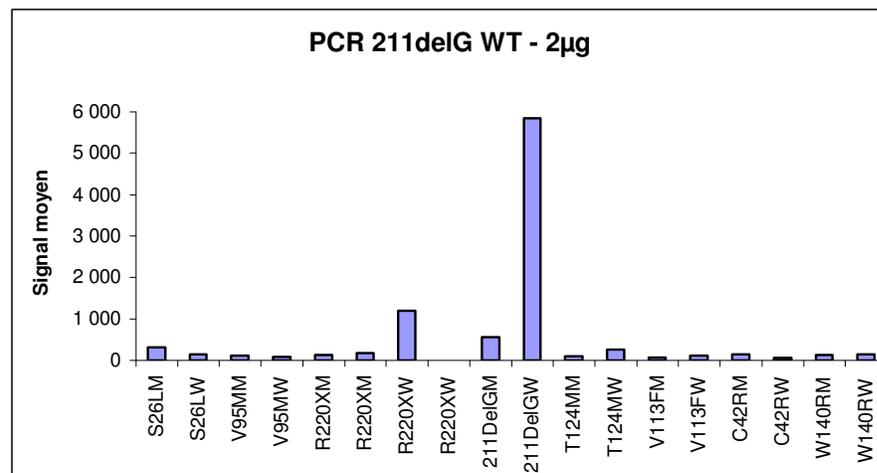
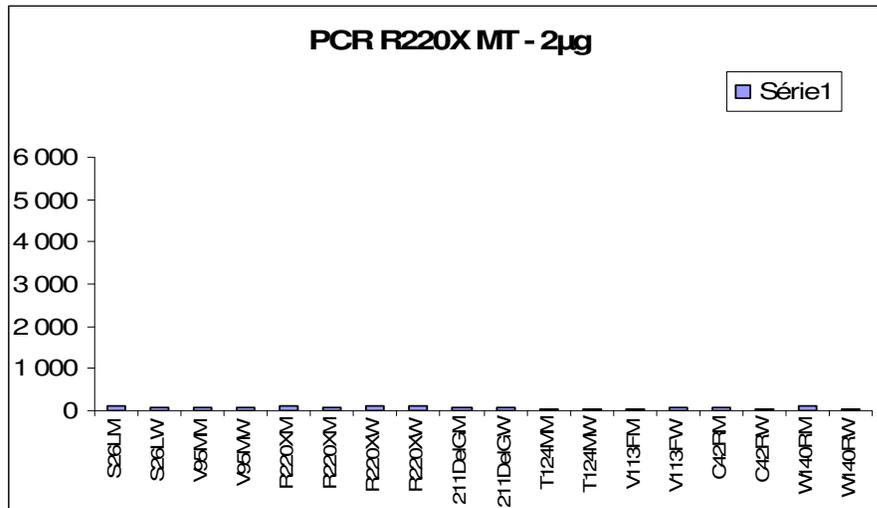


Figure 50 : Images des puces "hairpin" (troisième série).

II - 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - 2 - Analyses quantitatives des résultats d'hybridations des produits de PCR





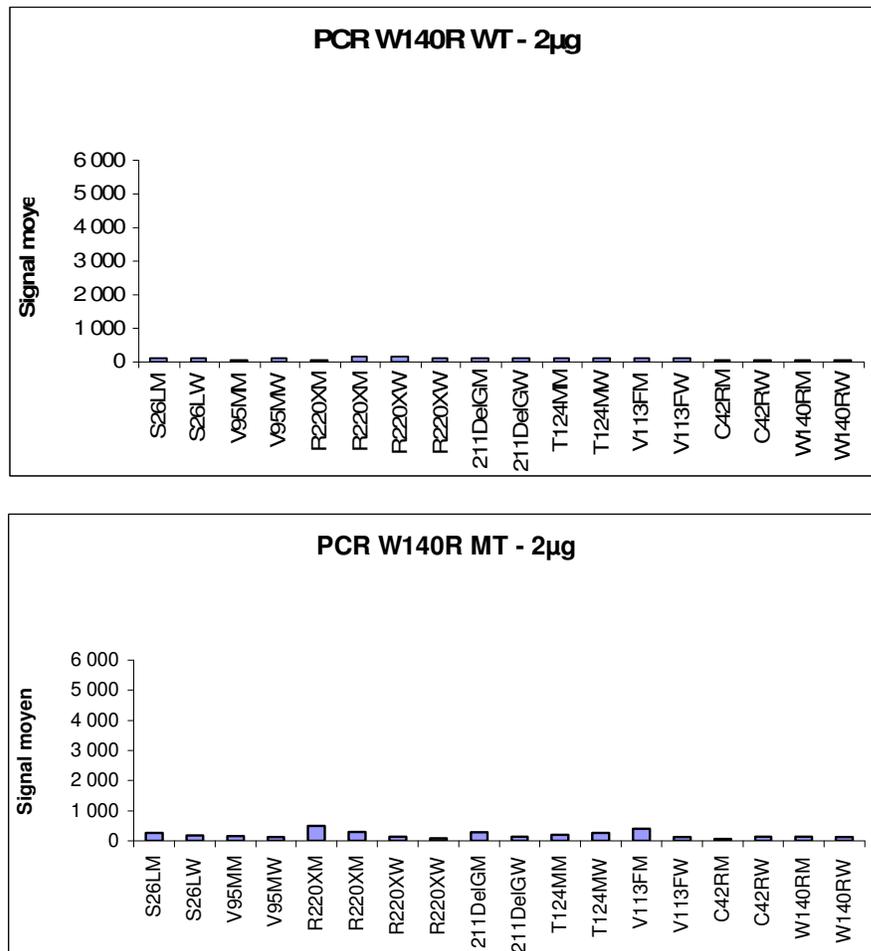


Figure 51 : Analyses quantitatives des signaux (troisième série).

II - 1 - 2 - 2 - 4 - 3 - Discussion

- Aucun signal significatif n'a été détecté concernant les sondes R220X et W140R ; WT et MT (signaux à la limite de bruit de fond).
- Lors de l'hybridation de produit de PCR 211del G WT, il s'hybride bien sur son "hairpin" correspondante, mais on détecte en plus la "hairpin" mutante qui ne devrait pas s'allumer.
- Lors de l'hybridation de produit de PCR 211del G MT, nous avons détecté une légère hybridation sur la "hairpin" 211del G WT sauvage mais la "hairpin" 211del G MT

mutante qui devrait être aussi intense se situe juste au dessus de la limite du bruit de fond.

- En effet, nous avons détecté les sondes sauvages WT et les sondes mutantes MT lors de l'hybridation des PCR 211del G WT ou MT. Le même profil d'hybridation a été obtenu dans les deux cas.

II - 1 - 2 - 2 - 4 - 4 - Conclusion

D'après les graphes nous avons obtenu des résultats équivalents aux résultats obtenus avec les tests PCR précédents, c'est-à-dire pas de signal pour les sondes R220X ni pour les sondes W140R, et un faible signal pour les sondes 211del G WT. L'unique différence était la taille des produits de PCR. Le seul nouveau point est la détection de signal sur les sondes 211del G MT, mais celui-ci est obtenu pour l'hybridation de PCR sauvage WT et du mutant MT ce qui traduit une non spécificité.

En conclusion, l'hybridation des produits de PCR plus courts n'a pas apporté une amélioration de la spécificité. Nous avons mis donc les designs des "*hairpins*" en cause. Les sondes R220X, W140R, et 211del G ; WT et MT doivent être réétudiés pour améliorer le design des "*hairpins*" correspondantes.

II - 1 - 2 - 2 - 5 - Quatrième série

Un dernier essai a été réalisée à Limoges en employant le lecteur "Imstar OSA Reader" réputé avoir une meilleure sensibilité pour scanner les lames. Le but de cette étape était de confirmer les résultats déjà obtenus et recalculer les taux de discrimination et confirmer ensuite une validation finale des certaines sondes. Cette étape concernait surtout les sondes préalablement détectées à *Genescore* ou à *Serial Genetics*. En même temps, nous avons essayé de vérifier la possibilité de détecter des nouvelles sondes.

II - 1 - 2 - 2 - 5 - 1 - Architecture de "spotting" et conditions de l'expérience

Les lames utilisées dans cette série d'expérience ont été commandées chez *Serial Genetics*. Le "spotting" de ces lames a été réalisé avec une nouvelle architecture (figure 52) selon laquelle on a :

- Quatre cadrans par matrice.
- Dans les deux cadrans de gauche (1+3), l'ensemble des 8 sondes WT est présent où chaque "spot" est présenté en 5 répliques verticales identiques.
- Dans les deux cadrans de droite (2+4), l'ensemble des 8 sondes MT est présent où chaque "spot" est présenté en 5 répliques verticales identiques.

L'espace intra "spot" est de 375 µm et celui inter cadrans de 9 mm. Chaque matrice est repérable par des oligonucléotides marqués en Cyanine 3. Ces oligonucléotides marqués ont été greffés comme un repère de position sur la puce. Ils sont présentés en forme d'une colonne de cinq "spots" au coté droite du cadran la (sous-unité ; bloc de "spots") inférieure droite. Nouvel design des sondes R220X WT, 211del G, et S26L ; WT et MT aussi bien que les sondes V95M MT a été spotté. La concentration des sondes "hairpins" spottées était à 20 µM.

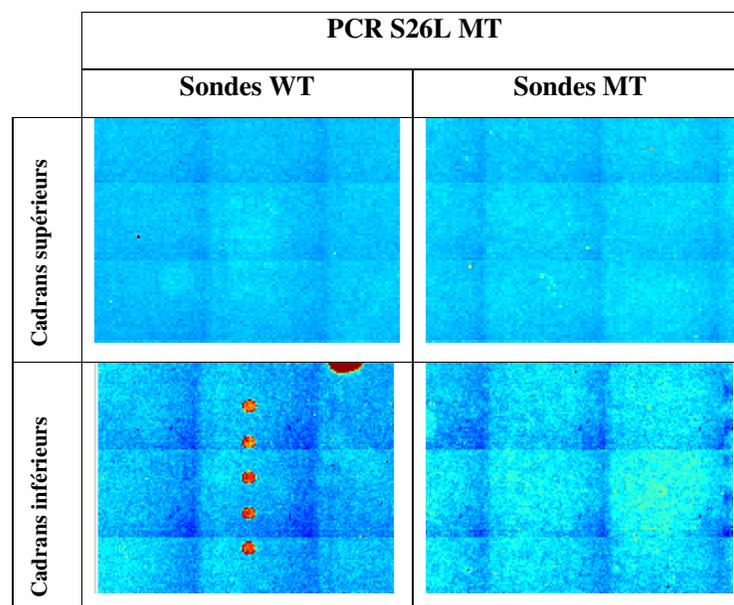
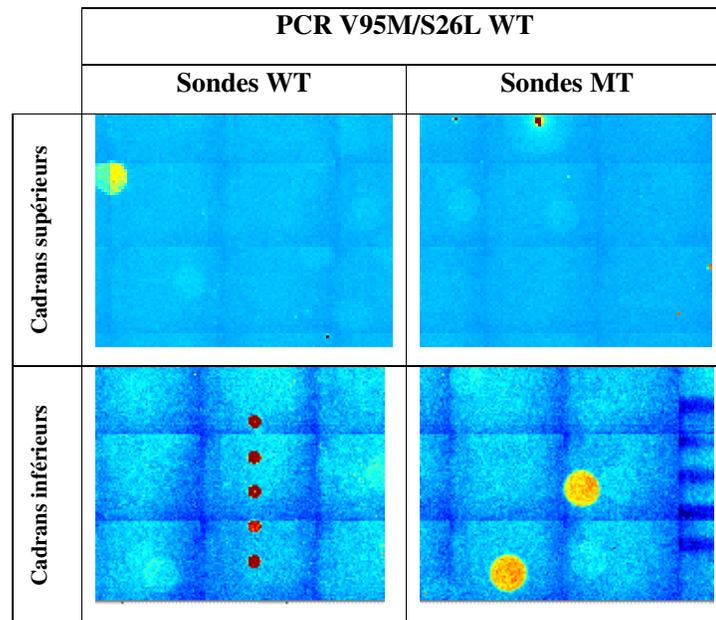
1	-	C42R_W	W140R_W	V113F_W	T124M_W	
	-	C42R_W	W140R_W	V113F_W	T124M_W	
	-	C42R_W	W140R_W	V113F_W	T124M_W	
	-	C42R_W	W140R_W	V113F_W	T124M_W	
	-	C42R_W	W140R_W	V113F_W	T124M_W	
2	-	C42R_M	W140R_M	V113F_M	T124M_M	
	-	C42R_M	W140R_M	V113F_M	T124M_M	
	-	C42R_M	W140R_M	V113F_M	T124M_M	
	-	C42R_M	W140R_M	V113F_M	T124M_M	
	-	C42R_M	W140R_M	V113F_M	T124M_M	
3	S26L_W1	V95M_W	R220K_W	211delG_W1	-	
	S26L_W1	V95M_W	R220K_W	211delG_W1	-	
	S26L_W1	V95M_W	R220K_W	211delG_W1	-	
	S26L_W1	V95M_W	R220K_W	211delG_W1	-	
	S26L_W1	V95M_W	R220K_W	211delG_W1	-	
4	S26L_M1	V95M_M	R220K_M1	211delG_M1	marqueur Cy3	
	S26L_M1	V95M_M	R220K_M1	211delG_M1	marqueur Cy3	
	S26L_M1	V95M_M	R220K_M1	211delG_M1	marqueur Cy3	
	S26L_M1	V95M_M	R220K_M1	211delG_M1	marqueur Cy3	
	S26L_M1	V95M_M	R220K_M1	211delG_M1	marqueur Cy3	

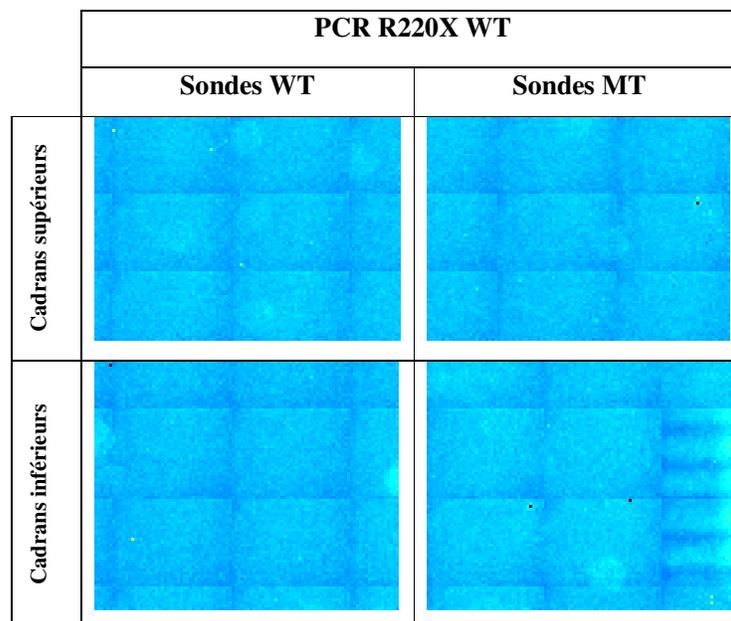
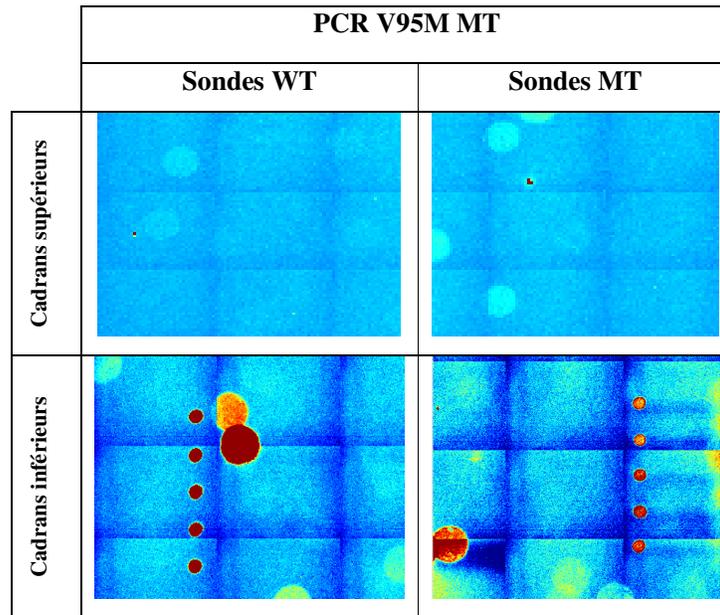
Figure 52 : Architecture de "spotting" pour la quatrième série

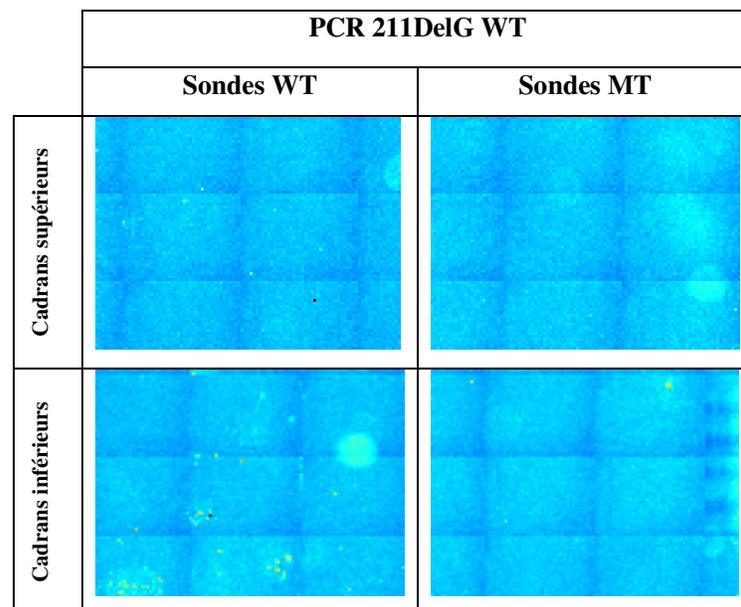
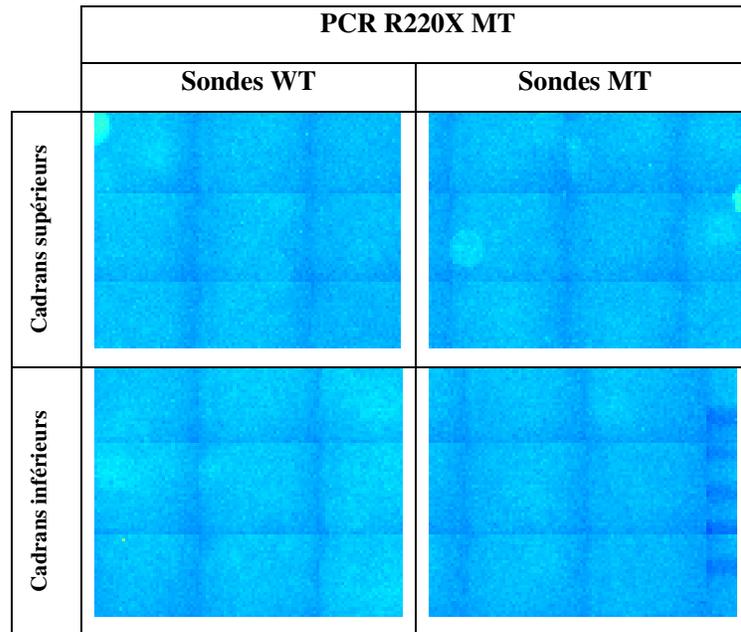
II - 1 - 2 - 2 - 5 - 2 - Hybridation de produits de PCR issus d'ADNs amplifiés de sujets sains ou atteints par CMT

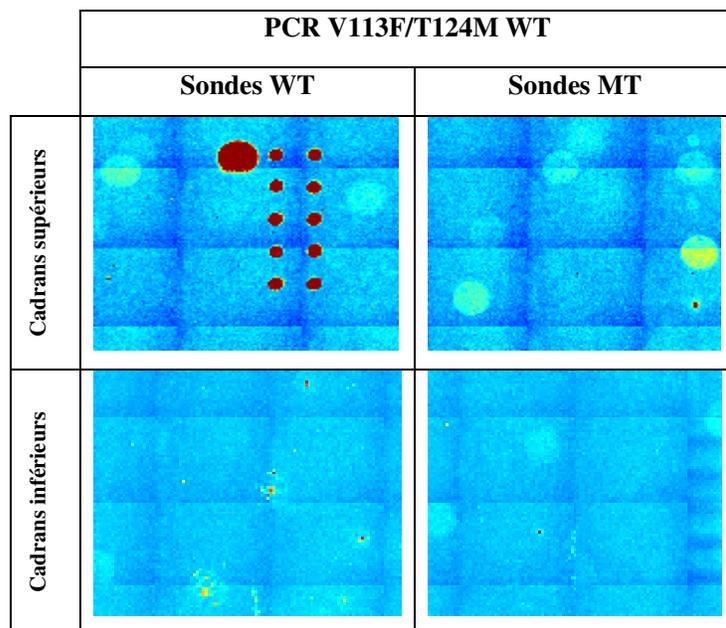
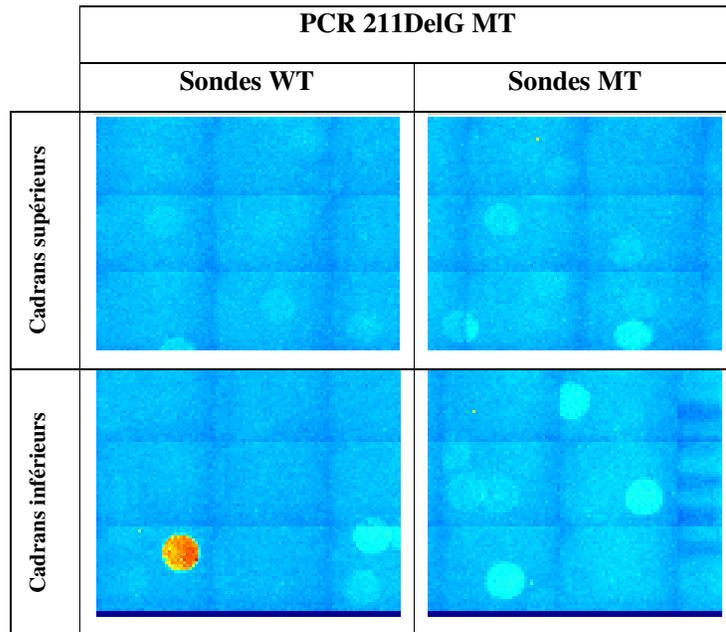
II - 1 - 2 - 2 - 5 - 2 - 1 - Lecture des images

