

FRÉDÉRIC RAYMOND

**DÉVELOPPEMENT D'UNE PLATE-FORME DE
BIOPUCE COMPATIBLE AVEC LE DIAGNOSTIC
MOLÉCULAIRE DES MALADIES INFECTIEUSES**

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise microbiologie-immunologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

OCTOBRE, 2004

Résumé

La technologie des biopuces permettrait une détection rapide et multiparamétrique des microorganismes infectieux et des gènes de résistance aux antibiotiques qui leur sont associés. Deux aspects des biopuces ont été étudiés durant ce projet. Premièrement, dans le but de faciliter la conception des sondes de capture, nous avons évalué l'influence de la position de la cible hybridée par une sonde. Nous avons observé que la longueur des chaînes non-hybridées dépassant de la sonde de capture avait une influence sur le signal d'hybridation obtenu et pouvait être responsable de faux-négatifs. Deuxièmement, afin de contribuer à éliminer la nécessité de l'amplification et du marquage des acides nucléiques cibles, nous avons développé une biopuce composée de sondes APN immobilisées sur une lame de verre. Cette biopuce permettra l'utilisation d'un polymère cationique senseur d'acides nucléiques comme transducteur de l'hybridation.

Abstract

Biochip technology could allow rapid multiparametric diagnosis of infectious diseases and related antimicrobial resistance genes. Two aspects of biochips were studied during this project. First, to facilitate DNA or PNA capture probes design, we studied the impact on hybridisation signal of the position targeted by the probe. We observed that the length of the target's non-hybridised overhangs had an influence on obtained hybridisation signal and that it could be responsible for false-negatives. Second, in order to contribute to the elimination of sample nucleic acids amplification and labelling before hybridisation, we developed a biochip made of PNA probes immobilised on a glass slides. This biochip allows detection using a soluble fluorescent cationic polythiophene that acts as hybridisation transducer.

Avant-Propos

Je désire avant tout remercier le Dr. Michel G. Bergeron qui m'a accueilli dans son équipe et qui m'a permis de prendre part à ce projet passionnant. Je désire aussi remercier Régis Peytavi, qui m'a supervisé au cours de ce projet et m'a conseillé tout au long de ma maîtrise, François Picard, dont les conseils ont toujours été utiles, Luc Bissonnette, dont les idées ont été un moteur important à mon projet, et Maurice Boissinot, dont la rigueur et les critiques m'ont beaucoup appris. Je désire aussi remercier Liu Ying Tang pour son bon travail ainsi que tous les autres membres de l'équipe Diagnostic Moléculaires, qui ont toujours été disponibles pour les conseils et le plaisir. Je veux aussi remercier Mario Leclerc et son équipe, en particulier Hoang-Anh Ho, avec qui ce fut un plaisir de collaborer et sans qui ce projet n'aurait pu être accompli. Finalement, je désire remercier Caroline ainsi que mes parents, dont le support et les encouragements m'ont toujours poussé à aller plus loin.

Les sections 2.2 à 2.6 de ce mémoire reproduisent l'article intitulé « Correlation between the position of capture probes on target nucleic acids and the efficiency of microarray DNA hybridisation » qui a été soumis au journal *Nucleic Acids Research*. Ses auteurs sont Régis Peytavi, Liu-ying Tang, Frédéric R. Raymond, Luc Bissonnette, Maurice Boissinot, François J. Picard, Ann Huletsky, Paul H. Roy, Marc Ouellette et Michel G. Bergeron. J'ai contribué à la moitié de la préparation de cet article. Entre autres, j'ai effectué une revue exhaustive de la littérature, réalisé les expériences avec Mme Tang, et élaboré le modèle et rédigé l'article avec M. Peytavi, mon supérieur immédiat. Des modifications mineures ont pu être apportées à cet article afin d'assurer son uniformité avec le reste du mémoire.

Le corps du chapitre 3 de ce mémoire provient de l'article intitulé : « Solid-state detection of DNA using fluorescent cationic polymer and peptide nucleic acid (PNA) probes », qui a été soumis au journal *BMC Biotechnology*. Ses auteurs sont Frédéric R. Raymond, Hoang-Anh Ho, Régis Peytavi, Luc Bissonnette, Maurice Boissinot, François J. Picard, Mario Leclerc et Michel G. Bergeron. Hoang-Ang Ho et moi-même sommes auteurs à titre égal de cet article. À l'exception de la synthèse du polymère senseur d'acides nucléiques, qui a été préparé par M. Ho, j'ai réalisé et analysé toutes les expériences. De plus, j'ai contribué à la moitié du travail de rédaction, l'autre moitié ayant été rédigée par M. Ho. Des

modifications mineures ont pu être apportées à cet article afin d'assurer son uniformité avec le reste du mémoire.

Pour Caroline, qui est toujours là

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	vi
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations et symboles.....	x
Liste des abréviations et symboles.....	x
Chapitre I – Introduction.....	1
1.1 Diagnostic et biopuces.....	1
1.1.1 Problématique du diagnostic rapide.....	1
1.1.2 Problématique d'utilisation diagnostique des biopuces.....	1
1.2 Biopuces.....	3
1.2.1 La chimie des surfaces.....	3
1.2.3 Les sondes.....	5
1.2.4 La dynamique de l'hybridation.....	11
1.2.5 La détection de l'hybridation.....	13
1.3 Objectifs généraux et spécifiques.....	16
Chapitre II - Correlation entre l'efficacité d'hybridation et la position de la sonde de capture sur l'ADN cible.....	17
2.1 Résumé français.....	19
2.2 Résumé anglais.....	20
2.3 Introduction.....	21
2.4 Materials and methods.....	23
2.5 Results and discussion.....	27
2.6 Acknowledgement.....	38
2.7 Addendum à l'article Correlation between the position of capture probes on target nucleic acids and the efficiency of microarray DNA hybridisation.....	39
2.7.1 Introduction.....	39
2.7.2 Matériel et méthodes.....	40
2.7.3 Résultats et discussion.....	43
Chapitre III - Détection d'ADN non-marqué en utilisant un polymère cationique fluorescent et des sondes d'acides peptido-nucléiques.....	47
3.1 Résumé français.....	49
3.2 Introduction.....	50
3.3 Materials and methods.....	51
3.4 Results and discussion.....	53
3.6 Acknowledgement.....	57
Chapitre IV – Conclusions.....	58
4.1 Conclusions.....	59
4.2 Perspectives.....	62
Bibliographie.....	64

Liste des tableaux

Tableau 1. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification du gène <i>bla_{SHV-1}</i>	40
---	----

Liste des figures

- Figure 1. Représentation schématique de la structure moléculaire d'analogues neutres d'acides nucléiques. A) Acide désoxyribonucléique (ADN), B) acide peptido-nucléique (APN) et C) méthylphosphonate (MPP).5
- Figure 2. Position of capture probes and PCR primers on the *ErmB* gene amplicons of either 402 bp (A) or 432 bp (B). Arrows represent primers used for generating the amplicons. Dashed boxes represent 5' amino-modified probes. Brackets indicate the length of the 5' overhanging tail for each capture probe.27
- Figure 3. Correlation between the fluorescence intensity and the length of the 5' overhang of the captured *ermB* amplicon strand. Panel A shows results for capture probes ErmB272 and ErmB272a hybridising to both *ermB* amplicons (*i.e.* 402- and 432-bp amplicons). Panel B shows hybridisation of probes ErmB370 and ErmB370a hybridising to both *ermB* amplicons. Panel C shows hybridisation of probes ErmB459 and ErmB459a hybridising to both *ermB* amplicons. Each value represents the mean of three replicates. Standard deviation for these replicates is also shown.29
- Figure 4. Hybridisation kinetics for the six oligonucleotide probes targeting *ErmB*. Arrays were hybridised for 15, 30, 60, 180 and 960 minutes (16 hours) to the denatured double-stranded 432-bp *ermB* amplicon. (A) Hybridisation to capture probe ErmB272a (163 bp to 5'). (B) Hybridisation to capture probe ErmB370 (151 bp to 5' end). (C) Hybridisation to capture probe ErmB459 (62 bp to 5' end). (D) Hybridisation to capture probe ErmB272 (249 bp to 5' end). (E) Hybridisation to capture probe ErmB370 (261 bp to 5' end). (F) Hybridisation to capture probe probe ErmB459a (350 bp to 5' end). Each value is the mean of three replicates. Standard deviation for these replicates is also shown. The scale for the fluorescence intensity axis is different for each panel to better illustrate the shape of the curves.30
- Figure 5. Possible interactions between an immobilised DNA probe and the two strands of the target amplicon. The target strand (T*) hybridise to the DNA probe, leaving a 5' overhang of variable length depending on the location of the region of the captured amplicon strand targeted by the probe. (A) Long 5' overhang and short 3' tail directed towards the glass support. (B) Short 5' overhang and long 3' tail. (C) The free complementary strand of the target amplicon (T') hybridises to the 5' overhanging tail of T*, thereby generating a branch migration that causes destabilisation of the secondary complex. (D) The free T* (T*_{free}) complex hybridises to the free 5' end region of T', thereby generating an antagonistic branch migration that prevents the first branch migration from breaking the secondary complex.32
- Figure 6. Hybridisation of the *ErmB* array to single-stranded target 432-bp amplicon strand (T*) generated by asymmetrical PCR followed by hybridisation with the complementary amplicon strand (T') also generated by asymmetrical PCR. T* was hybridised for 10 hours to the *ErmB* array. Non-hybridized T* (T*_{free}) complex was

then washed away and the array was hybridised for another 16 hours with an equimolar quantity of the complementary strand T' in hybridisation buffer (grey boxes) or with hybridisation buffer alone (black boxes). (A) Hybridisation to the lower strand of the 432-bp amplicon followed by hybridisation to the upper strand of the amplicon. (B) Hybridisation to the upper strand of the 432-bp amplicon followed by hybridisation to the lower strand of the amplicon. Each result is the mean of three replicates.35

Figure 7. Influence de la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon sur le signal d'hybridation. Le signal obtenu après une hybridation de 16 heures entre les sondes et les amplicons est représenté selon la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon pour chacune des trois sondes utilisées. Influence de la longueur de l'extrémité 5' sur l'hybridation d'un amplicon à A) une sonde APN de 15 nucléotides, B) une sonde ADN de 15 nucléotides et C) une sonde ADN de 20 nucléotides. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de triplicats intra-expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de ces trois résultats.44

Figure 8. Principles of glass modification. Silanisation of microscope slides, followed by activation of amine with carbonyldiimidazole (CDI) to attach arrayed PNA (or oligonucleotide) capture probe on the surface.53

Figure 9. Cationic polythiophene transducer for the fluorometric detection of hybridisation on microarrays. A) Schematic depiction of the interaction between cationic polymers and a) single stranded DNA, b) double-stranded DNA, c) single stranded PNA and d) PNA-DNA duplex. Cationic fluorescent polymer is shown in yellow, DNA is shown in green and PNA is shown in red. B) Experimental results for fluorometric detection on microarray when cationic polythiophene transducer is reacted with a) single stranded DNA, b) double-stranded DNA, c) single stranded PNA and d) PNA-DNA duplex. Results are shown in triplicate.55

Figure 10. Specificity of oligonucleotides' hybridisation to PNA probes when polymeric detection is used as transducer. Hybridisations were done at room temperature with a concentration of 7.5×10^{10} targets per μl . Hybridisation of PNA probes to complementary, centrally mismatched and twice mismatched oligonucleotides were done three times each. Fluorescence intensities of probes were corrected by subtraction of background fluorescence intensity.55

Liste des abréviations et symboles

°C	degré Celcius
A	adénine
ADN	acide désoxyribonucléique
APN	acide peptido-nucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
boc	<i>tert</i> -butyloxy-carboxyl
bp	<i>base pair</i> (paires de bases)
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	cytosine
dATP	désoxyadénosine triphosphate
dCTP	désoxycytidine triphosphate
DeltaG	différence d'énergie libre
dGTP	désoxyguanosine triphosphate
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dTTP	désoxythymidine triphosphate
dUTP	désoxyuridine triphosphate
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl
G	guanine
HCl	acide chlorhydrique
hr	<i>hour</i>
K	Kelvin
kcal	kilocalorie
KCl	chlorure de potassium
M	molaire
MeOH	méthanol
mL	millilitre
μL	microlitre

mm	millimètre
mol	mole
MPP	méthylphosphonate
μM	micromolaire
Na^+	ions sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	potentiel hydrogène
PNA	<i>peptide nucleic acid</i> (voir APN)
PVP	<i>polyvinyl pyrrolidone</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SiO_2	dioxyde de silice
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSPE	<i>salt sodium phosphate EDTA</i>
T	thymine
T_m	<i>melting temperature</i>

Chapitre I – Introduction

1.1 Diagnostic et biopuces

1.1.1 Problématique du diagnostic rapide

L'identification phénotypique des bactéries est utilisée depuis plus de 125 ans dans les laboratoires de microbiologie clinique pour identifier les agents pathogènes. Comme ces méthodes sont basées sur les propriétés de croissance des microorganismes, une incubation d'au moins 16 heures est essentielle à l'identification des bactéries et, en général, un minimum de 36 à 48 heures s'écoulent avant que le médecin n'obtienne les résultats de l'analyse des échantillons envoyés au laboratoire de microbiologie clinique. C'est pour cette raison que le clinicien prescrit souvent, en premier lieu, des antibiotiques à large spectre. Parfois, il ne vérifiera les résultats d'analyses que s'il y a échec thérapeutique. Si le médecin connaissait l'identité de l'agent infectieux responsable de la maladie de son patient, il serait en mesure de prescrire immédiatement le traitement approprié. En plus de diminuer les coûts liés à la thérapie, cela limiterait les échecs thérapeutiques ainsi que la sélection de mutants résistants aux antibiotiques (1).

Le test diagnostic idéal est rapide, simple et peu coûteux. Ce test consiste en un système fermé qui nécessite peu d'étapes et qui est assez rapide (moins d'une heure) pour être fait sans que le patient ne quitte la clinique (2-4). Idéalement, le test détecte une multitude de pathogènes, de facteurs de virulence et de gènes de résistance aux antibiotiques (5-8). La technologie des biopuces peut répondre à ce besoin, car elle permet d'aligner plusieurs milliers de sondes sur une surface de quelques centimètres carrés. Si la biopuce était intégrée dans un système microfluidique, la technologie serait adéquate pour un diagnostic moléculaire en milieu clinique (9-15).

1.1.2 Problématique d'utilisation diagnostique des biopuces

Quatre critères permettent l'évaluation des qualités analytiques d'un test diagnostic. Le test doit être rapide, spécifique, sensible et ubiquitaire (1). Lorsque le test en question utilise une biopuce, la spécificité (capacité de différencier des espèces différentes, mais apparentées) et l'ubiquité (capacité de détecter toutes les souches d'une même espèce) dépendent surtout des différences de séquence entre les cibles et les autres acides

nucléiques présents dans les échantillons. Ils dépendent aussi des conditions d'hybridation, qui détermineront la capacité du test à différencier des séquences similaires. Pour ce qui est de la sensibilité, la limite de détection de la méthode doit permettre de détecter la dose infectieuse, c'est-à-dire la quantité minimale de microorganismes nécessaires à l'infection.

Plusieurs exemples de biopuces permettant l'identification et la caractérisation de microorganismes peuvent être cités. Par exemple, des matrices de sondes ont été développées pour l'identification de pathotypes d'*Escherichia coli* et des gènes de virulence associés (16), de mutations responsables de la résistance aux fluoroquinolones chez *Streptococcus pneumoniae* (17), de *Mycobacterium tuberculosis* résistants à la rifampin (18), de rotavirus humains du groupe A (19), de bactéries de la flore intestinale (20) et d'autres cibles importantes pour le diagnostic clinique (21-23).

1.2 Biopuces

Une biopuce, ou *microarray*, est un outil d'analyse des acides nucléiques composé d'un support solide sur lequel des fragments d'ADN, des sondes, ont été déposés à des positions spécifiques (24,25). Le principe d'hybridation de l'ADN selon le modèle de Watson-Crick est à la base de la technologie des biopuces. Ainsi, selon sa séquence, chaque fragment d'ADN correspond à une question qui pourrait être décrite ainsi : « le complémentaire de cette sonde de capture est-il présent dans l'échantillon analysé ? » Dans des conditions appropriées, une biopuce incubée avec de l'ADN cible marqué permet de répondre aux questions posées. L'appariement des cibles aux sondes de capture entraînera l'apparition d'un signal localisé à la position de la sonde. Ainsi, la présence ou l'absence de signal sur une sonde indique si son complémentaire est présent ou non dans l'échantillon.

Deux éléments composent la biopuce : un support solide réactif et des sondes immobilisées sur ce support. Après un événement d'hybridation entre les sondes de capture et un échantillon d'acides nucléiques marqués, une étape de détection est effectuée afin d'associer chaque sonde à un signal qui sera proportionnel à la quantité de cibles complémentaires hybridées à la sonde de capture (26-28).

1.2.1 La chimie des surfaces

La nature et la qualité de la surface utilisée pour immobiliser les sondes aura une influence sur la qualité et la reproductibilité des résultats obtenus. Plusieurs critères définissent la qualité de la surface utilisée comme support solide d'hybridation (24). Elle doit être plate, uniforme, durable, inerte, efficace et accessible à l'hybridation. Le support peut être solide (verre, plastique, etc.) ou semi-solide (gel). La lame de verre de 25 mm X 76 mm X 0.94 mm constitue un support de taille standard qui est devenu le principal support pour la création de puces à ADN. Le verre ne contribuant pas à la fluorescence mesurée, il constitue un support inerte idéal. L'efficacité d'attachement des sondes au support solide dépendra du revêtement et de la chimie d'attachement.

Des lames avec divers revêtements de surface sont disponibles commercialement, mais elles peuvent aussi être fabriquées par l'utilisateur. Pour la préparation de biopuces

destinées à l'étude de l'expression génique, des surfaces de verre couvertes de poly-L-lysines peuvent être utilisées pour lier des sondes de plus de 70 nucléotides (26). Dans ces conditions, les molécules de poly-L-lysine, chargées positivement, s'adsorbent à la surface de verre, chargée négativement. L'ADN, quand à lui, réagit par électrostatisme avec la poly-L-lysine et il se couche sur le support.

Lorsque les sondes sont des oligonucléotides, il est préférable d'établir un lien covalent entre la surface et une extrémité de la sonde. Les organosilanes, des composés organométalliques contenant une partie silane et une partie organique, réagissent avec le dioxyde de silice (SiO_2) composant le verre et s'y lient de façon covalente, ce qui permet d'ajouter sur le verre des groupements réactifs qui peuvent ensuite être modifiés chimiquement selon les besoins de l'utilisateur (24,29). Parmi les organosilanes disponibles, les plus communs sont l'aminopropyltriméthoxysilane, qui permet de couvrir la surface de verre de groupements amines, et le mercaptosilane, qui permet de couvrir les surfaces de groupements thiols. Plusieurs combinaisons revêtement-modification de la sonde sont possibles. Des surfaces couvertes de groupements aldéhyde (30), de groupements époxy (31) ou de groupements amine activés (32) permettront l'attachement de sondes modifiées par un groupement amine. Une surface couverte de thiols permettra l'attachement de sondes modifiées par un thiol (33,34).

La surface utilisée peut aussi avoir un impact sur l'hybridation. Une surface chargée positivement attirera les acides nucléiques tandis qu'une surface chargée négativement les repoussera. La charge de la surface aura aussi un impact sur la conformation de la couche de sondes. Une charge positive fera s'affaisser sur la surface les sondes ADN chargées négativement, tandis qu'une surface de charge négative les fera se dresser perpendiculairement à la surface (29,35). Une surface solide peut aussi être couverte de dendrimères, c'est-à-dire que des groupements réactifs ramifiés couvrent la surface, chacun de ces groupements permettant la liaison de multiples sondes en un point de la surface de la lame. Cette technologie favorisera une haute densité de sondes tout en rendant les sondes plus accessibles en diminuant les contraintes d'encombrement stérique (36,37).

