



**ÉTUDE DES PHÉNOMÈNES RELIÉS À LA  
PRÉSENCE DU BRIN COMPLÉMENTAIRE AU  
BRIN CIBLE LORS D'HYBRIDATION AVEC  
SONDES DE CAPTURES FIXÉES SUR  
SUPPORT SOLIDE**

**Thèse**

**KAREL BOISSINOT**  
Doctorat en microbiologie-immunologie  
Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Karel Boissinot, 2015



## Résumé

Cette thèse de doctorat présente 3 études reliées à l'hybridation d'ADN fixée à un support solide et les phénomènes qui y sont associés. L'hybridation d'ADN en phase aqueuse est bien caractérisée, cependant plusieurs phénomènes et paramètres restent encore à déterminer lorsqu'un des brins est fixé sur un support solide. Un de ces paramètres est l'influence du brin complémentaire en fonction de la longueur de l'extrémité d'ADN cible immobilisée exposée à la phase aqueuse. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons établi une méthode pour digérer spécifiquement le brin d'ADN complémentaire pour simplifier l'hybridation sur support solide. La combinaison d'une molécule favorisant la digestion du brin complémentaire et d'une molécule bloquant la digestion du brin cible a permis de produire un ADN cible simple brin à l'aide de l'exonucléase Lambda, permettant d'obtenir des signaux d'hybridation supérieurs à ceux obtenus avec des ADN doubles brins. Ensuite, l'observation en temps réel de l'hybridation d'amplicons simples brins et doubles brins a permis de mieux comprendre les phénomènes de compétition entre le brin complémentaire et la cible. Finalement, les conclusions des deux premières études nous ont permis d'inventer une technologie tirant profit de la compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture et de l'activité exonucléase pour réaliser l'amplification PCR et l'hybridation sur biopuce en un seul site réactionnel et dans un seul tampon réactionnel. La combinaison de ces techniques aura pour effet une simplification des dispositifs et une diminution du nombre de réactifs permettant la fabrication de tests diagnostiques automatisés à moindre coûts. Les travaux de cette thèse ont permis d'approfondir nos connaissances sur les phénomènes reliés à l'hybridation sur support solide et de concevoir une technologie faisant l'objet d'une demande de brevet. La suite logique de ces travaux serait de poursuivre le développement et l'optimisation de la technologie pour augmenter ses capacités de multiplexage tout en l'intégrant à un dispositif microfluidique et à un instrument de détection qui combine amplification PCR et hybridation sur biopuce dans une seule réaction réalisée en une seule étape.



## **Abstract**

This thesis presents three studies related to the phenomenon related to DNA hybridization onto capture probes attached to solid support. The work was carried out in the context of infectious diseases detection, but the conclusions are of interest to any test based on the recognition of genetic material by solid support immobilized capture probes. DNA hybridization in aqueous phase is well characterised, however several parameters and phenomena related to hybridization onto solid supports are still to be determined. One of these parameters is the influence of the complementary strand in relation with the length of the solvent-exposed immobilized target strand. To better understand this phenomenon, we established a method to specifically digest the complementary DNA strands to simplify hybridization onto solid support. The presence of a molecule favorising digestion on the complementary strand and a blocking molecule on the target strand enabled selective digestion of the complementary strand using Lambda exonuclease in PCR buffer. Hybridization of single-stranded target DNA generated this way resulted in significantly higher fluorescence signals than those obtained with double stranded hybridization. Afterwards, observation of real-time hybridization of single-stranded amplicons and double-stranded amplicons to capture probes fixed onto solid support allowed for a better understanding of the competition phenomena between the complementary strand and the capture probe. Finally, the knowledge gained with the first two studies was used to invent a technology taking advantage of the competition between the complementary strand and the capture probe and exonuclease activity to perform single vessel and single buffer PCR amplification and microarray hybridization. The combination of these techniques will simplify devices and require fewer reagents storage and handling, facilitating production of automated diagnostic tests at lower costs. The works of this thesis have expended our understanding of the phenomena associated with hybridization onto a solid support and also resulted in the creation of a new technology covered by a patent application. The logical progression of this work is to further develop and optimize this technology by integrating it into a microfluidic device and an instrument compatible with the detection of microarrays to increase the multiplexing capabilities of molecular diagnostics.



# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xiii
Liste des abréviations.....	xv
Remerciements.....	xix
Avant-Propos.....	xxi
Introduction.....	1
Chapitre 1 Paramètres régissant l'hybridation et la détection d'acides nucléiques.....	5
1.1 Acides nucléiques.....	7
1.1.1 Paramètres physiques d'hybridation.....	8
1.1.2 Paramètres biochimiques d'hybridation.....	9
1.1.2.1 Brin complémentaire et extrémité flottante.....	10
1.1.2.2 Cations médiateurs d'hybridation.....	12
1.2 Techniques de détection de signatures biologiques basées sur l'hybridation.....	13
1.2.1 Multiplexage.....	16
1.2.2 Détection en phase aqueuse.....	17
1.2.3 Phase solide.....	27
1.2.3.1 Hybridation de fluorescence <i>in situ</i> (FISH).....	27
1.2.3.2 Southern blot/Northern blot.....	28
1.2.3.3 Microparticules/nanoparticules.....	28
1.2.3.3.1 Particules de capture.....	28
1.2.3.3.2 Particules de détection.....	29
1.2.3.3.2.1 Nanoparticules de détection.....	29
1.2.3.3.2.2 Microparticules de détection.....	30
1.2.3.4 Biopuces.....	30
1.2.3.5 Microfluidique et intégration « lab-on-chip ».....	32
Chapitre 2 Principes directeurs de la recherche.....	35
2.1 Objectifs.....	37
2.2 Hypothèse de recherche.....	38
2.3 Critères de développement.....	39
2.4 Choix des modèles expérimentaux.....	40
2.5 Aperçu des résultats et contribution scientifique.....	42
Chapitre 3 Digestion rapide par l'exonuclease lambda de matériel génétique amplifié par PCR pour générer des cibles d'ADN simple-brin.....	45
3.1 Résumé.....	48
3.2 Abstract.....	49
3.3 Introduction.....	50
3.4 Materials and Methods.....	51
3.5 Results.....	53
3.6 Discussion.....	54
3.7 Acknowledgements.....	56
3.8 References.....	57