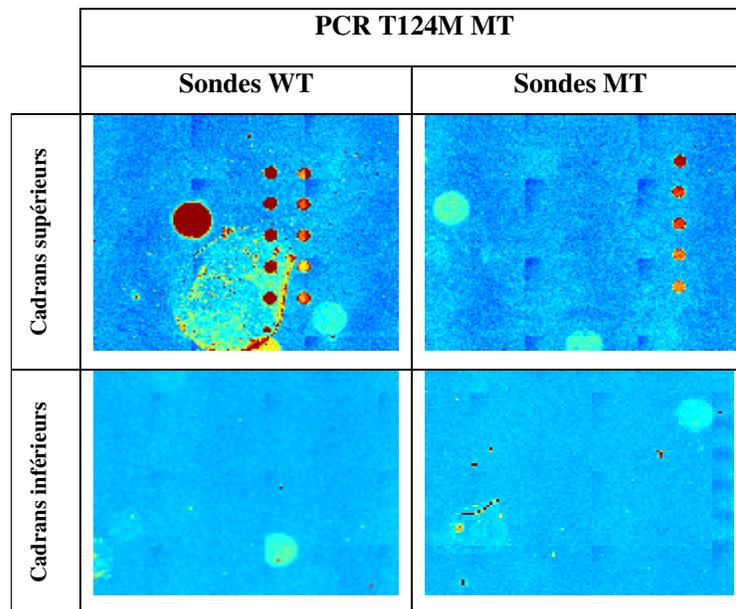
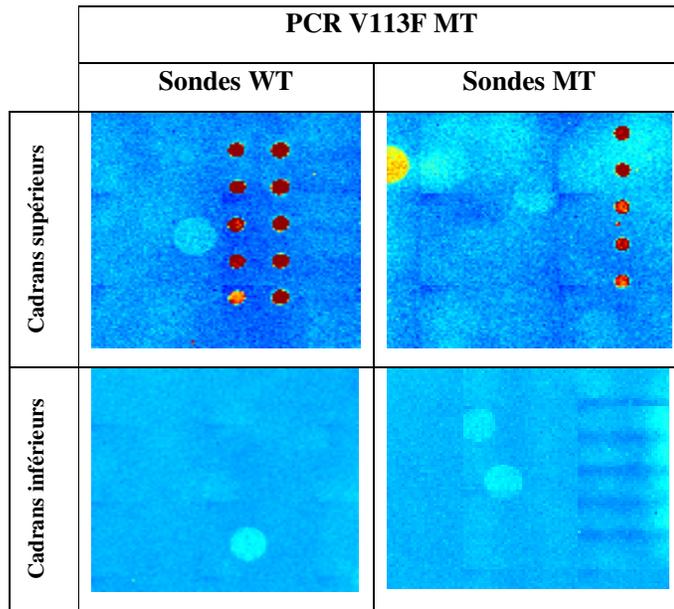
La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur IMSTAR "OSA Reader" :

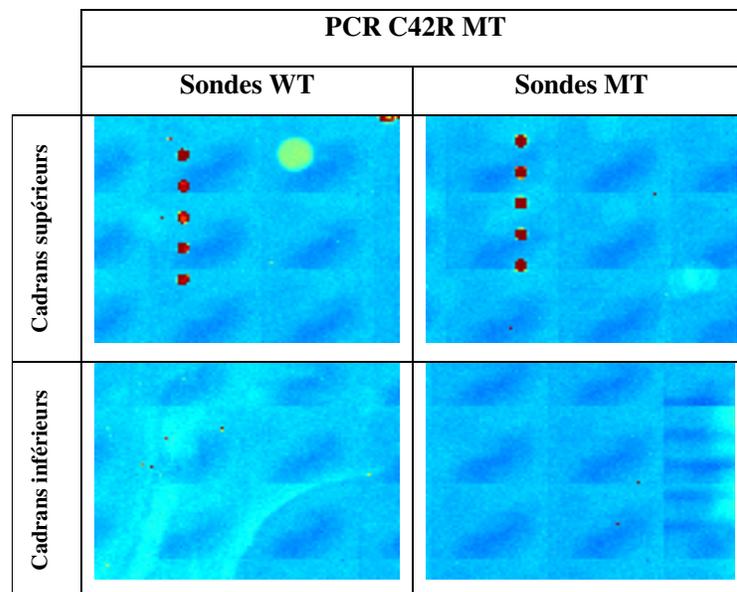
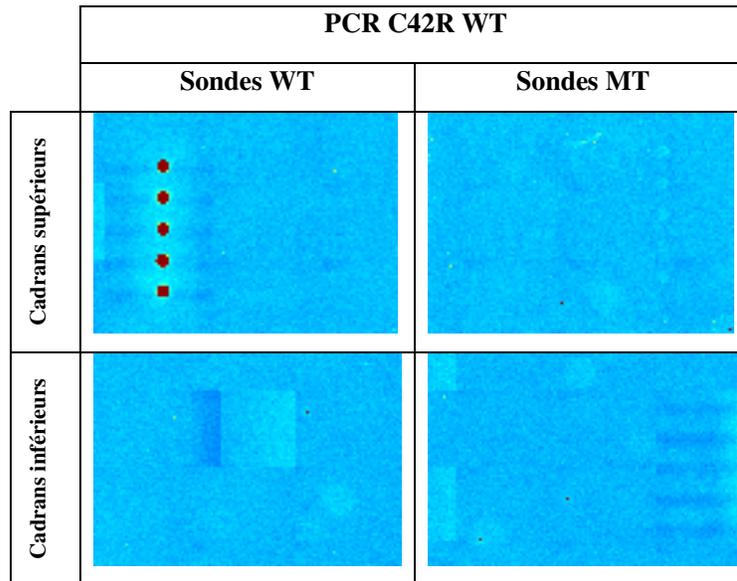












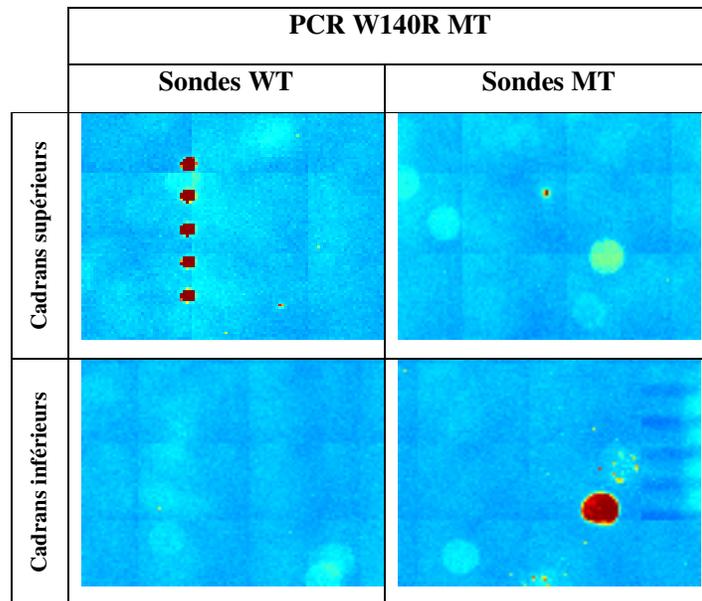
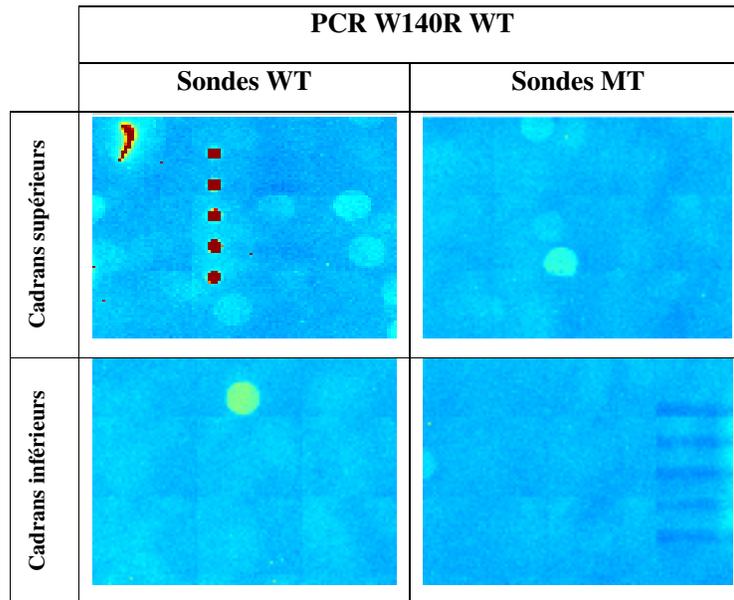


Figure 53 : Images des puces "hairpin" (quatrième série).

II - 1 - 2 - 2 - 5 - 2 - 2 - Résultats et calcul de taux de discrimination

Nous avons détecté une hybridation spécifique sur les sondes V95M, V113F, T124M, et C42R ; WT et MT lors de dépôt de ces produits de PCR correspondants. Les taux de discrimination étaient très satisfaisants pour ces sondes (Tableau 10).

La cible W140R WT s'hybride correctement sur leurs sondes complémentaires WT lors de l'hybridation des produits de PCR WT ou MT. Dans le cas de PCR WT, nous avons obtenu un taux de discrimination très satisfaisant. Cependant nous ne pouvons pas conclure à une validation de ces sondes par ce que les sondes W140R MT ne captent pas leurs cibles complémentaires. En effet, les sondes W140R MT n'ont pas donné aucun signal lors de dépôt de PCR W140R MT.

Aucun signal significatif n'a été détecté concernant les sondes S26L, R220X, et 211del G ; WT et MT.

Sondes	Gène / exon	Ech. : Cible PCR	Génotype Echantillon	Génotype détecté	Taux de discrimination	Validation
V95M WT	Cx 32-1	V95M/S26L WT	WT/WT	WT/WT	142,7	+
V95M MT	Cx 32-1	V95M MT/ S26L WT	WT/MT	WT/MT	0,32	+
T124M WT	P0-Ex3	T124M/V113F WT	WT/WT	WT/WT	81,15	+
T124M MT	P0-Ex3	T124M MT/V113F WT	WT/MT	WT/MT	0,91	+
V113F WT	P0-Ex3	V113F/T124M WT	WT/WT	WT/WT	408	+
V113F MT	P0-Ex3	V113F MT/ T124M WT	WT/MT	WT/MT	0,7	+
C42R WT	PMP22-Ex3	C42R WT	WT/WT	WT/WT	264	+
C42R MT	PMP22-Ex3	C42R MT	WT/MT	WT/MT	2,75	+
W140R WT	PMP22-Ex5	W140R WT	WT/WT	-	391,6	-

Tableau 10 : Taux de discrimination des sondes "hairpins" (quatrième série).

II - 1 - 2 - 2 - 5 - 3 - Conclusion

- Confirmation des résultats obtenus à *Serial Genetics* (Evry) lors de deuxième série d'expérience concernant les sondes V113F, T124M, et C42R ; WT et MT. Les sondes V95M ; WT et MT ont donné dans cette série un taux de discrimination très satisfaisant.

- Les sondes V95M, V113F, T124M, et C42R ; WT et MT peuvent être définitivement validés.
- En ce qui concerne les sondes W140R, seul les sondes W140R MT doivent être re-dessiner. Les taux de discrimination des sondes W140R WT et MT seront calculés après la validation des sondes W140R MT.
- Les sondes restantes : S26L, R220X, et 211delG doivent être re-dessiner parce que aucun signal significatif concernant ces sondes a été détecté.
- Les taux de discriminations pour les échantillons normaux obtenus à Limoges en employant le lecteur Imstar étaient clairement plus importants de ceux qui étaient déjà obtenus à *Serial Genetics* (Evry) ou à *Genescore* (Paris), ce qui indique une forte sensibilité du lecteur.

II - 1 - 2 - 2 - 6 - Hybridation d'un mélange de 2 produits de PCR (V95M Muté + C42R Muté)

II - 1 - 2 - 2 - 6 - 1 - Objectif

Nous avons essayé dans cette série d'expérience de vérifier si des degrés plus élevés de multiplexage seront possibles avec notre système. Nous avons donc testé si la puissance de la discrimination entre les génotypes reste inchangée en présence de plus d'un amplicon dans une seule hybridation. Le calcul du taux de discrimination lors des dépôts simultanés de deux cibles ayant des séquences différentes était notre premier objectif.

II - 1 - 2 - 2 - 6 - 2 - Architecture de "spotting" et conditions de l'expérience

Les deux échantillons sont groupés et concentrés, par évaporation sous vide, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 3 µl. Ce volume de produits de PCR a servi à préparer la solution (mix) d'hybridation finale selon le protocole *Genescore* (page 90). La solution préparée a été hybridée sur une lame *Serial Genetics* dont l'architecture est indiquée page 156. Après hybridation, la lame était lavée selon le protocole de lavage standard de *Genescore* et scannée grâce au lecteur Imstar OSA Reader.

II - 1 - 2 - 2 - 6 - 3 - Lecture des images

La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur IMSTAR "OSA Reader" :

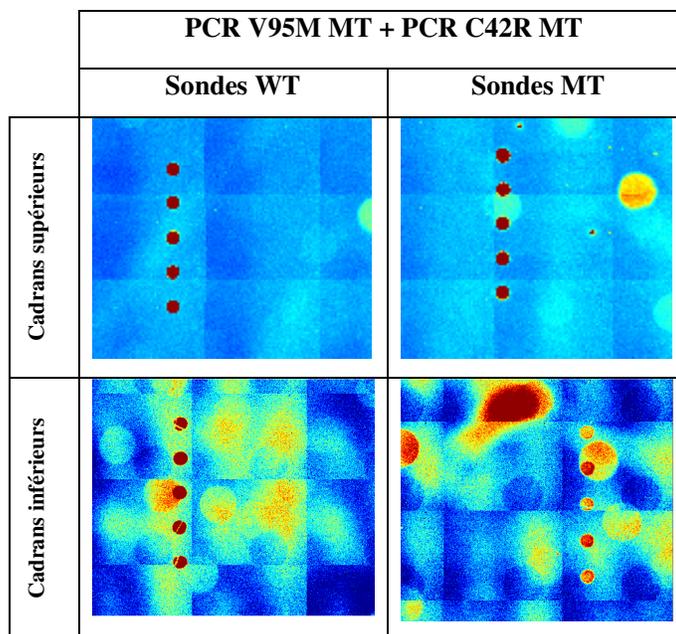


Figure 54 : Images des puces "hairpin" (hybridation simultanée de deux PCR MT différents).

II - 1 - 2 - 2 - 6 - 4 - Discussion et calcul de taux de discrimination

Nous observons pour les deux cadrans supérieurs et inférieurs une détection des signaux correspondant aux sondes C42R et V95M ; WT et MT. Ces résultats sont en concordance avec ceux obtenus séparément lors de précédentes expériences.

Le taux de discrimination pour chaque produit de PCR MT a été calculé. En comparant les taux de discrimination des précédentes mono hybridations avec cette double hybridation (tableau 11), la différence semble peu significative par rapport avec des hybridations réalisées précédemment avec deux cibles C42R MT et V95M MT séparément.

	Taux de discrimination de la mono hybridation	Taux de discrimination de la double hybridation
C42R Muté	0,32	0,29
V95M Muté	2,75	1,54

Tableau 11 : Taux de discrimination des sondes "hairpins" (hybridation simultanée de deux PCR MT différents).

II - 1 - 2 - 2 - 6 - 5 - Conclusion

La différence du taux de discrimination entre la mono hybridation et la double hybridation est plus importante pour la cible V95M MT, mais ce taux de discrimination reste toujours voisin et plus proche de 1 (mutation hétérozygote). En revanche, la différence du taux de discrimination entre la mono hybridation et la double hybridation pour la cible C42R MT était négligeable.

Malgré cette différence observée, les sondes C42R (WT et MT) et V95M (WT et MT) sont toujours validées pour la double hybridation. La double hybridation n'a pas modifié l'analyse du signal et le calcul du taux de discrimination.

Les résultats obtenus dans cette expérience nous ont encouragés à envisager un multiplexage de la méthode "hairpin" en employant une amplification PCR multiplexe.

II - 2 - Validation de la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT en utilisant des produits de PCR multiplexe

II - 2 - 1 - Matériels et Méthodes

II - 2 - 1 - 1 - Introduction

La PCR multiplexe est une technique puissante qui permet l'amplification de plusieurs produits en parallèle dans une seule réaction. Elle est largement utilisée dans des applications de génotypage et d'exploration de différentes régions d'ADN dans le cadre de la recherche, la médecine légale et le diagnostic moléculaire dans les laboratoires. La PCR multiplexe peut également être employée pour l'analyse qualitative et semi-quantitative d'expression génique en utilisant l'ADNc comme une matrice.

Le kit "QIAGEN Multiplex PCR", utilisé dans cette étude, réduit considérablement le besoin d'optimisation de la réaction, rendant la réalisation des PCRs multiplexes simple et rapide. Le kit contient une solution principale ("Master Mix") dont la composition et les éléments ont été spécifiquement développés pour des applications de PCR multiplexe. Cette solution principale contient des concentrations pré-optimisées d'une HotStarTaq polymérase d'ADN, de MgCl₂, des dNTPs. L'utilisation de cette solution principale réduit le temps d'optimisation des réactions et augmente la reproductibilité inter-essais.

II - 2 - 1 - 2 - Mutations de gène recherchées et extraction d'ADN génomique

Les mutations étudiées dans cette partie étaient celles dont les sondes avaient été validées dans la première partie de cette étude. Il s'agit des sondes V95M, V113F, T124M, et C42R : WT et MT. Les échantillons d'ADN contrôle (sans mutation) et ceux qui portent chacun une seule des quatre mutations étudiées ont été amplifiés et ensuite hybridés sur les lames. L'ADN de ces échantillons était extrait en utilisant le kit "Nucleon extraction and purification kit" (Amersham Biosciences). Les lames utilisées dans cette partie de l'étude étaient des lames commandées chez *Serial Genetics*.

II - 2 - 1 - 3 - Amorces

Le choix des amorces est une étape cruciale pour la réussite de la PCR multiplexe. En plus de la séquence des amorces, la longueur des produits de PCR doit également être

prise en considération. Les tailles des amplicons doivent différer suffisamment afin de pouvoir les distinguer les uns des autres sur les gels d'agarose.

II - 2 - 1 - 3 - 1 - Conception des amorces de PCR multiplexe

La conception des amorces de PCR mutiplexe a été réalisée selon des conditions prédéfinies. Outre les caractéristiques habituelles des amorces de PCR, la longueur des amorces de PCR multiplexe doit être de 21 à 30 nucléotides. Les points suivants devraient également être pris en compte:

- éviter les séquences complémentaires entre amorces dans la même paire ou dans des paires différentes.

- s'assurer de l'absence d'amplification non spécifique avec toutes combinaisons possibles des amorces de paires différentes.

II - 2 - 1 - 3 - 2 - La température de fusion (T_m)

Autant que possible, la conception d'amorces a été réalisée avec des valeurs semblables de T_m . La température de fusion des amorces utilisées pour la PCR multiplexe était entre 67,15 et 67,86 °C.

II - 2 - 1 - 3 - 3 - Séquences d'amorces

Trois paires d'amorces ont été conçues sur le site d'Internet primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>). Chaque paire, concernant les amorces Multi 1 et Muli 3, encercle un seul site de mutation, V95M et C42R successivement. Les amorces Multi 2 encerclent deux sites de mutations, il s'agit de V113F et T124M. Les gènes, les exons concernés, ainsi que les tailles de produits de PCR amplifiés sont illustrées dans le tableau 12.

En ce qui concerne l'amplification multiplexe avant toute hybridation sur lames, seules les amorces anti-sens étaient marquées à la Cy3.

Amorces	Mutation	Gène	Exon amplifié	T m	GC%	Taille de pd PCR	Séquence
Multi 1 sens	V95M	Cx32	Exon 2	67,20	45,83	574 pb	agcttgctcatggctggtgttt
Multi 1 anti-sens				67,15	59,09		actgtgtggggcaggggtaga
Multi 2 sens	V113F	P0	Exon 3	67,86	52,00	285 pb	ctctcacatgctcccctcattct
Multi 2 anti-sens	T124M			67,70	52,00		caaactgctcccataacctgtcc
Multi 3 sens	C42R	PMP22	Exon 3	67,78	52,00	197 pb	tcctcccctttctctcactctc
Multi 3 anti-sens				67,66	48,00		acaagctcatggagcacaaaaccag

Tableau 12 : Les amorces employées dans les réactions PCR Multiplexe, gènes et exons concernés, et les tailles des amplicons.