1.2.3 Les sondes

Selon la séquence des sondes composant la biopuce, différents gènes et allèles seront ciblés. Un choix adéquat de la séquence des sondes permettra à la biopuce d'être spécifique et ubiquitaire. Cependant, il n'y a toujours pas de méthode infaillible permettant la conception sans erreur de sondes de qualité. Plusieurs auteurs observent des sondes faussement négatives qu'ils sont incapables d'expliquer (20,22).

En plus d'être définies par leurs séquences, les sondes peuvent être de nature chimique différente. Le type de sonde le plus utilisé consiste en un acide désoxyribonucléique permettant l'hybridation d'une séquence complémentaire (26-28). Des analogues d'acides nucléiques comme l'acide peptido-nucléique (APN) et le méthylphosphonate (MPP) peuvent aussi être utilisés (Figure 1). Comme leurs propriétés diffèrent de celles de l'ADN, ils sont mieux adaptés à certaines utilisations, par exemple les études de spécificité (38-40). Au cours des dernières années, des protéines, anticorps, toxines, sucres et autres molécules de natures diverses ont été utilisées comme sondes sur des biopuces (41,42).

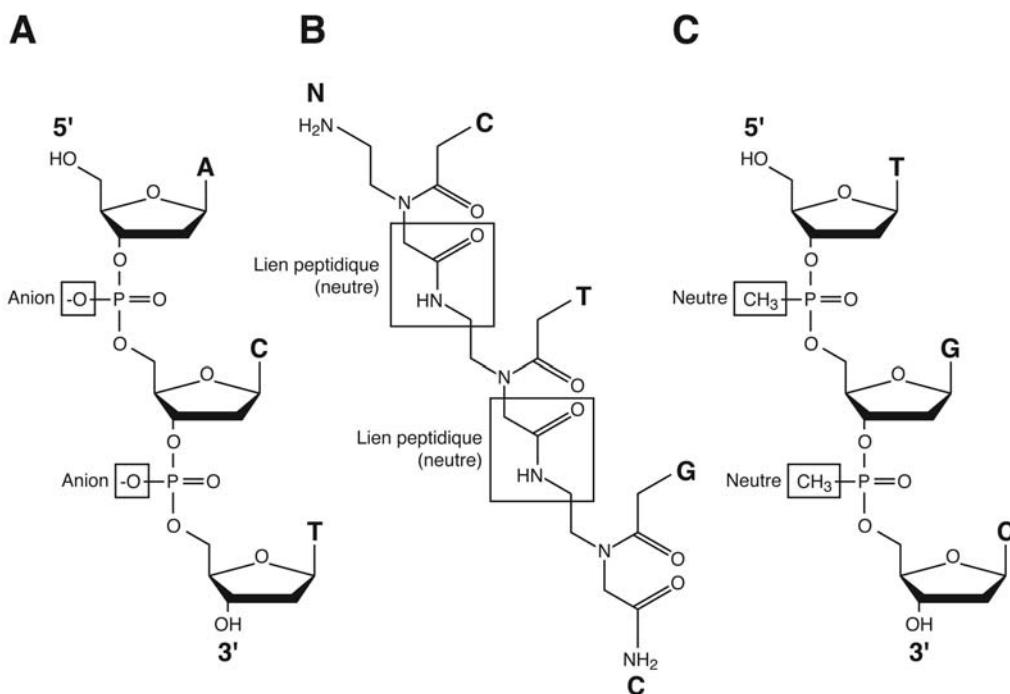


Figure 1. Représentation schématique de la structure moléculaire d'analogues neutres d'acides nucléiques. A) Acide désoxyribonucléique (ADN), B) acide peptido-nucléique (APN) et C) méthylphosphonate (MPP).

1.2.3.1 Structure et propriétés des acides désoxyribonucléiques

1.2.3.1 La complémentarité

Dans une cellule, la double hélice d'ADN est composée de deux brins complémentaires et antiparallèles liés entre eux par des ponts hydrogène. Chaque brin est un long polymère linéaire dans lequel se succèdent quatre nucléotides qui ont le même squelette ribose-phosphate, mais dont la base diffère (Figure 1A). Les purines adénine et guanine lient respectivement les pyrimidines thymine et cytosine (43-45). En plus d'être essentiel à sa réplication, la complémentarité de l'ADN constitue le principe fondamental derrière la technologie des biopuces. En utilisant une séquence d'ADN synthétique, il est possible d'interroger un échantillon sur la présence d'une séquence complémentaire à celle d'une sonde de séquence connue (16,26,28).

1.2.3.2 Les liaisons hydrogène

L'adénine et la thymine sont liées par deux liens hydrogène alors que la guanine et la cytosine le sont par trois liens (43). Cela ne serait pas uniquement causé par une complémentarité géométrique des bases, mais surtout par une complémentarité électronique. Dans le cas de l'ADN simple brin, les ponts hydrogène entre les bases sont remplacés par des ponts hydrogène avec des molécules d'eau (43). Même si des appariements non-complémentaires peuvent aussi former des ponts hydrogène entre les bases, ces interactions sont moins stables (46). Dans un contexte d'hybridation, il est possible qu'un appariement ne suivant pas les règles de Watson et Crick augmente la stabilité d'un duplex partiellement complémentaire (47,48). Par exemple, Ito *et al.* ont montré que la différence entre les températures de fusion de duplexes d'ADN complémentaires et divergents d'un polymorphisme dépendaient de l'identité des bases non-complémentaires (49). Dans le cas d'un duplex complémentaire G-C/C-G, la température de fusion était 70°C. Dans le cas de paires non-complémentaires G-A/A-G ou G-G/A-A, les températures de fusion étaient respectivement de 58°C et de 40°C.

1.2.3.3 Les autres forces impliquées

Ce n'est pas sans raison que l'ADN double brin forme une double hélice régulière. Même si les ponts hydrogène ont une importance primordiale dans la complémentarité de l'ADN,

c'est l'empilement des bases qui joue le premier rôle dans la stabilisation de la double-hélice. Les bases ayant une structure planaire, elles s'empilent parallèlement les unes sur les autres, leur hydrophobicité stabilisant l'hélice. Même si chaque nucléotide peut subir une torsion en six points différents, cette torsion est restreinte, ce qui augmente la stabilité de la double hélice. La présence des anneaux ribose et des interactions non-covalentes entre les groupements phosphates raidit la double hélice, restreignant ses possibilités de rotation. Aussi, les bases causent de l'encombrement stérique. Pour ce qui est du squelette de l'ADN, les interactions électrostatiques répulsives entre les groupements phosphates (chargés négativement) stabilisent la structure du duplex. (43).

1.2.3.2 Structures et propriétés des acides peptido-nucléiques

L'acide peptido-nucléique est un hybride entre un acide nucléique et une protéine. L'APN conserve les bases (adénine, guanine, thymine et cytosine) de l'acide désoxyribonucléique, mais échange le squelette ribose-phosphate contre un pseudo-peptide (Figure 1B). L'APN conserve les propriétés inhérentes aux acides nucléiques, en particulier la capacité de s'hybrider à l'ADN en formant des paires de bases Watson-Crick (50), tout en possédant de nouvelles qualités, attribuables à son squelette peptidique (39,40,51-57).

À l'origine, l'APN a été créé pour s'attacher au grand sillon de l'ADN double brin tout en reconnaissant une séquence spécifique. La modélisation moléculaire a permis à l'équipe de Ole Buchardt et de Peter Neilson de sélectionner le squelette pseudo-peptidique qui permettrait à l'APN d'avoir une structure homomorphique à celle de l'ADN. Ils espéraient que cet analogue d'acides nucléiques soit en mesure d'empêcher l'expression de certains gènes en se liant à des ARNm (58). Comme la structure de l'APN se rapproche de celle de l'ADN, il peut aussi hybrider spécifiquement de l'ADN simple brin (39,40,54).

1.2.3.2.1 Structure et méthode de synthèse

Contrairement au squelette phosphodiester de l'ADN (Figure 1A), l'acide peptido-nucléique est composé d'une série de 2-aminoethyl glycines attachés entre eux par des liaisons amide (Figure 1B). Les bases sont attachées au squelette par une liaison carboxylique. Comme l'APN ne contient aucun sucre ni aucun phosphate, son squelette est acyclique, achiral et neutre. Par convention, l'extrémité N-terminale de l'APN correspond à

l'extrémité 5' de l'ADN et l'extrémité C-terminale de l'APN à l'extrémité 3' de l'ADN. Comme l'unité de base du squelette de l'APN est un acide aminé, la synthèse des APNs demande l'utilisation des technologies conventionnelles de synthèse peptidique sur phase solide. (53)

1.2.3.2.3 Propriétés des APNs

Les propriétés propres à l'APN sont dues à la structure et à la charge de son squelette. Comparativement à un duplex ADN-ADN, la température de fusion d'un duplex antiparallèle APN-ADN a une température de fusion qui augmente d'environ 1,5 K par base. Dans le cas d'un duplex APN-ARN, la température de fusion augmente de 0,2 à 0,5 K par base comparativement au duplex APN-ADN (40,59-61). L'hybridation d'un APN à un ADN est possible à la fois de manière parallèle et antiparallèle. Cependant, des études de cinétique ont montré que le complexe antiparallèle était formé plus rapidement que le complexe parallèle, qui est moins stable et nécessite plusieurs heures à se former (39). Certaines séquences d'ADN double-brin sont favorables à l'invasion par l'APN, phénomène qui consiste au déplacement d'un des deux brins du duplex ADN-ADN par l'APN qui s'hybridera à l'autre brin (62). L'invasion de séquence est favorisée par une région riche en A-T ainsi que par une concentration faible en sels lors de l'hybridation. L'APN est aussi capable de former une triple-hélice, que ce soit avec de l'ADN double brin ou avec un duplex APN-ADN. Contrairement à l'invasion de séquence, la formation d'une triple hélice ne nécessite pas de bris de ponts hydrogène (39,40,63-65).

L'absence de charge du squelette de l'APN accélère la cinétique de l'hybridation et est en partie responsable de l'avidité accrue de l'APN pour son complémentaire, qu'il s'agisse d'ADN, d'ARN ou d'APN (39). Cela est dû à l'absence de répulsion électrostatique entre les brins. Pour cette même raison, la température de fusion d'un duplex ADN-APN, ARN-APN ou APN-APN est peu influencée par la présence de sels (66). Aussi, de par son squelette synthétique, l'APN n'est pas reconnu par les enzymes reconnaissant les acides nucléiques tels que les nucléases, les protéases et les polymérases.

Malgré ses qualités, la faible solubilité des APNs peut être un problème (40). Comme son squelette est neutre et les bases hydrophobes, la solubilité de l'APN diminue en fonction de

sa longueur et de son ratio purine/pyrimidine. L'ajout de résidus chargés, comme la lysine, augmente significativement la solubilité de l'APN (67).

1.2.3.3 Paramètres influençant la conception des sondes

1.2.3.3.1 Paramètres thermodynamiques

La première étape de la préparation d'une biopuce est la conception des sondes. Le choix de la séquence des sondes est préalable à la spécificité, à l'ubiquité et même à la sensibilité de la biopuce. La première étape de la conception d'une sonde est la comparaison de séquences de gènes afin de sélectionner une sonde ciblant les gènes et allèles appropriés. Suite au choix de la séquence, une recherche dans les banques de données permet de vérifier la spécificité et l'ubiquité théoriques de la sonde sélectionnée (24,68). Des paramètres thermodynamiques sont aussi étudiés, en particulier l'uniformité du T_m des sondes utilisées simultanément et la formation de structures secondaires intramoléculaires (69-71). Même s'il n'y a pas de règles permettant la conception à tout coup de sondes de qualité, l'évaluation des propriétés thermodynamiques d'une sonde permettra d'éliminer des sondes qui auraient été peu efficaces. Les propriétés thermodynamiques d'une sonde influencent la sensibilité, la spécificité, l'ubiquité et la rapidité de l'hybridation. Trois paramètres thermodynamiques peuvent être calculés : l'énergie d'hybridation spécifique, l'énergie de liaison intramoléculaire et l'énergie de liaison avec les séquences non-complémentaires présentes dans l'échantillon (72,73). Le calcul de l'énergie de liaison (ΔG) entre une sonde et sa cible permet d'éliminer celles qui auraient de faibles températures de fusion. Le calcul de la force des structures internes de la sonde ou entre deux oligonucléotides permettent d'éliminer les sondes qui auraient tendance à former des épingles à cheveux ou des duplexes les empêchant d'hybrider leur cible. Un dernier calcul peut être effectué afin d'améliorer la spécificité de l'hybridation : l'évaluation de l'énergie de liaison entre la sonde et les séquences non ciblées (humaines, bactériennes, virales, etc.) contenues dans les banques de données. Ces trois calculs permettront d'éviter des problèmes de sensibilité et d'ubiquité. Un autre paramètre pouvant être examiné lors de l'évaluation d'une sonde est la formation de structures secondaires par la cible (74,75). Si la cible est un ARNm ou un ADN simple-brin, l'évaluation des structures secondaires de la cible est recommandée (72). Parmi les solutions permettant d'éviter les problèmes de

structures secondaires de la cible, des oligonucléotides « helpers » peuvent être hybridés en périphérie de la sonde, ce qui permet de stabiliser l'hybridation de la sonde à sa cible en empêchant la formation de structures secondaires sur la cible (72). La longueur de la sonde est aussi un facteur à considérer. Une sonde longue permettra une meilleure sensibilité qu'une sonde courte, mais sa spécificité sera réduite (20,69). Religio *et al.* ont montré qu'une sonde de 30 ou de 35 nucléotides était de 2 à 2,5 fois plus sensible qu'une sonde de 25 nucléotides. Cependant, une sonde de 25 nucléotides est environ 1,6 fois plus spécifique qu'une sonde de 30 nucléotides et 2,4 fois plus spécifique qu'une sonde de 35 nucléotides (69).

1.2.3.3.2 Paramètres stériques

Les paramètres stériques influençant l'hybridation ne concernent pas la séquence de la sonde, mais les autres contraintes physiques devant être considérées afin d'améliorer l'hybridation. L'encombrement stérique dépend de trois facteurs : la densité de sondes, la distance entre la sonde et la surface ainsi que les propriétés de cette surface, c'est-à-dire son hydrophobicité et sa charge (29,34,35). Selon la longueur de la sonde, ces paramètres auront plus ou moins d'importance. Dans le cas de sondes courtes, l'encombrement stérique aura un impact plus important que dans le cas de sondes longues ; c'est pour cette raison que l'ajout d'espaceurs entre la sonde et la surface est essentiel (76). Ajouté à la sonde lors de sa synthèse, l'espaceur améliore la liberté de mouvement de la sonde, ce qui réduit l'encombrement stérique. Un espaceur plus long facilitera l'hybridation tandis que, si l'espaceur est trop court, la sonde sera inaccessible à l'hybridation. La densité de sondes dans chaque dépôt a aussi une importance et, plus la couche de sondes sera dense, plus l'ajout d'espaceurs sera essentiel à l'hybridation. En général, une densité de sondes trop faible ou trop élevée permettra peu d'hybridation tandis qu'une densité optimale permettra un meilleur signal. (34,77,78).

1.2.3.3.3 Paramètres spécifiques aux acides peptido-nucléiques

Parce que la solubilité d'un APN diminue avec sa longueur, un APN ne devrait pas excéder 18 bases, excluant les espaceurs, les acides aminés et les marqueurs. L'APN optimal a de 12 à 17 bases. Les APNs composés de plus de 60 % de purines ou possédant plus de quatre

purines côte-à-côte sont à rejeter. S'il est impossible de se soustraire à ces critères, il est suggéré de situer la sonde sur le brin complémentaire (40).

1.2.4 La dynamique de l'hybridation

Plusieurs facteurs influencent l'hybridation des cibles aux sondes. La complémentarité des séquences joue un rôle primordial, mais ce paramètre perd une partie de son importance dans certaines conditions. Comme l'hybridation est un processus dynamique, la probabilité de rencontre entre la sonde et la cible ainsi que l'effet de répulsion entre les brins complémentaires jouent un rôle important. En influençant ces deux paramètres, les conditions d'hybridation peuvent modifier la cinétique de la réaction afin d'améliorer la sensibilité, la spécificité et la rapidité de l'hybridation.

1.2.4.1 Probabilité de rencontre entre la sonde et la cible

Comme les sondes sont attachées à des positions précises sur la surface de verre, seules les cibles sont libres de se déplacer dans la chambre d'hybridation. La probabilité d'hybridation dépendra de la probabilité de collision entre les sondes et les cibles. Ainsi, elle dépendra de la concentration en sondes de chaque dépôt et de la concentration de cibles en solution. Cela peut être représenté par l'équation suivante.

$[C] + [S] \leftrightarrow [C : S]$ où $[C]$ correspond à la concentration de cibles en solution et où $[S]$ correspond à la concentration de sondes attachées à la surface (78).

Le mouvement des cibles dans les chambres d'hybridation est dû principalement au mouvement Brownien, qui imprime un déplacement irrégulier et incessant des particules microscopiques dans un liquide. Il est causé par l'agitation thermique des molécules du fluide qui se butent aux particules en solution. Ce mouvement entraîne l'ADN cible et l'amène à se déplacer de façon désordonnée dans la solution. Ce mouvement suffit à assurer des collisions efficaces entraînant une hybridation mais, pour que l'hybridation soit sensible, plusieurs heures sont nécessaires (79). La température d'hybridation aura une influence sur le déplacement de l'ADN dans la solution, car elle entraîne une augmentation du mouvement Brownien (80). L'agitation mécanique des fluides permet d'augmenter le mouvement de l'ADN, ce qui d'augmente la sensibilité et la rapidité de l'hybridation. Par

exemple, McQuain *et al.* ont comparé une hybridation passive avec une hybridation pendant laquelle les fluides étaient agités mécaniquement. Ils ont observé qu'une hybridation dynamique d'une heure était deux fois plus sensible qu'une hybridation passive de 24 heures (81).

Une autre stratégie pour favoriser la probabilité de collision entre les cibles et les sondes est l'intégration de la biopuce dans un système microfluidique linéaire. Contrairement à une chambre d'hybridation circulaire dans laquelle la matrice de sondes est centrée, un système linéaire favorise la promiscuité entre les sondes et les cibles en obligeant le flot de liquide à passer sur la région contenant la sonde. Dans ce cas, tout l'échantillon aura la possibilité d'interagir avec chacune des sondes. Wang *et al.* ont montré que la cinétique d'hybridation dans un système microfluidique dynamique dans lequel l'échantillon s'écoulait à la vitesse de 1 µl/seconde sur la biopuce permettait de réduire le temps d'hybridation de 2 heures, en hybridation passive, à 1 minute, en microfluidique (82). Cependant, les systèmes décrits par McQuain *et al.* et par Wang *et al.* ont le désavantage de nécessiter un appareillage complexe et coûteux. Une méthode plus simple permettant l'amélioration de la cinétique d'hybridation est la diminution de la taille de la chambre d'hybridation. Une chambre d'hybridation ayant un plus petit volume augmente la probabilité de collision entre l'analyte et la sonde, ce qui améliore la cinétique d'hybridation.

1.2.4.2 L'ADN est chargé négativement

Comme les groupements phosphates de l'ADN lui confèrent une charge négative, la relation électrostatique entre la sonde et la cible a une influence sur l'hybridation. Ainsi, l'électronégativité de l'ADN entraîne une répulsion entre la sonde et la cible. L'hybridation est rendue possible par la présence en solution d'ions chargés positivement (ex : Na⁺, Mg²⁺, etc.), qui neutralisent les charges négatives de l'ADN, limitant la répulsion entre les brins (83). Plusieurs publications rapportent l'influence sur le signal de la présence de sels dans la solution d'hybridation. Une concentration élevée de sels favorise une hybridation sensible tandis qu'une concentration moins élevée de sels réduit la sensibilité de l'hybridation tout en augmentant sa spécificité (29,46,84).