3.9 Tables .....	59
3.10 Figures .....	60
3.11 Supplemental data .....	61
Chapitre 4 Hybridation en temps réel sur lit de billes monocouche d'échantillons cliniques et d'amplicons possédant des extrémités 5' de longueur variable .....	57
4.1 Résumé .....	61
4.2 Abstract .....	62
4.3 Introduction .....	63
4.4 Materials and methods .....	65
4.4.1 Microfluidic cartridge and hybridization instrument .....	65
4.4.2 Probe grafting of microbeads .....	65
4.4.3 PCR amplification .....	65
4.4.4 Clinical samples preparation .....	66
4.4.5 Hybridization procedures .....	66
4.4.6 Data analysis .....	67
4.5 Results .....	68
4.5.1 SNP detection .....	68
4.5.2 Detection of amplicons from randomized clinical samples on microbeads .....	69
4.5.3 Hybridization of amplicons with varying dangling end lengths .....	69
4.6 Discussion .....	71
4.7 Conclusion .....	75
4.8 Acknowledgements .....	76
4.9 References .....	77
4.10 Tables .....	80
4.11 Figures .....	82
4.12 Supplemental data .....	84
Chapitre 5 Oligonucléotide synthétique structuré permettant la combinaison de la PCR et de l'hybridation sur biopuce dans un seul contenant et un seul tampon .....	85
5.1 Résumé .....	89
5.2 Abstract .....	90
5.3 Introduction .....	91
5.4 Materials and methods .....	94
5.4.1 Function of structured oligonucleotide .....	94
5.4.2 Design of SO .....	95
5.4.3 Modeling the theoretical hybridization behavior of SOs .....	95
5.4.4 Model targets .....	96
5.4.5 PCR .....	96
5.4.6 Microarray fabrication .....	97
5.4.7 Hybridization .....	97
5.4.8 Fluorescence acquisition and analysis .....	98
5.5 Results and discussion .....	100
5.5.1 Design of structured oligonucleotides .....	100
5.5.2 Hybridization in amplification buffers .....	101
5.5.3 Single-vessel multiplexed amplification and hybridization .....	102
5.7 Conclusion .....	105
5.8 Acknowledgements .....	106
5.9 References .....	107



5.10 Tables.....	111
5.11 Figures .....	114
Chapitre 6 Discussion .....	119
6.1 Discussion.....	121
6.2 Digestion rapide par l'exonuclease lambda de matériel génétique amplifié par PCR pour générer des cibles d'ADN simple-brin .....	122
6.2.1 Exonucléases.....	122
6.2.2 Alternative à l'ADN simple brin .....	123
6.2.3 Impact de la technique .....	124
6.3 Hybridation en temps réel de brins d'ADN avec extrémités 5'flottantes de longueur variable.....	125
6.3.1 Utilisations actuellement possibles.....	125
6.3.2 Système fermé.....	126
6.3.3 Automatisation.....	126
6.3.4 Améliorations pour l'obtention de données de cinétique .....	127
6.4 Oligonucléotide synthétique pour l'amplification et l'hybridation sur biopuce en une seule étape.....	129
6.4.1 Digestion de l'oligonucléotide synthétique structuré .....	129
6.4.2 Structure.....	129
6.4.3 Possibilités d'optimisation .....	131
6.4.4 Développements futurs de la technologie.....	131
6.4.5 Besoins du marché .....	133
6.4.6 Analyse MOFF .....	134
6.4.6.1. Menaces .....	135
6.4.6.2 Opportunités.....	135
6.4.6.3 Forces et faiblesses .....	136
6.5 Perspectives générales du projet doctoral .....	138
Conclusion .....	141
Bibliographie .....	145
Annexe .....	151



## Liste des tableaux

Chapitre 1 - Table 1 : Paramètres des techniques d'amplification pouvant être utilisées pour faire la détection des acides nucléiques .....	18
Chapitre 3 - Table 1 : Passive hybridization efficiencies with species-specific 20-mer capture probes.....	59
Chapitre 3 - Supplemental data - Table 1 : Primer sequences .....	61
Chapitre 3 - Supplemental data - Table 2 : Capture probe sequences .....	61
Chapitre 3 - Supplemental data - Table 3 : Control oligonucleotide sequences.....	61
Chapitre 4 - Table 1. Capture probes.....	80
Chapitre 4 - Table 2. Primer pairings for amplicon production and resulting dangling end lengths.....	80
Chapitre 4 - Table 3. Fluorescence endpoints and slopes of target hybridization to all permutations of central nucleotide capture probes .....	80
Chapitre 4 - Table 4. Fluorescence endpoints and slopes of clinical samples hybridized to bead-based capture probes.....	81
Chapitre 4 - Table 5. Hybridization rate of amplicons varying in overall and dangling end lengths.....	81
Chapitre 5 - Table 1. Structural and thermodynamic properties of the structured oligonucleotides used for amplification and hybridization.....	111
Chapitre 5 - Table 2. Primers used for PCR amplification.....	111
Chapitre 5 - Table 3. Capture probes used for microarray hybridization .....	112
Chapitre 5 - Table 4. Composition of master mix and PCR buffer .....	113



## Liste des figures

Chapitre 1 - Figure 1. Interactions idéalisées entre la sonde de capture immobilisés et les deux brins de l'ADN cible (Traduite de l'article).....	11
Chapitre 1 - Figure 2. Étapes et méthodes pour la détection d'acides nucléiques.....	14
Chapitre 3 - Figure 1:.....	60
Chapitre 3 - Supplemental data - Figure 1. Schéma représentant la structure et le fonctionnement de la digestion spécifique du brin complémentaire par l'exonucléase Lambda.....	62
Chapitre 4 - Figure 1. Hybridization of the target over perfect match probes or probes containing one mismatch.....	82
Chapitre 4 - Supplemental Figure 1. Evolution of recorded fluorescence signal for multi-step hybridization involving double-stranded amplicons of variable overall and dangling end length.....	83
Chapitre 5 – Figure 1 : Structured Oligonucleotide.....	114
Chapitre 5 - Figure 2. Schematics of the structured oligonucleotide biodetection system.....	115
Chapitre 5 - Figure 3. Experimental design for multiplexed amplification and hybridization assay with SO.....	116
Chapitre 5 - Figure 4. Fluorescence signal for hybridization of the tag segment in five amplification buffers.....	117
Chapitre 5 - Figure 5. Microarray fluorescence signal obtained for FluA, FluB, and RSV multiplex assays.....	118
Annexe - Figure A1 : Unité microfluidique.....	153
Annexe - Figure A2 : Instrument optique pour la détection en temps-réel d'hybridation sur microbilles.....	154
Annexe - Figure A3 : Microbilles et cartouche microfluidique.....	155
Annexe - Figure A4 : Système de détection de l'OS.....	156



## Liste des abréviations

A : adénine  
ADN : acide désoxyribonucléique  
AN : acide nucléique  
ARN : acide ribonucléique  
ARNr 16S : Sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique  
bp : base pair  
C : cytosine  
COPL : Centre d'optique, photonique et laser de l'Université Laval  
Cy3: fluorophore Cyanine 3  
Cy5 : fluorophore Cyanine 5  
G : guanine  
EDTA: acide éthylène diamine tétra-acétique  
HDA : amplification hélicase-dépendante  
LAMP : amplification isothermale à base de boucles  
LNA : locked nucleic acid  
MOFF: étude de type menaces, opportunités, forces et faiblesses.  
nM: nanomolaire  
nt : nucléotide  
p : groupement phosphate  
pb : paire de bases  
PCR : Réaction de polymérase en chaîne  
pN : picoNewton  
PNA : peptidic nucleic acid  
RCA: amplification par cercle roulant  
RPA: amplification par polymérase et recombinaise  
SDA : amplification par déplacement de brins  
SSPE : Solution saline avec tampon phosphate et EDTA  
TMA/NASBA : amplification basée sur la transcription  
T : thymine  
U : uracile





*À mes parents qui m'ont supporté et qui ont  
toujours cru en moi et  
À la mémoire de ma grand-mère Pauline qui  
a su stimulé mon imagination et ma curiosité*



## Remerciements

Je veux tout d'abord remercier le Dr Michel G. Bergeron qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis et encouragé à explorer des problématiques complexes, mais hautement stimulantes. Sa vision et sa passion pour la science et les affaires a été une excellente source d'inspiration.