II - 2 - 1 - 3 - 4 - Préparation d'amorces

Les amorces étaient HPLC purifiées et diluées dans un tampon de TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8,0) pour obtenir 100 µM de solution mère. Un mélange de toutes les amorces a été ensuite préparé en les diluant en TE jusqu'à une concentration finale de 2 µM.

La fonctionnalité et la spécificité de chaque paire d'amorces ont été vérifiées dans des réactions individuelles avant de les regrouper dans une seule réaction de PCR multiplexe.

II - 2 - 1 - 4 - Quantité d'ADN matrice employée dans chaque réaction PCR multiplexe

L'efficacité d'hybridation des amorces à l'ADN est un facteur important dans la PCR. Le rapport de primer:matrice d'ADN influence fortement la spécificité et l'efficacité de la PCR et devrait être optimisé empiriquement. Si trop peu de matrice est employée, les amorces peuvent ne pas pouvoir trouver leurs séquences complémentaires. Trop de matrice peut mener à une augmentation des événements d'appariement non approprié des amorces

avec la matrice "*mispriming*". Plusieurs quantités d'ADN de départ ont été testées et 100 ng d'ADN a été enfin utilisée pour chaque réaction PCR multiplexe.

II - 2 - 1 - 5 - Protocole d'amplification

Dans un volume final de 50 µl de solution, les concentrations finales en amorces, sens et anti-sens étaient à 0,3 µM. Les conditions PCR utilisées pour l'amplification des différents échantillons sont indiquées dans le tableau 13.

Etape	initiale	15 min	95°C
d'activation			
Les 3 étapes de cycles			
Dénaturation		30s	94°C
Hybridation d'amorces		90s	68°C (optimisée)
Elongation		90s	72°C
Nombre de cycles		35	
Elongation finale:		10 min	72°C

Tableau 13 : Programme de PCR multiplexe

II - 2 - 1 - 6 - Purification des produits de PCR multiplexe et détermination de leurs concentrations

Avant l'hybridation sur les puces à ADN "microarrays", les produits de PCR du même individu ont été purifiés et ensuite regroupés. Les produits de PCR ont été vérifiés sur gel d'agarose 1.5% avant et après purification. La purification de produits de PCR a été réalisée en utilisant le kit "QIAquick Gel Extraction Kit" (Qiagen : Ref : 28706) et en suivant les instructions du fabricant. Ensuite, les densités optiques (DOs) de tous les produits de PCR ont été mesurées par spectrophotométrie (Shimadzu, UV-160A). Cette mesure était nécessaire afin de déterminer leurs concentrations et les quantités appropriées de chaque réaction PCR pour la préparation de solution (mix) d'hybridation et le dépôt enfin sur les lames.

II - 2 - 1 - 7 - Hybridation, lavage, et lecture

Les protocoles d'hybridation et lavage étaient les mêmes que ceux utilisés dans la première partie de cette étude (voir page 90). 4 ou 6 μg de produits de PCR ont été hybridés par lame. Les produits de PCR ont été concentrés dans un volume final de 3 μl . Ce volume a servi à préparer la solution (mix) d'hybridation finale. Après lavage, les lames ont été scannées par le lecteur IMSTAR "OSA Reader" et analysées par le logiciel d'analyse d'image du lecteur.

II - 2 - 2 - Résultats

II - 2 - 2 - 1 - Amplification par PCR multiplexe

L'ADN des sujets normaux et des malades portant une de quatre mutations étudiées a été amplifié selon le protocole indiqué auparavant. L'amplification multiplexe a été optimisée en utilisant des amorces non-marquées et d'ADN normal.

II - 2 - 2 - 1 - 1 - Optimisation des conditions de PCR

La fonctionnalité et la spécificité de chaque paire d'amorces ont été vérifiées dans des réactions séparées dans un premier temps afin de les combiner ultérieurement dans une seule réaction PCR multiplexe. 200 ng d'ADN par réaction a été utilisée au cours de cette étape. La température d'hybridation d'amorces a été augmentée au cours de l'optimisation de conditions PCR par paliers de 2 degrés jusqu'à 68°C. A cette température, nous avons pu éliminer la formation de dimères d'amorces et obtenir une amplification spécifique et des produits de PCR aux tailles attendues (figure 55). La concentration finale de MgCl_2 et des amorces était à 3 mM et 0,3 μM respectivement. Ainsi, le nombre de cycles d'amplification PCR final était de 35 cycles.

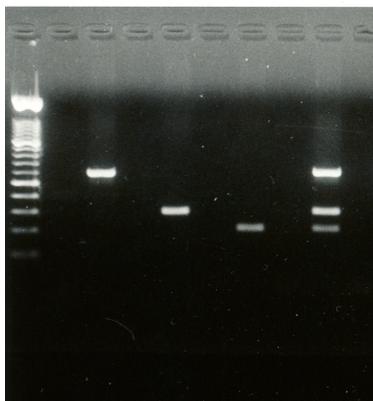


Figure 55 : Vérification gel d'agarose 1,5%, BET de l'amplification individuelle de chaque paire d'amorces et de l'amplification multiplexe. (1^{er} puits : poids moléculaire, 2-4-6-8 puits : contrôle négatif, 3^{ième} puits : amorces multi 1, 5^{ième} puits : amorces multi 2, 7^{ième} puits : amorces multi 3, 9^{ième} puits : amorces multi 1+2+3).

II - 2 - 2 - 1 - 2 - Optimisation de la quantité d'ADN de départ

Les quantités différentes d'ADN de départ par réaction PCR multiplexe et ces rendements respectifs mesurés par spectrophotométrie sont illustrés dans la figure 56. Ces quantités ont été testées afin d'optimiser l'amplification et d'obtenir une quantité adéquate de produit de PCR final.

Selon le graphe, nous constatons que l'augmentation de la quantité d'ADN de départ apporte une élévation de la quantité de produits de PCR obtenue. Une quantité de départ de 100 ng d'ADN génomique a été choisie car elle permet d'obtenir une quantité raisonnable de produits de PCR finaux tout en évitant une déperdition des ADN.

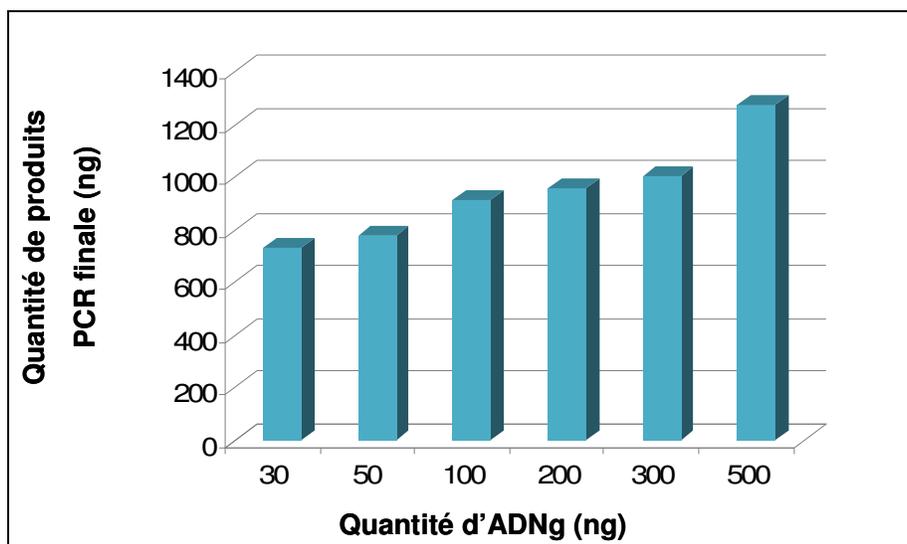


Figure 56 : Rendements de l'amplification PCR multiplexe selon les quantités d'ADN de départ par réaction.

II - 2 - 2 - 1 - 3 - Confirmation de la spécificité de l'amplification multiplexe

Une digestion enzymatique séparée de chaque produit de PCR a été réalisée par un enzyme de restriction différent afin de confirmer la spécificité de l'amplification. Les enzymes utilisés ainsi que les tailles présumées des produits avant et après digestion sont indiqués dans le tableau 14.

Séquence amplifiée	<i>Cx32</i>	<i>P0-Exon 3</i>	<i>PMP22-Exon 3</i>
Enzyme de digestion	Enz: <i>Hinf I</i>	Enz: <i>Aat II</i>	Enz: <i>EcoRV</i>
Taille de pds amplifiés	(574 pb)	285 pb	197 pb
2 fragts après digestion	(435 pb+139 pb)	(182 pb+103 pb)	(151 pb+46 pb)

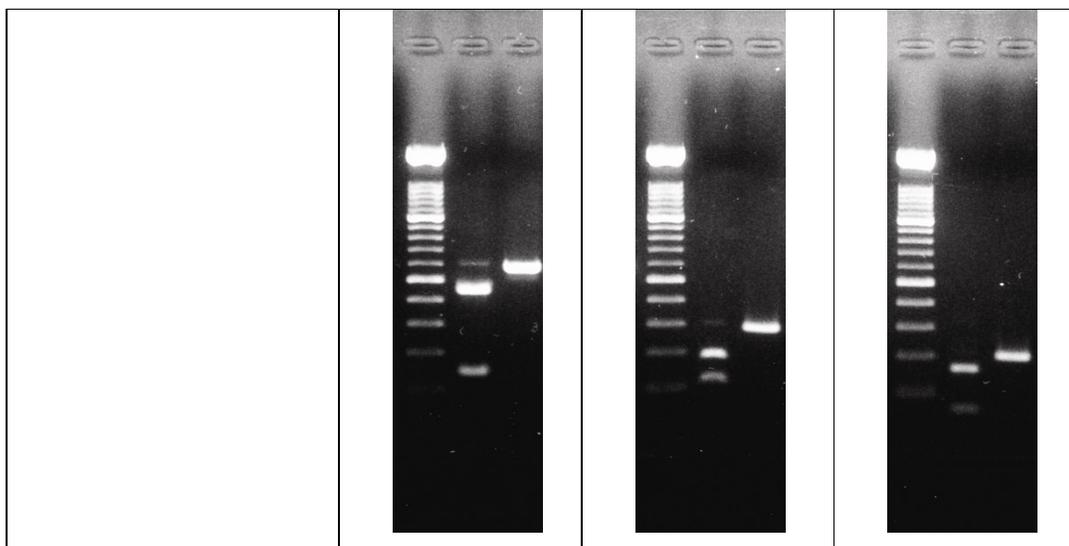


Tableau 14 : Les enzymes utilisés et les tailles présumées des produits de PCR au cours de la digestion enzymatique. (1^{er} puits : poids moléculaire, 2^{ième} puits : produits de PCR après digestion enzymatique, 3^{ième} puits : produits de PCR sans digestion enzymatique).

Après 6h de temps de digestion à 37°C, nous avons pu conclure à une amplification spécifique malgré la digestion incomplète de la séquence *Cx32* et quasiment complète des séquences *P0-Exon 3* et *PMP22-Exon 3* faute de temps de digestion.

II - 2 - 2 - 1 - 4 - Conclusion

Au vu de l'amplification multiplexe réussite et spécifique obtenue en utilisant les trois jeux d'amorces, nous avons décidé de les utiliser pour l'amplification d'ADN normal ou muté pour la suite. 100ng d'ADN sera utilisé par réaction PCR dans les conditions optimales : température d'hybridation d'amorces à 68°C, concentration finale de MgCl₂ et des amorces à 3 mM et 0,3 μM respectivement et le nombre de cycles d'amplification de PCR à 35 cycles.

II - 2 - 2 - 2 - Hybridation des produits de PCR multiplexe

Au cours de cette partie d'expérience, nous avons utilisé les mêmes jeux d'amorces employés lors de l'optimisation de PCR mais les amorces anti-sens étaient marquées en 5' à la Cy3. Les produits de PCR finals ont été hybridés sur des lames *Serial Genetics* comme indiqué dans la partie matériels et méthodes.

II - 2 - 2 - 2 - 1 - Résultats attendus lors de l'hybridation des produits de PCR multiplexe

La PCR multiplexe permet de réaliser une amplification simultanée de multiples séquences différentes en une seule réaction PCR. Nous avons essayé d'amplifier à la fois des séquences entourant tous les sites des mutations dont les sondes étaient déjà validées (V95M, V113F, T124M, C42R : WT et MT) au cours de la première partie de cette étude.

Lors de l'hybridation d'un produit de PCR multiplexe issu d'une amplification d'ADN normal, seules les sondes WT doivent être allumées (V95M, V113F, T124M, C42R : WT). Ce produit de PCR ne porte que les séquences normales qui vont s'hybrider sur les quatre sondes WT totalement complémentaires.

Les ADNs amplifiés des malades portent chacun une seule mutation confirmée par le séquençage directe. Les produits de PCR multiplexe issus de l'amplification de ces ADNs portent donc une seule base mutée alors qu'ils portent des séquences normales concernant le reste des sites de mutations étudiées. Lors de l'hybridation d'un produit de PCR multiplexe issu d'une amplification d'ADN muté, les sondes complémentaires aux deux allèles de la mutation présente (WT et MT) doivent être allumées parce que toutes les mutations étudiées sont hétérozygotes. L'allèle muté s'hybride sur les sondes MT et l'allèle normal sur les sondes normales respectivement avec un taux de discrimination égal à 1. Egalement, toutes les sondes WT complémentaires aux séquences normales des trois sites des mutations restantes étudiées doivent être allumées.

II - 2 - 2 - 2 - 2 - Hybridation des produits de PCR multiplexe normaux (optimisation de la quantité de produit de PCR hybridée et paramètres du scan)

Deux quantités différentes de produits de PCR ont été hybridées séparément par lame, il s'agit de 4 ou 6 µg. Au cours de cette optimisation, nous avons essayé d'avoir le maximum de signal des "*spots*" recherchés lors du scan en modulant le temps d'exposition et le gain. Notre but final était d'obtenir des taux de discrimination convenables et les comparer avec ceux qui étaient obtenus lors de l'hybridation des produits de PCR individuellement amplifiés.

II - 2 - 2 - 2 - 2 - 1 - Lecture des résultats

La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur IMSTAR "OSA Reader" :

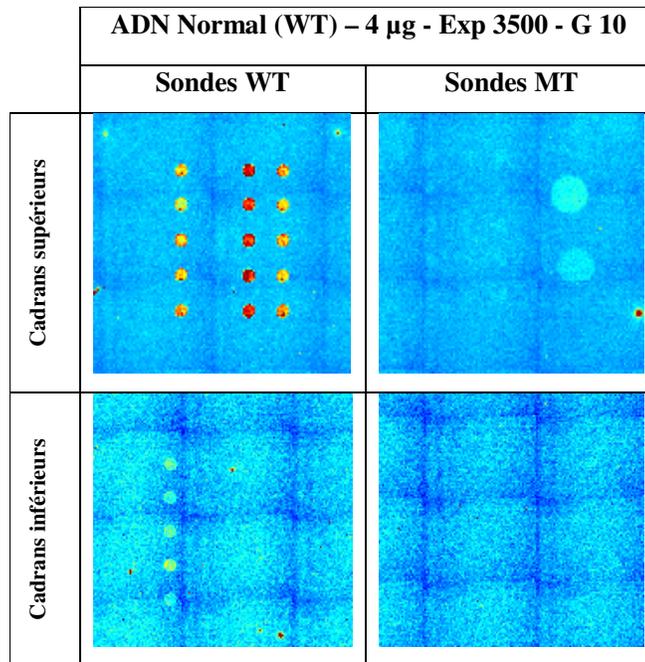


Figure 57 : Lame scannée après hybridation de 4 µg des produits de PCR normaux, exposition 3500 et gain 10.

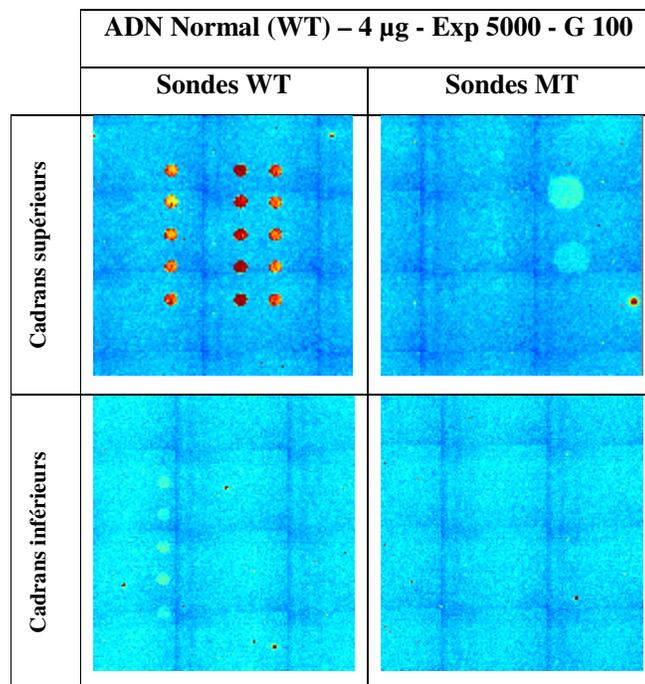


Figure 58 : Lame scannée après hybridation de 4 µg des produits de PCR normaux, exposition 5000 et gain 100.

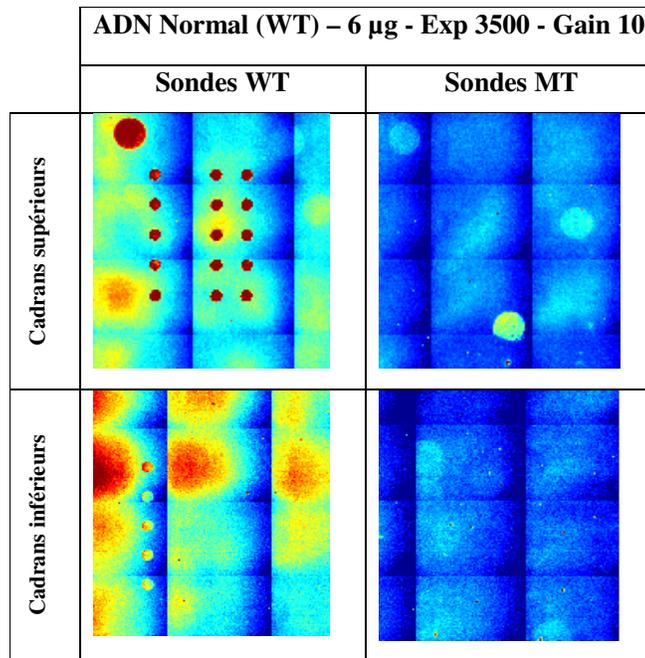


Figure 59 : Lame scannée après hybridation de 6 µg des produits de PCR normaux, exposition 3500 et gain 10.

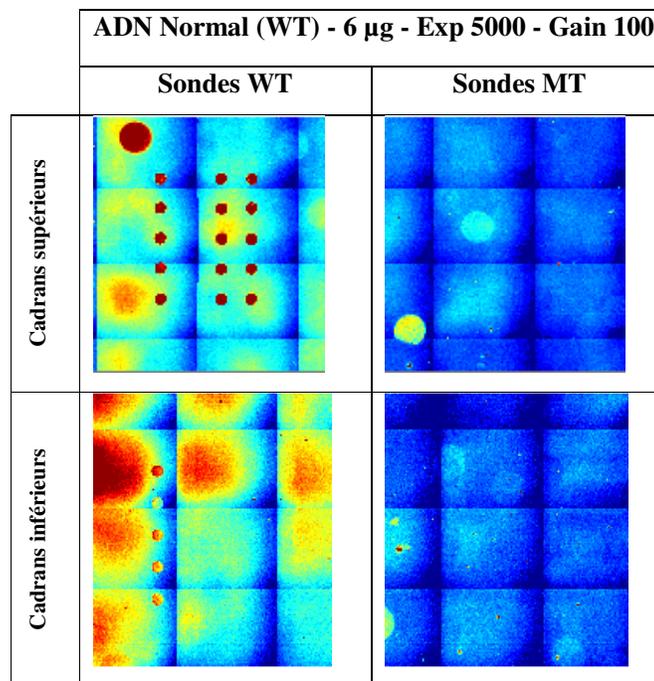


Figure 60 : Lame scannée après hybridation de 4 µg des produits de PCR normaux, exposition 5000 et gain 100.

II - 2 - 2 - 2 - 2 - 2 - Analyses quantitatives des puces "hairpin"

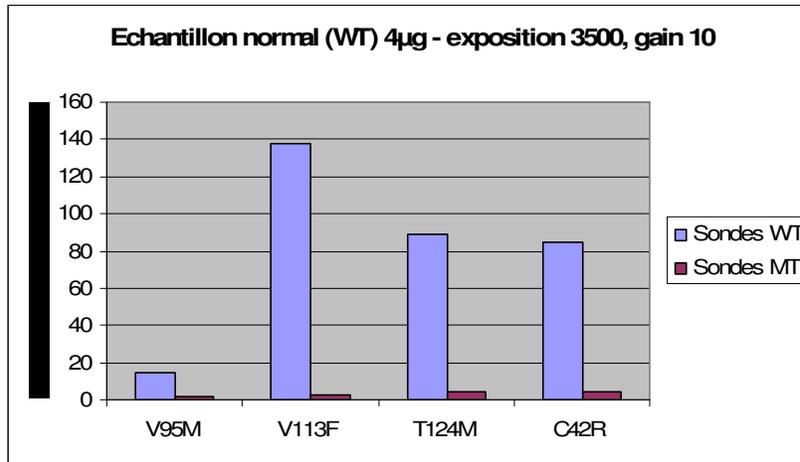


Figure 61 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 4 μ g des produits de PCR normaux, exposition 3500 et gain 10.