Il existe plusieurs stratégies pour utiliser la charge de l'ADN afin de l'attirer vers les sondes et, ainsi, favoriser l'hybridation. Belosludstev *et al.* ont montré que l'hybridation à des oligonucléotides immobilisés par des molécules de streptavidine sur une surface couverte de biotine nécessite une concentration 75 fois plus faible d'ions sodium à pH 5,4 qu'à pH 7,0. Cela serait dû à la charge positive des molécules de streptavidine à pH acide. De plus, dans ces conditions, la cinétique d'hybridation est plus rapide (85). Zhang *et al.* ont modifié la surface de leur biopuce en y ajoutant des peptides dont la charge varie en fonction du pH (86). Lorsque la charge est positive, l'ADN cible est attiré par la surface. Lorsque la charge est négative, l'ADN cible est repoussé. En modifiant le pH selon l'étape du protocole (plus acide lors de l'hybridation, plus basique lors des lavages), ils ont accéléré l'hybridation à leur biopuce tout en améliorant sa spécificité. Une version plus technologique de ce principe a été développée par Nanogen, une compagnie américaine. Près de chaque sonde, une électrode et une contre-électrode permettent de moduler un champ électrique. Pendant l'hybridation, la paire d'électrodes produit un champ électrique qui attire les acides nucléiques en solution vers les sondes, favorisant les collisions entre les sondes et les cibles. Ils obtiennent une hybridation presque instantanée. Après l'hybridation, le champ électrique est inversé, ce qui améliore la spécificité de l'hybridation, car le champ électrique repoussera les acides nucléiques qui ne sont pas totalement complémentaires avec la sonde (21,87).

1.2.5 La détection de l'hybridation

La méthode de détection de l'hybridation utilisée dans les études d'expression consiste en l'ajout de nucléotides marqués pendant l'amplification des cibles. L'ADN marqué hybridé à la biopuce sera détecté avec un numériseur confocal. L'avantage de cette technologie est qu'elle permet de marquer différemment deux échantillons et de les hybrider simultanément pour comparer leur contenu. Cette technologie a aussi l'avantage d'être sensible (26,88). Taroncher-Oldenburg *et al.* ont détecté jusqu'à 10^7 amplicons marqués avec les fluorophores Cy3 ou Cy5 (89). Cependant, malgré ses qualités, cette technique n'est pas appropriée pour le diagnostic, car elle ne permet pas la détection sans marquage des analytes. Comme l'amplification et le marquage des échantillons augmentent la complexité d'un test diagnostique, il serait utile de développer une méthode de détection

sensible ne nécessitant pas de marquage des ADNs cibles. Des technologies sensibles et rapides permettant la détection d'ADN non-marqué existent, mais elles sont complexes et coûteuses. Par exemple, Brandt *et al.* utilisent la technologie MALDI-TOF pour détecter des oligonucléotides non-marqués hybridés à des sondes APN. Ils ont détecté aussi peu que 12,5 fmol d'oligonucléotides (90). Cette technologie serait difficilement adaptable à un laboratoire de microbiologie clinique.

1.2.5.1 La détection polymérique

Les matériaux intelligents sont définis comme des matériaux capables d'identifier des stimuli environnementaux, de traiter cette information et d'y répondre adéquatement (91). Le polymère senseur d'acides nucléiques développé par Ho *et al.* répond à cette définition, car ses propriétés observables sont différentes s'il est seul, sous forme de duplex avec de l'ADN simple-brin ou sous forme de triplex avec de l'ADN double-brin (92,93). Ce polymère, un polythiophène cationique et soluble dans l'eau, répond aux stimuli environnementaux par un changement de chromicité. Le passage du squelette du polymère de sa forme plane à sa forme non-plane dépendra des interactions entre ses chaînes latérales et la molécule avec laquelle elles interagissent. Les interactions électrostatiques entre le polycation (le polymère senseur d'acides nucléiques) et le polyanion (l'ADN) entraîneraient un changement de conformation du polymère dont le squelette changerait de forme selon la structure de son ligand. Cela modifierait les propriétés optiques et électriques du polymère senseur d'acides nucléiques (94). De plus, la complexation serait facilitée par un changement d'entropie causé par la libération de molécules d'eau (95). Cette détection basée sur les polymères n'exige aucun marquage de la sonde ou de la cible et peut distinguer l'hybridation spécifique de l'hybridation non-spécifique (92). Cette technologie est d'autant plus prometteuse que ce polymère est assez sensible pour détecter moins de 1000 molécules d'ARN génomique du virus *Influenza A* (96). De plus, les monomères constituant le polythiophène peuvent être modifiés afin de moduler les propriétés optiques, électriques, thermochromiques, ionochromiques, biochromiques ou fluorométriques du polymère final (94).

D'autres groupes ont aussi utilisé des polymères conjugués pour détecter de l'ADN non-marqué. Gaylord *et al.* ont utilisé le polyfluorène phényle pour la détection en solutions

d'acides nucléiques non-marqués (97,98). Des polythiophènes zwitterioniques ont été utilisés dans un contexte similaire par Nilson *et al.*, qui ont aussi utilisé ce polymère pour détecter l'ADN hybridé à des sondes d'ADN immobilisées sur des matrices semi-solides. Dans cet exemple, les sondes sont liées électrostatiquement aux polythiophènes, puis elles sont incorporées dans des hydrogels. Après l'hybridation à un oligonucléotide complémentaire, la fluorescence du polythiophène est modifiée, ce qui permet la détection de l'événement d'hybridation (99). Cette méthode de détection de l'ADN non-marqué hybridé sur biopuce serait difficilement adaptable à un numériseur confocal disponible commercialement, car les lasers disponibles n'ont pas les longueurs d'ondes nécessaires à la discrimination du triplex polymère-ADN double-brin et du duplex polymère-ADN simple-brin.

1.3 Objectifs généraux et spécifiques

Dans un premier temps, mon projet de maîtrise visait l'optimisation de la technologie actuelle des biopuces afin de la rendre compatible avec le diagnostic moléculaire des maladies infectieuses. En particulier, nous avons étudié l'influence de la position ciblée par les sondes sur l'amplicon, ce qui nous a permis de proposer un modèle pour une conception efficace des sondes de capture faites d'ADN ou d'APN. Dans un second temps, nous avons utilisé des acides peptido-nucléiques comme remplacement aux sondes ADN, ce qui a permis la détection de l'hybridation d'acides nucléiques non-marqués grâce à un nouveau polymère cationique fluorescent. Ces travaux permettront un meilleur choix des sondes de capture et ouvrent la porte à une nouvelle technologie de détection de l'ADN non-marqué.

Objectif général

- Développer une plate-forme de biopuce adaptable à la détection et à l'identification des microorganismes ainsi qu'à la détection et l'identification des gènes de résistance aux antibiotiques.

Objectifs spécifiques

- Déterminer l'influence sur l'hybridation de la position ciblée sur un amplicon par une sonde ADN.
- Utiliser les acides peptido-nucléiques comme sondes de capture sur une biopuce.
- Déterminer l'influence sur l'hybridation de la position ciblée sur un amplicon par une sonde APN.
- Démontrer l'utilité des sondes de capture APN pour la détection de l'hybridation d'ADN non-marqué à l'aide d'un polymère cationique fluorescent.

Chapitre II - Correlation entre l'efficacité d'hybridation et la position de la sonde de capture sur l'ADN cible

Correlation between the position of capture probes on target nucleic acids and the efficiency of microarray DNA hybridisation.

Régis Peytavi¹, Liu-ying Tang¹, Frédéric R. Raymond^{1,2}, Luc Bissonnette¹, Maurice Boissinot^{1,2}, François J. Picard¹, Ann Huletsky^{1,2}, Paul H. Roy^{1,3}, Marc Ouellette^{1,2}, Michel G. Bergeron^{1,2}

Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Pavillon CHUL), Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2¹; Division de Microbiologie, Faculté de Médecine² and Département de Biochimie et de Microbiologie, Faculté des Sciences et de Génie³, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1K 7P4

Soumis à Nucleic Acids Research le 17 mai 2004

Send all correspondence to:

Dr. Michel G. Bergeron

Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval
Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL
2705 Boul. Laurier, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4G2

Tel: (418) 654-2705, Fax: (418) 654-2715

E-mail: Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca

2.1 Résumé français

Afin d'étudier l'effet qu'a sur l'hybridation la position ciblée sur un amplicon par une sonde ADN courte, des sondes oligonucléotidiques de vingt bases ciblant plusieurs régions d'un amplicon furent conçues. Deux paires d'amorces ont été utilisées afin de produire deux amplicons se chevauchant. Les sondes furent immobilisées sur une biopuce et hybridées avec l'un ou l'autre des amplicons marqués. L'évaluation de la corrélation entre le signal d'hybridation et la position ciblée par la sonde permet d'effectuer un rapprochement entre le signal obtenu et la longueur de l'extrémité 5' du brin d'amplicon ciblé. Des expériences supplémentaires ont démontré que ce phénomène dépend de la cinétique de réassociation entre le brin d'amplicon hybridé et son complémentaire. Cette étude propose de nouveaux paramètres influençant l'efficacité d'hybridation de sondes oligonucléotidiques immobilisées sur une surface de verre. Ces paramètres seront utiles pour la conception de sondes de capture destinées à l'identification d'amplicons sur biopuce.

2.2 Résumé anglais

The hybridisation behaviour of small oligonucleotides arrayed on glass slides is often unpredictable. In order to examine the hybridisation efficiency of capture probes along a target nucleic acid, 20-mer oligonucleotide probes were designed to hybridise at different distances from the 5' end of two overlapping PCR amplicons labelled with fluorescent dyes. These probes were spotted onto glass slides and hybridised with the two labelled amplicons. Evaluation of the hybridisation signal for each probe revealed a correlation between the length of the free overhanging 5' end portion of the captured strand and the hybridisation signal intensity. Further experiments demonstrated that this phenomenon is dependent on the reassociation kinetics of the free overhanging tail of the captured DNA strand with its complementary strand. This study delineates key predictable parameters that govern the hybridisation efficiency of short capture probes arrayed onto glass slides. These parameters should be most useful for designing arrays for the detection of amplicons and nucleotide polymorphisms.

2.3 Introduction

Over the last decade, DNA microarrays have become useful tools in genomic studies and drug discovery (100-102). Unlike other hybridisation formats, microarrays allow significant miniaturisation, as thousands of different DNA fragments or oligonucleotide probes can be spotted onto a solid support, generally a glass slide. Therefore, this technology is ideal for extensive gene profiling studies and multiplexed detection of nucleic acids for diagnostic purposes. While microarrays have been widely used in gene expression profiling, they offer a great potential for the detection and identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and for the diagnosis of diseases. Examples of useful applications include cancer prognostics (103-105), applications in forensic science (106), detection of microbes and their associated antimicrobial resistance genotypes (17,18), and detection of bio-weapon pathogens (107).

While DNA probes longer than 50 nucleotides give reproducible hybridisation signals (20,108), only short oligonucleotides (15- to 20-mer) allow efficient discrimination of SNPs (76,109). However, the hybridisation efficiency of short capture DNA probes is still unpredictable and false-negative results are often observed when these probes are used on microarrays. Several research groups have noticed that hybridisation efficiency is dependent on the position at which the probe binds on the target nucleic acid strand but no explanation was provided for these observations (110,111). Many parameters are suspected of influencing the hybridisation efficiency of target DNA to immobilised oligonucleotide DNA probes. These parameters include steric hindrance, secondary structure of the target DNA, and binding capacity of the surface-bound probe. Steric hindrance may vary with probe density and spacer length, as well as with hydrophobicity and charge of the solid support (110). Secondary structure of the target DNA was shown to influence the efficiency of hybridisation and could be relieved by using helper oligonucleotides hybridising beside the probe (20). The influence of target secondary structure could be partially circumvented by selecting probes for their signal intensity and reproducibility (111) or for their theoretical thermodynamic behaviour (72). In addition, the use of single-stranded nucleic acid targets instead of denatured, double-stranded amplicons has been found to increase the sensitivity of hybridisation reactions using short capture probes suggesting that the

complementary strand may interfere with the hybridisation of targets onto the probes (111-114). Moreover, the design of short oligonucleotide probes that are both sensitive and specific enough to discriminate SNPs is not easily predictable by the capture probe T_m (20,115). Thus, oligonucleotide design is done either empirically (116,117) or by using software based on heuristic algorithms (118).

In this work, we have attempted to understand the hybridisation behaviour of short oligonucleotides anchored by their 5' end (34) onto a solid support, using as a model system the detection of the bacterial antibiotic resistance gene *ermB* encoding an adenine- N^6 methyltransferase, which confers resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B (119). We show that the efficiency of hybridisation of 20-mer capture probes to labelled PCR amplicons is highly dependent on their positions on the captured amplicon strand. We provide evidence that kinetic effects and reassociation to the amplicon's complementary strand can lead to destabilisation of the capture probe/DNA target duplex and that this kinetic effect is governed by the position of the complementary sequence on the target nucleic acid.

2.4 Materials and methods

Microarray production

Twenty-mer oligonucleotide capture probes bearing a 5' amino-linker were synthesised by Biosearch Technologies (Novato, CA). Probe sequences are (5'-CAATTTTATACCTCTGTTTG-3') for ErmB272, (5'-GAATCCTTCTTCAACAATCA-3') for ErmB370, (5'-TCCGCTGGCAGCTTAAGCAA-3') for ErmB459, (5'-CAAACAGAGGTATAAAATTG-3') for ErmB272a, (5'-TGATTGTTGAAGAAGGATTC-3') for ErmB370a, and (5'-TTGCTTAAGCTGCCAGCGGA-3') for ErmB459a. The amino linker modification allowed covalent attachment of the probes onto aldehyde coated glass slides (CEL Associates, Pearland, TX). Oligonucleotide probes at 10 μ M in TE buffer (10 mM Tris (pH 8.0), 1 mM EDTA) were diluted two-fold in Array-it Microspotting Solution Plus (Telechem International, Sunnyvale, CA), to a final concentration of 5 μ M. Oligonucleotides were spotted in triplicate using a VIRTEK SDDC-2 arrayer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with SMP3 pins (Telechem International). After spotting, slides were dried overnight, washed by immersion in 0.2% sodium dodecyl sulphate (SDS) for 2 min, and rinsed in ultra-pure water for 2 min. Slides were boiled in ultra-pure water for 5 min for washing out the unbound oligonucleotides. Imine bonds between the glass surface and probes were reduced to a stable amide link by immersion into a sodium borohydride solution (1 g sodium borohydride, 300 ml PBS, 100 ml ethanol) for 20 min. Slides were then washed in 0.2% SDS for 1 min and rinsed in ultra-pure water for 1 min. Slides were finally dried by centrifugation for 5 min under vacuum and stored in a dry, oxygen-free and dark environment. All above chemical treatments of the slides were performed at room temperature.

PCR amplification and amplicon labelling

Fluorescent dyes were incorporated during PCR amplification. Cy 3 or Cy 5 dUTP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) were mixed at concentrations of 0.02 mM in a 50 μ l PCR mixture containing 0.05 mM dATP, 0.05 mM dCTP, 0.05 mM dGTP, 0.02 mM dTTP, 5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl (pH 9), 0.01% Triton X-100, 2.5 mM

MgCl₂, 0.5 Unit of *Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI), 1 ng of purified genomic DNA, and 0.2 μM of each of the two PCR primers. To test the effect of oligonucleotide probe position on the captured target DNA strand on hybridisation efficiency, we amplified by PCR two overlapping portions (402- and 432-bp amplicons) of the *Staphylococcus aureus ermB* gene (Fig. 1). The *ermB* gene was amplified from genomic DNA isolated from the erythromycin-resistant *S. aureus* strain R561. The 402-bp amplicon was produced using primers ErmB225 (5'-TCGTGTCACCTTAATTCACCAAGATA-3') and ErmB601 (5'-TTTTAGTAAACAGTTGACGATATTC-3') while the 432-bp amplicon was produced using primers ErmB109 (5'-GGAACAGGTAAAGGGCATTAAACGAC-3') and ErmB512 (5'-CTGTGGTATGGCGGGTAAGTTTTATTAAG-3'). Thermal cycling for PCR amplification (180 s at 94°C followed by 40 cycles of 5 s at 95°C, 30 s at 55°C, and 30 s at 72°C) was carried out on a PTC-200 DNA Engine thermocycler (MJ Research, Reno, NV). PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). The dye incorporation was measured with a Ultraspec 2000 spectrophotometer (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec, Canada) at 550 nm for Cy 3 and at 650 nm for Cy 5. Concentration of the amplified product was determined at 260 nm using the spectrophotometer.

Asymmetric PCR was performed using the PCR conditions described above except that the upper strand was obtained using a 20:1 ratio of ErmB109 and ErmB512 primers, respectively. The lower strand was produced using a 20:1 ratio of ErmB512 and ErmB109, respectively. Each asymmetric PCR reaction was verified on a 1.5% agarose gel to ensure the production of single-stranded DNA and quantified using the spectrophotometer at 260nm. The concentration of single-stranded DNA was adjusted to 1 pM and hybridised to the microarray to confirm the absence of signal from the complementary strand.

DNA microarray hybridisation and data acquisition

Prehybridisation and hybridisation were performed in 15 x 13 mm Hybri-well self-sticking hybridisation chambers (GraceBio-Labs, Bend, OR). Microarrays were first prehybridised for 30 min at room temperature with 1X hybridisation solution (6X SSPE (Omnipur, Kansas City, MO), 1% BSA, 0.01% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.01% SDS, and 25%

formamide). Cy-dUTP-labelled PCR amplicons were denatured at 95°C for 5 min and then quickly chilled on ice. Five µl of denatured labelled amplicons were mixed with 10 µl of 2X hybridisation buffer (12X SSPE, 2% BSA, 0.02% PVP, 0.02% SDS and 25 % formamide). The prehybridisation solution was removed from the chamber and replaced by the labelled amplicons resuspended in hybridisation solution. The hybridisation was carried out at 22°C for 15 min to 16 hours. After hybridisation, microarrays were washed with 2X SSPE containing 0.1% SDS for 5 min at room temperature and rinsed once with 2X SSPE for 5 min. Microarrays were dried by centrifugation at 1348 x g for 3 min. Slides were scanned using a ScanArray 4000XL (Packard Bioscience Biochip Technologies, Billerica, MA) and fluorescent signals were analysed using the QuantArray software. Prehybridisation and hybridisation were performed in 15 x 13 mm Hybri-well self-sticking hybridisation chambers (GraceBio-Labs, Bend, OR). Microarrays were first prehybridised for 30 min at room temperature with 1X hybridisation solution (6X SSPE (Omnipur, Kansas City, MO), 1% BSA, 0.01% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.01% SDS, and 25% formamide). Cy-dUTP-labelled PCR amplicons were denatured at 95°C for 5 min and then quickly chilled on ice. Five µl of denatured labelled amplicons were mixed with 10 µl of 2X hybridisation buffer (12X SSPE, 2% BSA, 0.02% PVP, 0.02% SDS and 25 % formamide). The prehybridisation solution was removed from the chamber and replaced by the labelled amplicons resuspended in hybridisation solution. The hybridisation was carried out at 22°C for 15 min to 16 hours. After hybridisation, microarrays were washed with 2X SSPE containing 0.1% SDS for 5 min at room temperature and rinsed once with 2X SSPE for 5 min. Microarrays were dried by centrifugation at 1348 x g for 3 min. Slides were scanned using a ScanArray 4000XL (Packard Bioscience Biochip Technologies, Billerica, MA) and fluorescent signals were analysed using the QuantArray software. Prehybridisation and hybridisation were performed in 15 x 13 mm Hybri-well self-sticking hybridisation chambers (GraceBio-Labs, Bend, OR). Microarrays were first prehybridised for 30 min at room temperature with 1X hybridisation solution (6X SSPE (Omnipur, Kansas City, MO), 1% BSA, 0.01% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.01% SDS, and 25% formamide). Cy-dUTP-labelled PCR amplicons were denatured at 95°C for 5 min and then quickly chilled on ice. Five µl of denatured labelled amplicons were mixed with 10 µl of 2X hybridisation buffer (12X SSPE, 2% BSA, 0.02% PVP, 0.02% SDS and 25 %

formamide). The prehybridisation solution was removed from the chamber and replaced by the labelled amplicons resuspended in hybridisation solution. The hybridisation was carried out at 22°C for 15 min to 16 hours. After hybridisation, microarrays were washed with 2X SSPE containing 0.1% SDS for 5 min at room temperature and rinsed once with 2X SSPE for 5 min. Microarrays were dried by centrifugation at 1348 x g for 3 min. Slides were scanned using a ScanArray 4000XL (Packard Bioscience Biochip Technologies, Billerica, MA) and fluorescent signals were analysed using the QuantArray software.