Je tiens également à remercier le Dr Régis Peytavi, une source sans fonds d'idées fantastiques et de motivation à explorer mes propres idées. Je veux aussi souligner la contribution exceptionnelle du Dr Maurice Boissinot pour mes études graduées, tant au niveau scientifique, rédactionnel, qu'entrepreneurial.

Je remercie aussi les Drs Ann Huletsky, Luc Bissonnette, François Picard et Gale Stewart qui ont contribué à la guidance et apporté des critiques constructives de mes projets de recherche.

Je remercie aussi tous les membres de l'EDM et du CRI avec qui j'ai discuté. S'ajoutent à ces remerciements les collaborateurs du COPL, du CNRC-Boucherville et du CERMA qui m'ont permis de développer mes connaissances en chimie et en optique.

Je tiens aussi à remercier SOVAR pour leur soutien financier et l'expérience de collaboration pour la rédaction de subventions liées à la valorisation des inventions.

Enfin je tiens à remercier mes parents, Lynn et Paul, qui m'ont toujours encouragé à poursuivre mes études et mes passions. Merci à Sandra pour m'avoir encouragé et supporté pendant ces études. Merci à Manon Tétreault pour son aide dans la mise en page de cette thèse. Merci aux autres membres de ma famille et à mes amis.



## **Avant-Propos**

Cette thèse comporte trois articles scientifiques qui ont été réalisés avec des co-auteurs différents d'une fois à l'autre. Pour cette raison, la description de ma contribution scientifique et de celle de mes co-auteurs est insérée devant chaque chapitre (3, 4 et 5) pour en simplifier la compréhension.



# Introduction

L'amélioration des techniques de biologie moléculaire ont entraîné un développement important pour la détection et l'identification de signatures biologiques. En effet, les outils et les techniques développés en lien avec cette science nous permettent maintenant de récolter de l'information sur les diverses composantes biologiques d'une cellule, sans devoir attendre qu'elle se multiplie ou encore sans se limiter à ce qui est exprimé phénotypiquement par l'organisme d'intérêt. Il est maintenant possible de détecter et d'identifier des séquences d'ADN, les protéines de surface et intracellulaires et même les complexes formés par ces composantes. Il est possible aussi de détecter la différence d'un seul nucléotide entre deux brins d'ADN, ou encore de connaître le génome complet d'une bactérie en quelques jours ou d'un organisme eucaryote tel l'humain en un peu plus d'une semaine. Bien que les avancées du domaine ne se limitent pas qu'à l'ADN, je m'attarderai plus sur cette molécule dans le chapitre 1, puisque mes travaux ce sont concentrés sur l'ADN comme signature biologique à détecter.

En 2003-2004, Peytavi *et al* (Peytavi *et al.*, 2005a) mettent en évidence l'importance du positionnement de la sonde de capture d'une biopuce sur la séquence d'un ADN cible lorsque que le brin complémentaire à la cible est présent dans le milieu. Cette étude démontre qu'une longue extrémité accessible dans la phase aqueuse permet au brin complémentaire de se réassocier avec le brin cible. Cette réassociation résulte en la séparation du brin cible et de la sonde de capture, entraînant une perte de signal. En positionnant la sonde de capture de façon à avoir une courte extrémité exposée au liquide, on peut limiter la réassociation du brin cible avec son complémentaire et ainsi maximiser l'hybridation. Cependant, les séquences ou le groupe de séquences des organismes d'intérêt que l'on veut détecter ne permettent pas toujours un positionnement optimal des sondes de captures favorisant la stabilité de l'hybridation, c'est pourquoi j'ai travaillé à développer une technique simple et rapide pour éliminer spécifiquement le problème. Par la suite, la fabrication par les chercheurs du Centre d'Optique, de photonique et de lasers d'un outil permettant de mesurer l'hybridation de l'ADN en temps-réel sur support solide m'a permis de mieux comprendre le phénomène de la compétition entre le brin cible, le brin complémentaire et la sonde de capture. Ainsi, il a

été possible de visualiser d'abord l'hybridation puis le décrochage du brin cible en présence du brin complémentaire. Enfin, après avoir accumulé une grande expérience sur l'hybridation sur support solide et l'influence du brin complémentaire, le Dr Régis Peytavi, l'étudiante Laurie Girard et moi avons développé une technique permettant de faire l'amplification en liquide et l'hybridation en solide de l'ADN en une seule étape, basée en partie sur l'activité exonucléase 5'→3' de la Taq polymérase. Avec cette méthode, il est possible d'hybrider sur biopuce de courts oligonucléotides simples brins lorsque la cible d'intérêt est présente, alors qu'en absence de la cible, l'oligonucléotide structuré (OS) ne s'hybridera pas sur la sonde de capture. En effet, l'OS est dessiné pour former une structure secondaire en forme de tige boucle qui rend la séquence «tag» inaccessible à l'hybridation sur puce dans cette conformation. En absence de cible, cette structure sera adoptée préférentiellement, empêchant l'hybridation du «tag» sur la biopuce, alors qu'en présence de la cible d'intérêt, l'OS sera partiellement digéré pour générer un court oligonucléotide complémentaire aux sondes de capture immobilisées à la surface du microdamier.

Je vais résumer les différentes stratégies utilisées pour faire la détection et l'identification d'acides nucléiques, tout en m'attardant plus particulièrement sur les techniques d'hybridation sur support solide que j'ai étudiées plus en détails lors de mes travaux. Je présenterai les avantages et inconvénients de chaque technique et les découvertes effectuées pour contourner certains avantages ou bien transformer un inconvénient en avantage à l'aide de dessin de sondes adaptées au système. Bien que ces techniques ne se limitent pas qu'aux acides nucléiques de bactéries et de virus, je me suis penché sur ces organismes dans le cadre de projet plus vastes visant à développer de nouveaux outils pour le diagnostic rapide des maladies infectieuses. Il serait toutefois très facile d'envisager utiliser ces avancées dans le domaine de la génétique humaine ou pour toute autre application ou la détection de multiplexe de séquence d'ADN est requise.