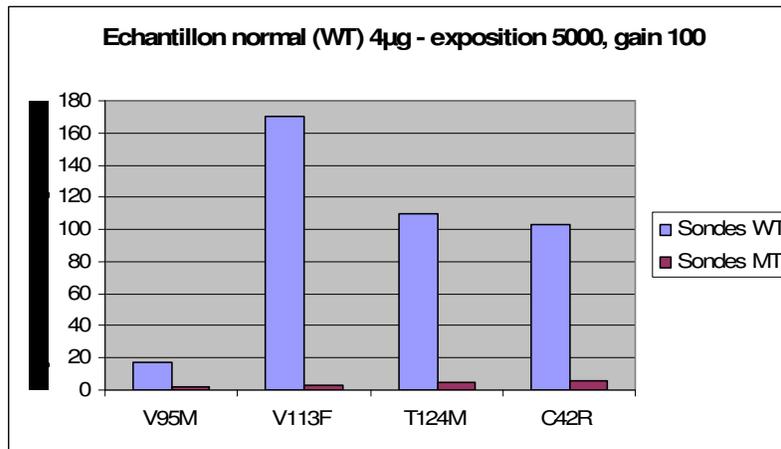


Figure 62 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 4 μ g des produits de PCR normaux, exposition 5000 et gain 100.

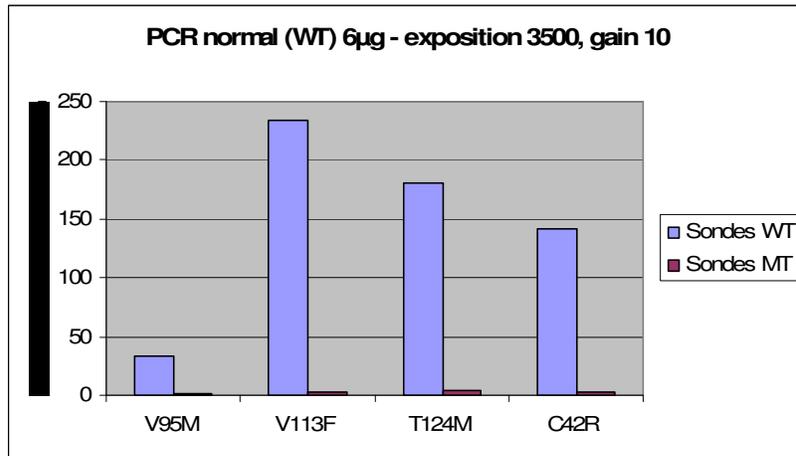


Figure 63 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR normaux, exposition 3500 et gain 10.

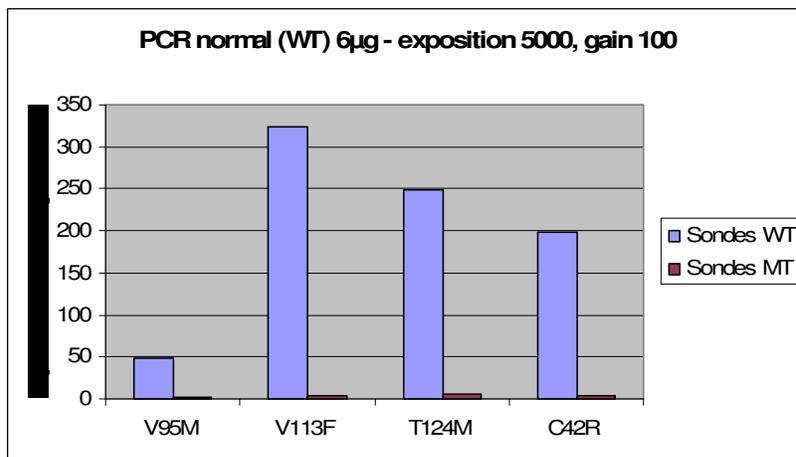


Figure 64 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR normaux, exposition 5000 et gain 100.

- Systématiquement et après le dépôt de différents produits de PCR testés, tous les "spots" attendus et recherchés se sont allumés ce qui indique une hybridation spécifique.
- Bruit de fond plus élevé lors de dépôt de 6 µg que 4 µg de produits de PCR.

- L'augmentation de la quantité de produits de PCR de 4 µg à 6 µg permet de mieux visualiser les "spots" allumés et surtout les "spots" V95M WT. Egalement, les trois paramètres S, S-B, S/B sont plus importants lors de l'hybridation de 6 µg que 4 µg.
- L'augmentation de temps d'exposition (de 3500 jusqu'à 5000 ms) et de gain (de 10 jusqu'à 100) ne permet pas de mieux visualiser les "spots" allumés et surtout les "spots" V95M WT. Egalement, nous n'avons pas obtenu une élévation importante des paramètres S, S-B, S/B issus de cette augmentation.
- Les "spots" V95M WT s'allument moins fortement que les autres "spots" WT. En plus, les trois paramètres S, S-B, S/B des sondes V95M WT allumées sont moins importants par rapport aux autres sondes WT allumées soit après le dépôt de 4 µg ou 6 µg de produits de PCR et avec les différents paramètres du scan employés.

II - 2 - 2 - 2 - 2 - 3 - Calcul des taux de discrimination

Les taux de discrimination des sondes recherchées (V95M, V113F, T124M, C42R : WT) dont les "spots" se sont allumés ont été calculés. Le tableau 15 montre les taux de discrimination obtenus selon les différents paramètres employés.

Sondes	Taux de dis. WT/MT	Taux de dis. WT/MT	Taux de dis. WT/MT	Taux de dis. WT/MT
	ADN normal (4 µg) Exp. 3500, g10	ADN normal (4 µg) Exp. 5000, g100	ADN normal (6 µg) Exp. 3500, g10	ADN normal (6 µg) Exp. 5000, g100
V95M WT	9,25	8,75	17,58	17,51
V113F WT	61,38	58,72	73,70	74,05
T124M WT	21,92	22,39	50,58	45,42
C42R WT	18,83	17,76	65,66	48,47

Tableau 15 : Effet de la quantité de produits de PCR hybridée et les conditions du scan sur les taux de discrimination des sondes sauvages.

II - 2 - 2 - 2 - 2 - 4 - Conclusion

Nous avons observé :

- Une hybridation spécifique de produits de PCR multiplexe normaux.
- Une augmentation nette des taux de discrimination pour toutes les sondes (V95M, V113F, T124M, et C42R) WT lors de dépôt d'un produit de PCR issu d'un ADN normal en utilisant 6 µg au lieu de 4 µg. Cela est accompagné par une augmentation des rapports S/B pour tous les "*spots*" détectés. L'augmentation de temps d'exposition et du gain ne permet pas d'obtenir des taux de discrimination plus importants. Les taux de discrimination sont élevés et supérieurs à 17,58 concernant les sondes WT lors de l'hybridation des produits de PCR normaux et homozygotes. Nous avons donc décidé de procéder au dépôt de 6 µg pour l'hybridation des produits de PCR issus d'ADN muté pour la suite. Les conditions de scan seront à 3500 ms de temps d'exposition et 10 de gain.

II - 2 - 2 - 2 - 3 - Hybridation des produits de PCR mutés

Quatre échantillons d'ADN portant chacun une seule des quatre mutations étudiées ont été séparément amplifiés. 6 µg de chaque produit de PCR multiplexe a été hybridée par lame. Les lames ont été scannées en employant les paramètres optimaux trouvés lors de l'hybridation des produits de PCR normaux.

II - 2 - 2 - 2 - 3 - 1 - Lecture des résultats

La lecture des images a été réalisée en utilisant le lecteur IMSTAR "OSA Reader" :

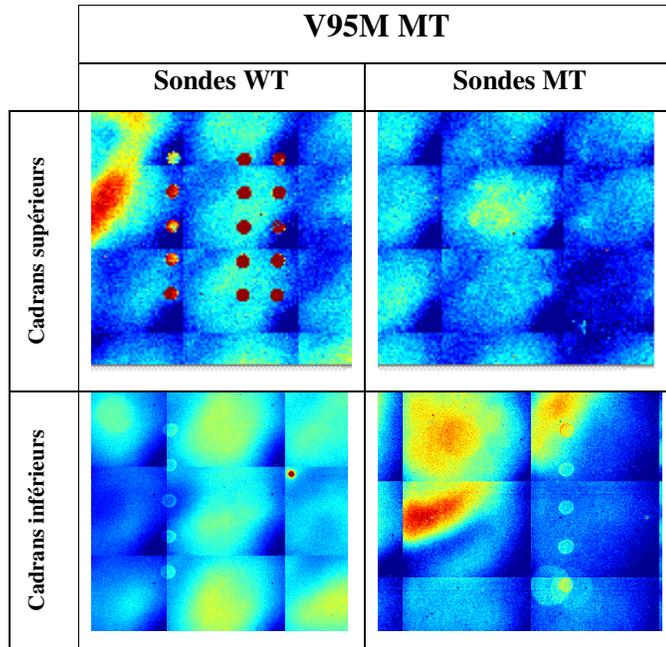


Figure 65 : Lame scannée après hybridation de 6 µg des produits PCR multiplexe issus de l'amplification d'ADN portant la mutation V95M, exposition 3500 et gain 10.

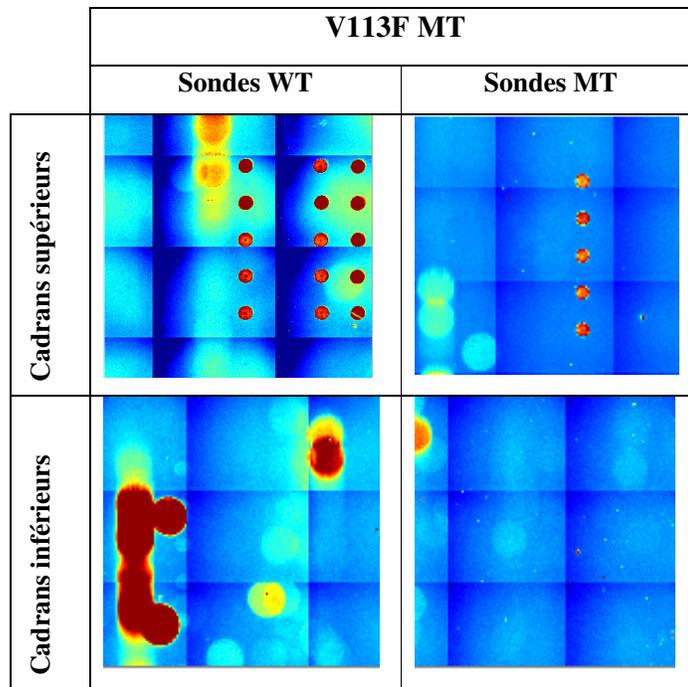


Figure 66 : Lame scannée après hybridation de 6 µg de produits PCR multiplexe issus de l'amplification d'ADN portant la mutation V113F, exposition 3500 et gain 10.

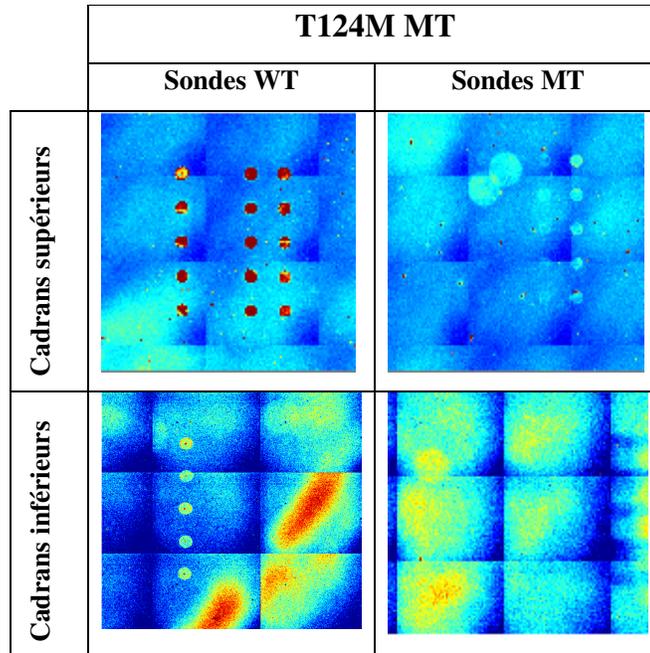


Figure 67 : Lame scannée après hybridation de 6 µg de produits PCR multiplexe issus de l'amplification d'ADN portant la mutation T124M, exposition 3500 et gain 10.

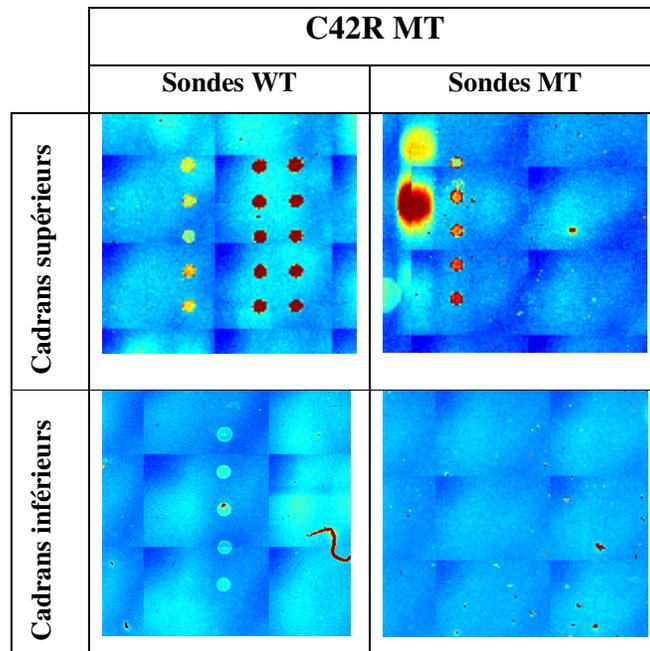


Figure 68 : Lame scannée après hybridation de 6 µg de produits PCR multiplexe issus de l'amplification d'ADN portant la mutation C42R, exposition 3500 et gain 10.

II - 2 - 2 - 2 - 3 - 2 - Analyses quantitatives des puces "hairpin"

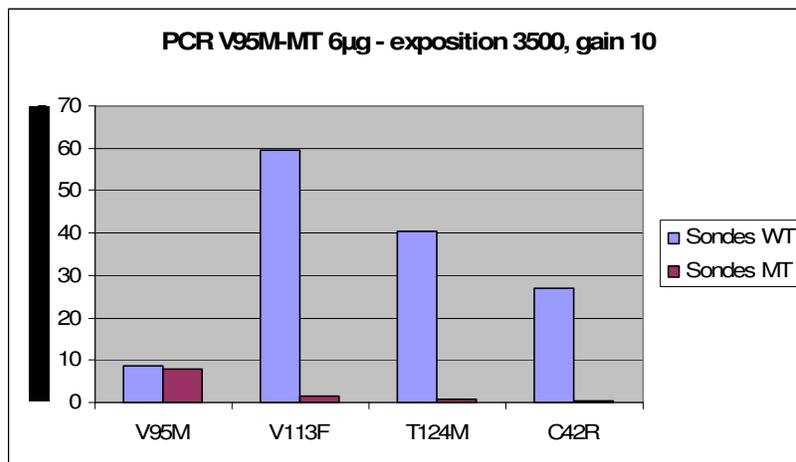


Figure 69 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR issus de l'amplification d'ADN portant la mutation V95M, exposition 3500 et gain 10.

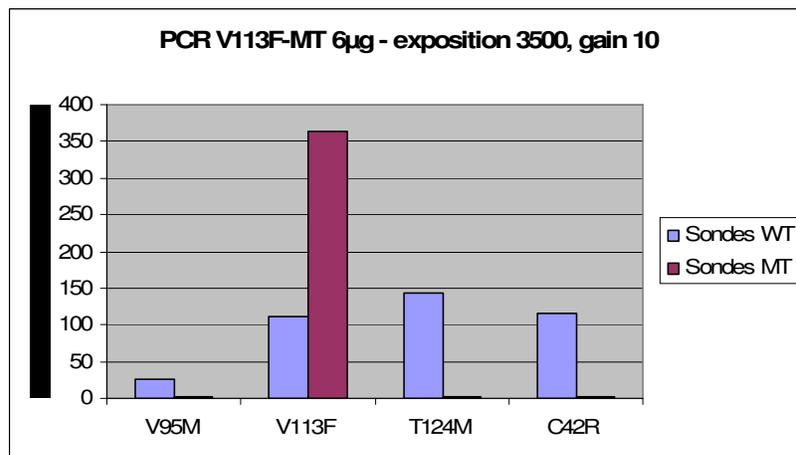


Figure 70 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR issus de l'amplification d'ADN portant la mutation V113F, exposition 3500 et gain 10.

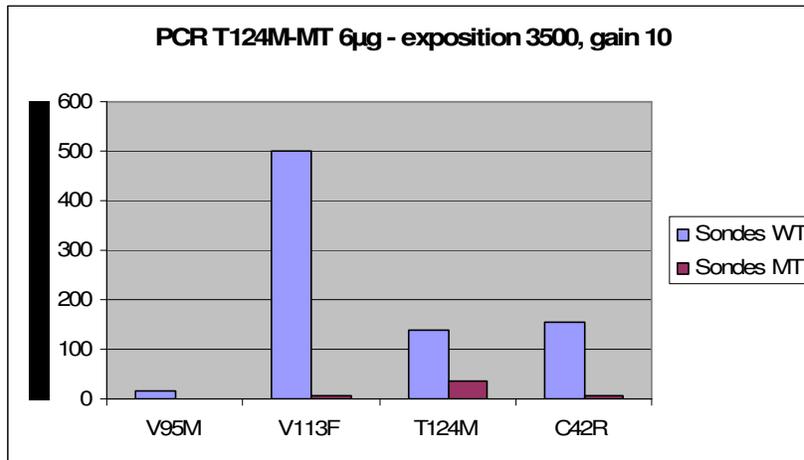


Figure 71 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR issus de l'amplification d'ADN portant la mutation T124M, exposition 3500 et gain 10.

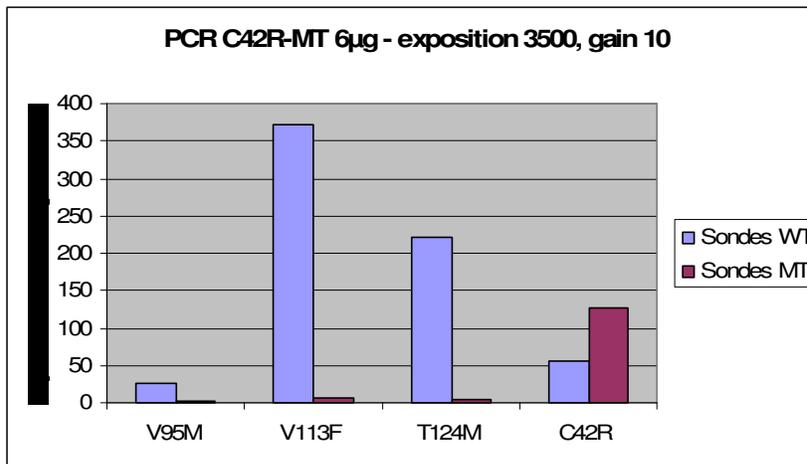


Figure 72 : Distribution des signaux lors de l'hybridation de 6 µg des produits de PCR issus de l'amplification d'ADN portant la mutation C42R, exposition 3500 et gain 10.

- Systématiquement et après le dépôt de différents produits de PCR multiplexe mutés, tous les "spots" attendus et recherchés se sont allumés ce qui indique une hybridation spécifique.

- Bruit de fond élevé après le dépôt de 6 µg de produits de PCR.
- Les "spots" V95M WT et MT s'allument moins fortement que les autres "spots" détectés. En plus, les trois paramètres S, S-B, S/B des sondes V95M WT et MT allumées sont moins importants par rapport aux autres sondes allumées.

II - 2 - 2 - 2 - 3 - 3 - Calcul des taux de discrimination

Les taux de discrimination des sondes recherchées (V95M, V113F, T124M, C42R : WT) dont les "spots" se sont allumés étaient calculés. Le tableau 16 montre les taux de discrimination obtenus selon les différents paramètres employés.

Sondes	Taux de discrimination	Taux de discrimination	Taux de discrimination	Taux de discrimination
	ADN muté V95M (6µg)	ADN muté V113F (6µg)	ADN muté T124M (6µg)	ADN muté C42R (6µg)
	Exp. 3500, g10	Exp. 3500, g10	Exp. 3500, g10	Exp. 3500, g10
V95M	MT/WT : 0,93	WT/MT : 14,6	WT/MT : 19	WT/MT : 13,3
V113F	WT/MT : 42,5	MT/WT : 3,2	WT/MT : 87,5	WT/MT : 59
T124M	WT/MT : 57,7	WT/MT : 54,8	MT/WT : 0,24	WT/MT : 52,3
C42R	WT/MT : 54,2	WT/MT : 44,4	WT/MT : 30,1	MT/WT : 2,2

Tableau 16 : Calcul des taux de discrimination des sondes sauvages et mutées lors de l'hybridation des produits de PCR multiplexe issus de l'amplification d'ADN muté.

II - 2 - 2 - 2 - 4 - 4 - Conclusion

Nous avons observé :

- Une hybridation spécifique de produits de PCR multiplexe mutés.
- Les taux de discrimination sont satisfaisants et supérieurs à 13,3 concernant les sondes WT. Ces taux de discrimination sont aussi satisfaisants et proches de 1 (entre 0,24 et 3,2) concernant les sondes MT lors de l'hybridation des produits de PCR mutés hétérozygotes.