2.5 Results and discussion

This work was initiated to study the parameters that could govern the hybridisation efficiency of oligonucleotide probes arrayed onto a solid support. We first tested whether the region on the amplicon targeted by the oligonucleotide capture probes influenced hybridisation efficiency. To achieve this goal, we generated two overlapping *ermB* amplicons each targeted by six 20-mer capture probes complementary to different areas of the amplicons (Fig 2). Three of these probes (ErmB272, ErmB370, and ErmB459) were designed to be complementary to the lower strand of both amplicons while the three other probes (ErmB272a, ErmB370a and ErmB459a) targeted the same region but hybridised to the upper strand of both amplicons. Rafalski (120) have shown that fully complementary oligonucleotides each targeting one of a amplicon strand have identical hybridisation efficiencies in solution. Therefore, variations in the performance of hybridisation between capture probes targeting the same region located on the opposite strand of an amplicon could be attributable to a bias correlated with hybridisation onto solid support.

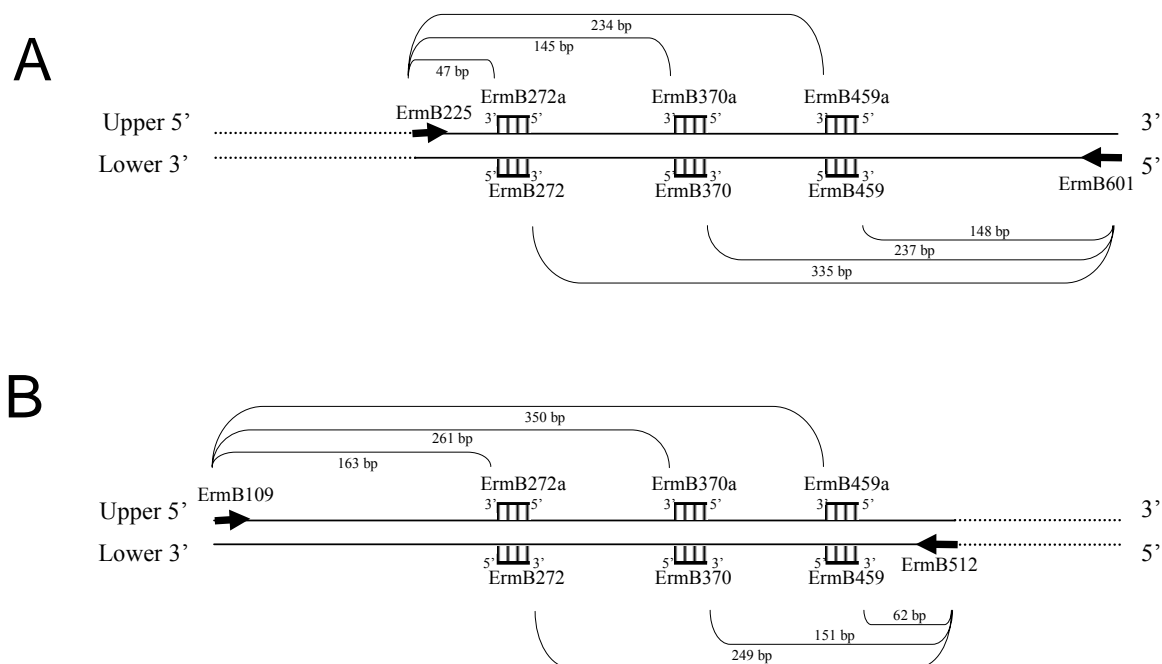


Figure 2. Position of capture probes and PCR primers on the *ErmB* gene amplicons of either 402 bp (A) or 432 bp (B). Arrows represent primers used for generating the amplicons. Dashed boxes represent 5' amino-modified probes. Brackets indicate the length of the 5' overhanging tail for each capture probe.

The Cy 3-labelled 402- and 432-bp amplicons were hybridised overnight to the *ermB* array that contained the six different capture probes (Fig. 2). After proper washing and analysis, it was observed that the fluorescence signal for each capture probe after overnight hybridisation was different. Plotting the fluorescence intensities of hybridisation against the regions of the amplicon recognized by each capture probe revealed a correlation between the hybridisation efficiency and the length of the free 5' overhanging portion of the captured amplicon strand (Fig. 3). For each of the six capture probes, the strongest hybridisation signal was always observed for the probes targeting a region closest to the 5' end of the upper or lower targeted strand. Since these probes hybridised close to the 5' end of the complementary strand of the amplicon, they left the shortest overhanging 5' end. Both target amplicons (402- and 432-bp) behaved similarly with respect to fluorescence intensity and position of the capture probe. Also, no significant difference was observed between the upper and lower strands. This is illustrated eloquently in Fig. 3 B which demonstrates that the fluorescence intensities were similar for oligonucleotides ErmB370 (151 bp from 5' end) hybridized to the lower strand of the 432-bp *ermB* amplicon, and for oligonucleotide ErmB370a (145 bp from 5' end) hybridized to the upper strand of the 402 bp *ermB* amplicon. These results suggest that captured amplicon strands having a similar 5' overhanging length have similar hybridisation efficiencies to the capture probe. Despite the fact that for the same oligonucleotide capture probe, the key determinant for hybridisation efficiency appears to be the length of the 5' overhang of the hybridised target DNA strand, some probes worked better than others. For example, we showed that the hybridisation signal for probe ErmB272a (5' overhang length of 47 bp) was six times stronger than with probe ErmB459 (5' overhang length of 62 bp). One explanation could be that the area covered by probe ErmB459 may be less available for hybridisation or less stable once hybridised than the area covered by probes 272 (Fig. 4 C). This behaviour could be attributed either to the secondary structure of the target strand or to thermodynamic properties of the probes. It is salient to point out that the ΔG of the secondary structure from probe ErmB459 is $-14,2 \text{ Kcal mol}^{-1}$ which represents a much higher energy than that for the other probes used in this study ($-5,3 \text{ Kcal mol}^{-1}$ for probe ErmB272 and $-3,5 \text{ Kcal mol}^{-1}$ for probe ErmB370). Nonetheless, even if probe ErmB459 gave a lower hybridisation signal, its intensity correlated with the length of the 5' tail (Fig. 3 C).

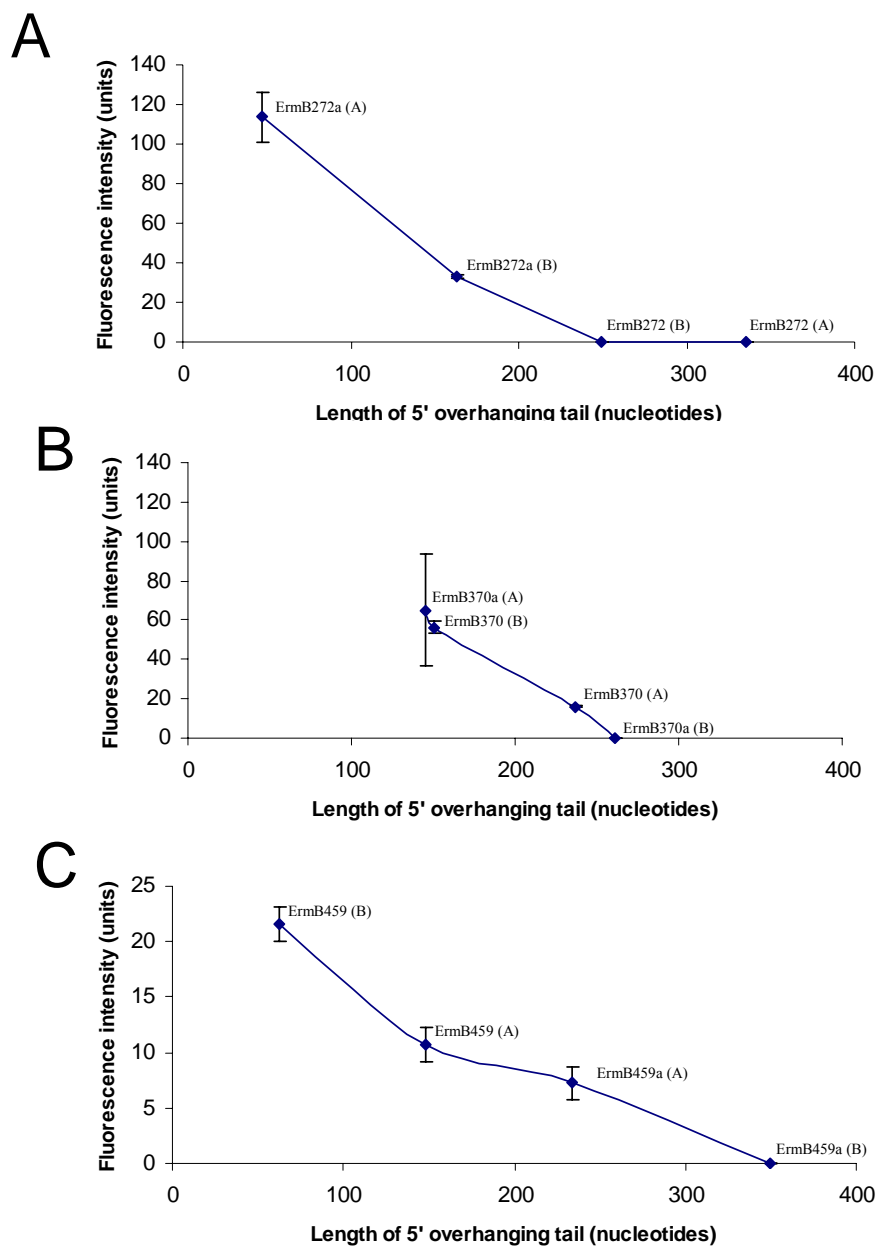


Figure 3. Correlation between the fluorescence intensity and the length of the 5' overhang of the captured *ermB* amplicon strand. Panel A shows results for capture probes ErmB272 and ErmB272a hybridising to both *ermB* amplicons (*i.e.* 402- and 432-bp amplicons). Panel B shows hybridisation of probes ErmB370 and ErmB370a hybridising to both *ermB* amplicons. Panel C shows hybridisation of probes ErmB459 and ErmB459a hybridising to both *ermB* amplicons. Each value represents the mean of three replicates. Standard deviation for these replicates is also shown.

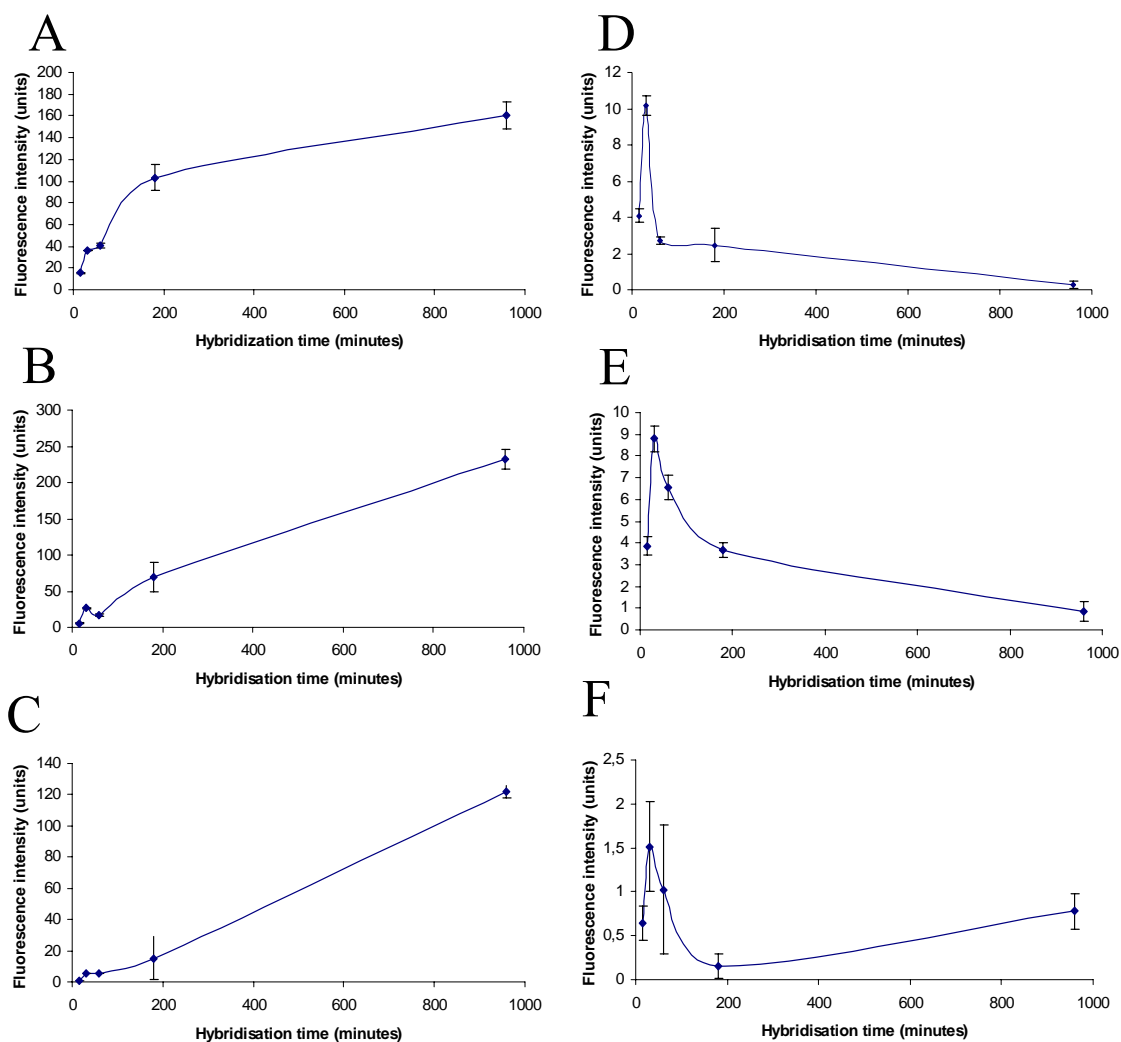
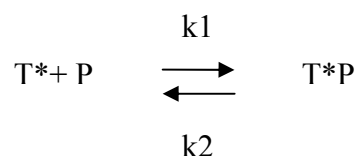


Figure 4. Hybridisation kinetics for the six oligonucleotide probes targeting *ErmB*. Arrays were hybridised for 15, 30, 60, 180 and 960 minutes (16 hours) to the denatured double-stranded 432-bp *ermB* amplicon. (A) Hybridisation to capture probe ErmB272a (163 bp to 5'). (B) Hybridisation to capture probe ErmB370 (151 bp to 5' end). (C) Hybridisation to capture probe ErmB459 (62 bp to 5' end). (D) Hybridisation to capture probe ErmB272 (249 bp to 5' end). (E) Hybridisation to capture probe ErmB370 (261 bp to 5' end). (F) Hybridisation to capture probe probe ErmB459a (350 bp to 5' end). Each value is the mean of three replicates. Standard deviation for these replicates is also shown. The scale for the fluorescence intensity axis is different for each panel to better illustrate the shape of the curves.

Thus, capture probes (P) targeting the 5' end of the captured target strand (T*) gave strong and reproducible hybridisation signals, while probes targeting the 3' extremity of the captured target strand gave no or very weak hybridisation signals after overnight hybridisation. One plausible explanation is that the 3' end of T* could be less available for an efficient hybridisation with capture probes spotted onto a solid support. Alternatively, T* hybridised by its 3' end may be less stable than the same strand hybridised closer to its 5' end. To verify these hypothesis, hybridisation kinetics was assessed by hybridising the 432-bp labelled amplicons with the *ermB* array for 15, 30, 60, 180 minutes and 16 hours. We demonstrated that for hybridisations targeting regions closer to the 5' end of the captured amplicon strand, fluorescent signals increased over time (Fig. 4 A, B, C). On the other hand, probes targeting regions leaving longer 5' overhang of either strands of the amplicons exhibited very different hybridisation kinetics. Indeed, for hybridisations targeting regions closer to 3' end of the captured amplicon strand, fluorescent signals increased during the first 30 minutes of hybridisation and then decreased to reach the background level (Fig. 4 D, E, F). This kinetics of hybridisation during the first 30 minutes is also observed for probes targeting the 5' end of the captured strand. We propose that, during the first 30 minutes of the reaction, local higher concentration of capture probe (P) favoured hybridisation of T* to P. This hybridisation behaviour appears to follow a classical equilibrium equation:



where k1 is the hybridisation constant and k2 the dissociation constant.

The hybridisation kinetics following the first 30 minutes, which is dependent on the position of the probe on the captured strand, could be explained by the topology of the T*P duplex. When a probe recognises an area closer to the 3' end of the captured target strand T*, most of the overhanging 5' end of non hybridized DNA is exposed to the liquid phase above the glass surface (Fig 5 A). On the other hand, when it hybridises to an area close to the 5' end of the captured strand target, most of T* (3' end) is directed towards the glass

surface (Fig. 5 B). In the first conformation, the protruding tail of T* could be available for reassociation with its complementary strand T', a process that could destabilise the probe-target duplex (T*P).

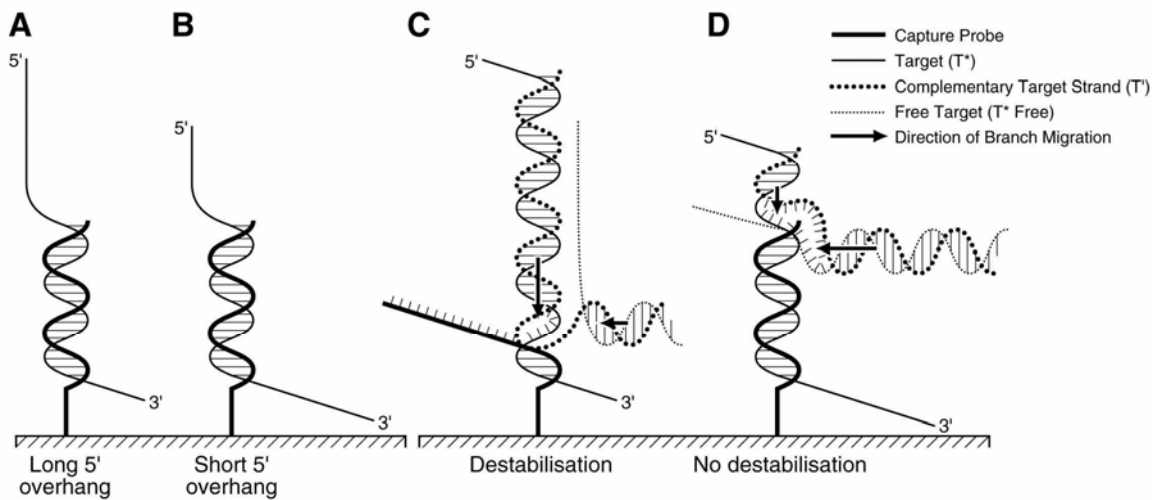


Figure 5. Possible interactions between an immobilised DNA probe and the two strands of the target amplicon. The target strand (T*) hybridise to the DNA probe, leaving a 5' overhang of variable length depending on the location of the region of the captured amplicon strand targeted by the probe. (A) Long 5' overhang and short 3' tail directed towards the glass support. (B) Short 5' overhang and long 3' tail. (C) The free complementary strand of the target amplicon (T') hybridises to the 5' overhanging tail of T*, thereby generating a branch migration that causes destabilisation of the secondary complex. (D) The free T* (T*_{free}) complex hybridises to the free 5' end region of T', thereby generating an antagonistic branch migration that prevents the first branch migration from breaking the secondary complex.