Aujourd'hui, la PCR, la PCR en temps réel et les biopuces à ADN sont les technologies les plus utilisées en pratique courante, comme outils diagnostiques ou pour des fins de recherche. Notre meilleure compréhension de l'interaction entre brins d'ADN sur support solide ouvre la voie à une nouvelle approche simple et peu coûteuse de type laboratoire sur puce applicable



en pratique courante, qui peut être bénéfique à la détection des agents microbiologiques responsables des infections.



**Chapitre 1**  
**Paramètres régissant l'hybridation et la détection**  
**d'acides nucléiques.**



## 1.1 Acides nucléiques

Les acides nucléiques, découverts en 1869 par Friedrich Miescher servent de point de départ à mon projet. C'est surtout avec L'acide désoxyribonucléique ou ADN que j'ai travaillé. Il est important, pour bien situer mes travaux de se rappeler de notions importantes liées à l'ADN. On connaît bien la forme caractéristique d'hélice double brin, telle que décrite par Watson et Crick en 1953 (Watson et Crick, 1953), qui confère à l'ADN une bonne stabilité et permet donc de conserver l'information génétique malgré la présence de stress comme des cassures ou des erreurs de réplication. Cependant, il y a un coût important d'associé à cette grande stabilité. En effet, la plupart des activités reliées à l'ADN (par exemple : duplication et génération d'ARN pour l'expression des gènes en protéine) nécessitent une portion simple brin pour s'effectuer. Il faut donc toute une machinerie pour défaire la double hélice et stabiliser l'ADN simple brin pour réaliser ces fonctions biologiques. Par contre, sous forme simple brin, l'ADN est cependant plus à risque d'être modifiée par l'environnement. Par exemple, une cassure causée par un rayon UV pourra facilement être réparée sur un ADN double brin, mais sera en général irréparable sur un ADN simple brin ou un ARN. Considérant qu'une cellule humaine peut compter jusqu'à 10 000 hydrolyse des liens glycosidiques des nucléotides puriques à chaque jour (Voet et Voet, 2005), il n'est pas surprenant que le matériel génétique adopte souvent la conformation doubles brins. L'évolution a donc entraîné la mise en place de plusieurs méthodes pour séparer temporairement (ou irréversiblement) les deux brins d'ADN et donc permettre à ceux-ci d'exercer leurs fonctions. Certaines enzymes telles que les hélicases et certaines polymérases permettent de désenrouler l'ADN. Une fois les brins séparés, certaines protéines servent à les stabiliser, comme la protéine affine de l'ADN simple brin représentée par l'abréviation SSB en anglais. D'autres parts, certaines enzymes sont responsables de faire des coupures ou même digérer un brin, dans ce cas-ci on parle de « nicking enzymes » de nucléases endo ou exo et de recombinaisons. Les chercheurs se sont donc inspirés de la nature pour développer des techniques d'amplification des acides nucléiques. La plupart de ces méthodes consiste à utiliser une ou plusieurs enzymes pour répliquer l'ADN, mais les stratégies de séparation des deux brins sont très diversifiées. Celles-ci seront explorées dans les prochains paragraphes

en contexte avec la détection spécifique par sondes, soit en phase aqueuse, soit en support solide.

### 1.1.1 Paramètres physiques d'hybridation

L'ADN comporte plusieurs paramètres de physique mécanique, optique et électrique qui sont étroitement liés à son hybridation. Tout d'abord, l'hybridation de l'ADN résulte en la formation d'une hélice stable formée de deux brins. Il est possible de séparer ces deux brins à nouveau, généralement en présence de chaleur ou en présence d'une base (généralement le NaOH), ce processus est appelé dénaturation de l'ADN. La dénaturation n'endommage pas l'ADN, permettant de faire plusieurs cycles d'hybridation et de dénaturation. Il est possible de mesurer la force reliant ces deux brins d'ADN en étirant l'hélice. Soumis à une force d'étirement de 65 pN (pour le génome du phage lambda), la structure de l'hélice adoptera une conformation étirée mais stable, cependant entre 65 pN et 200 pN, les deux brins se sépareront, résultant en une dénaturation mécanique de l'ADN. Un haut contenu GC, dû à la triple liaison hydrogène formée par ces bases, permettra à l'ADN de résister à une plus grande force. Un brin seul d'ADN peut quant à lui résister à des forces d'au moins 0,8 nN avant que les liens phosphates covalent ne cèdent et résulte en la cassure du brin d'ADN (Clausen-Schaumann *et al.*, 2000; Gross *et al.*, 2011).

L'ADN a aussi des propriétés optiques qui peuvent être utilisées pour déterminer sa conformation. On peut tout d'abord penser à l'expérience de diffraction des rayons X réalisée par Rosalind Franklin qui a permis à Watson et Crick de déterminer sa structure en double hélice, mais l'ADN a aussi des propriétés particulières dans le spectre UV. L'ADN simple brin absorbe les rayons UV environ 40% plus que l'ADN double brin, par un phénomène appelé effet d'hyperchromicité. La séparation des brins défait l'empilement des bases et augmente leur exposition au milieu aqueux, expliquant cette absorbance augmentée. Il est donc possible de suivre la dénaturation/renaturation de l'ADN avec ce phénomène, permettant de trouver sa température de fusion ou  $T_m$  qui correspond au point milieu de la variation de l'hyperchromicité. Il est aussi possible de vérifier la pureté d'une préparation d'ADN (ou d'ARN) en comparant son absorbance à 260 nm versus 280 nm. Un ratio de  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}} = 1,8$  indique la présence d'ADN pure alors qu'un ratio inférieur indique la

présence de protéines dans l'échantillon. En revanche, un ratio supérieur à 1,8 indique la présence d'ARN ou d'ADN simple brin (Sambrook et Russell, 2001a).

Enfin, l'ADN compte une charge nette négative égale au nombre d'acides nucléiques. Il est donc possible d'utiliser cette particularité pour faire migrer cette molécule vers une charge positive, technique couramment utilisées pour la migration d'ADN sur gel. Il est aussi possible de faire circuler un courant électrique dans l'ADN et de discriminer un appariement parfait d'un mésappariement G-T ou C-A en observant la résistance qu'offre les deux brins d'ADN entre des électrodes formées par des nanotubes de carbone. La présence d'un mésappariement dans une hybridation de deux brins de 15 nucléotides résulte en une augmentation de la résistance d'environ 300 fois en comparaison avec le contrôle parfaitement apparié (Guo *et al.*, 2008). Cependant, les instruments utilisés (microscopie de force atomique avec microscopie à effet tunnel ne sont présentement pas compatible avec une détection rapide, simple et automatisée).