II - 2 - 3 - Conclusion finale de l'hybridation des produits de PCR multiplexe

Nous avons observé dans cette partie d'expérience, une concordance des résultats obtenus lors de l'hybridation de produits de PCR issus d'une amplification individuelle (première partie d'expérience) ou d'une amplification multiplexe. Il s'agit d'une hybridation spécifique simultanée des produits de PCR multiplexe sur leurs sondes cibles. Malgré le bruit de fond élevé engendré par l'hybridation de 6 µg de produits de PCR multiplexe, nous avons obtenu des résultats satisfaisants et des taux de discrimination qui ont pu distinguer entre les séquences normales et mutées lors de l'hybridation de tous les types des produits multiplex d'ADN normal ou muté. Ce résultat a été obtenu grâce à l'utilisation du système " Spot finder " du logiciel " Pathfinder™ OSA image analysis software package ".

II - 3 - Hybridation de produits d'amplification de l'ADN génomique total (AGT) pour la détection des mutations impliquées dans la maladie de CMT

II - 3 - 1 - Matériels et Méthodes

II - 3 - 1 - 1 - Introduction

Le kit "BioPrime® Array CGH Genomic Labeling System" emploie une forme mutante du fragment de Klenow de la polymérase I d'ADN (exo-Klenow) et des amorces aléatoires et des nucléotides marqués avec un fluorochrome afin de marquer des échantillons d'ADN génomique. Le kit inclut un mélange optimisé de nucléotides contenant Cy3®-dCTP.

En utilisant ce kit, nous avons d'abord hybridé notre ADN génomique avec des amorces aléatoires octamériques. Ces amorces étaient ensuite allongées dans une réaction de polymérisation en utilisant des concentrations élevées du fragment exo-Klenow et des nucléotides marqués. Ceci avait pour résultat une incorporation efficace du fluorochrome. Nous avons purifié ensuite les échantillons amplifiés et marqués afin d'enlever les amorces et les nucléotides non incorporés et procéder enfin à l'hybridation sur les puces à ADN. L'avantage de ce système est ce qu'il nous permet d'amplifier et marquer la totalité de nos échantillons d'ADN dans une seule étape. Cela nous permet d'éviter de réaliser plusieurs PCR individuelles ou multiplexes afin d'amplifier nos séquences d'intérêt qui contiennent les mutations ponctuelles étudiées.

II - 3 - 1 - 2 - Avantages du système

La polymérase d'Exo-Klenow, dépourvue d'activité exonucléasique 5'-3' et 3'-5', est responsable de rendements plus importants en échantillons marqués et augmente de ce fait la sensibilité. Ceci permet d'obtenir des intensités plus fortes de signal et une plus grande reproductibilité des résultats. De plus et grâce à ce système, l'amplification de l'ADN génomique total est réalisée dans moins de trois heures.

II - 3 - 1 - 3 - Mutations de gène recherchées et extraction d'ADN génomique

A ce stade, nous avons essayé d'amplifier et marquer un échantillon d'ADN homozygote venant d'un sujet normal. Après hybridation sur les lames, nous avons calculé les taux de discrimination pour les sondes WT déjà validées afin de les comparer avec les résultats précédemment obtenus. Les lames utilisées dans cette partie de l'étude étaient des lames commandées chez *Serial Genetics* dont le schéma de "spotting" est illustré page 156.

II - 3 - 1 - 4 - Plan Expérimental

Les différentes étapes de cette partie expérimentale comprenaient d'abord la digestion de l'ADN génomique total en utilisant l'enzyme *Dpn II*. Le site de coupure de *Dpn II* est : 5'..↓GATC...3' et la taille moyenne des fragments après digestion est de 250 pb. Pour cette étape, nous avons employé 4 µg l'ADN génomique et 5 µg du contrôle de sperme de saumon selon le protocole suivant :

Composant	Volume
ADN génomique	X µl (5 µg de sperme de saumon ou 4 µg d'ADN)
Dpn II tampon	4 µl
Dpn II enzyme	2 µl
Eau distillée	jusqu'au 20 µl

La purification après la digestion enzymatique a été réalisée ensuite en utilisant le kit "Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System" suivant les instructions du fabricant.

Ensuite, le marquage et l'amplification de l'ADN génomique total, la purification et l'évaluation de l'efficacité du marquage ont été réalisés en utilisant le kit "BioPrime[®] Array CGH Genomic Labeling System".

II - 3 - 1 - 5 - Hybridation, lavage, et lecture

Les protocoles d'hybridation et lavage étaient les mêmes que ceux utilisés dans les deux parties expérimentales précédentes de cette étude (voir page 90). La totalité de produits d'amplification et de marquage de 4 µg d'ADN a été hybridée sur lame. Les produits finals ont été concentrés, par évaporation sous vide, jusqu'à l'obtention d'un volume final de 3 µl. Ce volume a servi à préparer la solution (mix) d'hybridation finale.

Après lavage, les lames ont été scannées par le lecteur IMSTAR "OSA Reader" et analysées par le logiciel d'analyse d'image du lecteur.

II - 3 - 2 - Résultats

Au vu des résultats obtenus lors de l'hybridation des produits de PCR multiplexe, nous avons voulu utiliser un multiplexage plus complexe de la méthode "hairpin". Afin d'éviter des nombreuses PCRs, individuelles ou multiplexes, une seule étape d'amplification et marquage de l'ADN génomique total a été testée avant hybridation sur lame. Nos implications étaient d'avoir un bon rendement d'amplification de l'ADN, un marquage efficace au Cy3 de l'ADN amplifié, et finalement avoir une hybridation spécifique de l'ADN amplifié et marqué.

II - 3 - 2 - 1 - Amplification et marquage

L'amplification et marquage de trois échantillons ont été réalisés ; 5 µg d'un contrôle de sperme de saumon après digestion optimisée par DpnII, 4 µg d'ADN normal après digestion optimisée par DpnII, et finalement 4 µg d'ADN normal sans digestion (figure 73). Nous avons pu détecter des produits d'amplification avec des tailles différentes. La taille de la majorité des produits d'amplification obtenue était inférieure de 1500pb (<1500pb) avec une amplification homogène concernant le contrôle de sperme de saumon ainsi que l'ADN digéré D'autre côté, elle était de grande taille et supérieure à 1500pb (>1500pb) concernant l'échantillon d'ADN non-digéré.

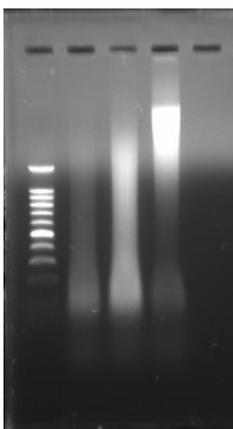


Figure 73 : Contrôle gel d'agarose 1,5% de l'amplification d'ADN génomique total (1^{er} puits : poids moléculaire, 2^{ième} puits : contrôle de sperme de saumon après digestion, 3^{ième} puits : ADN normal après digestion, 4^{ième} puits : ADN normal sans digestion).

Le rendement et le coefficient de l'amplification ainsi que le rapport base/fluorochrome qui montre l'efficacité d'incorporation des nucléotides marqués ont été calculés pour l'ADN digéré et non digéré. Les différents résultats montrés dans le tableau 17 ont indiqué de bon niveau d'amplification et marquage pour l'ADN digéré. La digestion permet d'obtenir un rendement plus important. Un nucléotide marqué à la Cy3 était incorporé toutes les 42 bases pour l'échantillon d'ADN amplifié et marqué après digestion alors que nous avons obtenu un toutes les 60 bases pour l'échantillon d'ADN sans digestion.

Echantillon	Quantité d'ADN initiale (Av. amp.)	Rendement Final (Ap. amp.)	Coefficient d'amplification	Rapport base/fluorochrome
ADN avec digestion	4 µg	7,5 µg	1,9	42,1
ADN sans digestion	4 µg	4,72 µg	1,18	60,7

Tableau 17 : Le rendement d'amplification et de marquage d'ADN avec et sans digestion.

II - 3 - 2 - 2 - Hybridation de produits d'amplification génomique total

La totalité des produits d'amplification et marquage de 4 µg d'ADN après digestion a été hybridée sur une lame *Serial Genetics* selon les protocoles d'hybridation et de lavage standards comme indiqué dans la partie matériels et méthodes.

II - 3 - 2 - 3 - Lecture des résultats

Après avoir scanné la lame en utilisant le lecteur IMSTAR "OSA Reader" (figure 74), nous avons constaté, et malgré la grande quantité des produits hybridée, que les signaux des "spots" allumés sont faible. Trois types des sondes validées ont été analysés et quantifiés, il s'agit des sondes V95M, V113F, et T124M. Nous n'avons pas obtenu des signaux pour les sondes C42R WT et MT qui ne se sont pas allumées.

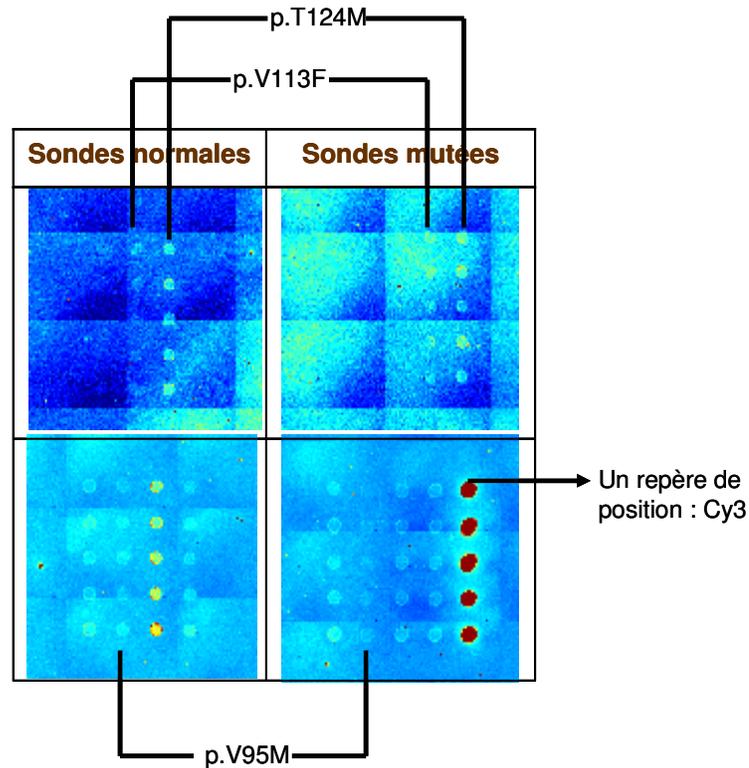


Figure 74 : Lame scannée après l'hybridation d'un produit issu de l'amplification et de marquage d'ADN génomique total.

II - 3 - 2 - 4 - Calcul de taux de discrimination

Les taux de discrimination ont été calculés pour les sondes V95M, T124M, et V113F sauvages (WT). Les résultats obtenus étaient non-significatifs car les taux de discrimination pour ces sondes WT étaient très faibles et proche de 1 ce qui indique une hybridation de masse sur tous les "spots", alors que nous devrions avoir un taux de discrimination beaucoup plus élevé et discriminant car l'échantillon amplifié était normal homozygote. Les taux de discrimination obtenus sont illustrés dans le tableau 18.

Sondes	V95M WT	V113F WT	T124M WT
Taux de discrimination : WT/MT	1,6	0,96	1,2

Tableau 18 : Les taux de discrimination calculés suite à une hybridation d'un produit d'amplification et marquage de l'ADN génomique total.

II - 3 - 3 - Conclusion

Les résultats obtenus après quantification de la lame hybridée indiquent que les signaux obtenus ne sont pas spécifiques. Ceci pourrait être expliqué par le fait que la séquence des sondes n'ait pas été alignée et comparée sur le génome entier. En effet, les sondes utilisées ont été sélectionnées après vérification d'homologie minimale sur les produits de PCR utilisés (individuels ou multiplex) sans vérification d'absence d'homologie sur d'autres séquences du génome. D'autre part, l'hybridation non-spécifique obtenue ici pourrait être due à la petite taille des boucles (15-18 bases) des "*hairpins*" qui contribuent à l'hybridation avec les cibles. Il serait donc nécessaire de refaire un design de sondes plus long afin de les adapter à une hybridation avec de l'ADN issu d'une amplification génomique total.

Troisième Partie

Discussion et Perspectives

III - Discussion et perspectives

Dans cette étude, nous avons étudié la faisabilité du génotypage utilisant des puces à ADN avec un type particulier de sondes en forme d'épingle à cheveux ou "*hairpin*". Ces sondes présentent des séquences de tige et de boucle spécifiques. Ces séquences peuvent donc être optimisées afin qu'une cible parfaitement complémentaire à la boucle, puisse s'hybrider à celle-ci et ainsi obliger la tige à s'ouvrir.

Les altérations géniques étudiées (sept mutations ponctuelles et une délétion) sont hétérozygotes. L'ADN de patients, touchés par ces altérations, était disponible dans notre laboratoire. Les séquences de chaque échantillon avaient déjà fait l'objet d'un séquençage direct. Les altérations étudiées sont localisées sur trois gènes différents causant la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) : le gène *GJB1* (*Cx32*), le gène *MPZ*, et le gène *PMP22*. 100 nM d'oligonucléotides de synthèse ou deux microgrammes de chaque produit PCR a été hybridé par lame.

III - 1 - Evaluation des résultats

La spécificité de la détection des mutations ponctuelles a été optimisée dans un premier temps par l'hybridation d'oligonucléotides de synthèse. Cette spécificité a été estimée par le calcul des deux paramètres ; le taux d'hybridation croisée et le taux de discrimination pour chaque type de sondes. D'après les données issues de l'hybridation d'oligonucléotides de synthèse, nous avons pu définir certains points critiques du protocole: (i) dénaturation des cibles durant 3 minutes à 98°C, (ii) hybridation sur des sondes spottées à 20 µM en tampon phosphate 150 mM, pH 8,3.

Une concentration de 100 nM d'oligonucléotides de synthèse a été finalement choisie pour être le compromis approprié entre la sensibilité, la spécificité et la gamme dynamique ("*dynamic range*") de détection du lecteur de puces. Le taux d'hybridation croisée moyen était inférieur à 3% du signal non spécifique pour toutes les sondes utilisées dans cette étude. D'autre part, tous les taux de discriminations pour les mélanges

d'oligonucléotides représentant les allèles "homozygotes" étaient élevés (>8,5). Pour les mélanges d'oligonucléotides représentant les allèles sauvages et mutés "hétérozygotes", les taux de discrimination étaient voisins de 1, ce qui correspondait à la valeur prévue. Les résultats obtenus étaient très encourageants car ils ont montré une spécificité élevée et des taux élevés de discrimination, permettant la détection de mutations ponctuelles.

Ceci nous a conduit à tester cette méthode en hybridant des produits de PCR issus d'ADN provenant de sujets normaux ou de malades hétérozygotes pour la mutation. Notre but était, d'une part, de tester ces produits de PCR et de vérifier si ceux-ci s'hybridaient bien sur leurs sondes complémentaires et anti-parallèles. D'autre part nous avons cherché à savoir si l'intensité du signal émis était assez forte pour les détecter sans ambiguïté. Nous avons pu détecter et distinguer clairement des séquences normales quatre mutations ponctuelles (V95M, V113F, T124M, et C42R) de patients atteints de CMT. Nous avons validé 8 sondes dont une sonde WT et une sonde MT pour chaque mutation. Les taux de discrimination étaient très élevés et au-dessus de 80 (compris entre 81 et 408) pour les échantillons normaux « homozygotes ». D'autre part, les taux de discrimination étaient voisins de 1 comme prévu pour les échantillons « hétérozygotes » des malades qui portent chacun une mutation.

La puissance de discrimination ("*discrimination power*") entre génotypes a également été estimée pour chaque paire de sondes après hybridation des produits de PCR correspondants, individuellement amplifiés. Cette puissance de discrimination a été calculée en divisant le ratio de S-B entre les allèles normale et mutant obtenus à une position homozygotes (DR, homozygotes), avec le ratio des S-B d'allèles obtenus à une position hétérozygotes (DR, hétérozygotes). Nos puissances de discrimination étaient très hautes et comprise entre 89 et 583. Ces puissances de discrimination concernant les sondes T124M, C42R, V95M et V113F étaient respectivement de 89, 96, 446 et 583.

Les taux de discriminations concernant les produits de PCR issus des échantillons sauvages « homozygotes » obtenus à Limoges en employant le lecteur Imstar étaient clairement plus importants que ceux obtenus par d'autres lecteurs grâce à la haute sensibilité du lecteur Imstar OSA Reader.

De plus, les DRs obtenus avec les produits de PCR individuellement amplifiés sauvages « homozygotes » étaient plus importants que ceux obtenus avec leurs homologues d'oligonucléotides de synthèse. Cette différence peut être attribuée aux quantités relativement élevées de produits de PCR utilisés dans cette étude. Pour un produit de PCR de 363 bases (taille moyenne des amplicons détectés dans cette étude), 2 µg est équivalent à une concentration de 556 nM pour une hybridation dans un volume final de 15 µl. Ceci doit être comparé à 100 nM de solution d'oligonucléotides utilisés dans cette étude. Une deuxième raison pour cette différence de taux de discrimination est la haute sensibilité du lecteur OSA Imstar Reader employé pour les expériences des produits de PCR.

Les sondes 211DelG WT, W140R WT s'hybrident correctement avec leurs cibles correspondantes malgré le faible signal de la première. Cependant, leurs analogues MT n'ont pas donné une hybridation spécifique. Ces sondes MT ont besoin d'une amélioration de spécificité par un nouveau design de leurs architectures afin de pouvoir valider les sondes WT et MT correspondants aux deux mutations concernées.

Les sondes S26L et R220X (WT et MT) n'ont donné aucun signal significatif lors de l'hybridation de leurs cibles correspondantes. Ces sondes ont besoin d'être réétudiées et re-dessinées afin d'augmenter leur spécificité.

La double hybridation (deux produits de PCR différents) n'a pas modifié significativement l'analyse du signal ni les valeurs du taux de discrimination. Les résultats obtenus nous ont permis d'envisager un multiplexage de la méthode "*hairpin*". Cela a été testé dans un premier temps par une amplification PCR multiplexe de trois amplicons comportant chacun un ou deux sites de mutation dont les sondes étaient déjà validées avec des produits de PCR individuellement amplifiés. L'hybridation des produits de PCR issus de cette amplification était très spécifique. Les génotypes obtenus étaient en concordance, d'une part avec ceux obtenus avec le séquençage direct et d'autre part, avec l'hybridation sur puces des produits amplifiés individuellement. Nous avons obtenu des taux de discrimination très satisfaisants soit pour les échantillons provenant des sujets normaux ou des malades. Les taux de discrimination pour les produits de PCR multiplexe issus des échantillons sauvages « homozygotes » (compris entre 18 et 74) étaient moins importants que ceux obtenus avec leurs homologues individuellement amplifiés. Cette différence

pourrait être expliquée par la diminution de disponibilité des sondes "*hairpins*" due à la grande quantité (6 µg) de produit de PCR utilisé pour l'hybridation multiplexe. De plus, les produits de PCR non complémentaires à une sonde donnée pourraient, par leur quantité, empêcher l'hybridation avec la cible correspondante. Le bruit de fond élevé, qui a engendré une baisse des valeurs de S-B lors de l'hybridation de 6 µg de produits de PCR multiplexe, est une cause supplémentaire de cette différence de DRs. Nous pouvons aussi citer l'effet négatif de l'hybridation croisée entre les différents produits de PCR. Les taux de discrimination pour les produits de PCR multiplexe issus des échantillons « hétérozygotes » des malades étaient voisins de 1, comme prévu. Ceci indique une bonne spécificité des sondes.

La puissance de discrimination des différentes sondes était comprise entre 19 et 211 en hybridant les produits de PCR multiplexe. Ces puissances de discrimination étaient respectivement de 211, 30, 19 et 23 pour les sondes T124M, C42R, V95M et V113F. Les résultats issus de l'hybridation multiplexe indiquent un fort potentiel de multiplexage pour la méthode "*hairpin*".

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'amplification et le marquage d'ADN génomique total. Les résultats obtenus ici étaient non significatifs car les taux de discrimination pour les sondes WT déjà validés étaient très faibles et proche de 1 ce qui indique une hybridation de masse sur tous les "*spots*". Cela était dû à la petite taille des boucles (15-18 bases) des "*hairpins*" ce qui a généré cette hybridation non spécifique. Des sondes plus spécifiques devront être dessinées afin d'éviter d'éventuelles hybridations sur des séquences analogues présentes dans le génome. Cela pourrait être corrigé par un nouveau design de sondes plus longues qui augmenterait de manière importante la spécificité de celles-ci. Ensuite, toutes les séquences de sondes "*hairpins*" doivent être alignées sur le génome entier afin de vérifier une homologie minimum de séquence entre les sondes et les cibles non complémentaires.

III - 2 - Quelles sont les causes d'un échec éventuel lors du génotypage par la méthode "*hairpin*" et quelles sont les mesures à prendre afin de les éviter ?

Les causes possibles de l'échec de génotypage par notre méthode peuvent être résumées de la façon suivante: (i) erreur d'hybridation et/ou de préparation des solutions d'hybridation, (ii) formation de structures secondaires, (iii) erreur de "*spotting*", (iv) faible marquage (fluorochrome inactif ou problème lors de l'amplification), (v) défaut de sensibilité du lecteur de puces, (vi) design de la sonde "*hairpin*" imparfait, causant un manque de spécificité.