To test the ability of the complementary strand T' to destabilise the T*P duplex, we carried out experiments with single-stranded amplicons generated by asymmetric PCR. Microarrays were hybridized for 10 hours with the lower strand of the amplified 432-bp *ermB* product (T*). After washing out the non hybridized T* still in solution (T*_{free}), the hybridisation was carried out for 16 additional hours either with the hybridisation buffer alone or with hybridisation buffer containing an equimolar amount of the complementary upper strand T'. In the presence of only single-stranded target DNAs (T*), the region at which the oligonucleotide probe hybridises no longer influences the hybridisation efficiency. For example, probe ErmB272 with a 5' overhang of 249 nucleotides hardly captured any of the target DNA when the double-stranded amplicon was used as the target (Fig. 3 A). However, this same probe captured efficiently the complementary single-stranded DNA produced by asymmetrical PCR (Fig. 6 A). Similar results were observed for hybridisation with the upper amplicon strand. On the other hand, the intensity of the fluorescence signal decreased drastically when the complementary T' bottom strand was included in the hybridisation assay (Fig. 6 B). The addition of the complementary strand T' reduced the intensity of the hybridisation signal close to background levels, suggesting that T*P duplex destabilisation occurs in the presence of the complementary strand. Displacement of T* from P by reassociation with T' probably proceeds through a sequential displacement pathway also known as a zipper effect (121). Hybridisation between the captured T* strand and its complementary strand T' in solution will occur first at the exposed overhang tail of the captured T* and will be followed by a branch migration mechanism towards the 3' end. Such a mechanism was recently used to build a DNA-fuelled nanomolecular machine (122,123). In those studies, the authors used the complementary DNA strand (called "fuel DNA") to close and open double-stranded DNA structures. In the experiment described above, the complementary strand T' seems to act as the "fuel DNA", pulling the captured target strand T* from the probe (Fig. 5 C). A longer 5' overhang increases the probability of collision between the complex T*P and free T' and thus leads to a faster destabilisation effect. This could explain the hybridisation bias observed with long 5' overhangs but does not explain why a short 5' overhang end generates a hybridisation signal that increases over time (Fig. 4 A, B, C).

When asymmetrical PCR products were hybridised sequentially as described above, a significant decrease in signal was observed when the complementary strand T' was hybridised for 16 hours compared to the control hybridisation using buffer only (Fig. 6). We showed that the captured strands were displaced by the target complementary strand T' independently of the amplicon area targeted by the probe suggesting that there is stabilisation of the T*P complex when the hybridisations are performed in the presence of both T* and T'. This could be explained by the absence of non-hybridised T* in solution (T^*_{free}) for the sequential hybridisation of asymmetrically amplified DNA (Fig. 6). For example, in any hybridisation event with double-stranded DNA, T^*_{free} could hybridize to T' and thus limit its interactions with the T*P complex. We propose that T^*_{free} forms a quaternary complex ($T^*T'T^*_{free}P$) with the ternary complex ($T'T^*P$) captured on the glass surface (Fig 5. C and D). In accordance with the random walk theory for branch migration (124), the branch point between T^*T' and $T'T^*_{free}$ duplexes of the $T^*T'T^*_{free}P$ complex can move in either direction. The random walk would continue until one of two helices becomes shorter than the minimum length of a stable duplex (Fig. 5 C and D) (121). This means that the longer the duplex part of the helix is, the more likely it is to displace the other competing duplex (e.g. if T^*T' forms a longer helix it will destabilise the complex $T'T^*_{free}$ and *vice-versa*).

A nucleation step would occur first with T' and the overhanging part of the captured T*. A double helix would rapidly be formed until it reaches the branch point made by the complex T*P (125). At that point, we suggest that strand displacement by branch migration would start with the two complexes T*P and T'T*. Simultaneously, the T^*_{free} would form a double-stranded helix with the overhanging part of T' associated with T*P (Fig. 5 C and D), thereby forming an antagonist migration fork. When the 5' overhang of T* DNA is longer (Fig. 5 C), the double helix formed with T' will be longer than the double helix formed between T^*_{free} and the overhanging part of T'. Branch mechanism competition between the two duplexes would be in favour of the reassociation of captured T* with T', pulling the target T* away from the probe P. In contrast, when the 5' tail is short (Fig. 5 D), the competing forming helix $T^*_{free}T'$ would be long enough to favour reassociation of T^*_{free} with T', thereby depleting locally the T' and thus stabilising the T*P complex. Over time, diffusion of T* in close proximity with free probes P, would feed the hybridisation of the

target T^* with the captured probe P , thereby increasing the fluorescent signal (Fig. 4 A, B, C).

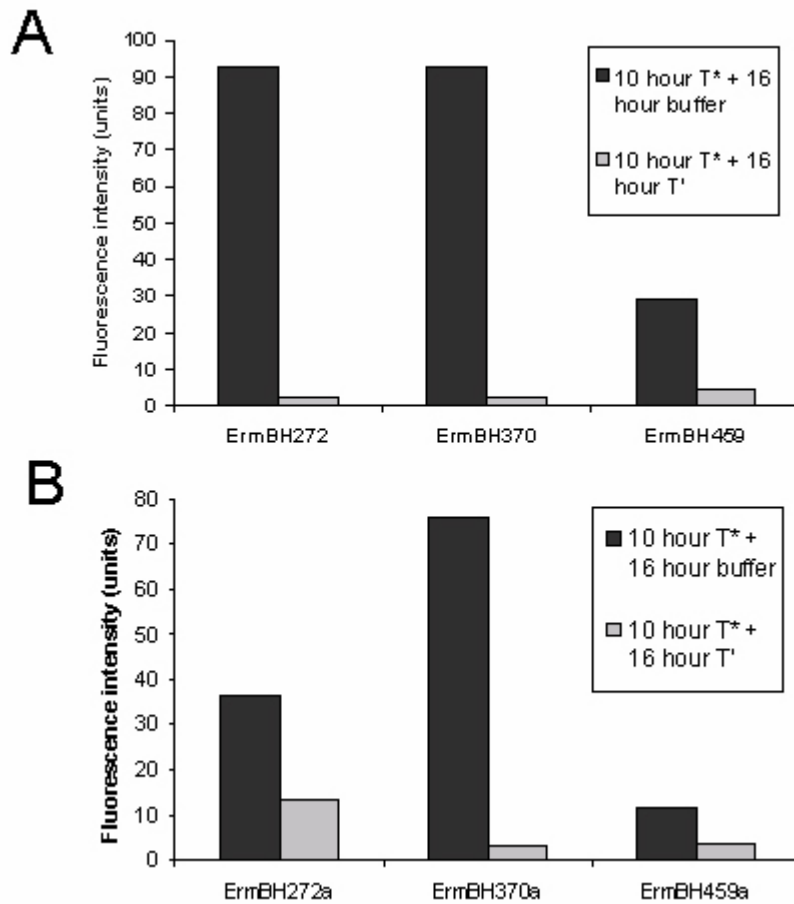


Figure 6. Hybridisation of the *ErmB* array to single-stranded target 432-bp amplicon strand (T^*) generated by asymmetrical PCR followed by hybridisation with the complementary amplicon strand (T') also generated by asymmetrical PCR. T^* was hybridised for 10 hours to the *ErmB* array. Non-hybridized T^* (T^*_{free}) complex was then washed away and the array was hybridised for another 16 hours with an equimolar quantity of the complementary strand T' in hybridisation buffer (grey boxes) or with hybridisation buffer alone (black boxes). (A) Hybridisation to the lower strand of the 432-bp amplicon followed by hybridisation to the upper strand of the amplicon. (B) Hybridisation to the upper strand of the 432-bp amplicon followed by hybridisation to the lower strand of the amplicon. Each result is the mean of three replicates.

In addition to the length of the 5' overhang, the length of the 3' tail directed towards the solid support could also influence the hybridisation performance. Indeed, we observed that for a constant 5' overhang, a longer 3' tail directed towards the glass support increases the hybridisation signal (data not shown). This could be explained by electrostatic interactions between the 3' end of the captured amplicon strand and the glass slide coating, which would result in stabilisation of the T*P complex (Fig. 5 D) by hampering the free rotation of the 3' end of the target, required during the branch migration process (125).

Our results were obtained from two amplicons derived from the bacterial antibiotic resistance gene *ermB* conferring resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin B. To demonstrate that these results are applicable to other DNA targets, we have also tested the hybridisation efficiency of capture probes (according to the region to which they hybridise) targeting the highly conserved *tuf* gene that encodes the elongation factor EF-Tu (126). Similarly to what was observed with the *ermB* amplicons, probes hybridising in the vicinity of the 3' end of captured strand from a *tuf* gene amplicon yielded low or no fluorescence signal, while probes targeting the 5' end of a captured *tuf* strand gave stronger hybridisation signals (data not shown). Thus, the hybridisation behaviour of capture probes seems to obey similar rules, irrespective of the probe or amplicon sequences.

In conclusion, the results presented here explain the hybridisation behaviour of short (\cong 20-mer) oligonucleotide capture probes. We have clearly demonstrated a correlation between the region of the amplicon targeted by a capture probe and the efficiency of hybridisation. We have also provided evidence indicating that the presence of the complementary strand is associated with the poor hybridisation efficiency of probes targeting the 3' end of a captured amplicon strand but has no effect on probes targeting the 5' end of the same amplicon strand. These experimental data should contribute to establish novel guidelines for the efficient design of capture probes, which should allow improvements in the sensitivity and specificity of microarrays of DNA probes. This study demonstrates the importance of choosing the appropriate nucleic acid target region to ensure efficient and sensitive detection by hybridisation of target DNAs such as PCR amplicons. This is particularly important for SNP detection which requires a high discriminatory power.

Finally, we are currently developing novel amplification and labelling systems for efficient production of single-stranded DNA amplicons that should allow to circumvent the problem of competition between complementary strands.

2.6 Acknowledgement

This research project was supported by a Valorisation de la Recherche du Québec (VRQ) grant. M.O. is a Burroughs Wellcome Fund scholar in molecular parasitology and the holder of a Canada Research Chair in antimicrobial resistance.

2.7 Addendum à l'article Correlation between the position of capture probes on target nucleic acids and the efficiency of microarray DNA hybridisation

2.7.1 Introduction

L'élaboration du modèle de déstabilisation de l'ADN hybridé à une sonde de capture oligonucléotidique par son brin complémentaire entraîne la formulation de l'hypothèse que l'hybridation à une sonde de capture faite d'APN puisse être influencée par la position ciblée par la sonde sur l'amplicon. Ce même modèle pourrait aussi suggérer que la longueur de la sonde de capture aurait une influence sur la longueur d'extrémité 5' nécessaire à la déstabilisation de la cible hybridée par son brin complémentaire. L'influence de la longueur de la sonde sur le signal d'hybridation obtenu a déjà été suggérée ; une sonde longue permettrait une hybridation plus sensible qu'une sonde courte et permettrait l'élimination de faux-négatifs (20). Dans cette section, deux hypothèses seront étudiées en comparant l'hybridation d'amplicons de différentes longueurs avec trois sondes de séquences similaires : une sonde APN de 15 nucléotides, une sonde ADN de 15 nucléotides et une sonde ADN de 20 nucléotides. Premièrement, l'hybridation à une sonde APN pourrait être influencée par la position ciblée par la sonde de capture sur l'amplicon. Deuxièmement, la longueur d'extrémité 5' nécessaire pour que la déstabilisation de l'ADN soit possible pourrait varier en fonction de la longueur de la sonde.

2.7.2 Matériel et méthodes

Séquences des amorces et des sondes

Les amorces ont été conçues en utilisant le logiciel Oligo 6.67 (West Cascade, CO). Les séquences des amorces et la longueur des extrémités 5' et 3' produites sont indiquées dans le tableau 1. Les sondes de capture utilisées ont été modifiées en 5' par l'ajout d'un espaceur de 18 atomes de carbone et d'une fonction amine. Les sondes ADN ont été synthétisées par Biosearch Technologies (Novato, CA). La sonde de capture APN, synthétisée par Applied Biosystems (Foster City, CA), a un espaceur de 18 atomes et une fonction amine en N-terminal. Toutes les sondes utilisées ciblent une région hautement polymorphique du gène *bla_{SHV-1}* (127). La séquence des sondes de 15 nucléotides (ADN ou APN) est CCGCTCGCCAGCTCC alors que la séquence de la sonde de 20 nucléotides (ADN) est CCCCCTCGCCAGCTCCGGT.

Orientation	Position	Séquence	Longueur 5'	Longueur 3'
Forward	604	CAGCTGCTGCAGTGGATGGT	91	
	644	CGTTGATCCGCTCCGTG	51	
	671	GCTGGTTTATCGCCGATAAG	23	
	694	GGAGCTGGCGAGCGG	0	
Reverse	763	GTATCCCGCAGATAAATCACCCAC		77

Tableau 1. Séquence des amorces utilisées pour l'amplification du gène *bla_{SHV-1}*

Préparation des surfaces de verre

Toutes les réactions chimiques ont été effectuées dans des fioles de polypropylène. Les surfaces utilisées étaient des lames de verre de 25 millimètres par 75 millimètres (VWR Scientific, West Chester, PA). Après sonication (1 heure) dans l'eau désionisée, les lames ont été soniquées dans 40 ml de NaOH 10% pour 1 heure, lavées trois fois avec de l'eau désionisée, et séchées sous un jet d'azote. Ensuite, les lames ont été soniquées dans une solution d'aminopropyltriméthoxysilane (2 ml d'eau, 38 ml MeOH et 2 ml d'aminopropyltriméthoxysilane) pour 1 heure, lavées avec du méthanol, séchées et cuites au four à 110°C pendant 15 minutes. Les lames couvertes de groupements amine ont été activées par une sonication de 16 heures dans 40 ml de 1,4-dioxane contenant 0.32 g (2

mmol) de carbonyldiimidazole, lavées au dioxane et à l'éther diéthylique, et séchées sous un jet d'azote.

Préparation des biopuces

Les sondes ont été diluées par l'addition d'un volume égal de *Microspotting Solution Plus* (Telechem International, Sunnyvale, CA), pour obtenir une concentration finale de 5 μ M. Chacune des sondes de capture a été déposée en triplicat avec un VIRTEK SDDC-2 (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA) utilisant des pointes SMP3 (Telechem international). Après le dépôt des sondes, les lames ont été séchées pendant 16 heures, puis lavées par immersion dans l'Igepal CA-630 0.1 % bouillant pour 5 minutes, rincées dans l'eau ultra-pure pendant 2 minutes, et séchées par centrifugation pendant 5 minutes (SpeedVac plus ; Savant, Milford Thermo, MA). Les lames ont été stockées à la température ambiante dans un environnement sec et en absence d'oxygène.

Amplification et marquage

Des nucléotides fluorescents ont été incorporés à l'amplicon pendant l'amplification PCR. Le mélange PCR de 50 μ l contient : 0.05 mM dATP, 0.05 mM dCTP, 0.05 mM dGTP, 0.02 mM dTTP, 5 mM KCl, 1 mM Tris-HCl (pH 9), 0.01% Triton X-100, 2.5 mM MgCl₂, 0.5 unités d'ADN polymérase Taq (Promega, Madison, WI), 1 ng d'ADN génomique purifié, 0.2 μ M de chacune des deux amorces, et 0.02 μ M de dCTP-Cy5 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Qc). L'amplification PCR (180 s à 94°C suivi de 40 cycles de deux étapes, soit 1 s à 95°C et 30 s à 60°C et, finalement, de 120 s à 72°C) a été effectuée dans un cycleur thermique PTC-200 DNA Engine (MJ Research, Reno, NV).

Hybridation et détection

La préhybridation et l'hybridation sont faites dans des chambres d'hybridation autocollantes *Hybri-well* de 15 mm par 13 mm ayant un volume de 20 μ l (Sigma-Aldrich; St. Louis, MI). Les biopuces sont préhybridées pendant 30 minutes à la température de la pièce dans une solution d'hybridation 1X composée de 6X SSPE, de 0.03% polyvinylpyrrolidone (PVP) et de 30% formamide. L'amplicon est dénaturé par incubation à 95°C pendant 5 minutes dans un PTC-200 (MJ Research), puis mis sur glace. 5 μ l

d'échantillon est mélangé à 15 μ l de solution d'hybridation 1,5X. La solution de préhybridation est expulsée de la chambre d'hybridation par jet d'air et elle est remplacée par la solution d'hybridation contenant la cible. L'hybridation a lieu à la température de la pièce (22°C) pendant approximativement 16 heures.

Après l'hybridation, la chambre d'hybridation est décollée et la lame est immergée dans le 2X SSPE-0.1% SDS pendant 2 minutes à la température de la pièce avec une agitation de 2 sur un *Lab Rotator* (Lab-line, Dubuque, IA). Elles sont ensuite rincées deux minutes dans le 2X SSPE et séchées par centrifugation à 1348 x g pour 3 minutes dans une *CR3i compact multi-function refrigerated bench-top centrifuge* (Jouan, Winchester, VA). Les biopuces sont numérisées avec *ScanArray 4000XL* (Packard Bioscience Biochip Technologies; Billerica, MA). Le signal fluorescent est dosé avec le logiciel *QuantArray 3.0.0.0* (Packard Bioscience Biochip Technologies). Les moyennes et écarts-types sont calculés avec *Microsoft Access 97* et les graphiques sont créés avec *Microsoft Excel 97*.

2.7.3 Résultats et discussion

Quatre amplicons ont été préparés et hybridés sur une biopuce contenant trois sondes de capture de séquence similaire : une sonde APN de 15 nucléotides, une sonde ADN de 15 nucléotides et une sonde ADN de 20 nucléotides. Les amplicons utilisés ont tous une extrémité 3' de 77 nucléotides tandis que leur extrémité 5' est de zéro nucléotide, de 23 nucléotides, de 51 nucléotides et de 91 nucléotides. Ils sont produits avec les amorces 763 et 694 pour le premier amplicon, 763 et 671 pour le second, 763 et 644 pour le troisième, et 763 et 604 pour le quatrième amplicon. Après une hybridation de 16 heures entre ces quatre amplicons et la sonde APN, un signal d'hybridation significatif est observé lorsque l'extrémité 5' de l'amplicon est de 0 ou de 23 nucléotides, tandis qu'aucun signal significatif n'est observé si l'extrémité 5' est de 51 ou de 91 nucléotides (Figure 7A). Dans le cas d'une sonde ADN de 15 nucléotides, l'hybridation à l'un ou l'autre des quatre amplicons permet l'obtention d'un signal d'hybridation significatif (Figure 7B). Un signal d'hybridation significatif est aussi observé lors de l'hybridation de chacun des quatre amplicons avec la sonde ADN de 20 nucléotides (Figure 7C). La différence d'hybridation entre la sonde APN et les deux sondes ADN suggère que l'hybride APN-amplicon est plus sensible à la déstabilisation par le brin complémentaire de l'amplicon que les hybrides ADN-amplicon. Comme le montre la figure 7, l'influence de la longueur de l'extrémité 5' sur l'hybridation semble plus forte sur une sonde APN que sur une sonde ADN de même longueur.