### **1.1.2 Paramètres biochimiques d'hybridation**

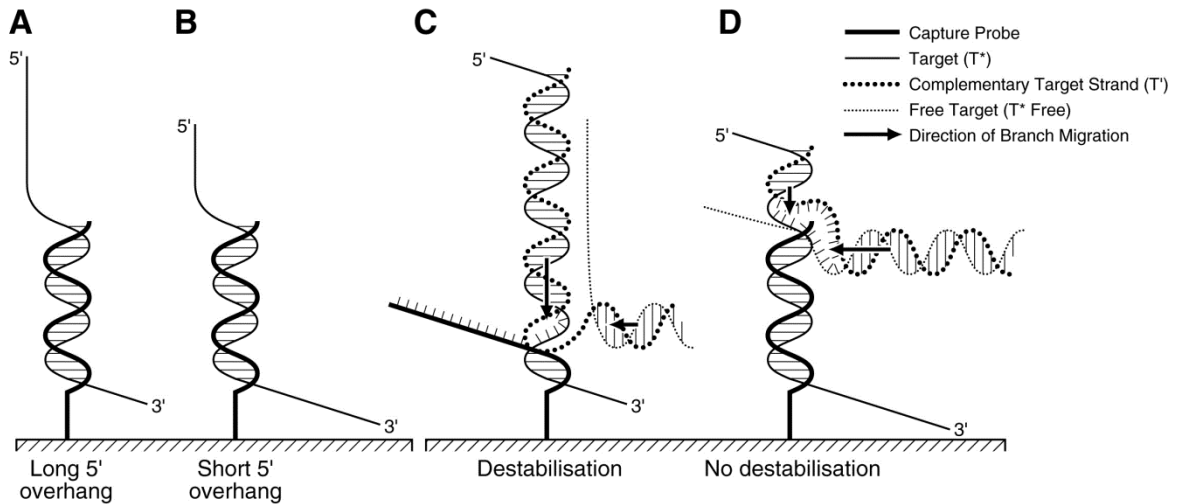
Tout d'abord, l'interaction entre les acides nucléiques est d'ordre chimique, soit des ponts hydrogènes et la rencontre et l'hybridation de ces deux brins peut être décrite par une cinétique réactionnelle, généralement considérée de 2<sup>ième</sup> ordre, c'est-à-dire que la concentration des 2 brins est impliquée dans le calcul de la constante d'hybridation. Une fois les deux brins s'étant rencontré à l'aide de ces interactions de type pont hydrogène, c'est plutôt le caractère électronique des orbitaux pi (type de couche d'électron autour d'un atome qui représente un volume allongé au-dessus et en dessous du plan formé par le cycle de carbone) qui assurera la stabilité de la structure en double hélice de l'ADN. Ce type d'interaction est appelé empilement des bases. La stabilité thermique de l'ADN double brin va dépendre du nombre d'appariements A-T et G-C. En effet, les appariements GC sont plus stables et contribuent à augmenter le  $T_m$  du polymère de façon plus importante que les appariements A-T. Une règle simpliste suggère que chaque A-T augmentera le  $T_m$  de 2°C alors que chaque G-C augmentera le  $T_m$  de 4°C. Cependant, cette règle ignore l'effet des sels et des bases voisines qui influencent en réalité la stabilité de l'appariement. En effet, plusieurs travaux ont permis de décrire le phénomène d'hybridation de l'ADN en phase

aqueuse par un modèle des « plus proches voisins » ou « nearest-neighbor ». Ce modèle a été élaboré par SantaLucia *et al.* (SantaLucia, 1998) et démontre que la stabilité énergétique d'un appariement donné dépend de l'appariement qui précède et de celui qui suit. La stabilité d'un brin d'ADN sera exprimée en énergie libre de Gibbs, ou  $\Delta G$  et représente la somme des énergies de chaque appariement et ses voisins. Une hybridation stable résultera en une valeur de  $\Delta G$  négative. Cependant, ce modèle n'est pas parfaitement adapté pour l'hybridation sur support solide puisque d'autres types d'interactions se retrouvent. À ces phénomènes s'ajoute les interactions avec une surface, dans le cas d'hybridation hétérophase solide. L'ADN ayant une charge négative, la chimie de la surface sur laquelle les sondes sont hybridées peut jouer un rôle important dans l'hybridation. En effet, il a été démontré que l'or (Au) pouvait interagir avec l'ADN simple brin et diminuer la disponibilité de cette dernière pour s'hybrider avec l'ADN cible (Chen *et al.*, 2009). Lorsqu'une sonde de capture est immobilisée, elle possède moins de degrés de liberté et seule la cible peut se déplacer pour rencontrer l'ADN immobilisé, ce qui modifie la cinétique réactionnelle. De plus la taille de l'ADN jouera un rôle sur sa vitesse de diffusion. Singh *et al.* (Singh *et al.*, 2009) ont démontré qu'un ADN de 2000 bases prenait 5 fois plus de temps avant d'arriver au demi temps de l'hybridation sur une biopuce à microdamier. La cinétique de l'hybridation d'ADN décrite ci-haut sera approfondie dans le chapitre 4.

#### **1.1.2.1 Brin complémentaire et extrémité flottante**

Dans notre laboratoire, nous avons observé que lorsque la sonde de capture est fixée sur une surface solide, le brin complémentaire à la cible peut venir interférer avec l'hybridation sonde de capture/cible et entraîner un décrochage de cette dernière, résultant en une chute du signal d'hybridation (Peytavi *et al.*, 2005a). C'est un phénomène complexe qui fait intervenir la sonde de capture, l'ADN cible immobilisé, le brin complémentaire et un brin d'ADN cible libre. D'autres paramètres, tel que les structures secondaires entre aussi en ligne de compte (Yin et Zhao, 2011). Nous avons démontré que la longueur de l'extrémité flottante, ou exposée à la phase aqueuse, était déterminante pour ce phénomène, alors que l'extrémité exposée à la surface ne semble pas être un facteur important (Figure 1, traduite de l'article de (Peytavi *et al.*, 2005a)).





**Chapitre 1 - Figure 1. Interactions idéalisées entre la sonde de capture immobilisés et les deux brins de l'ADN cible (Traduite de l'article).**

(A) Le brin cible « target strand » (T\*) s'hybride sur la sonde de capture « capture probe », produisant une longue extrémité 5' exposées à la phase aqueuse. (B) Le brin cible (T\*) s'hybride sur la sonde de capture, produisant une courte extrémité 5' exposées à la phase aqueuse. (C) Le brin complémentaire libre « complementary strand » (T') s'hybride à l'extrémité exposée de T\*, générant une migration de l'embranchement qui déstabilise le complexe T\*-sonde de capture. (D) Le brin cible libre (T\*free) s'hybride à la région inoccupée du brin complémentaire T', générant une migration de l'embranchement antagoniste, empêchant le premier embranchement de déstabiliser le complexe T\*-sonde de capture.