Afin de réaliser un génotypage fiable par la méthode "*hairpin*", plusieurs étapes indispensables doivent être mise en oeuvre :

- Appliquer rigoureusement les protocoles standard d'hybridation de *Serial Genetics* avec une dénaturation systématique afin d'éliminer une erreur d'hybridation ou une formation de structures secondaires.
- Réaliser un contrôle de "*spotting*" par hybridation d'oligonucléotides de synthèse pour chaque lot de lames fabriqué et avant chaque série de manipulation pour confirmer que le "*spotting*" est correct.
- Réaliser chaque hybridation en duplicata afin de minimiser les erreurs d'hybridation ou de "*spotting*".
- Renouveler périodiquement les jeux d'amorces (tous les 6 mois) et vérifier sur gel la taille et l'efficacité de l'amplification PCR.
- Utiliser un lecteur puissant et sensible.
- Concevoir de nouvelles sondes lorsque celles-ci engendrent des signaux non-spécifiques ou qu'elles ne sont pas allumées après l'hybridation des produits de PCR complémentaires.

Enfin, l'amplification et l'hybridation de produits de PCR plus courts n'a pas fourni d'amélioration de la spécificité ni permis la validation des certaines sondes. Pour cela, nous avons principalement mis en cause le design des "*hairpins*" concernées et la formation de structures secondaires à l'intérieur des amplicons. Naturellement, plus de mutations connues devraient être examinées en utilisant notre méthode afin d'augmenter sa puissance diagnostique. Néanmoins, les résultats obtenus ici sont intéressants une fois comparés à ceux obtenus par d'autres approches de génotypage comme les sondes "*molecular beacons*", APEX ou SBE-tags.

III - 3 - Utilisation de la méthode "*hairpin*" pour le diagnostic de 49 mutations de la Mucoviscidose

Installée au sein de la Génopole d'Evry, la société Serial Genetics s'est spécialisée dans le développement et la commercialisation de kits de diagnostic médical sur biopuces. Cette entreprise exploite sa technique propriétaire HairLoopTM (sondes en forme "*d'hairpin*"), qui permet d'analyser tous les types possibles de mutations de l'ADN, de la simple base modifiée aux grandes délétions. Un kit complet (allant de l'amplification d'ADN jusqu'à l'analyse du signal, figure 75) de diagnostic de la mucoviscidose, HairLoopTM CF, a été commercialisé en septembre 2007 en collaboration avec la société Greiner Bio-One (Frickenhausen, Allemagne). Il repose sur l'analyse des 49 mutations les plus fréquentes du gène CFTR en causes (sur quelque 1 300 mutations connues). Toutes les altérations géniques détectables par ce kit sont montrées dans le tableau 19. Ce test permettra aux laboratoires agréés pour le dépistage de cette maladie génétique de n'utiliser qu'un seul test au lieu de plusieurs actuellement. La durée totale de l'analyse de l'ensemble de ces 49 altérations géniques est estimée à 4h30min. Le protocole d'utilisation du kit est joint en annexe.

Serial Genetics compte aussi proposer en 2008 deux autres tests diagnostiques fondés sur la technologie HairLoopTM. L'un concernera l'hémochromatose, une maladie génétique fréquente caractérisée par une surcharge en fer, l'autre la bêta-thalassémie, maladie de l'hémoglobine dont la forme homozygote est mortelle chez l'enfant et dont le dépistage est assuré actuellement par des technologies de « reverse dot-blot » ou d'électrophorèse en gel dénaturant (DGGE).



Figure 75: Le kit HairLoop™ CF de Serial Genetics pour le diagnostic génétique et l'analyse de mutations de la mucoviscidose.

Exon	Mutation	Exon	Mutation
3	E60X	11	R553X
	G85E		R560T
	394delTT	12	A561E
R117H	1898+1G>A		
4	Y122X	13	2113delA
	621+1 G>T		2183AA>G
	intron 5		711+1 G>T
711+5 G>T			K710X
6a	L206W		intron 14B
	Q220X	15	S945L
	L227R	intron 16	3120+1G>A
7	1078delT	17	3272-26A>G
	R334W		L1065P
	R347P		R1066C
	R347H		Y1092X (C/A)
intron 8	7T	19	R1158X
	9T		R1162X
	5T		3659delC
9	A455E	intron 19	3849+10kbC>T
10	Δ I507	20	G1244E
	Δ F508		S1251N
	1677delTA		3905insT
1717-1G>A	W1282X		
11	G542X	21	4016insT
	S549R (T/G)		N1303K
	G551D		

Tableau 19 : Les altérations géniques détectables par le kit HairLoop™ CF de Serial Genetics.

III - 4 - Comparaison avec d'autres méthodes de génotypage

Nous avons également essayé de comparer nos résultats aux autres méthodes considérées comme efficaces pour la détection des polymorphismes mononucléotidiques ("SNP"). Plusieurs systèmes basés sur le principe des puces à ADN et l'extension de sondes spécifiques ont été décrits. Ces sondes ont des séquences complémentaires des séquences adjacentes du polymorphisme étudié. L'étape d'extension est réalisée en solution comme dans la méthode de l'extension d'une base unique (SBE-tags) (Hirschhorn et al. 2000; Lindroos et al. 2002) ou directement sur la puce dans la méthode APEX ("Arrayed Primer Extension") (Kurg et al. 2000; Le Calvez et al. 2005; Schrijver et al. 2005). Malheureusement, l'analyse de signal n'a pas été détaillée dans ces études. L'exactitude du génotypage a été estimée par un pourcentage et était comprise entre 92 et 97% de l'ensemble des échantillons testés. Ces méthodes nécessitent également des réactions de PCR avant l'étape d'extension. Dans notre méthode, une étape d'extension n'est nécessaire ni en solution comme (SBE-tags), ni sur puce comme la méthode APEX. Ceci rend notre méthode non seulement plus simple et plus rapide, mais également moins consommatrice de réactifs. Ces méthodes, y compris la nôtre, emploient des puces peu coûteuses qui n'exigent aucun matériel supplémentaire que les lecteurs. La technologie d'APEX peut avoir comme conséquence un mésappariement évalué à 10% ("mismatching") engendré par la polymérase (Tonisson et al. 2000). Plusieurs raisons expliquent ce phénomène, l'auto appariement des sondes, l'extension des appariements partiels, et l'extension des appariements de la cible (Nikiforov et al. 1994). Un autre inconvénient de la méthode APEX réside dans la nécessité d'étapes additionnelles d'inactivation de dNTPs non incorporés dans la réaction et d'une fragmentation des produits de PCR (Kringen et al. 2005; Landi et al. 2005). De plus, la puissance de discrimination de notre méthode est sensiblement plus élevée que celle obtenue par APEX (Pastinen et al. 1997).

Des puces à ADN à haute densité (ex: des puces "GeneChips" de "Affymetrix") utilisant des sondes oligonucléotidiques linéaires allèle-spécifiques (ASO ; "allele-specific oligonucleotide") sont largement employées pour le génotypage des polymorphismes mononucléotidiques par l'hybridation différentielle sur les sondes. Ces puces, produites uniquement par des sociétés industrielles spécialisées, emploient un grand nombre de sondes différentes pour le génotype de chaque "SNP" (Borevitz 2006; Matsuzaki et al.

2004a; Matsuzaki et al. 2004b). Actuellement, chacun des deux allèles d'un "SNP" peut être représenté par 10 ou 14 sondes (un ensemble de presque 20 sondes par "SNP") (Lamy et al. 2006). Les conséquences sont une complexité plus élevée menant à un coût important, d'une part, et à une analyse de données plus complexes d'autre part. De plus, ces puces exigent, en général, l'utilisation de méthodes et d'équipements imposés par le fournisseur (lecteurs de puces, logiciel d'analyse). Ces puces ont été également souvent critiquées pour une certaine inflexibilité comme, en particulier, les contraintes de production qui n'ont pas permis de fabriquer (contrairement à notre méthode) une quantité réduite des puces spécifique pour les besoins spécifiques de notre laboratoire. La spécificité du génotypage par cette méthode dépend fortement du contexte de la séquence nucléotidique du "SNPs" et des conditions de réaction (Conner et al. 1983; Southern et al. 1992). Ceci a mené "Affymetrix" à exclure ou remplacer certain "SNPs" dans sa puce de 10K "SNP" (Lamy et al. 2006) à cause de bas taux de révélation ("call rates"), de basse confiance et de faible reproductibilité des résultats. Le génotypage des altérations hétérozygotes est particulièrement difficile en utilisant ces puces (Cronin et al. 1996) où un allèle peut s'hybrider avec une intensité considérablement différente comparée à l'autre. De plus les rendements d'hybridation sont fréquemment bas et variables (Mir and Southern 2000). Il est difficile de comparer la spécificité d'hybridation et l'analyse de signal avec notre méthode en raison de l'utilisation de logiciels d'analyse algorithmique (ex: GDAS, DM, PBG,...) pour les interprétations des données des puces à haute densité. De plus, les résultats de ces analyses sont toujours évalués et présentés par des pourcentages de l'exactitude ("accuracy") et/ou des taux moyens de révélation (Lamy et al. 2006; Matsuzaki et al. 2004a; Matsuzaki et al. 2004b).

D'autres méthodes utilisant des sondes possédant une structure de tige-et-boucle comme par exemple les sondes "*molecular beacons*" ont été décrites comme fiables pour la détection de l'ADN cible non marqué. Ces sondes sont essentiellement employées en solution (Marras et al. 1999; Tyagi et al. 1998; Tyagi and Kramer 1996). L'étude rapportée par Bonnet *et coll.* (Bonnet et al. 1999) employant ces sondes "*molecular beacons*" a démontré que les contraintes structurales sur la sonde mènent à une spécificité augmentée. Cette spécificité est due à leur capacité à former une structure de tige-et-boucle. Ces sondes sont considérablement plus spécifiques que leurs sondes correspondantes linéaires et montrent plus de stabilité et une meilleure sélectivité (Riccelli et al. 2001). Elles peuvent

alors distinguer entre des cibles différentes d'un seul nucléotide (Marras et al. 1999; Tyagi and Kramer 1996). La spécificité des sondes d'oligonucléotides peut être modulée en changeant le degré de contrainte appliqué à leur conformation.

Des études plus récentes ont démontré la possibilité d'utiliser les sondes "*molecular beacons*" couplées aux supports solides comme une méthode efficace pour détecter des polymorphismes mononucléotidiques. Ces études ont utilisé des sondes "*molecular beacons*" modifiées et fixées sur un support solide au lieu de les employer dans la solution, y compris les surfaces de fibre optique (Stemers et al. 2000) et les lames de verre (Ramachandran et al. 2004). Dans ces études, les supports ont servi seulement comme un moyens de couplage tandis que la fonction de la sonde est la même que pour les analyses en solution. Cette méthode partage des similitudes avec notre système de détection. La principale différence de notre étude réside dans le marquage de la cible en incorporant des amorces marquées au cours de l'amplification ce qui réduit le coût de manière importante, alors qu'une cible non-marquée est employée dans l'application des sondes "*molecular beacons*". En utilisant ces sondes, la source de fluorescence est constituée par la dissociation de la tige d'épingle à cheveux et la séparation du fluorochrome et du "*quencher*" situés chacun à une extrémité de la sonde lors de l'hybridation avec la cible.

D'autres études ont décrit des supports solides servant d'agent d'extinction efficaces pour les sondes "*molecular beacons*" immobilisées. Du *et coll.* (Du et al. 2005), ont utilisé un support en or qui a éteint le fluorophore couplé au 3' de la sonde (forme fermée : sans hybridation avec la cible) par un phénomène de "*FRET*" ou "*contact quenching*" processus. Les sondes immobilisées ici ont montré une haute spécificité. Le taux de discrimination était considérablement plus important pour les sondes fixées que pour leurs homologues en solution ayant la même séquence (Du et al. 2005). Ces taux étaient compris entre 2 et 12-fois en discriminant un mésappariement ("*mismatch*") de G/G avec une cible de 24 pb à température ambiante. Nos taux de discrimination étaient plus importants pour les oligonucléotides de synthèse et pour les produits de PCR.

Nous pensons que notre méthode présente différents avantages. Elle est simple, rapide et moins coûteuse pour le génotypage des "*SNPs*" avec des taux de discrimination fiables pour les séquences d'allèles homozygotes ou bien hétérozygotes.

III - 5 - Comment pouvons-nous augmenter la sensibilité de la méthode ?

Les divers travaux que nous avons menés dans l'étude actuelle ont permis une avancée non négligeable de la méthode "*hairpin*". Cependant plusieurs améliorations sont nécessaires pour l'utilisation de cette méthode en routine pour le diagnostic et le génotypage des mutations connues. Malgré la bonne concordance entre les échantillons testés, la sensibilité de l'analyse doit être améliorée pour de futures études. Des quantités relativement élevées de produits de PCR ont été employées dans cette étude. Il est donc nécessaire de travailler sur le procédé proprement dit de façon à améliorer la sensibilité du test pour les sondes validées. Différentes approches pourraient être envisagées :

- 1- Obtenir des produits de PCR simple brin. La solution envisagée est celle de l'utilisation d'une digestion avec une exonuclease lambda après une PCR en utilisant une seule amorce phosphorylée. Après la digestion, nous n'obtenons que le brin complémentaire aux sondes.
- 2- Obtenir des fragments de PCR plus courts, soit par un nouveau design d'amorces, soit par incorporation de dUTP lors de la PCR (mélange de dUTP + 4 dNTPs) dans un premier temps, suivie d'une digestion aléatoire après la PCR avec l'Uracile-N Glycosylase (UNG) pour générer des brins d'ADN de taille restreinte afin d'améliorer l'hybridation sur les sondes "*hairpins*".
- 3- Optimiser d'avantage le marquage des amplicons lors de la PCR ou post-PCR. Le but est d'avoir un meilleur marquage donc un meilleur signal. Une première approche sera de marquer les brins par incorporation des nucléotides couplés à une cyanine et lors de la PCR afin qu'il y ait un meilleur marquage de l'ADN. L'utilisation des fluorochromes qui donnent une meilleure fluorescence (Alexas) est aussi envisageable. Une deuxième approche consisterait à augmenter l'intensité de fluorescence par un marquage après amplification. Cela serait réalisé par couplage de fluorochromes réagissant avec le N7 des guanines pour fournir un complexe stable entre l'acide nucléique et le fluorochrome (ULYSIS[®] Nucleic Acid Labeling Kit, Invitrogen). Le rendement de marquage pour les deux approches serait plus important que le mono-marquage avec un seul fluorochrome couplé par amorce, ce qui était fait jusque là dans

notre étude. Cependant, cette augmentation du marquage pourrait engendrer un bruit de fond plus élevé qui gênerait l'analyse du signal lors de l'hybridation.

Conclusion

IV - Conclusion

Nous espérons avoir montré par ce travail que la détermination de mutations ponctuelles pouvait se faire en utilisant des puces à ADN "microarrays" avec une quantité raisonnable d'effort grâce à l'utilisation de sondes en épingle à cheveux ou "*hairpin*". La méthode présentée ici a mis en évidence des différences très importantes du signal entre les séquences sauvages WT et les séquences mutées MT des produits de PCR humains ne différant que d'une base. Les taux de discrimination et les pouvoirs de discrimination étaient très élevés pour les mutations que nous avons sélectionnées. Il n'en sera peut-être pas de même pour toutes les mutations mais avec un travail d'optimisation cela nous semble probable. Le rendement de cette méthode pourra être encore amélioré par différentes approches de multiplexage.

En ce qui concerne l'application clinique, une grande collaboration entre les laboratoires impliqués dans le diagnostic de la maladie de CMT pourrait voir le jour. Cette collaboration pourrait produire une puce à ADN qui détecterait en un seul passage toutes les mutations de CMT connues actuellement. Les progrès faits en matière de CMT, de diagnostic moléculaire et de génomique permettent de penser que les années à venir vont être, elles-aussi, passionnantes...

Bibliographie

- Aboul-ela, F., D. Koh, I. Tinoco, Jr., and F.H. Martin. 1985. Base-base mismatches. Thermodynamics of double helix formation for dCA3XA3G + dCT3YT3G (X, Y = A,C,G,T). *Nucleic Acids Res* **13**: 4811-4824.
- Ansorge, W., H. Voss, U. Wirkner, C. Schwager, J. Stegemann, R. Pepperkok, J. Zimmermann, and H. Erfle. 1989. Automated Sanger DNA sequencing with one label in less than four lanes on gel. *J Biochem Biophys Methods* **20**: 47-52.
- Bains, W. and G.C. Smith. 1988. A novel method for nucleic acid sequence determination. *J Theor Biol* **135**: 303-307.
- Balice-Gordon, R.J. 1996. Dynamic roles at the neuromuscular junction. Schwann cells. *Curr Biol* **6**: 1054-1056.
- Barczak, A., M.W. Rodriguez, K. Hanspers, L.L. Koth, Y.C. Tai, B.M. Bolstad, T.P. Speed, and D.J. Erle. 2003. Spotted long oligonucleotide arrays for human gene expression analysis. *Genome Res* **13**: 1775-1785.
- Beattie, K., K. Eggers, J. Shumaker, M. Hogan, R. Varma, J. Lamture, M. Hollis, D. Ehrlich, and D. Rathman. 1993. Genosensor technology. *Clinical Chemistry* **39**: 719-722.
- Beaucage, S.L. 2001. Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. *Curr Med Chem* **8**: 1213-1244.
- Beier, M. and J.D. Hoheisel. 1999. Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res* **27**: 1970-1977.
- Boerkoel, C.F., H. Takashima, C.A. Garcia, R.K. Olney, J. Johnson, K. Berry, P. Russo, S. Kennedy, A.S. Teebi, M. Scavina, L.L. Williams, P. Mancias, I.J. Butler, K. Krajewski, M. Shy, and J.R. Lupski. 2002. Charcot-Marie-Tooth disease and related neuropathies: mutation distribution and genotype-phenotype correlation. *Ann Neurol* **51**: 190-201.
- Bonnet, G., S. Tyagi, A. Libchaber, and F.R. Kramer. 1999. Thermodynamic basis of the enhanced specificity of structured DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6171-6176.
- Borevitz, J. 2006. Genotyping and mapping with high-density oligonucleotide arrays. *Methods Mol Biol* **323**: 137-145.
- Bos, J.L., M. Verlaan-de Vries, A.M. Jansen, G.H. Veeneman, J.H. van Boom, and A.J. van der Eb. 1984. Three different mutations in codon 61 of the human N-ras gene

- detected by synthetic oligonucleotide hybridization. *Nucleic Acids Res* **12**: 9155-9163.
- Bosse, F., G. Zoidl, S. Wilms, C.P. Gillen, H.G. Kuhn, and H.W. Muller. 1994. Differential expression of two mRNA species indicates a dual function of peripheral myelin protein PMP22 in cell growth and myelination. *J Neurosci Res* **37**: 529-537.
- Bowtell, D.D. 1999. Options available--from start to finish--for obtaining expression data by microarray. *Nat Genet* **21**: 25-32.
- Broude, N.E., K. Woodward, R. Cavallo, C.R. Cantor, and D. Englert. 2001. DNA microarrays with stem-loop DNA probes: preparation and applications. *Nucleic Acids Res* **29**: E92.
- Brown, P.O. and D. Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* **21**: 33-37.
- Chee, M., R. Yang, E. Hubbell, A. Berno, X.C. Huang, D. Stern, J. Winkler, D.J. Lockhart, M.S. Morris, and S.P. Fodor. 1996. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. *Science* **274**: 610-614.
- Chen, Y.W., P. Zhao, R. Borup, and E.P. Hoffman. 2000. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* **151**: 1321-1336.
- Cheung, V.G., M. Morley, F. Aguilar, A. Massimi, R. Kucherlapati, and G. Childs. 1999. Making and reading microarrays. *Nat Genet* **21**: 15-19.
- Cho, R.J., M.J. Campbell, E.A. Winzeler, L. Steinmetz, A. Conway, L. Wodicka, T.G. Wolfsberg, A.E. Gabrielian, D. Landsman, D.J. Lockhart, and R.W. Davis. 1998. A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol Cell* **2**: 65-73.
- Chu, S., J. DeRisi, M. Eisen, J. Mulholland, D. Botstein, P.O. Brown, and I. Herskowitz. 1998. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**: 699-705.
- Conner, B.J., A.A. Reyes, C. Morin, K. Itakura, R.L. Teplitz, and R.B. Wallace. 1983. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 278-282.
- Cooper, J.P. and P.J. Hagerman. 1990. Analysis of fluorescence energy transfer in duplex and branched DNA molecules. *Biochemistry* **29**: 9261-9268.
- Cronin, M.T., R.V. Fucini, S.M. Kim, R.S. Masino, R.M. Wespi, and C.G. Miyada. 1996. Cystic fibrosis mutation detection by hybridization to light-generated DNA probe arrays. *Hum Mutat* **7**: 244-255.