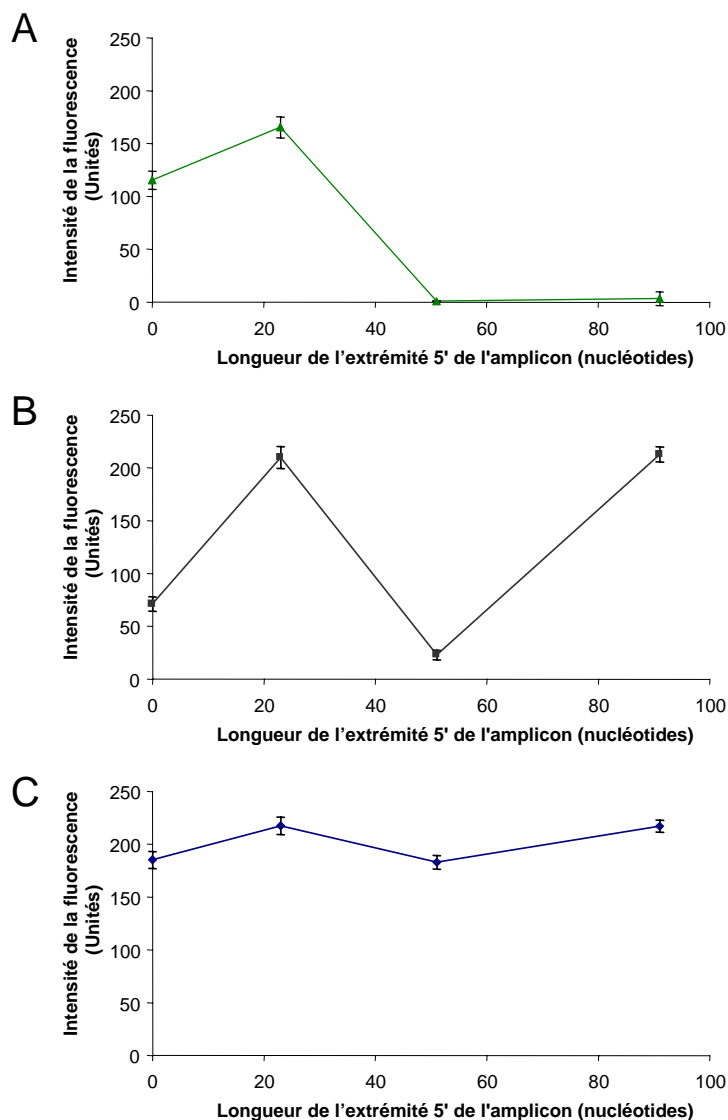


Figure 7. Influence de la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon sur le signal d'hybridation. Le signal obtenu après une hybridation de 16 heures entre les sondes et les amplicons est représenté selon la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon pour chacune des trois sondes utilisées. Influence de la longueur de l'extrémité 5' sur l'hybridation d'un amplicon à A) une sonde APN de 15 nucléotides, B) une sonde ADN de 15 nucléotides et C) une sonde ADN de 20 nucléotides. Les résultats présentés correspondent à la moyenne de triplicats intra-expérimentaux. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de ces trois résultats.

Les résultats obtenus permettent de proposer qu'une sonde APN subit des contraintes similaires à celles décrites pour une sonde ADN dans les sections 2.2 à 2.6 de ce mémoire, c'est-à-dire que la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon hybridé à la sonde de capture influence le signal obtenu et peut entraîner des faux-négatifs. Selon ces résultats, ces contraintes pourraient avoir un impact encore plus grand dans le cas d'une sonde APN que dans le cas d'une sonde ADN. Cela est contre-intuitif car, comme un APN devrait avoir un T_m plus élevé qu'un ADN identique, sa liaison avec l'ADN cible devrait être plus forte (61). Cependant, la différence d'hybridation entre les deux sondes de 15 nucléotides avec les amplicons ayant une extrémité 5' de 51 ou de 91 nucléotides pourrait être expliquée par la différence de structure entre la sonde ADN et la sonde APN. Comme les deux molécules ont un squelette différent chimiquement, la conformation et la flexibilité des hybrides ADN-ADN et APN-ADN sont différents. Sen *et al.* ont observé que l'APN simple-brin conservait une structure stable au cours du temps tandis que l'ADN simple-brin et l'ARN simple-brin avaient des conformations variables. Ils attribuent cette stabilité à l'empilement des bases qui est stable chez l'APN simple-brin, contrairement à l'ADN et l'ARN. De plus, ils ont observé que la liaison entre le squelette et les bases de l'APN était plus rigide que celles des ADNs ou des ARNs (56). Le squelette des acides peptido-nucléiques étant plus rigide que celui des acides désoxyribonucléiques, l'amplicon hybridé pourrait être plus facilement déstabilisé lorsque hybridé à une sonde APN comparativement à une sonde ADN. Une sonde APN pourrait ne pas s'adapter aux changements conformationnels entraînés par l'hybridation de l'amplicon cible avec son brin complémentaire, ce qui faciliterait le bris des ponts hydrogène entre la sonde et sa cible.

L'hypothèse selon laquelle une sonde plus courte nécessite une extrémité 5' plus courte pour être déstabilisée ne peut être confirmée par les résultats présentés à la figure 7. Selon les résultats obtenus, il n'est pas possible de conclure que la longueur de la sonde de capture influence l'impact de la position ciblée sur l'amplicon sur le signal d'hybridation. Ainsi, l'hypothèse proposant qu'un amplicon hybridé à une sonde plus longue soit moins sujet à être déstabilisé que s'il est hybridé à une sonde plus courte ne peut être confirmée. Wang *et al.* a déjà montré qu'une molécule hybridée à une sonde plus longue permet un signal d'hybridation plus fort que si elle est hybridée à une sonde plus courte (20). Il serait intéressant de comparer la longueur minimale d'extrémité 5' nécessaire à la déstabilisation

d'un amplicon hybridé à une sonde de 15 nucléotides comparativement à un amplicon hybridé à une sonde de 20 nucléotides.

Les résultats présentés dans la figure 3 suggèrent que l'extrémité 5' de l'amplicon doit être supérieure à 200 nucléotides afin d'entraîner la déstabilisation de l'amplicon hybridé à une sonde de capture de 20 nucléotides. Cependant, comme le montre la figure 3, la longueur d'extrémité 5' nécessaire au bris du duplex sonde-amplicon varie d'une sonde à l'autre. D'un même point de vue, il est possible que certains amplicons ayant une extrémité 5' courte aient un signal d'hybridation faible. Par exemple, comme observé dans la figure 7B, l'amplicon ayant une extrémité 5' de 51 nucléotides donne un signal d'hybridation inférieur à celui obtenu avec les amplicons ayant des extrémités 5' de 0, de 23 ou de 91 nucléotides. Selon le modèle d'hybridation décrit dans les sections 2.2 à 2.6 de ce mémoire, le signal obtenu lors de l'hybridation de l'amplicon ayant une extrémité 5' de 51 nucléotides aurait dû donner un signal d'hybridation aussi élevé que ceux obtenus avec les trois autres amplicons. Ce résultat suggère que d'autres paramètres thermodynamiques pourraient influencer l'hybridation d'amplicons à des sondes de capture. Comme il a déjà été observé que chaque sonde se comporte différemment (Figure 3), il est possible que chaque amplicon ait une interaction propre avec la sonde avec laquelle il interagit.

Un autre élément de la figure 7 peut sembler discordant. Le signal d'hybridation observé sur chacune des deux sondes de 15 nucléotides avec l'amplicon ayant une extrémité 5' de 23 nucléotides est plus élevé que celui n'ayant aucune extrémité 5' (0 nt). Cette différence de signal pourrait être expliquée par une différence de marquage entre les deux amplicons, car l'amplicon ayant une extrémité 5' de 23 nucléotides est plus long, ce qui pourrait entraîner l'incorporation de nucléotides fluorescents supplémentaires lors de l'amplification. Il est aussi possible que cet amplicon soit mieux adapté à l'hybridation que l'amplicon n'ayant aucune extrémité 5'.

**Chapitre III - Détection d'ADN non-marqué en utilisant
un polymère cationique fluorescent et des sondes d'acides
peptido-nucléiques**

Solid-state detection of DNA using fluorescent cationic polymer and peptide nucleic acid (PNA) probes

Frédéric R. Raymond^{1,3}, Hoang-Anh Ho^{2,3}, Régis Peytavi¹, Luc Bissonnette¹, Maurice Boissinot¹, François J. Picard¹, Mario Leclerc² and Michel G. Bergeron¹

¹ Centre de recherche en infectiologie, Centre hospitalier universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada, G1V 4G2.

² Canada Research Chair in Electroactive and Photoactive Polymers, Département de Chimie, Université Laval, Quebec City, Qc, Canada, G1K 7P4.

³ These authors contributed equally to this work.

Soumis à BMC Biotechnology le 17 juin 2004.

Correspondance should be adressed to M.G.B. and M.L.

3.1 Résumé français

Une nouvelle méthode permettant la détection fluorescente d'acides nucléiques non-marqués a été développée. Nous avons développé un polythiophène cationique soluble capable de traduire l'hybridation d'un ADN à une sonde en un signal fluorescent détectable avec un lecteur de biopuces conventionnel. Comme l'ADN est chargé négativement, le polymère s'y lie par des liens ioniques. Cela cause un bruit de fond indésirable lorsque les sondes utilisées sont faites d'ADN. L'acide peptido-nucléique (APN), un analogue neutre d'acide nucléiques, permet l'utilisation du polymère pour la détection d'événements d'hybridation sans problème de bruit de fond aspécifique dû à la liaison du polymère aux sondes. Cette combinaison biosenseur (APN) - transducteur (polymère) apporte une nouvelle approche à la détection de l'ADN sur biopuce.

3.2 Introduction

The rapid, sensitive, and specific detection of nucleic acids is of central importance for genetic analysis. DNA microarray methodologies allow to carry multiple interrogations simultaneously (27,128-131). However, most of these methods have the disadvantage of requiring the chemical coupling of a photoactive or electroactive tagging agent onto the target or the probe prior to hybridisation. In solution, it has been previously demonstrated that smart materials such as cationic polymers can be used as signal transducers of nucleic acid hybridization and discriminate single nucleotide polymorphisms (SNP) (92,97,99,132). Peptide nucleic acid (PNA) probes (90,133,134), which are DNA analogs with a neutral polyamide backbone, show a stronger and more specific affinity for complementary DNA than analogous DNA/DNA complexes (50,135). By combining surface-attached PNA probes and fluorescent cationic polythiophene transducers, here we show a remarkably simple and sensitive solid-state electrostatic approach which enables the direct detection and specific identification of the complementary nucleic acid analyte without any covalently tagged reporter molecule.

3.3 Materials and methods

Materials

All chemical reagents were obtained from Sigma-Aldrich Co. (St-Louis, MI) and were used without further purification unless otherwise noted. Polymeric transducer, poly(1H-imidazolium, 1-methyl-3-[2-[(4-methyl-3-thienyl)oxy]ethyl]-, chloride), was prepared following already published procedures (92,96). Oligodeoxyribonucleotide capture probes, which were 5'-modified by the addition of two nine carbon spacers and an amino-linker, were synthesised by Biosearch Technologies (Novato,CA). Peptide nucleic acids capture probe having a N-terminal amine and two O linkers was synthesized by Applied Biosystems (Foster City, CA). The amino-linker modification permits the covalent attachment of probes onto a functionalised glass surface. All capture probes target a highly polymorphic region of the *bla*_{SHV-1} gene. The sequence of the 15 mer (DNA or PNA) probe is CCGCTCGCCAGCTCC. Target oligonucleotides complementary to the probe (GGAGCTGGCGAGCGG), complementary target having two-mismatched bases (GGCGCTGACGAGCGG) and complementary target having a single central mismatch (GGAGCTGACGAGCGG) were also synthesized by Biosearch Technologies.

Preparation of glass slides

All chemical reactions were carried out in polypropylene jars. Surfaces used were 25 mm x 75 mm microscope glass slides (VWR Scientific, West Chester, PA). After sonication (1 hour) in deionized water, the slides were sonicated in 40 mL of 10% NaOH for 1 hr, washed several times with deionized water, and dried under a stream of nitrogen. The slides were then sonicated in an aminopropyltrimethoxysilane solution (2 mL water, 38 mL MeOH and 2 mL aminopropyltrimethoxysilane) for 1 hr, washed with methanol, dried and baked at 110°C for 15 min. The amine modified slides were activated by sonication overnight in 40 mL of 1,4-dioxane containing 0.32 g (2 mmol) of carbonyldiimidazole as coupling agent, washed with dioxane and diethyl ether, and dried under a stream of nitrogen.

Microarray production

The probes were diluted two-fold by the addition of Array-it Microspotting Solution Plus (Telechem International, Sunnyvale, CA), to a final concentration of 5 μ M. Capture probes were spotted in triplicate, using a VIRTEK SDDC-2 arrayer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) with SMP3 pins (Telechem International). Upon spotting, each spot has a volume of 0,6 nL, a diameter between 140 and 150 μ m and contains about $1,8 \times 10^9$ amino-modified probes. After spotting, slides were dried overnight, washed by immersion in boiling 0.1% Igepal CA-for 5 min, rinsed in ultra-pure water for 2 min, and dried by centrifugation for 5 min under vacuum (SpeedVac plus; Thermo Savant, Milford, MA). Slides were stored at room-temperature in a dry, oxygen-free environment.

DNA microarray hybridization, polymeric detection and data acquisition

Prehybridization and hybridization were performed in 15 x 13 mm Hybri-well self-sticking hybridization chambers (Sigma-Aldrich). Microarrays were first prehybridised for 15 min at room temperature with 20 μ L of 1X hybridization solution (6X SSPE [Omnipur], 0.03% polyvinylpyrrolidone [PVP], and 30% formamide). Subsequently, the prehybridization buffer was blown out of the chambers and replaced with the same buffer containing the target oligonucleotide (complementary, central mismatch or two mismatches) at a final concentration of 2.5 μ M, except for sensitivity experiments for which concentrations ranged from 0.25 nM to 2.5 μ M. Hybridization was carried out at 22°C for 15 minutes. After hybridisation, the liquid was expelled from the chambers and replaced by an aqueous solution of cationic polymer (7.3×10^{-4} M based on monomeric units). After a 15 min incubation period, the slides were washed with deionized water containing 0,1 % Igepal CA-630. Microarrays were dried by centrifugation at 3000 rpm for 3 minutes. Slides were scanned using the Cy3 configuration (excitation wavelength at 530 nm) of ScanArray 4000XL (Packard Bioscience Biochip Technologies; Billerica, MA) and the fluorescent signals were analysed using QuantArray software (Packard Bioscience Biochip Technologies).

3.4 Results and discussion

Our preliminary experiments with commercially available aldehyde-functionalized glass slides (Cel Associates) permitted labeled-oligonucleotide detection with PNA probes but gave strong background and no or poor signal when detection was conducted using our polymeric biosensor (data not shown). To solve this challenge, central to the utilization of polythiophene transducers on PNA microarrays, we explored different surface chemistries. Glass functionalization methods were developed and permitted the comparison between commercial aldehyde slides and home-made aminoalkylsilane slides activated with carbonyldiimidazole (Figure 8) (32). Fluorophore-labeled targets and polymeric detection were both tested on each type of functionalized slide. First, we observed a significant increase in hybridisation signal when aminoalkylsilane slides were used in detection experiments using targets labeled with fluorophores. Also, those slides were compatible with detection using the polymeric biosensor, while aldehyde slides gave no signal (data not shown). The aminated slides activated by carbodiimidazole were then chosen to immobilize both DNA and PNA capture probes for all experiments described hereafter.

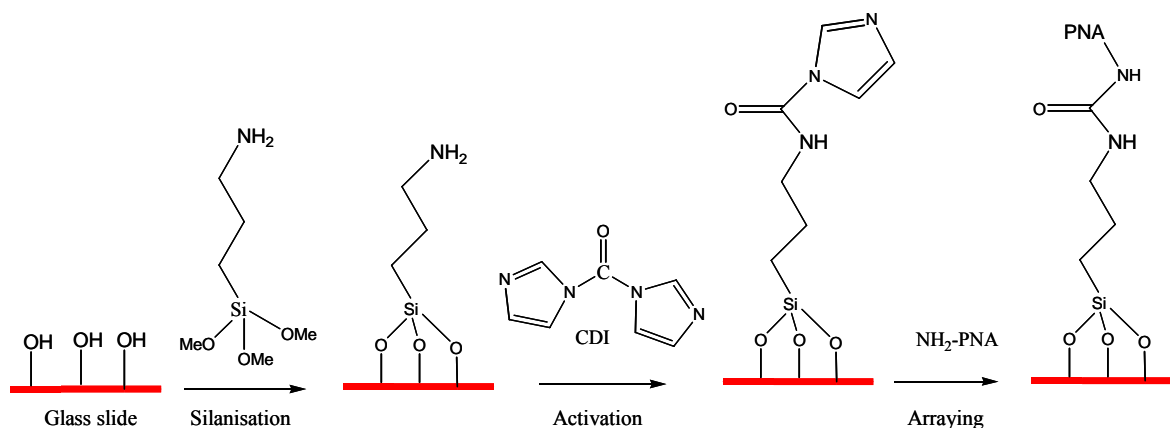


Figure 8. Principles of glass modification. Silanisation of microscope slides, followed by activation of amine with carbonyldiimidazole (CDI) to attach arrayed PNA (or oligonucleotide) capture probe on the surface.

Cationic polythiophene binds nucleic acids via electrostatic interactions with negatively-charged phosphate groups of DNA backbone. Therefore, oligonucleotide capture probes produce important background which interfered with detection using our polymeric biosensor. This is illustrated in Figure 9 where single-stranded DNA capture probes (Figure 9A) and target/probe double-stranded DNA hybrids (Figure 9B) both produce fluorescent signals due to the formation of DNA-polythiophene complexes. Thus, discrimination between hybridized and non-hybridized spots is severely hampered when using a conventional microarray made with DNA capture probes. In contrast, the cationic polymer do not bind to neutral PNA capture probes alone (Figure 9C), but strongly interact with negatively charged backbone of the complementary oligonucleotide bound to PNA probes allowing transduction of hybridisation into fluorescence (Figure 9D). Our results obtained on solid support, are consistent with those previously reported by Gaylord *et al.* using cationic polyfluorene derivatives and PNA probes in aqueous solutions (98). This study clearly demonstrated the usefulness of PNA capture probes for the detection of hybridisation events with positively-charged fluorescent conjugated polymers on solid support.

Specificity of polymeric detection was investigated by hybridising mismatched oligonucleotides with PNA probes. After 15 minutes hybridisation of oligonucleotides with PNA probes, at room temperature, polymeric detection gave a strong signal over background when target oligonucleotide was fully complementary to the capture probe. Single- and double-mismatched oligonucleotides produced near-background signals easily distinguishable from the much stronger signal observed with perfectly matched hybrids (Figure 10). These results suggest that high specificity could be achieved using PNA probes grafted onto solid supports. The sensitivity of the detection scheme described here is approximately 2.5×10^{-13} mole of oligonucleotide.

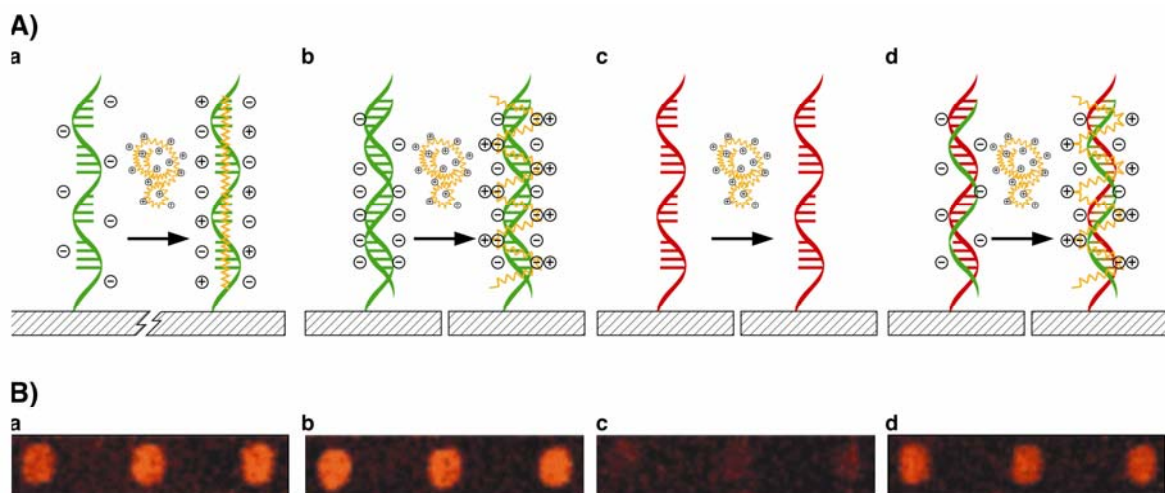


Figure 9. Cationic polythiophene transducer for the fluorometric detection of hybridisation on microarrays. A) Schematic depiction of the interaction between cationic polymers and a) single stranded DNA, b) double-stranded DNA, c) single stranded PNA and d) PNA-DNA duplex. Cationic fluorescent polymer is shown in yellow, DNA is shown in green and PNA is shown in red. B) Experimental results for fluorometric detection on microarray when cationic polythiophene transducer is reacted with a) single stranded DNA, b) double-stranded DNA, c) single stranded PNA and d) PNA-DNA duplex. Results are shown in triplicate.