À l'instar de la nature, il est préférable de limiter la portion disponible pour un ré-appariement avec le brin complémentaire, telles que le font les protéines stabilisatrices des ADN simple brin à l'intérieur de la cellule. Il est donc recommandé de dessiner les sondes de captures de façon à ce qu'elles génèrent de courtes extrémités flottantes pour maximiser le signal d'hybridation. Cependant, en fonction des cibles biologiques à détecter et à discriminer, il n'est pas toujours possible de trouver des sondes de captures, répondant aux critères d'ubiquité et de spécificité désiré, situées au bon endroit de l'amplicon. C'est pourquoi il est important de travailler sur des stratégies de production d'ADN simple brin pour permettre l'utilisation des amplicons sur toute leur longueur. Plusieurs sources avaient remarqué que la dénaturation à la chaleur n'était pas aussi bonne qu'une digestion d'un brin à l'exonucléase sans toutefois fournir d'explication adéquate ou en fournissant une explication incomplète (réassociation des deux brins en phase aqueuse) (Holloway *et al.*, 1993; Nikiforov *et al.*,

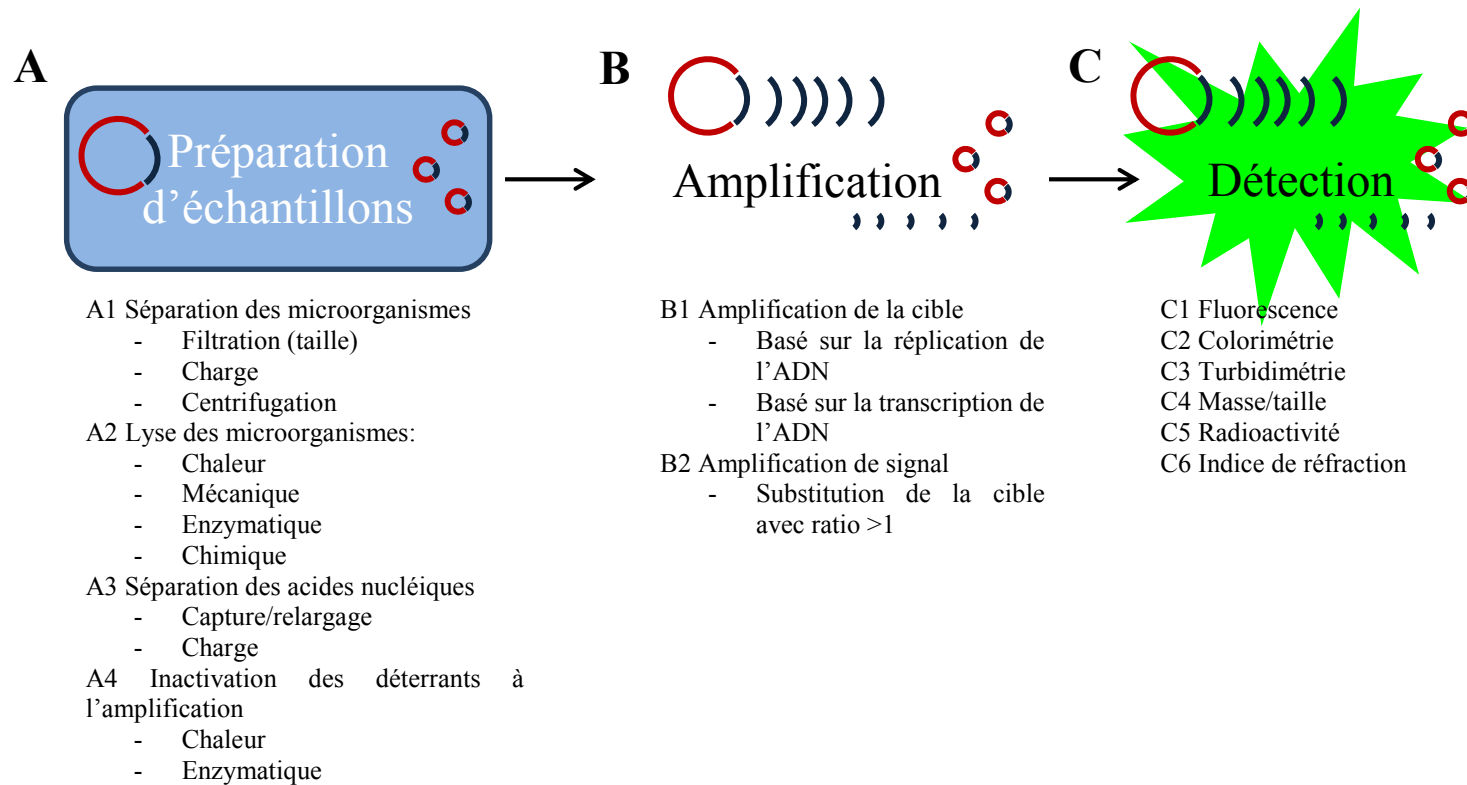
1994; Southern *et al.*, 1999). Il est possible d'utiliser la PCR asymétrique conventionnelle pour générer un brin en grand excès, cependant, la sensibilité en est généralement affecté (Song *et al.*, 2013).

### **1.1.2.2 Cations médiateurs d'hybridation**

Finalement, un autre paramètre biochimique important pour l'hybridation de l'ADN est la concentration de cations monovalent et divalent présent dans le milieu (Owczarzy *et al.*, 2008). De règle générale, une augmentation de la concentration de cations résultera en une augmentation du  $T_m$ . Les cations servent de contrions à l'ADN chargé négativement et facilite le rapprochement des deux brins d'ADN, même à plus haute température. Toujours selon Owczarzy *et al.*, les ions  $K^+$  ont une faible influence sur le  $T_m$  entre 1 mM et 100 mM, alors que de 100 mM à 1 M, l'effet est assez prononcé, soit une augmentation d'environ 10°C pour un oligonucléotide de 25 bases. Pour les ions  $Mg^{2+}$ , l'augmentation du  $T_m$  est à peu près constante entre 1 mM et 10 mM, alors qu'entre 10 mM et 100 mM le  $T_m$  reste plutôt stable. Les tampons PCR comptent généralement une concentration de 50 mM d'ions potassium et de 2,5 à 4,5 mM d'ions magnésium, alors que le tampon d'hybridation utilisé au laboratoire (6 X SSPE) compte environs 900 mM d'ions sodium, soit une différence d'un peu plus de 15 fois. Cependant, lors d'un lavage de biopuce, nous utilisons une solution de 0,2X SSPE, qui est donc 2 fois moins concentrée en cation que le tampon PCR pour obtenir une plus grande stringence d'hybridation. Toutes ces données suggèrent que le tampon PCR pourrait être compatible avec l'hybridation sur biopuce.

## **1.2 Techniques de détection de signatures biologiques basées sur l'hybridation**

Le matériel génétique est un excellent médium pour permettre l'identification rapide d'agents biologiques. Cependant, il n'est que très rarement facilement accessible, étant à l'intérieur de la cellule. Il est aussi possible que le matériel soit mélangé avec des éléments indésirables pour les étapes suivantes, c'est pourquoi il faut réaliser une préparation de l'échantillon. Par la suite, il faudra généralement procéder à une amplification de la cible ou du signal pour détecter l'ADN cible. De nombreuses méthodes de diagnostic moléculaire, souvent inspirées par la biologie ont été développées et sont résumées dans le tableau 1. Par ailleurs, plusieurs de ces techniques ont intégré des méthodes de détection pour faciliter les manipulations et obtenir les résultats plus facilement. La figure 2 présente quelques stratégies utilisées pour chacune des étapes.