- Davidsson, J., A. Collin, M. Oreberg, and D. Gisselsson. 2007. Array-based genotype-phenotype correlation in a case of supernumerary ring chromosome 12. *Clin Genet*.
- De Saizieu, A., U. Certa, J. Warrington, C. Gray, W. Keck, and J. Mous. 1998. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* **16**: 45-48.
- DeBellard, M.E., S. Tang, G. Mukhopadhyay, Y.J. Shen, and M.T. Filbin. 1996. Myelin-associated glycoprotein inhibits axonal regeneration from a variety of neurons via interaction with a sialoglycoprotein. *Mol Cell Neurosci* **7**: 89-101.
- Debouck, C. and P.N. Goodfellow. 1999. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet* **21**: 48-50.
- DeRisi, J., L. Penland, P.O. Brown, M.L. Bittner, P.S. Meltzer, M. Ray, Y. Chen, Y.A. Su, and J.M. Trent. 1996. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* **14**: 457-460.
- DeRisi, J.L., V.R. Iyer, and P.O. Brown. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
- Dovichi, N.J. 1997. DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18**: 2393-2399.
- Drmanac, R., S. Drmanac, I. Labat, R. Crkvenjakov, A. Vicentic, and A. Gemmell. 1992. Sequencing by hybridization: towards an automated sequencing of one million M13 clones arrayed on membranes. *Electrophoresis* **13**: 566-573.
- Drmanac, R., I. Labat, I. Brukner, and R. Crkvenjakov. 1989. Sequencing of megabase plus DNA by hybridization: theory of the method. *Genomics* **4**: 114-128.
- Du, H., C.M. Strohsahl, J. Camera, B.L. Miller, and T.D. Krauss. 2005. Sensitivity and specificity of metal surface-immobilized "molecular beacon" biosensors. *J Am Chem Soc* **127**: 7932-7940.
- Dubiley, S., E. Kirillov, and A. Mirzabekov. 1999. Polymorphism analysis and gene detection by minisequencing on an array of gel-immobilized primers. *Nucleic Acids Res* **27**: e19.
- Duggan, D.J., M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, and J.M. Trent. 1999. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**: 10-14.
- Edelmann, L., Hashmi, G., Song, Y., Han, Y., Kornreich, R., and Desnick, R.J. 2004. Cystic fibrosis carrier screening: validation of a novel method using BeadChip technology. *Genet. Med.* **6 (5)**: 431-438.

- Erickson, R.P., T.D. de Stahl, C.E. Bruder, and J.P. Dumanski. 2007. A patient with 22q11.2 deletion and Opitz syndrome-like phenotype has the same deletion as velocardiofacial patients. *Am J Med Genet A*.
- Fan, J.B., Oliphant, A., Shen, R., Kermani, B.G., Garcia, F., Gunderson, K.L., Hansen, M., Steemers, F., Butler, S.L., Deloukas, P., et al. 2003. Highly parallel SNP genotyping. *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* **68**: 69-78.
- Fannon, A.M., D.L. Sherman, G. Ilyina-Gragerova, P.J. Brophy, V.L. Friedrich, Jr., and D.R. Colman. 1995. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol* **129**: 189-202.
- Fodor, S.P., J.L. Read, M.C. Pirrung, L. Stryer, A.T. Lu, and D. Solas. 1991. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science* **251**: 767-773.
- Freeman, W.M., D.J. Robertson, and K.E. Vrana. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques* **29**: 1042-1046, 1048-1055.
- Gerry, N.P., N.E. Witowski, J. Day, R.P. Hammer, G. Barany, and F. Barany. 1999. Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol* **292**: 251-262.
- Giordano, M., P.J. Oefner, P.A. Underhill, L.L. Cavalli Sforza, R. Tosi, and P.M. Richiardi. 1999. Identification by denaturing high-performance liquid chromatography of numerous polymorphisms in a candidate region for multiple sclerosis susceptibility. *Genomics* **56**: 247-253.
- Gogate, N., L. Verma, J.M. Zhou, E. Milward, R. Rusten, M. O'Connor, C. Kufta, J. Kim, L. Hudson, and M. Dubois-Dalcq. 1994. Plasticity in the adult human oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* **14**: 4571-4587.
- Golub, T.R., D.K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J.P. Mesirov, H. Coller, M.L. Loh, J.R. Downing, M.A. Caligiuri, C.D. Bloomfield, and E.S. Lander. 1999. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* **286**: 531-537.
- Graves, D.J., H.J. Su, S. Addya, S. Surrey, and P. Fortina. 2002. Four-laser scanning confocal system for microarray analysis. *Biotechniques* **32**: 346-348, 350, 352, 354.
- Gunderson, K.L., X.C. Huang, M.S. Morris, R.J. Lipshutz, D.J. Lockhart, and M.S. Chee. 1998. Mutation detection by ligation to complete n-mer DNA arrays. *Genome Res* **8**: 1142-1153.
- Gunderson, K.L., F.J. Steemers, H. Ren, P. Ng, L. Zhou, C. Tsan, W. Chang, D. Bullis, J. Musmacker, C. King, L.L. Lebruska, D. Barker, A. Oliphant, K.M. Kuhn, and R. Shen. 2006. Whole-genome genotyping. *Methods Enzymol* **410**: 359-376.

- Hacia, J.G. 1999. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet* **21**: 42-47.
- Hacia, J.G., L.C. Brody, M.S. Chee, S.P. Fodor, and F.S. Collins. 1996. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis. *Nat Genet* **14**: 441-447.
- Hacia, J.G., J.B. Fan, O. Ryder, L. Jin, K. Edgemon, G. Ghandour, R.A. Mayer, B. Sun, L. Hsie, C.M. Robbins, L.C. Brody, D. Wang, E.S. Lander, R. Lipshutz, S.P. Fodor, and F.S. Collins. 1999. Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **22**: 164-167.
- Hacia, J.G., B. Sun, N. Hunt, K. Edgemon, D. Mosbrook, C. Robbins, S.P. Fodor, D.A. Tagle, and F.S. Collins. 1998. Strategies for mutational analysis of the large multiexon ATM gene using high-density oligonucleotide arrays. *Genome Res* **8**: 1245-1258.
- Haff, L.A. and I.P. Smirnov. 1997. Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers. *Nucleic Acids Res* **25**: 3749-3750.
- Head, S.R., Y.H. Rogers, K. Parikh, G. Lan, S. Anderson, P. Goelet, and M.T. Boyce-Jacino. 1997. Nested genetic bit analysis (N-GBA) for mutation detection in the p53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res* **25**: 5065-5071.
- Heller, M.J. 2002. DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* **4**: 129-153.
- Herrmann, M.G., J.D. Durtschi, L.K. Bromley, C.T. Wittwer, and K.V. Voelkerding. 2006. Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes. *Clin Chem* **52**: 494-503.
- Higgins, G.S., D.P. Little, and H. Koster. 1997. Competitive oligonucleotide single-base extension combined with mass spectrometric detection for mutation screening. *Biotechniques* **23**: 710-714.
- Hirschhorn, J.N., P. Sklar, K. Lindblad-Toh, Y.M. Lim, M. Ruiz-Gutierrez, S. Bolk, B. Langhorst, S. Schaffner, E. Winchester, and E.S. Lander. 2000. SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12164-12169.
- Ho-Pun-Cheung, A., S. Choblet, T. Colineau, H. Abaibou, D. Zsoldos, K. Brengel-Pesce, J. Grenier, P. Cleuziat, and E. Lopez-Crapez. 2006. Detection of single nucleotide polymorphisms by minisequencing on a polypyrrole DNA chip designed for medical diagnosis. *Lab Invest* **86**: 304-313.
- Hughes, T.R., M. Mao, A.R. Jones, J. Burchard, M.J. Marton, K.W. Shannon, S.M. Lefkowitz, M. Ziman, J.M. Schelter, M.R. Meyer, S. Kobayashi, C. Davis, H. Dai,

- Y.D. He, S.B. Stephanians, G. Cavet, W.L. Walker, A. West, E. Coffey, D.D. Shoemaker, R. Stoughton, A.P. Blanchard, S.H. Friend, and P.S. Linsley. 2001. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol* **19**: 342-347.
- Iyer, V.R., M.B. Eisen, D.T. Ross, G. Schuler, T. Moore, J.C. Lee, J.M. Trent, L.M. Staudt, J. Hudson, Jr., M.S. Boguski, D. Lashkari, D. Shalon, D. Botstein, and P.O. Brown. 1999. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* **283**: 83-87.
- Jacobs, J.W. and S.P. Fodor. 1994. Combinatorial chemistry--applications of light-directed chemical synthesis. *Trends Biotechnol* **12**: 19-26.
- Jones, A.C., J.R. Sampson, and J.P. Cheadle. 2001. Low level mosaicism detectable by DHPLC but not by direct sequencing. *Hum Mutat* **17**: 233-234.
- Kaderali, L. 2007. Primer design for multiplexed genotyping. *Methods Mol Biol* **402**: 269-286.
- Kallioniemi, A., O.P. Kallioniemi, D. Sudar, D. Rutovitz, J.W. Gray, F. Waldman, and D. Pinkel. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818-821.
- Keller, M.A. 2005. Molecular diagnostic testing for inherited thrombophilia using Invader. *Methods Mol Med* **114**: 107-119.
- Khomyakova, E.B., E.V. Dreval, M. Tran-Dang, M.C. Potier, and F.P. Soussaline. 2004. Innovative instrumentation for microarray scanning and analysis: application for characterization of oligonucleotide duplexes behavior. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **50**: 217-224.
- Khrapko, K.R., P. Lysov Yu, A.A. Khorlin, I.B. Ivanov, G.M. Yershov, S.K. Vasilenko, V.L. Florentiev, and A.D. Mirzabekov. 1991. A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix. *DNA Seq* **1**: 375-388.
- Khrapko, K.R., P. Lysov Yu, A.A. Khorlyn, V.V. Shick, V.L. Florentiev, and A.D. Mirzabekov. 1989. An oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing. *FEBS Lett* **256**: 118-122.
- Kiseleva, V.I., T.B. Kolesnik, M.F. Turchinsky, L.L. Wagner, V.A. Kovalenko, D. Plaksin, B. Koukalova, V. Kuhrova, V. Brabec, and A.M. Poverenny. 1992. Trans-diamminedichloroplatinum (II)-modified probes for detection of picogram quantities of DNA. *Anal Biochem* **206**: 43-49.
- Kringen, P., A. Bergamaschi, E.U. Due, Y. Wang, E. Tagliabue, J.M. Nesland, A. Nehman, N. Tonisson, and A.L. Borresen-Dale. 2005. Evaluation of arrayed primer extension for TP53 mutation detection in breast and ovarian carcinomas. *Biotechniques* **39**: 755-761.

- Kronquist, K.E., B.F. Crandall, W.B. Macklin, and A.T. Campagnoni. 1987. Expression of myelin proteins in the developing human spinal cord: cloning and sequencing of human proteolipid protein cDNA. *J Neurosci Res* **18**: 395-401.
- Krypuy, M., A.A. Ahmed, D. Etemadmoghadam, S.J. Hyland, A. DeFazio, S.B. Fox, J.D. Brenton, D.D. Bowtell, and A. Dobrovic. 2007. High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Cancer* **7**: 168.
- Kuiper, H.A., G.A. Kleter, H.P. Noteborn, and E.J. Kok. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J* **27**: 503-528.
- Kunitsyn, A., S. Kochetkova, E. Timofeev, and V. Florentiev. 1996. Partial thermodynamic parameters for prediction stability and washing behavior of DNA duplexes immobilized on gel matrix. *J Biomol Struct Dyn* **14**: 239-244.
- Kurg, A., N. Tonisson, I. Georgiou, J. Shumaker, J. Tollett, and A. Metspalu. 2000. Arrayed primer extension: solid-phase four-color DNA resequencing and mutation detection technology. *Genet Test* **4**: 1-7.
- Lamtore, J.B., K.L. Beattie, B.E. Burke, M.D. Eggers, D.J. Ehrlich, R. Fowler, M.A. Hollis, B.B. Kosicki, R.K. Reich, S.R. Smith, and et al. 1994. Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Res* **22**: 2121-2125.
- Lamy, P., C.L. Andersen, F.P. Wikman, and C. Wiuf. 2006. Genotyping and annotation of Affymetrix SNP arrays. *Nucleic Acids Res* **34**: e100.
- Landi, S., F. Gemignani, S. Monnier, and F. Canzian. 2005. A database of single-nucleotide polymorphisms and a genotyping microarray for genetic epidemiology of lung cancer. *Exp Lung Res* **31**: 223-258.
- Lane, M.J., T. Paner, I. Kashin, B.D. Faldasz, B. Li, F.J. Gallo, and A.S. Benight. 1997. The thermodynamic advantage of DNA oligonucleotide 'stacking hybridization' reactions: energetics of a DNA nick. *Nucleic Acids Res* **25**: 611-617.
- Le Calvez, F., A. Ahman, N. Tonisson, J. Lambert, S. Temam, P. Brennan, D.G. Zaridze, A. Metspalu, and P. Hainaut. 2005. Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem* **51**: 1284-1287.
- Leal, A., C. Berghoff, M. Berghoff, G. Del Valle, C. Contreras, O. Montoya, E. Hernandez, R. Barrantes, U. Schlotzer-Schrehardt, B. Neundorfer, A. Reis, B. Rautenstrauss, and D. Heuss. 2003. Charcot-Marie-Tooth disease: a novel Tyr145Ser mutation in the myelin protein zero (MPZ, P0) gene causes different phenotypes in homozygous and heterozygous carriers within one family. *Neurogenetics* **4**: 191-197.

- Lee, C.K., R.G. Klopp, R. Weindruch, and T.A. Prolla. 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* **285**: 1390-1393.
- Lee, M. and D.R. Walt. 2000. A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Anal Biochem* **282**: 142-146.
- Lemieux, B., A. Aharoni, and M. Schena. 1998. Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* **4**: 277-289.
- Lemke, G. 1988. Unwrapping the genes of myelin. *Neuron* **1**: 535-543.
- Lemke, G. and R. Axel. 1985. Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell* **40**: 501-508.
- Lennon, G.G. and H. Lehrach. 1991. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. *Trends Genet* **7**: 314-317.
- Li, A.X., Seul, M., Cicciarelli, J., Yang, J.C. and Iwaki Y. 2004. Multiplexed analysis of polymorphisms in the HLA gene complex using bead array chips. *Tissue Antigens* **36 (6)**: 518-528.
- Liew, M., R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon, and C. Wittwer. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* **50**: 1156-1164.
- Lindblad-Toh, K., D.M. Tanenbaum, M.J. Daly, E. Winchester, W.O. Lui, A. Villapakkam, S.E. Stanton, C. Larsson, T.J. Hudson, B.E. Johnson, E.S. Lander, and M. Meyerson. 2000a. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* **18**: 1001-1005.
- Lindblad-Toh, K., E. Winchester, M.J. Daly, D.G. Wang, J.N. Hirschhorn, J.P. Laviolette, K. Ardlie, D.E. Reich, E. Robinson, P. Sklar, N. Shah, D. Thomas, J.B. Fan, T. Gingeras, J. Warrington, N. Patil, T.J. Hudson, and E.S. Lander. 2000b. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse. *Nat Genet* **24**: 381-386.
- Lindroos, K., S. Sigurdsson, K. Johansson, L. Ronnblom, and A.C. Syvanen. 2002. Multiplex SNP genotyping in pooled DNA samples by a four-colour microarray system. *Nucleic Acids Res* **30**: e70.
- Liotta, L. and E. Petricoin. 2000. Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet* **1**: 48-56.
- Lipshutz, R.J., S.P. Fodor, T.R. Gingeras, and D.J. Lockhart. 1999. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet* **21**: 20-24.
- Lipshutz, R.J., D. Morris, M. Chee, E. Hubbell, M.J. Kozal, N. Shah, N. Shen, R. Yang, and S.P. Fodor. 1995. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* **19**: 442-447.

- Little, D.P., A. Braun, M.J. O'Donnell, and H. Koster. 1997. Mass spectrometry from miniaturized arrays for full comparative DNA analysis. *Nat Med* **3**: 1413-1416.
- Livache, T., A. Roget, E. Dejean, C. Barthet, G. Bidan, and R. Teoule. 1994. Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res* **22**: 2915-2921.
- Livak, K.J. 1999. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* **14**: 143-149.
- Livak, K.J., J. Marmaro, and J.A. Todd. 1995. Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nat Genet* **9**: 341-342.
- Livshits, M.A., V.L. Florentiev, and A.D. Mirzabekov. 1994. Dissociation of duplexes formed by hybridization of DNA with gel-immobilized oligonucleotides. *J Biomol Struct Dyn* **11**: 783-795.
- Ly, D.H., D.J. Lockhart, R.A. Lerner, and P.G. Schultz. 2000. Mitotic misregulation and human aging. *Science* **287**: 2486-2492.
- Lyamichev, V., A.L. Mast, J.G. Hall, J.R. Prudent, M.W. Kaiser, T. Takova, R.W. Kwiatkowski, T.J. Sander, M. de Arruda, D.A. Arco, B.P. Neri, and M.A. Brow. 1999. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* **17**: 292-296.
- Lysov Iu, P., V.L. Florent'ev, A.A. Khorlin, K.R. Khrapko, and V.V. Shik. 1988. [Determination of the nucleotide sequence of DNA using hybridization with oligonucleotides. A new method]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **303**: 1508-1511.
- Macdonald, S.J., T. Pastinen, A. Genissel, T.W. Cornforth, and A.D. Long. 2005. A low-cost open-source SNP genotyping platform for association mapping applications. *Genome Biol* **6**: R105.
- Mantripragada, K.K., P.G. Buckley, T.D. de Stahl, and J.P. Dumanski. 2004. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends Genet* **20**: 87-94.
- Marques, W., Jr., M.G. Hanna, S.R. Marques, M.G. Sweeney, P.K. Thomas, and N.W. Wood. 1999. Phenotypic variation of a new P0 mutation in genetically identical twins. *J Neurol* **246**: 596-599.
- Marras, S.A., F.R. Kramer, and S. Tyagi. 1999. Multiplex detection of single-nucleotide variations using molecular beacons. *Genet Anal* **14**: 151-156.
- Marshall, A. and J. Hodgson. 1998. DNA chips: an array of possibilities. *Nat Biotechnol* **16**: 27-31.
- Marton, M.J., J.L. DeRisi, H.A. Bennett, V.R. Iyer, M.R. Meyer, C.J. Roberts, R. Stoughton, J. Burchard, D. Slade, H. Dai, D.E. Bassett, Jr., L.H. Hartwell, P.O.

- Brown, and S.H. Friend. 1998. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med* **4**: 1293-1301.
- Mashal, R.D., J. Koontz, and J. Sklar. 1995. Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases. *Nat Genet* **9**: 177-183.
- Maskos, U. and E.M. Southern. 1992. Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Res* **20**: 1675-1678.
- Matson, R.S., J. Rampal, S.L. Pentoney, Jr., P.D. Anderson, and P. Coassin. 1995. Biopolymer synthesis on polypropylene supports: oligonucleotide arrays. *Anal Biochem* **224**: 110-116.
- Matson, R.S., J.B. Rampal, and P.J. Coassin. 1994. Biopolymer synthesis on polypropylene supports. I. Oligonucleotides. *Anal Biochem* **217**: 306-310.
- Matsuzaki, H., H. Loi, S. Dong, Y.Y. Tsai, J. Fang, J. Law, X. Di, W.M. Liu, G. Yang, G. Liu, J. Huang, G.C. Kennedy, T.B. Ryder, G.A. Marcus, P.S. Walsh, M.D. Shriver, J.M. Puck, K.W. Jones, and R. Mei. 2004a. Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Res* **14**: 414-425.
- Matsuzaki, H., S. Dong, H. Loi, X. Di, G. Liu, E. Hubbell, J. Law, T. Berntsen, M. Chadha, H. Hui, G. Yang, G.C. Kennedy, T.A. Webster, S. Cawley, P.S. Walsh, K.W. Jones, S.P. Fodor, and R. Mei. 2004b. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* **1**: 109-111.
- McGall, G., J. Labadie, P. Brock, G. Wallraff, T. Nguyen, and W. Hinsberg. 1996. Light-directed synthesis of high-density oligonucleotide arrays using semiconductor photoresists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13555-13560.
- McGall, G.H. and F.C. Christians. 2002. High-density genechip oligonucleotide probe arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **77**: 21-42.
- Mein, C.A., B.J. Barratt, M.G. Dunn, T. Siegmund, A.N. Smith, L. Esposito, S. Nutland, H.E. Stevens, A.J. Wilson, M.S. Phillips, N. Jarvis, S. Law, M. de Arruda, and J.A. Todd. 2000. Evaluation of single nucleotide polymorphism typing with invader on PCR amplicons and its automation. *Genome Res* **10**: 330-343.
- Meinkoth, J. and G. Wahl. 1984. Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* **138**: 267-284.
- Meldal, M. and K. Breddam. 1991. Anthranilamide and nitrotyrosine as a donor-acceptor pair in internally quenched fluorescent substrates for endopeptidases: multicolumn peptide synthesis of enzyme substrates for subtilisin Carlsberg and pepsin. *Anal Biochem* **195**: 141-147.