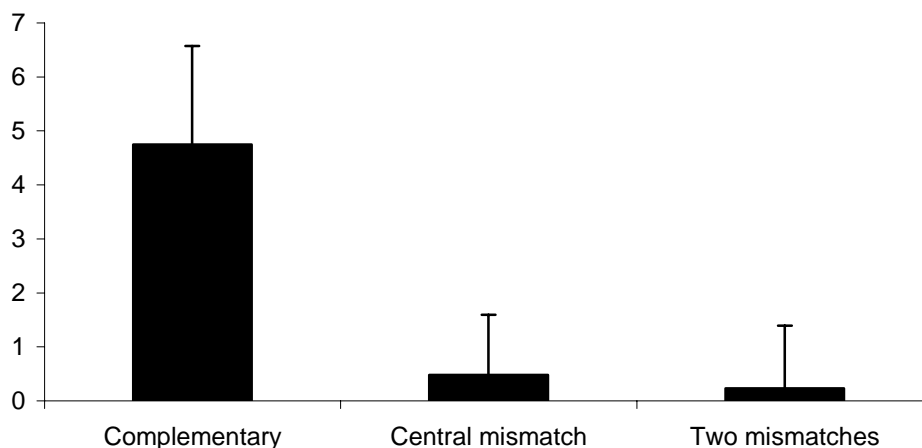


Figure 10. Specificity of oligonucleotides' hybridisation to PNA probes when polymeric detection is used as transducer. Hybridisations were done at room temperature with a concentration of 7.5×10^{10} targets per μl . Hybridisation of PNA probes to complementary, centrally mismatched and twicely mismatched oligonucleotides were done three times each. Fluorescence intensities of probes were corrected by subtraction of background fluorescence intensity.

In conclusion, this simple solid-state polymeric approach allows multiple DNA detections rapidly (15 minutes) and specifically without any chemical tagging of the probes or the analytes. In a recent report, Nilsson and Inganäs have shown the use of a similar polymeric biosensor able to detect 2×10^{-8} mole in a hydrogel surface (99). Our approach based on standard glass slide support microarray technologies, is already five orders of magnitude more sensitive (limit of detection of 2×10^{-13} mole for 20-mer oligonucleotide analytes) and major progress in term of sensitivity should be obtained by using more efficient fluorescent reporter / exciting source combinations and by reducing the size of the spots and hybridization reaction volumes. The detection of larger DNA molecules (e.g. amplicons) will also increase sensitivity since the amount of complexed polymeric fluorescent transducer is theoretically proportional to the amount of possible electrostatic interactions. It is worth noting that recent optimizations of this electrostatic polymeric approach have enabled the detection of only few hundred molecules of genetic materials in aqueous solutions and clearly indicate the great potential for cationic conjugated polymers as highly sensitive fluorescent transducers (96). This remarkably simple methodology opens exciting possibilities for genetic analysis applied for the diagnosis of infections, identification of genetic mutations, and forensic inquiries. For instance, this would allow the use of PNA microarray technology for the identification of pathogens and related antimicrobial resistance genotypes. Finally, the electroactivity of the present polythiophene derivative could be exploited for a real-time electrical discrimination of SNPs on solid support.

3.6 Acknowledgement

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Infectio Diagnostic (IDI) Inc., and the Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Research and Technology Initiative (CRTI).

Chapitre IV – Conclusions

4.1 Conclusions

Ce projet comportait deux sections complémentaires. La première section traitait du développement de biopuces ayant comme sondes de capture de courts fragments d'ADN ou d'APN. La deuxième section décrivait comment une biopuce à APN pouvait être utilisée comme support pour l'hybridation d'ADN non-marqué détecté par un polymère cationique fluorescent.

Les expériences avec une biopuce servant à l'hybridation de cibles marquées ont permis de développer un nouveau modèle expliquant la cinétique d'hybridation de produits PCR à une sonde de capture ADN de 20 nucléotides. Suite à l'évaluation de plusieurs sondes distribuées dans deux régions d'un amplicon produit à partir du gène *tuf*, nous avons observé que l'une des deux régions ne produisait aucun signal en présence de son complémentaire alors que l'autre région produisait un signal fort. Suite à ces faux-négatifs, nous avons conçu des sondes ciblant plusieurs régions du gène *ErmB*. Lors de l'hybridation à un amplicon marqué, nous avons observé le même patron de faux-négatifs. Nous avons conclu que la position ciblée par la sonde sur un amplicon pouvait influencer le signal obtenu jusqu'à provoquer des faux-négatifs. Plus précisément, le signal d'hybridation diminue lorsque la longueur de la partie de l'amplicon qui dépasse de la sonde vers la solution augmente. L'utilisation d'amplicons simple-brin, produits par PCR asymétrique, comme cibles d'hybridation éliminait en partie l'influence de la longueur de l'extrémité 5' de l'amplicon sur le signal d'hybridation. Nous avons conclu que la longueur de la partie de l'amplicon dépassant de la sonde était responsable d'une augmentation de la probabilité de réappariement entre l'amplicon hybridé et son complémentaire toujours présent en solution. Des études de cinétique d'hybridation ont montré que ce phénomène était dynamique et que, en fonction du temps d'hybridation, l'effet déstabilisateur du brin complémentaire était plus ou moins observable. De plus, des amplicons simple-brin hybridés à une sonde de capture étaient déstabilisés (perte totale du signal d'hybridation), lorsqu'ils étaient incubés en présence de leur brin complémentaire. La sélection de la position ciblée sur l'amplicon par les sondes permet d'éviter la déshybridation des cibles et de faire une conception plus efficace des sondes de capture. La compréhension de l'influence de la position ciblée par la

sonde de capture sur l'amplicon permettra de sélectionner des sondes et des amorces mieux adaptées à l'hybridation sur un support solide.

Le développement d'une biopuce composée de sondes APN a été un défi de taille. Pour commencer, nous avons montré l'immobilisation de sondes APN sur un support solide en y hybridant des oligonucléotides marqués. Par contre, les premiers essais d'hybridation aux sondes APN d'amplicons ayant une extrémité 5' supérieure ou égale à 90 nucléotides ont été infructueux. L'étude de l'influence de la longueur de l'extrémité 5' sur l'hybridation d'amplicons à une sonde de capture APN a permis d'observer qu'une hybridation entre un amplicon et une sonde APN n'était possible que si l'extrémité 5' de l'amplicon était très courte. Ainsi, un amplicon ayant une extrémité orientée vers la solution de moins de 23 nucléotides produisait un signal d'hybridation sur la sonde APN tandis qu'un amplicon ayant une extrémité de plus de 50 nucléotides ne produisait aucun signal. Tout comme les sondes de capture ADN, les sondes de capture APN semblent subir une déstabilisation lorsque l'extrémité 5' de l'amplicon hybridé dépasse une limite. Ainsi, le choix de l'amplicon utilisé comme cible pour l'hybridation à des sondes APN peut être la cause de faux-négatifs.

L'utilisation de sondes de capture APN a permis d'utiliser un nouveau transducteur permettant la détection d'ADN non-marqué hybridé sur une biopuce. Le polymère senseur d'acides nucléiques avait déjà prouvé sa capacité à détecter l'hybridation d'ADN en solution ou dans un gel, mais jamais sur un support solide. Ayant une charge positive, le polymère se lie à l'ADN, qui est chargé négativement. L'utilisation du polymère pour détecter l'hybridation de cibles sur des sondes de capture immobilisées sur un support solide nécessitait le développement d'une stratégie permettant d'éviter le bruit de fond dû à l'adsorption du polymère sur les sondes ADN. La stratégie préconisée fut l'utilisation de sondes de capture faites d'APN, un analogue neutre de l'ADN. Le polymère permet l'obtention d'un signal fluorescent lorsqu'un oligonucléotide est hybridé à la sonde APN tandis qu'il ne montre aucun signal lorsqu'aucun complémentaire à l'APN n'est présent en solution. Il a aussi été possible de discriminer des polymorphismes d'une seule base. Cette méthode a permis la détection d'une concentration de 2.5×10^{-13} mol ($1,5 \times 10^{11}$ molécules) de cibles oligonucléotidiques en moins de 45 minutes. Actuellement, notre méthode est peu

sensible, car sa limite de détection est inférieure de plusieurs ordres de grandeur à celle couramment utilisée (marquage d'ADN avec des fluorophores disponibles commercialement). Cependant, les résultats obtenus en solution par *Doré et al.* suggèrent qu'il est possible d'atteindre un fort niveau de sensibilité avec le polymère senseur d'acides nucléiques (96).

Même si la détection d'oligonucléotides synthétiques par le polymère était un modèle adéquat pour prouver que le polymère et l'APN pouvaient être utilisés conjointement pour détecter de l'ADN non-marqué, la détection d'une cible plus apparentée à un échantillon réel est essentielle. Ainsi, l'étape suivante consiste en la détection par le polymère d'amplicons hybridés à une sonde APN. Comme il a été montré au chapitre 2, l'hybridation d'un amplicon à une sonde APN subit des contraintes exceptionnelles et ces paramètres doivent être considérés lorsque des sondes de capture APN sont utilisées. Cependant, même en considérant ces paramètres, il n'a pas été possible de détecter l'hybridation d'amplicons à une sonde APN avec le polymère. L'hybridation d'amplicons à une sonde APN étant moins sensible que l'hybridation à une sonde ADN, la sensibilité de la détection par le polymère est limitée par la quantité de cibles hybridées. D'un autre côté, le bruit de fond causé par l'adsorption non-spécifique du polymère sur le verre limite la sensibilité de la détection avec le polymère sur un support solide. Ces deux désavantages rendent difficile la détection d'amplicons avec cette méthode. Une optimisation de la détection polymérique est nécessaire afin d'augmenter la sensibilité de cette technique et de détecter des cibles moins abondantes et dont l'hybridation est moins efficace que des oligonucléotides. L'appareil utilisé pour détecter le polymère a aussi une influence sur les résultats obtenus. L'appareil disponible pour la lecture des biopuces permet d'exciter à 530 nm et de lire à 570 nm. Cependant, même si ces longueurs d'ondes permettent d'exciter et de détecter le polymère, elles ne sont pas optimales, car le pic d'excitation du polymère est obtenu lorsqu'il est excité à 420 nm. Si la détection était effectuée avec les longueurs d'ondes appropriées, une proportion importante du bruit de fond serait éliminée et la sensibilité du système serait améliorée.

4.2 Perspectives

En ce qui a trait aux perspectives découlant des travaux déjà effectués, le modèle d'hybridation décrit au chapitre 2 et la détection de l'hybridation avec un polymère senseur d'acides nucléiques décrit au chapitre 3 pourront faire l'objet de nouvelles études. Aussi, le développement d'un système diagnostique sensible, spécifique et rapide sur biopuces n'en étant qu'à ses premières étapes de développement, plusieurs étapes doivent être franchies :

- L'évaluation de l'influence de la position de l'amplicon ciblée par la sonde sur la spécificité de l'hybridation afin de développer des stratégies pour rendre les sondes conçues plus spécifiques par la déstabilisation des hybrides non-complémentaires.
- Le développement d'une méthode de conception de sondes permettant d'éliminer *in silico* les sondes de mauvaise qualité.
- L'utilisation d'analogues neutres d'acides nucléiques autres que l'APN, par exemple les méthylphosphonates, comme sondes de capture pour la détection avec le polymère.
- Le développement d'un protocole de détection polymérique incluant des étapes de blocage et de lavage permettant d'éliminer le bruit de fond dû à l'adsorption du polymère sur le verre et ainsi d'améliorer la sensibilité du système.
- L'utilisation d'un lecteur de biopuces ayant des profils de détection fluorescente adaptés à la détection du polymère senseur d'acides nucléiques. Un tel appareil est présentement en développement chez nos collaborateurs.
- L'intégration de la biopuce développée dans un système microfluidique fermé qui, après l'insertion de l'échantillon, est indépendant de l'utilisateur. L'intégration de la biopuce dans un système microfluidique permettra de diminuer le temps d'hybridation tout en rendant cette dernière plus sensible.
- Le développement de sondes permettant l'identification précise et spécifique des pathogènes et des gènes de résistance aux antibiotiques ou de virulence qui leur sont

associés, ainsi que la vérification de ces sondes pour ce qui est de leur spécificité et de leur ubiquité.

- L'amélioration de la sensibilité du système biosenseur-transducteur afin de détecter l'ADN génomique non-marqué qui n'a subi aucune étape d'amplification PCR.

Comme le suggèrent ces perspectives, plusieurs domaines de recherche seront impliqués dans le développement à long terme d'un système de diagnostic moléculaire permettant d'identifier plusieurs pathogènes à la fois ainsi que les gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques qui leur sont associés. Déjà, ce projet de maîtrise a montré que l'alliance de la biologie moléculaire et de la chimie des polymères permet de créer de nouvelles technologies utilisables dans plusieurs domaines. Ainsi, comme le suggèrent les perspectives énoncées ci-dessus, les connaissances biologiques, chimiques, informatiques et physiques devront être mises en commun afin de permettre un développement rapide et innovateur des technologies diagnostiques.

Bibliographie

1. Boissinot, M. and Bergeron, M. G. (2002) Toward rapid real-time molecular diagnostic to guide smart use of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol.*, **5**, 478-482.
2. Bergeron, M. G. and Ouellette, M. (1998) Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 2169-2172.
3. Bergeron, M. G. and Ouellette, M. (1995) Diagnosing bacterial infectious diseases in one hour: An essential upcoming revolution. *Infection.*, **23**, 69-72.
4. Bergeron, M. G. (2001) In Bruns, D. E. (ed.), *Molecular Testing in Laboratory Medicine*. AACC Press, Washington, D.C., pp. 217-218.
5. Fredricks, D. N. and Relman, D. A. (1999) Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis.*, **29**, 475-486.
6. Foy, C. A. and Parkes, H. C. (2001) Emerging homogeneous DNA-based technologies in the clinical laboratory. *Clin Chem.*, **47**, 990-1000.
7. Tang, Y. W., Procop, G. W. and Persing, D. H. (1997) Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.*, **43**, 2021-2038.
8. Picard, F. J. and Bergeron, M. G. (2002) Rapid molecular theranostics in infectious diseases. *Drug Discov Today.*, **7**, 1092-1101.
9. Pfaller, M. A. and Herwaldt, L. A. (1997) The clinical microbiology laboratory and infection control: emerging pathogens, antimicrobial resistance, and new technology. *Clin Infect Dis.*, **25**, 858-870.
10. Jain, K. K. (2000) Applications of biochip and microarray systems in pharmacogenomics. *Pharmacogenomics.*, **1**, 289-307.
11. Gilbert, G. L. (2002) Molecular diagnostics in infectious diseases and public health microbiology: cottage industry to postgenomics. *Trends Mol Med.*, **8**, 280-287.
12. Vo-Dinh, T. and Cullum, B. (2000) Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J Anal Chem.*, **366**, 540-551.
13. Petricoin, E. F., 3rd, Hackett, J. L., Lesko, L. J., Puri, R. K., Gutman, S. I., Chumakov, K., Woodcock, J., Feigal, D. W., Jr., Zoon, K. C. and Sistare, F. D. (2002) Medical applications of microarray technologies: a regulatory science perspective. *Nat Genet.*, **32 Suppl**, 474-479.
14. Talary, M. S., Burt, J. P. and Pethig, R. (1998) Future trends in diagnosis using laboratory-on-a-chip technologies. *Parasitology.*, **117 Suppl**, S191-203.
15. Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. (2000) Antimicrobial susceptibility testing: special needs for fastidious organisms and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clin Infect Dis.*, **30**, 799-808.
16. Bekal, S., Brousseau, R., Masson, L., Prefontaine, G., Fairbrother, J. and Harel, J. (2003) Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol.*, **41**, 2113-2125.
17. Davies, T. A. and Goldschmidt, R. (2002) Screening of large numbers of *Streptococcus pneumoniae* isolates for mutations associated with fluoroquinolone resistance using an oligonucleotide probe assay. *FEMS Microbiol Lett.*, **217**, 219-224.

18. Mikhailovich, V., Lapa, S., Gryadunov, D., Sobolev, A., Strizhkov, B., Chernyh, N., Skotnikova, O., Irtuganova, O., Moroz, A., Litvinov, V., Vladimirkii, M., Perelman, M., Chernousova, L., Erokhin, V., Zasedatelev, A. and Mirzabekov, A. (2001) Identification of rifampin-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol.*, **39**, 2531-2540.
19. Chizhikov, V., Wagner, M., Ivshina, A., Hoshino, Y., Kapikian, A. Z. and Chumakov, K. (2002) Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol.*, **40**, 2398-2407.
20. Wang, R. F., Beggs, M. L., Robertson, L. H. and Cerniglia, C. E. (2002) Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *FEMS Microbiol Lett.*, **213**, 175-182.
21. Westin, L., Miller, C., Vollmer, D., Canter, D., Radtkey, R., Nerenberg, M. and O'Connell, J. P. (2001) Antimicrobial resistance and bacterial identification utilizing a microelectronic chip array. *J Clin Microbiol.*, **39**, 1097-1104.
22. Wilson, W. J., Strout, C. L., DeSantis, T. Z., Stilwell, J. L., Carrano, A. V. and Andersen, G. L. (2002) Sequence-specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology. *Mol Cell Probes.*, **16**, 119-127.
23. Bavykin, S. G., Akowski, J. P., Zakhariev, V. M., Barsky, V. E., Perov, A. N. and Mirzabekov, A. D. (2001) Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis. *Appl Environ Microbiol.*, **67**, 922-928.
24. Schena, M. (2003) *Microarray analysis*, First edition Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.
25. Pirrung, M. C. (2002) How to make a DNA chip. *Angew Chem Int Ed.*, **41**, 1276-1289.
26. Bryant, P. A., Venter, D., Robins-Browne, R. and Curtis, N. (2004) Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis.*, **4**, 100-111.
27. Heller, M. J. (2002) DNA microarray technology: devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.*, **4**, 129-153.
28. Maughan, N. J., Lewis, F. A. and Smith, V. (2001) An introduction to arrays. *J Pathol.*, **195**, 3-6.
29. Vainrub, A. and Pettitt, B. M. (2003) Surface electrostatic effects in oligonucleotide microarrays: control and optimization of binding thermodynamics. *Biopolymers.*, **68**, 265-270.
30. Zammateo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L. and Remacle, J. (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem.*, **280**, 143-150.
31. Chiu, S. K., Hsu, M., Ku, W. C., Tu, C. Y., Tseng, Y. T., Lau, W. K., Yan, R. Y., Ma, J. T. and Tzeng, C. M. (2003) Synergistic effects of epoxy- and amine-silanes on microarray DNA immobilization and hybridization. *Biochem J.*, **374**, 625-632.
32. Beier, M. and Hoheisel, J. D. (1999) Versatile derivatisation of solid support media for covalent bonding on DNA-microchips. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 1970-1977.
33. Halliwell, C. M. and Cass, A. E. G. (2001) A factorial analysis of silylation conditions for the immobilisation of oligonucleotides on glass surfaces. *Anal Chem.*, **73**, 2476-2483.

34. Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M. and Tarlov, M. J. (2000) Immobilization of nucleic acids at solid surfaces: effect of oligonucleotide length on layer assembly. *Biophys J.*, **79**, 975-981.
35. Vainrub, A. and Pettitt, B. M. (2002) Coulomb blockage of hybridization in two-dimensional DNA arrays. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, **66**, 041905.
36. Beaucage, S. L. (2001) Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. *Curr Med Chem.*, **8**, 1213-1244.
37. Le Berre, V., Trevisiol, E., Dagkessamanskaia, A., Sokol, S., Caminade, A. M., Majoral, J. P., Meunier, B. and Francois, J. (2003) Dendrimeric coating of glass slides for sensitive DNA microarrays analysis. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e88.
38. Leumann, C. J. (2002) DNA analogues: from supramolecular principles to biological properties. *Bioorg Med Chem.*, **10**, 841-854.
39. Nielsen, P. E. and Egholm, M. (1999) An introduction to peptide nucleic acid. *Curr Issues Mol Biol.*, **1**, 89-104.
40. Stender, H., Fiandaca, M., Hyldig-Nielsen, J. J. and Coull, J. (2002) PNA for rapid microbiology. *J Microbiol Methods.*, **48**, 1-17.
41. Zhu, H. and Snyder, M. (2003) Protein chip technology. *Curr Opin Chem Biol.*, **7**, 55-63.
42. Schaeferling, M., Schiller, S., Paul, H., Kruschina, M., Pavlickova, P., Meerkamp, M., Giammasi, C. and Kambhampati, D. (2002) Application of self-assembly techniques in the design of biocompatible protein microarray surfaces. *Electrophoresis.*, **23**, 3097-3105.
43. Voet, D. and Voet, J. G. (1995) Biochemistry, Second edition Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York.
44. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature.*, **171**, 737-738.
45. Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.*, **171**, 964-967.
46. Sponer, J., Leszczynski, J. and Hobza, P. (2001) Electronic properties, hydrogen bonding, stacking, and cation binding of DNA and RNA bases. *Biopolymers.*, **61**, 3-31.
47. Naef, F., Lim, D. A., Patil, N. and Magnasco, M. (2002) DNA hybridization to mismatched templates: a chip study. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, **65**, 040902.
48. Peterson, A. W., Wolf, L. K. and Georgiadis, R. M. (2002) Hybridization of mismatched or partially matched DNA at surfaces. *J Am Chem Soc.*, **124**, 14601-14607.
49. Ito, Y., Sone, Y. and Mizutani, T. (2004) Stability of non-Watson-Crick G-A/A-G base pair in synthetic DNA and RNA oligonucleotides. *Molecular biology reports.*, **31**, 31-36.
50. Egholm, M., Buchardt, O., Christensen, L., Behrens, C., Freier, S. M., Driver, D. A., Berg, R. H., Kim, S. K., Norden, B. and Nielsen, P. E. (1993) PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature.*, **365**, 566-568.
51. Wang, J. (1999) PNA biosensors for nucleic acid detection. *Curr Issues Mol Biol.*, **1**, 117-122.

52. Armitage, B. A. (2003) The impact of nucleic acid secondary structure on PNA hybridization. *Drug Discov Today.*, **8**, 222-228.
53. Ray, A. and Norden, B. (2000) Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *Faseb J.*, **14**, 1041-1060.
54. Nielsen, P. E. (1999) Applications of peptide nucleic acids. *Curr Opin Biotechnol.*, **10**, 71-75.
55. Ratilainen, T., Holmen, A., Tuite, E., Haaima, G., Christensen, L., Nielsen, P. E. and Norden, B. (1998) Hybridization of peptide nucleic acid. *Biochemistry.*, **37**, 12331-12342.
56. Sen, S. and Nilsson, L. (2001) MD simulations of homomorphous PNA, DNA, and RNA single strands: characterization and comparison of conformations and dynamics. *J Am Chem Soc.*, **123**, 7414-7422.
57. Demidov, V. V. (2002) PNA comes of age: from infancy to maturity. *Drug Discov Today.*, **7**, 153-155.
58. van Rossenberg, S. M., Sliedregt-Bol, K. M., Prince, P., van Berkel, T. J., van Boom, J. H., van der Marel, G. A. and Biessen, E. A. (2003) A targeted peptide nucleic acid to down-regulate mouse microsomal triglyceride transfer protein expression in hepatocytes. *Bioconjug Chem.*, **14**, 1077-1082.
59. Jensen, K. K., Orum, H., Nielsen, P. E. and Norden, B. (1997) Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique. *Biochemistry.*, **36**, 5072-5077.
60. Giesen, U., Kleider, W., Berding, C., Geiger, A., Orum, H. and Nielsen, P. E. (1998) A formula for thermal stability (T_m) prediction of PNA/DNA duplexes. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 5004-5006.
61. Schwarz, F. P., Robinson, S. and Butler, J. M. (1999) Thermodynamic comparison of PNA/DNA and DNA/DNA hybridization reactions at ambient temperature. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4792-4800.
62. Peffer, N. J., Hanvey, J. C., Bisi, J. E., Thomson, S. A., Hassman, C. F., Noble, S. A. and Babiss, L. E. (1993) Strand-invasion of duplex DNA by peptide nucleic acid oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **90**, 10648-10652.
63. Lohse, J., Dahl, O. and Nielsen, P. E. (1999) Double duplex invasion by peptide nucleic acid: a general principle for sequence-specific targeting of double-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96**, 11804-11808.
64. Kuhn, H., Demidov, V. V., Coull, J. M., Fiandaca, M. J., Gildea, B. D. and Frank-Kamenetskii, M. D. (2002) Hybridization of DNA and PNA molecular beacons to single-stranded and double-stranded DNA targets. *J Am Chem Soc.*, **124**, 1097-1103.
65. Demidov, V. V., Yavnilovich, M. V., Belotserkovskii, B. P., Frank-Kamenetskii, M. D. and Nielsen, P. E. (1995) Kinetics and mechanism of polyamide ("peptide") nucleic acid binding to duplex DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **92**, 2637-2641.
66. Tomac, S., Sarkar, M., Ratilainen, T., Wittung, P., Nielsen, P. E., Norden, B. and Graslund, A. (1996) Ionic effects on the stability and conformation of peptide nucleic acids complexes. *J am Chem Soc.*, **118**, 5544-5552.
67. Gildea, B. D., Casey, S., MacNeill, J., Perry-O'Keefe, H., Sorensen, D. and Coull, J. M. (1998) PNA solubility enhancers. *Tetrahedron Letters.*, **39**, 7255-7258.
68. Rychlik, W. (2000) *Oligo Primer analysis software*, Seventh Edition Ed., Molecular biology insights, inc., Cascade.

69. Religio, A., Schwager, C., Richter, A., Ansorge, W. and Valcarcel, J. (2002) Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays. *Nucleic Acids Res.*, **30**, e51.
70. Persing, D. H. (1993) In Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C., and White, T. J. (eds.), *Diagnostic molecular microbiology Principles and applications*. American society for microbiology, Washington, D.C., pp. 88-104.
71. kampke, T., Kieninger, M. and Mecklenburg, M. (2001) Efficient primer design algorithms. *Bioinformatics.*, **17**, 214-225.
72. Matveeva, O. V., Shabalina, S. A., Nemtsov, V. A., Tsodikov, A. D., Gesteland, R. F. and Atkins, J. F. (2003) Thermodynamic calculations and statistical correlations for oligo-probes design. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 4211-4217.
73. Li, F. and Stormo, G. D. (2001) Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays. *Bioinformatics.*, **17**, 1067-1076.
74. Chandler, D. P., Newton, G. J., Small, J. A. and Daly, D. S. (2003) Sequence versus structure for the direct detection of 16S rRNA on planar oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 2950-2958.
75. Mir, K. U. and Southern, E. M. (1999) Determining the influence of structure on hybridization using oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.*, **17**, 788-792.
76. Guo, Z., Guilfoyle, R. A., Thiel, A. J., Wang, R. and Smith, L. M. (1994) Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 5456-5465.
77. Peterson, A. W., Heaton, R. J. and Georgiadis, R. M. (2001) The effect of surface probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 5163-5168.
78. Erickson, D., Li, D. and Krull, U. J. (2003) Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal Biochem.*, **317**, 186-200.
79. Axelrod, D. and Wang, M. D. (1994) Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors. *Biophys J.*, **66**, 588-600.
80. Bringuier, E. and Bourdon, A. (2003) Colloid transport in nonuniform temperature. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.*, **67**, 011404.
81. McQuain, M. K., Seale, K., Peek, J., Fisher, T. S., Levy, S., Stremmler, M. A. and Haselton, F. R. (2004) Chaotic mixer improves microarray hybridization. *Anal Biochem.*, **325**, 215-226.
82. Wang, Y., Vaidya, B., Farquar, H. D., Stryjewski, W., Hammer, R. P., McCarley, R. L., Soper, S. A., Cheng, Y.-W. and Barany, F. (2003) Microarrays Assembled in Microfluidic Chips Fabricated from Poly(methyl methacrylate) for the Detection of Low-Abundant DNA Mutations. *Anal Chem.*, **75**, 1130-1140.
83. Sugimoto, N., Nakano, S. and Fujimoto, M. (1997) Experimental quantitation of cation effect on nucleic acid stability. *Nucleic Acids Symp Ser.*, **1**, 147-148.
84. Nakano, S., Fujimoto, M., Hara, H. and Sugimoto, N. (1999) Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2957-2965.
85. Belosludtsev, Y., Belosludtsev, I., Iverson, B., Lemeshko, S., Wiese, R., Hogan, M. and Powdrill, T. (2001) Nearly instantaneous, cation-independent, high selectivity nucleic acid hybridization to DNA microarrays. *Biochem Biophys Res Commun.*, **282**, 1263-1267.
86. Zhang, P., Briones, N., Liu, C. G., Brush, C. K., Powdrill, T., Belosludtsev, Y. and Hogan, M. (2001) Acceleration of nucleic acid hybridization on DNA microarrays

- driven by pH tunable modifications. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.*, **20**, 1251-1254.
87. Weidenhammer, E. M., Kahl, B. F., Wang, L., Duhon, M., Jackson, J. A., Slater, M. and Xu, X. (2002) Multiplexed, targeted gene expression profiling and genetic analysis on electronic microarrays. *Clin Chem.*, **48**, 1873-1882.
 88. Epstein, J. R., Biran, I. and Walt, D. R. (2002) Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays. *Analytica Chimica Acta.*, **469**, 3-36.
 89. Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E. M., Francis, C. A. and Ward, B. B. (2003) Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 1159-1171.
 90. Brandt, O., Feldner, J., Stephan, A., Schroder, M., Schnolzer, M., Arlinghaus, H. F., Hoheisel, J. D. and Jacob, A. (2003) PNA microarrays for hybridisation of unlabelled DNA samples. *Nucleic Acids Res.*, **31**, e119.
 91. Wallace, G. G., Spinks, G. M., Kane-Maguire, L. A. P. and Teasdale, P. R. (1997) *Conductive electroactive polymers*, Second Edition Ed., CRC Press, Washington, D.C.
 92. Ho, H. A., Boissinot, M., Bergeron, M. G., Corbeil, G., Doré, K., Boudreau, D. and Leclerc, M. (2002) Colorimetric and fluorometric detection of nucleic acids using cationic polythiophene derivatives. *Angew Chem Int Ed.*, **41**, 1548-1551.
 93. Ho, H. A. and Leclerc, M. (2003) New colorimetric and fluorometric chemosensor based on a cationic polythiophene derivative for iodide-specific detection. *J Am Chem Soc.*, **125**, 4412-4413.
 94. Bernier, S., Garreau, S., Bera-Aberem, M., Gravel, C. and Leclerc, M. (2002) A versatile approach to affinitychromic polythiophenes. *J Am Chem Soc.*, **124**, 12463-12468.
 95. Chen, L., Xu, S., McBranch, D. and Whitten, D. (2000) Turning the properties of conjugated polyelectrolytes through surfactant complexation. *J Am Chem Soc.*, **122**, 9302-9303.
 96. Doré, K., Dubus, S., Ho, H. A., Lévesque, I., Brunette, M., Corbeil, G., Boissinot, M., Boivin, G., Bergeron, M. G., Boudreau, D. and Leclerc, M. (2004) Fluorescent polymeric transducer for the rapid, simple, and specific detection of nucleic acids at the zeptomole level. *J Am Chem Soc.*, On the web, ASAP March 10th 2004.
 97. Gaylord, B. S., Heeger, A. J. and Bazan, G. C. (2003) DNA hybridization detection with water-soluble conjugated polymers and chromophore-labeled single-stranded DNA. *J Am Chem Soc.*, **125**, 896-900.
 98. Gaylord, B. S., Heeger, A. J. and Bazan, G. C. (2002) DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 10954-10957.
 99. Nilsson, K. P. and Inganas, O. (2003) Chip and solution detection of DNA hybridization using a luminescent zwitterionic polythiophene derivative. *Nat Mater.*, **2**, 419-424.
 100. Debouck, C. and Goodfellow, P. N. (1999) DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet.*, **21**, 48-50.
 101. Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.*, **21**, 10-14.
 102. Marton, M. J., DeRisi, J. L., Bennett, H. A., Iyer, V. R., Meyer, M. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., Dai, H., Bassett, D. E., Jr., Hartwell, L.

- H., Brown, P. O. and Friend, S. H. (1998) Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat Med.*, **4**, 1293-1301.
103. Cromer, A., Carles, A., Millon, R., Ganguli, G., Chalmel, F., Lemaire, F., Young, J., Dembele, D., Thibault, C., Muller, D., Poch, O., Abecassis, J. and Wasyluk, B. (2004) Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. *Oncogene.*, **23**, 2484-2498.
104. Cardoso, F. (2003) Microarray technology and its effect on breast cancer (re)classification and prediction of outcome. *Breast Cancer Res.*, **5**, 303-304.
105. Ringner, M. and Peterson, C. (2003) Microarray-based cancer diagnosis with artificial neural networks. *Biotechniques.*, **34**, S30-S35.
106. Verpoorte, E. (2002) Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis.*, **23**, 677-712.
107. Stenger, D. A., Andreadis, J. D., Vora, G. J. and Pancrazio, J. J. (2002) Potential applications of DNA microarrays in biodefense-related diagnostics. *Curr Opin Biotechnol.*, **13**, 208-212.
108. Kane, M. D., Jatkoa, T. A., Stumpf, C. R., Lu, J., Thomas, J. D. and Madore, S. J. (2000) Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50-mer) microarrays. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4552-4557.
109. Urakawa, H., El Fantroussi, S., Smidt, H., Smoot, J. C., Tribou, E. H., Kelly, J. J., Noble, P. A. and Stahl, D. A. (2003) Optimization of single-base-pair mismatch discrimination in oligonucleotide microarrays. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 2848-2856.
110. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K. and Levy, D. D. (2001) Microarray analysis of microbial virulence factors. *Appl Environ Microbiol.*, **67**, 3258-3263.
111. Peplies, J., Glockner, F. O. and Amann, R. (2003) Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol.*, **69**, 1397-1407.
112. Gao, H. F., Tao, S. C., Wang, D., Zhang, C., Ma, X., Cheng, J. and Zhou, Y. (2003) Comparison of different methods for preparing single stranded DNA for oligonucleotide microarray. *Analytical Letters.*, **33**, 2849-2863.
113. Tao, S. C., Gao, H. F., Cao, F., Ma, X. M. and Cheng, J. (2003) Blocking oligo--a novel approach for improving chip-based DNA hybridization efficiency. *Mol Cell Probes.*, **17**, 197-202.
114. Nikiforov, T. T., Rendle, R. B., Kotewicz, M. L. and Rogers, Y. H. (1994) The use of phosphorothioate primers and exonuclease hydrolysis for the preparation of single-stranded PCR products and their detection by solid-phase hybridization. *PCR Methods Appl.*, **3**, 285-291.
115. Reyes-Lopez, M. A., Mendez-Tenorio, A., Maldonado-Rodriguez, R., Doktycz, M. J., Fleming, J. T. and Beattie, K. L. (2003) Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 779-789.
116. Southern, E. M., Case-Green, S. C., Elder, J. K., Johnson, M., Mir, K. U., Wang, L. and Williams, J. C. (1994) Arrays of complementary oligonucleotides for analysing the hybridisation behaviour of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 1368-1373.
117. Antipova, A. A., Tamayo, P. and Golub, T. R. (2002) A strategy for oligonucleotide microarray probe reduction. *Genome Biol.*, **3**, research0073.0071-00073.00074.

118. Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M. T., Gallo, M. V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H. and Brown, E. L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol.*, **14**, 1675-1680.
119. Roberts, M. C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L. B., Rood, J. and Seppala, H. (1999) Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother.*, **43**, 2823-2830.
120. Rafalski, J. A. (1988) Two strands of DNA are not equivalent as probes in hybridizations at low stringency. *Anal Biochem.*, **173**, 383-386.
121. Reynaldo, L. P., Vologodskii, A. V., Neri, B. P. and Lyamichev, V. I. (2000) The kinetics of oligonucleotide replacements. *J Mol Biol.*, **297**, 511-520.
122. Yurke, B., Turberfield, A. J., Mills, A. P., Jr., Simmel, F. C. and Neumann, J. L. (2000) A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature.*, **406**, 605-608.
123. Alberti, P. and Mergny, J. L. (2003) DNA duplex-quadruplex exchange as the basis for a nanomolecular machine. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **100**, 1569-1573.
124. Lee, C. S., Davis, R. W. and Davidson, N. (1970) A physical study by electron microscopy of the terminally repetitive, circularly permuted DNA from the coliphage particles of *Escherichia coli* 15. *J Mol Biol.*, **48**, 1-22.
125. Radding, C. M., Beattie, K. L., Holloman, W. K. and Wiegand, R. C. (1977) Uptake of homologous single-stranded fragments by superhelical DNA. IV. Branch migration. *J Mol Biol.*, **116**, 825-839.
126. Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D., Paradis, S., Roy, P. H., Ouellette, M. and Bergeron, M. G. (2001) Development of a PCR assay for identification of staphylococci at genus and species levels. *J Clin Microbiol.*, **39**, 2541-2547.
127. Medeiros, A. A. (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generation of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis.*, **24**, S19-S45.
128. Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T. and Solas, D. (1991) Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.*, **251**, 767-773.
129. Livache, T., Roget, A., Dejean, E., Barthet, C., Bidan, G. and Teoule, R. (1994) Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of polypyrrole and oligonucleotide bearing a pyrrole group. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2915-2921.
130. Park, S. J., Taton, T. A. and Mirkin, C. A. (2002) Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science.*, **295**, 1503-1506.
131. Patolsky, F., Weizmann, Y. and Willner, I. (2002) Redox-active nucleic-acid replica for the amplified bioelectrocatalytic detection of viral DNA. *J Am Chem Soc.*, **124**, 770-772.
132. Kim, W. J., Sato, Y., Akaike, T. and Maruyama, A. (2003) Cationic comb-type copolymers for DNA analysis. *Nature Mater.*, **2**, 815-820.
133. Aoki, H. and Umezawa, Y. (2003) Trace analysis of an oligonucleotide with a specific sequence using PNA-based ion-channel sensors. *Analyst.*, **128**, 681-685.
134. Wang, J., Palecek, E., Nielsen, P. E., Rivas, G., Cai, X., Shiraishi, H., Dontha, N., Luo, D. and Farias, P. A. M. (1996) Peptide nucleic acid probes for sequence-specific DNA biosensors. *J Am Chem Soc.*, **118**, 7667-7670.

135. Nielsen, P. E., Egholm, M., Berg, R. H. and O., B. (1991) Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science.*, **254**, 1497-1500.