## Chapitre 1 - Figure 2. Étapes et méthodes pour la détection d'acides nucléiques.

Les étapes A, B et C sont considérées pratiquement essentielles pour réaliser la détection des acides nucléiques alors que les sous sections A1 à C7 représentent différentes méthodologies pouvant être utilisées pour chacune des grandes sections. A. Préparation de l'échantillon: Libération des acides nucléiques de la capsid virale, de la membrane cellulaire ou du noyau. Méthode optionnelle en A1, il est possible de séparer les cellules ciblées des autres composantes présentes dans l'échantillon. La lyse en A2 doit être réalisée pour rendre accessible les acides nucléiques au réactifs d'amplification et de détection. En A3, certaines techniques nécessitent une préparation d'acides nucléiques ayant un niveau de pureté plus ou moins élevé, c'est pourquoi des stratégies de séparation de ces derniers peuvent être utilisées. B. Amplification : Multiplication de la cible ou d'un substitut associé à la cible pour en obtenir en quantité suffisante pour permettre la détection. En B1, on reproduit la cible soit sous forme d'ADN ou d'ARN. En B2, on multiplie le signal plutôt que les cibles. On peut remplacer chaque cible par plusieurs copies d'un substitut, en utilisant des dendrimères ou des code barre bio. C. Détection : Le matériel amplifié peut être révélé en observant différents critères ou marqueurs.

B de la cible ou de la substitution en multipliant les détecteurs qui pourraient être de nature C1 à C6 (généralement la fluorescence sera amplifiée). Une cible sera couplée à plusieurs détecteurs d'une même nature.

Références : (Charlebois *et al.*, 2010; Isabel *et al.*, 2012; Niemz *et al.*, 2011; Noh *et al.*, 2011; Persing, 2011; Rahman et Elaissari, 2012; Siegrist *et al.*, 2009; Siegrist *et al.*, 2010)

## 1.2.1 Multiplexage

Tout d'abord, avant de parler des types de détection, il faut définir un terme important pour la détection d'acides nucléiques, le multiplexage. Ce terme est fréquemment utilisé pour parler d'un essai qui permet la détection simultanée de plusieurs cibles différentes, cependant, il existe plusieurs niveaux ou types de multiplexage. Le multiplexage peut s'effectuer soit lors de la préparation de l'échantillon, lors de l'amplification et/ou lors de la détection. Voici quelques exemples pour illustrer les différents types de multiplexages.

Les séquenceurs de nouvelle génération tels que le HiSeq fonctionnent avec des index, ajoutés aux acides nucléiques à séquencer lors de la préparation de l'échantillon. Ces index permettront donc de mélanger plusieurs échantillons différents qui pourront par la suite être identifiés séparément en regroupant chaque séquence en fonction des index. Il est possible de combiner 96 échantillons différents avec les kits actuellement disponibles (Illumina, 2013).

Il est aussi possible de multiplexer l'amplification de cible sans toutefois discriminer et identifier séparément les cibles individuelles. La trousse de détection des mutations du gène *EGFR* de Roche permet de détecter 41 mutations réparties dans 4 exons (Roche). Le test permet de déterminer le type de cancer (« non small cell lung cancer ») et le traitement approprié, cependant, le test ne permet pas de spécifier précisément laquelle des 41 mutations est présente.

Enfin, on peut avoir un multiplexage d'amplification/détection permettant d'identifier spécifiquement chaque cible de l'essai. Par exemple, la technologie xTag de Luminex (Luminex) permet de détecter et identifier 71 mutations reliées à la fibrose kystique. Le test permettra d'identifier précisément laquelle ou lesquelles mutations sont présentes dans l'échantillon. Généralement, c'est ce troisième type auquel il sera référé dans cette thèse, à moins d'être spécifiquement indiqué.

### **1.2.2 Détection en phase aqueuse**

La détection de signatures biologiques en phase aqueuse consiste à réaliser les étapes biologiques et optiques en solution, sans attache à un support solide. Ces différentes techniques et leurs caractéristiques particulières sont résumées dans le tableau 1. La PCR en temps-réel fait figure de proue pour ce genre de moyen de détection, mais il existe d'autres techniques d'amplification enzymatiques en solution qui permettent de faire une détection/identification sans support solide. En général, ces techniques nécessitent un rapporteur fluorescent ou colorimétrique, ce qui limite généralement les possibilités de multiplexage de détection à 5 ou 6 (Siegrist *et al.*, 2009). Cette limite est imposée en partie par la largeur des spectres des fluorophores, mais aussi par les sources d'excitation et leurs filtres. Cependant, des méthodes récentes ont trouvé des moyens de confiner géographiquement des réactions enzymatiques en phase aqueuse, permettant d'augmenter le multiplexage jusqu'à 120 en théorie, et 27 dans un test approuvé (Biofire).

## Chapitre 1 - Tableau 1. Paramètres des techniques d'amplification pouvant être utilisées pour faire la détection des acides nucléiques

	Quantité de matériel initial	Nombre d'enzymes	Stratégies simple brin pour polymérisation	Température/cyclage	Temps total (obtention résultat)	Amorces	Sortie d'amplification
PCR	ADN: 1 à 10 copies	1	Température	~50 à 62°C, 72°C et 95°C	1H À 2H (30-40 mins)	En paires, 18-30-nt	ADN double brin: jusqu'à 10 <sup>12</sup> -10 <sup>13</sup> copies
	ARN: 1 à 10 copies 1 ou 2 étapes	2	Température	40°C à 50°C, puis comme le PCR pour l'ADN			
RPA	ADN:	5	Recombinase et protéines stabilisant l'ADN simple brin	30°C à 42°C	20 à 40 mins (10-15 mins)	En paires, 27-30-nt	ADN doublebrin
	ARN: 10-20 copies	6	Recombinase et protéines stabilisant l'ADN simple brin	42°C			
HDA	ADN: 10 à 10 <sup>3</sup> copies	3	Hélicase et protéines stabilisant l'ADN simple brin	37°C ou 60-65°C	80-120 mins (<1h)	En paires, de longueurs compatibles avec la PCR	ADN doublebrin
TMA/NASBA	ARN: 10 copies	3	RNAse H	65°C, puis stable à 41°C	94-105 mins	2 amorces dont une contenant un promoteur de l'ARN polymérase T7	ARN antisens
	ADN: 10 copies		RNAse H	65°C, puis stable à 41°C			
LAMP	ADN: 10 à 100 copies	1	ADN polymérase avec activité de déplacement du brin complémentaire	60°C à 65°C	60-90 mins	2 amorces internes et 2 amorces externes reconnaissant au total 6 séquences cibles	ADN double brin: jusqu'à 10 <sup>9</sup> -10 <sup>10</sup> copies
	ARN: 100 à 1000 copies	2					
RCA	ADN	2	Activité 5'→3' exonucléase, puis déplacement du brin complémentaire	31°C	60 mins	Sonde circulaire «cadena»	Long ADN simple brin
SDA	ADN:	2	Température initialement, puis déplacement du brin complémentaire	95°C, puis 37°C	60 mins	En paires, 15-20-nt dont 1 site de restriction	ADN doublebrin contenant des A en 5' alpha-thiols résistants au clivage

Références : (Cosnier et Mailley, 2008; Larsson *et al.*, 2004; Persing, 2011; Sidoti *et al.*, 2013; Teles et Fonseca, 2008; Wong et Medrano, 2005).