- Mergny, J.L., A.S. Boutorine, T. Garestier, F. Belloc, M. Rougee, N.V. Bulychev, A.A. Koshkin, J. Bourson, A.V. Lebedev, B. Valeur, and et al. 1994. Fluorescence energy transfer as a probe for nucleic acid structures and sequences. *Nucleic Acids Res* **22**: 920-928.
- Mir, K.U. and E.M. Southern. 2000. Sequence variation in genes and genomic DNA: methods for large-scale analysis. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **1**: 329-360.
- Mirsky, R. and K.R. Jessen. 1996. Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr Opin Neurobiol* **6**: 89-96.
- Morgan, L., K.R. Jessen, and R. Mirsky. 1994. Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3. *Development* **120**: 1399-1409.
- Morrison, L.E., T.C. Halder, and L.M. Stols. 1989. Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Anal Biochem* **183**: 231-244.
- Mrksich, M., L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1997. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp Cell Res* **235**: 305-313.
- Myers, R.M., Z. Larin, and T. Maniatis. 1985. Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science* **230**: 1242-1246.
- Nikiforov, T.T., R.B. Rendle, P. Goelet, Y.H. Rogers, M.L. Kotewicz, S. Anderson, G.L. Trainor, and M.R. Knapp. 1994. Genetic Bit Analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* **22**: 4167-4175.
- O'Donnell-Maloney, M.J., C.L. Smith, and C.R. Cantor. 1996. The development of microfabricated arrays for DNA sequencing and analysis. *Trends Biotechnol* **14**: 401-407.
- O'Donovan, M.C., P.J. Oefner, S.C. Roberts, J. Austin, B. Hoogendoorn, C. Guy, G. Speight, M. Upadhyaya, S.S. Sommer, and P. McGuffin. 1998. Blind analysis of denaturing high-performance liquid chromatography as a tool for mutation detection. *Genomics* **52**: 44-49.
- Oliphant, A., Barker, D.L., Stuelpnagel, J.R., Chee, M.S. 2002. BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. *Biotechniques Suppl*:56-58, 60-51

- O'Meara, D., P. Nilsson, P.A. Nygren, M. Uhlen, and J. Lundeberg. 1998. Capture of single-stranded DNA assisted by oligonucleotide modules. *Anal Biochem* **255**: 195-203.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 2766-2770.
- Parinov, S., V. Barsky, G. Yershov, E. Kirillov, E. Timofeev, A. Belgovskiy, and A. Mirzabekov. 1996. DNA sequencing by hybridization to microchip octa- and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. *Nucleic Acids Res* **24**: 2998-3004.
- Pastinen, T., A. Kurg, A. Metspalu, L. Peltonen, and A.C. Syvanen. 1997. Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res* **7**: 606-614.
- Pastinen, T., K. Liitsola, P. Niini, M. Salminen, and A.C. Syvanen. 1998. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**: 695-698.
- Pastinen, T., M. Perola, P. Niini, J. Terwilliger, V. Salomaa, E. Vartiainen, L. Peltonen, and A. Syvanen. 1998. Array-based multiplex analysis of candidate genes reveals two independent and additive genetic risk factors for myocardial infarction in the Finnish population. *Hum Mol Genet* **7**: 1453-1462.
- Pastinen, T., M. Raitio, K. Lindroos, P. Tainola, L. Peltonen, and A.C. Syvanen. 2000. A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on microarrays. *Genome Res* **10**: 1031-1042.
- Pease, A.C., D. Solas, E.J. Sullivan, M.T. Cronin, C.P. Holmes, and S.P. Fodor. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5022-5026.
- Peters, A. 1960. The formation and structure of myelin sheaths in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* **8**: 431-446.
- Peters, A. 1960. The structure of myelin sheaths in the central nervous system of *Xenopus laevis* (Daudin). *J Biophys Biochem Cytol* **7**: 121-126.
- Phimister, B. 1999. Going global. *Nature Genetics* **21**: 1.
- Pirastu, M., Y.W. Kan, A. Cao, B.J. Conner, R.L. Teplitz, and R.B. Wallace. 1983. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia. Detection of a single nucleotide mutation in DNA. *N Engl J Med* **309**: 284-287.
- Pogue, R., S. West, and K. Bushby. 1998. Multiplex SSCP and heteroduplex analysis with Southern hybridization for large-scale mutation detection. *Genomics* **54**: 1-4.

- Ragoussis, J., G.P. Elvidge, K. Kaur, and S. Colella. 2006. Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet* **2**: e100.
- Ramachandran, A., J. Flinchbaugh, P. Ayoubi, G.A. Olah, and J.R. Malayer. 2004. Target discrimination by surface-immobilized molecular beacons designed to detect *Francisella tularensis*. *Biosens Bioelectron* **19**: 727-736.
- Ramsay, G. 1998. DNA chips: state-of-the art. *Nat Biotechnol* **16**: 40-44.
- Ranvier, M. 1878. Leçons sur l'Histologie du Système Nerveux. *Librairie F. Savy, Paris*.
- Religio, A., C. Schwager, A. Richter, W. Ansorge, and J. Valcarcel. 2002. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res* **30**: e51.
- Remahl, S. and C. Hildebrand. 1990. Relations between axons and oligodendroglial cells during initial myelination. II. The individual axon. *J Neurocytol* **19**: 883-898.
- Riccelli, P.V., F. Merante, K.T. Leung, S. Bortolin, R.L. Zastawny, R. Janeczko, and A.S. Benight. 2001. Hybridization of single-stranded DNA targets to immobilized complementary DNA probes: comparison of hairpin versus linear capture probes. *Nucleic Acids Res* **29**: 996-1004.
- Roberts, R., A.F. Stewart, G.A. Wells, K.A. Williams, N. Kavaslar, and R. McPherson. 2007. Identifying genes for coronary artery disease: An idea whose time has come. *Can J Cardiol* **23 Suppl A**: 7A-15A.
- Rockett, J.C. and D.J. Dix. 2000. DNA arrays: technology, options and toxicological applications. *Xenobiotica* **30**: 155-177.
- Roth, H.J., K.E. Kronquist, N. Kerlero de Rosbo, B.F. Crandall, and A.T. Campagnoni. 1987. Evidence for the expression of four myelin basic protein variants in the developing human spinal cord through cDNA cloning. *J Neurosci Res* **17**: 321-328.
- Rumsby, M.G. 1978. Organization and structure in central-nerve myelin. *Biochem Soc Trans* **6**: 448-462.
- Rychlik, W. and R.E. Rhoads. 1989. A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and in vitro amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* **17**: 8543-8551.
- Saiki, R.K., P.S. Walsh, C.H. Levenson, and H.A. Erlich. 1989. Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 6230-6234.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.

- Sanlaville, D., J.M. Lapiere, A. Coquin, C. Turleau, J. Vermeesch, L. Colleaux, G. Borck, M. Vekemans, A. Aurias, and S.P. Romana. 2005. [Microarray CGH: principle and use for constitutional disorders]. *Arch Pediatr* **12**: 1515-1520.
- Sauer, S. 2006. Typing of single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry: principles and diagnostic applications. *Clin Chim Acta* **363**: 95-105.
- Scherer, S.S., S.M. Deschenes, Y.T. Xu, J.B. Grinspan, K.H. Fischbeck, and D.L. Paul. 1995. Connexin32 is a myelin-related protein in the PNS and CNS. *J Neurosci* **15**: 8281-8294.
- Schrijver, I., M. Kulm, P.I. Gardner, E.P. Pergament, and M.B. Fiddler. 2007. Comprehensive arrayed primer extension array for the detection of 59 sequence variants in 15 conditions prevalent among the (Ashkenazi) Jewish population. *J Mol Diagn* **9**: 228-236.
- Schrijver, I., E. Oitmaa, A. Metspalu, and P. Gardner. 2005. Genotyping microarray for the detection of more than 200 CFTR mutations in ethnically diverse populations. *J Mol Diagn* **7**: 375-387.
- Selvin, P.R. and J.E. Hearst. 1994. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: improvements on fluorescence energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10024-10028.
- Senderek, J., V.T. Ramaekers, K. Zerres, S. Rudnik-Schoneborn, J.M. Schroder, and C. Bergmann. 2001. Phenotypic variation of a novel nonsense mutation in the P0 intracellular domain. *J Neurol Sci* **192**: 49-51.
- Shumaker, J.M., A. Metspalu, and C.T. Caskey. 1996. Mutation detection by solid phase primer extension. *Hum Mutat* **7**: 346-354.
- Skre, H. 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* **6**: 98-118.
- Slavin, A.J., T.G. Johns, J.M. Orian, and C.C. Bernard. 1997. Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development. *Dev Neurosci* **19**: 69-78.
- Smith, L.M., J.Z. Sanders, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C.R. Connell, C. Heiner, S.B. Kent, and L.E. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-679.
- Southern, E., K. Mir, and M. Shchepinov. 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet* **21**: 5-9.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517.

- Southern, E.M. 1996. DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genet* **12**: 110-115.
- Southern, E.M., U. Maskos, and J.K. Elder. 1992. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics* **13**: 1008-1017.
- Spellman, P.T., G. Sherlock, M.Q. Zhang, V.R. Iyer, K. Anders, M.B. Eisen, P.O. Brown, D. Botstein, and B. Futcher. 1998. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273-3297.
- Starr, A., H.J. Michalewski, F.G. Zeng, S. Fujikawa-Brooks, F. Linthicum, C.S. Kim, D. Winnier, and B. Keats. 2003. Pathology and physiology of auditory neuropathy with a novel mutation in the MPZ gene (Tyr145->Ser). *Brain* **126**: 1604-1619.
- Stemers, F.J., J.A. Ferguson, and D.R. Walt. 2000. Screening unlabeled DNA targets with randomly ordered fiber-optic gene arrays. *Nat Biotechnol* **18**: 91-94.
- Strezoska, Z., T. Paunesku, D. Radosavljevic, I. Labat, R. Drmanac, and R. Crkvenjakov. 1991. DNA sequencing by hybridization: 100 bases read by a non-gel-based method. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10089-10093.
- Stryer, L. 1978. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem* **47**: 819-846.
- Suter, U. and G.J. Snipes. 1995. Biology and genetics of hereditary motor and sensory neuropathies. *Annu Rev Neurosci* **18**: 45-75.
- Syvanen, A.C., K. Aalto-Setälä, L. Harju, K. Kontula, and H. Soderlund. 1990. A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* **8**: 684-692.
- Takashima, H., C.F. Boerkoel, and J.R. Lupski. 2001. Screening for mutations in a genetically heterogeneous disorder: DHPLC versus DNA sequence for mutation detection in multiple genes causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Genet Med* **3**: 335-342.
- Tang, J., Q. He, H. Chen, and N. He. 2005. Synthesis and hybridization studies of DNA on functionalized polypropylene surfaces. *J Nanosci Nanotechnol* **5**: 1225-1229.
- Timofeev, E., S.V. Kochetkova, A.D. Mirzabekov, and V.L. Florentiev. 1996. Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res* **24**: 3142-3148.
- Tobe, V.O., S.L. Taylor, and D.A. Nickerson. 1996. Single-well genotyping of diallelic sequence variations by a two-color ELISA-based oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res* **24**: 3728-3732.

- Tonisson, N., A. Kurg, K. Kaasik, E. Lohmussaar, and A. Metspalu. 2000. Unravelling genetic data by arrayed primer extension. *Clin Chem Lab Med* **38**: 165-170.
- Topilko, P., S. Schneider-Maunoury, G. Levi, A. Baron-Van Evercooren, A.B. Chennoufi, T. Seitanidou, C. Babinet, and P. Charnay. 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**: 796-799.
- Tost, J. and I.G. Gut. 2005. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* **38**: 335-350.
- Triggs, W.J., R.H. Brown, Jr., and D.L. Menkes. 2006. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 18-2006. A 57-year-old woman with numbness and weakness of the feet and legs. *N Engl J Med* **354**: 2584-2592.
- Tyagi, S., D.P. Bratu, and F.R. Kramer. 1998. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* **16**: 49-53.
- Tyagi, S. and F.R. Kramer. 1996. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* **14**: 303-308.
- Underhill, P.A., L. Jin, A.A. Lin, S.Q. Mehdi, T. Jenkins, D. Vollrath, R.W. Davis, L.L. Cavalli-Sforza, and P.J. Oefner. 1997. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* **7**: 996-1005.
- Van Moorsel, C.H., E.E. van Wijngaarden, I.F. Fokkema, J.T. den Dunnen, D. Roos, R. van Zwieten, P.C. Giordano, and C.L. Harteveld. 2004. beta-Globin mutation detection by tagged single-base extension and hybridization to universal glass and flow-through microarrays. *Eur J Hum Genet* **12**: 567-573.
- Virchow, R. 1854. Uber das ausgebreite vorkommen einer der Nervenmark analogen Substanz in den tierischen Geweben. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* **6**: 562.
- Wallace, R.B., J. Shaffer, R.F. Murphy, J. Bonner, T. Hirose, and K. Itakura. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res* **6**: 3543-3557.
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M.S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T.J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, and E.S. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* **280**: 1077-1082.
- Wang, I.M., S. Stepaniants, Y. Boie, J.R. Mortimer, B. Kennedy, M. Elliott, S. Hayashi, L. Loy, S. Coulter, S. Cervino, J. Harris, M. Thornton, R. Raubertas, C. Roberts, J.C. Hogg, M. Crackower, G. O'Neill, and P.D. Pare. 2007. Gene Expression Profiling in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer. *Am J Respir Crit Care Med.*

- Wang, J., X. Cai, G. Rivas, H. Shiraishi, P.A. Farias, and N. Dontha. 1996. DNA electrochemical biosensor for the detection of short DNA sequences related to the human immunodeficiency virus. *Anal Chem* **68**: 2629-2634.
- Warner, L.E., M.J. Hilz, S.H. Appel, J.M. Killian, E.H. Kolodry, G. Karpati, S. Carpenter, G.V. Watters, C. Wheeler, D. Witt, A. Bodell, E. Nelis, C. Van Broeckhoven, and J.R. Lupski. 1996. Clinical phenotypes of different MPZ (P0) mutations may include Charcot-Marie-Tooth type 1B, Dejerine-Sottas, and congenital hypomyelination. *Neuron* **17**: 451-460.
- Wilson, S.B., S.C. Kent, H.F. Horton, A.A. Hill, P.L. Bollyky, D.A. Hafler, J.L. Strominger, and M.C. Byrne. 2000. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 7411-7416.
- Yershov, G., V. Barsky, A. Belgovskiy, E. Kirillov, E. Kreindlin, I. Ivanov, S. Parinov, D. Guschin, A. Drobishev, S. Dubiley, and A. Mirzabekov. 1996. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 4913-4918.
- Yoneda, K., M.M. Chang, K. Chmiel, Y. Chen, and R. Wu. 2003. Application of high-density DNA microarray to study smoke- and hydrogen peroxide-induced injury and repair in human bronchial epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* **14**: S284-289.
- Zhang, Y., M.Y. Coyne, S.G. Will, C.H. Levenson, and E.S. Kawasaki. 1991. Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* **19**: 3929-3933.
- Zorick, T.S., D.E. Syroid, E. Arroyo, S.S. Scherer, and G. Lemke. 1996. The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol Cell Neurosci* **8**: 129-145.

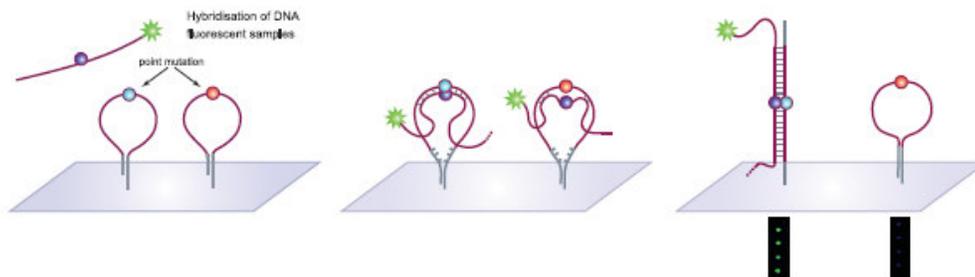
Annexes

Annexe 1 : Article publié dans Biotechniques

Annexe 2 : Article en cours de soumission

Annexe 3 : Prtocolé du kit HairLoopTM CF

Annexe 3



Principle of HairLoop™ hybridisation technology

HairLoop™ CF at a glance:

- Simultaneous detection of 49 mutations in the CFTR gene
- Complete kit for 10 samples with DNA-arrays and solutions
- Automatic scanning, data collection and report generation with CheckScanner™ and CheckReport™ Software
- High specificity using HairLoop™ technology
- Best pan-ethnic coverage available, relevant to European populations

HairLoop™ CF is a test kit for the simultaneous qualitative *in vitro* detection of 49 mutations in the CFTR gene (OMIM™ gene number 602421) in DNA preparations from human whole blood. DNA is extracted and amplified in a multiplex PCR reaction. 17 fragments are amplified from the CFTR gene together with 3 fragments from other human genes for control purposes. In total, the PCR is a 20-plex reaction. Primers for amplification reaction are fluorescent, being labelled with Cy™5 dye. Amplified fragments are subsequently digested by the exonuclease lambda, to give single-stranded fluorescent fragments.

In a second step, the amplified products are hybridised for 60 min at room temperature to specific DNA-probes fixed on the DNA-chip.

HairLoop™ CF assays use the HairLoop™ specific hybridisation technology. HairLoop™ is a hairpin-shaped, single-stranded DNA molecule, consisting of a probe sequence embedded between complementary sequences that form a hairpin stem. The stem is attached to the micro-array surface by only one of its strands. In the absence of an amplified DNA (target), the HairLoop™ is held in the closed state. When the target binds perfectly to its HairLoop™ (no mismatch), the greater stability of the probe-target helix forces the stem to unwind, resulting in an opening of the HairLoop™. Due to these unique structural and thermodynamic properties, HairLoop™ offers several advantages over linear probes, one of which is their increased specificity differentiating between two DNA targets that differ by as little as a single nucleotide⁴⁴.

Finally, unbound DNA is washed away and the HairLoop™ CF slide is automatically scanned, analysed and evaluated using the CheckScanner™ and CheckReport™ Software.

The innovative HairLoop™ design of the HairLoop™ CF Kit permits the control of all critical steps during processing of the slide (DNA amplification and digestion, DNA hybridisation).



Cat.-No.	468 070	468 010
Description	HairLoop™ CF Kit Genotyping of 49 mutations in the CFTR gene	HairLoop™ CF Kit Genotyping of 49 mutations in the CFTR gene
Reactions per case	1 x 10	5 x 2

Working schedule for HairLoop™ CF Kit



1 Sample collection

- whole blood sample



2 DNA Extraction

Duration: 30 min

Fast DNA extraction from whole blood with commercial kits or conventional protocols*.



3 PCR and Digestion

Duration: 120 + 30 min

Multiplex amplification reaction including CFTR and control gene amplifications.
A post-PCR digestion with exonuclease lambda results in the generation of single-stranded DNA fragments.
Thermostable DNA-polymerase and nucleotides needed but not provided*.



4 Hybridisation

Duration: 60 min

Hybridisation to the HairLoop™ CF DNA-chip. The hybridisation is performed at room temperature in the dark.



5 Washing

Duration: 10 min

Sample DNA is removed from the HairLoop™ CF DNA-chip by three rapid and stringent washing steps at room temperature.



6 Scanning

Duration: 10 min

HairLoop™ CF DNA-chip is scanned using the CheckScanner™, a two-colour laser scanner with excitation wavelength of 532nm and 635nm.



7 Evaluation

Duration: 5 min

Automatic evaluation and report generation are done with the easy-to-use CheckReport™ Software.

* Recommended kits must be used in conjunction with the HairLoop™ CF kit. For more details see the HairLoop™ CF kit manual.

¹ www.genet.sickkids.on.ca/cftr

² In US available for RESEARCH USE ONLY

³ http://www.scmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/cf.htm

⁴ Tjagi, S. and Kramer, F. S. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridisation (1995) Nature Biotechnology 14, 303 - 306.

⁵ Patsek A. S., Tjagi S., Pohl A. C., Talant A., Miller L. R., Kramer F. R. and Allend D. Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. (1998) Nature Biotechnology 16, 350 - 363.

⁶ Mamas, S., Kramer, F. S. and Tjagi, S. Genotyping SNPs With Molecular Beacons. In "Single Nucleotide Polymorphism Methods and Protocols" pp. 111-126. Hwok, P.J.-Yan Ed. 2002. ISBN: 1-59259-327-5. Methods in Molecular Biology Series, Humana Press, Totowa, NJ, USA.

Liste des abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AGT	Amplification Génomique Total
APEX	Arrayed Primer Extension
ASO	Allele-Specific Oligonucleotide
CCD	Charge-Coupled Device
CE	Capillary Electrophoresis
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CHR	Cross Hybridization Rate ; taux d'hybridation croisée
CMT	Maladie de Charcot-Marie-Tooth
CSH	Contiguous Stacking Hybridization
Cx32	Connexine, 32KDa
dATP	désoxy Adénosine Triphosphate
dCTP	désoxy Cytosine Triphosphate
dGTP	désoxy Guanine Triphosphate
dHPLC	denaturing High-Performance Liquid Chromatography
dNTP	désoxy Nucléotide Triphosphate
DO	Densité optique
DR	Discrimination Rate ; taux de discrimination
dUTP	désoxy Uracile Triphosphate
ENMG	Electroneuromyographique
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography ; chromatographie liquide sous haute pression
MAG	Myelin Associated Glycoprotein
MBP	Myelin Basic Protein; Protéines basiques de la myéline
MM	Mismatched
MOG	Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein

MS	Mass Spectrometry
MT	Une séquence (de sonde ou cible) représentant un allèle muté de la mutation considérée ("mutant type")
NPH	Neuropathie Périphérique Hériditaire
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Poly-Ethylene-Glycole
PLP	Les protéolipides majeurs de la myéline
PM	Perfectly Matched
PMP22	Peripheral Myelin Protein, 22KDa
PMT	Photo-Multiplier Tube
RT	Reverse Transcriptase
S	Signal
S/B	Ratio du Signal sur le Bruit de fond
S-B	Signal "moins" Bruit de fond
SBE	Single Base Extension
SNP	Single-Nucleotide Polymorphism ; Polymorphisme mononucléotidique
TEAA	Acétate de tri-éthylammonium
TE	Tris-EDTA
UH	Unité d'hybridation
VCM	Vitesse de Conduction Motrice
WT	Une séquence (de sonde ou cible) représentant un allèle sauvage de la mutation considérée ("wild type")