### 1.2.3 Phase solide

La détection de matériel biologique sur phase solide a surtout été popularisée avec des lames de verres et des membranes. Un avantage important de la détection sur phase solide est la possibilité de multiplexage qui n'est limité que par l'espace disponible. Cependant, il existe des différences entre l'hybridation sur support solide et l'hybridation en phase aqueuse. Tout d'abord, puisqu'un seul des deux brins est mobile, le temps d'hybridation est plus long (Gao *et al.*, 2006). La surface peut avoir des interactions non-spécifiques avec les sondes de captures ou les cibles biologiques qui doivent être pris en compte pour obtenir de bons résultats (Southern *et al.*, 1999). Il est aussi plus difficile d'assurer un mélange homogène constant de la solution en contact avec la surface

#### 1.2.3.1 Hybridation de fluorescence *in situ* (FISH)

L'hybridation de sondes d'ADN directement dans les organismes ciblés est une technique qui peut se réaliser avec ou sans amplification et qui permet de faire une détection spécifique, parfois même sans culture. Pour cette technique, l'amplification se fait avant la préparation de l'échantillon, c'est-à-dire qu'on placera les microorganismes en condition de reproduction avant de les immobiliser sur une surface. Cette technique est basée sur la reconnaissance des ARN ribosomiaux, plus particulièrement les ARNr 16S, un gène très conservé qui permet généralement de discriminer les domaines, les phylums, les familles, les genres ou les espèces. Dans une cellule bactérienne en croissance, on peut retrouver jusqu'à  $10^4$ - $10^5$  copies de l'ARNr 16S, permettant une bonne sensibilité de détection. Puisque cette technique est basée sur l'observation au microscope de fluorescence à l'intérieur de bactéries intactes, l'ARN a été choisi parce qu'il est déjà simple brin et peut facilement s'hybrider avec les sondes d'ADN synthétiques. La combinaison de la fluorescence et de la forme, structure, etc... permet de détecter spécifiquement une très grande quantité de bactéries. Cette technique nécessite plusieurs étapes utilisant plusieurs produits chimiques et une microscopie de pointe. De plus la préparation est complexe et sa qualité est critique pour obtenir de bons résultats. Nous n'avons donc pas étudié cette technique malgré son utilisation de matériel génétique simple brin, puisqu'elle n'est pas facilement envisageable dans un contexte d'intégration à des systèmes de détections intégrés et automatisés. (Ivey et Phister, 2011).

### **1.2.3.2 Southern blot/Northern blot**

Edwin Southern a inventé une technique permettant d'hybrider l'ADN sur des membranes de nitrocellulose ou de nylon, après les avoir fait migrer dans un gel d'agarose (Southern, 1975). Par opposition à l'ADN, la technique basée sur l'hybridation de l'ARN a été nommée Northern blot, mais fonctionne de façon similaire. Ces techniques consistent tout d'abord à séparer les acides nucléiques par leur taille et plus spécifiquement leur charge, on les immobilise ensuite sur une membrane et on utilise des sondes à séquences connues pour révéler les cibles, permettant d'identifier les bandes de façon spécifique.

### **1.2.3.3 Microparticules/nanoparticules**

Bien que les particules de tailles nano et micro peuvent être utilisées dans un tube sans support solide « fixe » tel une lame de biopuce ou une unité microfluidique, je les considérerai comme support solide parce qu'elles jouent un rôle physique qui se rapproche beaucoup à une surface plane. En effet, le degré de liberté de l'ADN immobilisé sur ces particules est plus faible qu'un oligo non-attaché. De plus, la chimie de la bille peut avoir un impact sur les interactions non-spécifiques entre l'ADN et la surface. Il existe plusieurs types de billes qui auront à leur tour des rôles différents, soit dans la capture ou la détection du matériel génétique.

#### **1.2.3.3.1 Particules de capture**

Ces particules servent à reconnaître un agent biologique d'intérêt. On peut, par exemple, utiliser une sonde de capture spécifique pour immobiliser l'ADN cible, soit pour le relâcher (Parham *et al.*, 2007) ou soit pour le révéler avec une sonde marquée ou une seconde bille (Nam *et al.*, 2004). Elles peuvent être faites de plusieurs types de matériaux différents, que ce soit le polystyrène, la silice ou un amalgame de fer (ex : billes MyOne de la compagnie Dynal). Les billes ont l'avantage d'avoir une surface accessible au milieu aqueux et donc plus de sondes disponible pour une même unité de surface que les surfaces planes et peuvent généralement se déplacer dans le liquide ou créer de la turbulence, favorisant les rencontres avec la cible. Une sous-catégorie peut s'établir ici entre les billes magnétiques (super paramagnétique) et les billes non-magnétiques qui vont influencer les méthodes de déplacement/confinement. Pour ces-dernières, on utilisera généralement la centrifugation ou le confinement physique, comme par exemple une constriction de taille inférieure au

diamètre des billes dans un canal microfluidique ou une colonne. Pour la capture d'ADN, on va généralement chauffer à 95 °C pour dénaturer la double hélice et capturer un seul brin puis utiliser une méthode de déplacement/confinement pour séparer l'ADN capturée du brin complémentaire, limitant les chances d'avoir des interactions indésirables entre les deux brins.

#### **1.2.3.3.2 Particules de détection**

Il existe plusieurs types de particules pouvant être détectées par diverses méthodes, ayant des tailles et des chimies différentes. Dans le domaine « nano », on retrouve principalement les points quantiques (quantum dots) (Li *et al.*, 2013), les nanoparticules de silice (Wang *et al.*, 2008), d'or (Au) (Li *et al.*, 2010) ou d'autres métaux (Lessard-Viger *et al.*, 2009). D'autre part, on retrouve les microparticules, communément en polystyrène, mais aussi en silice, en fer et en latex. Pour ces deux tailles de particules, le rapporteur peut être intrinsèque, ajouté à l'intérieur ou à l'extérieur.

##### **1.2.3.3.2.1 Nanoparticules de détection**

Pour un volume définit, les nanoparticules auront une plus grande surface disponible que les microparticules, permettant d'immobiliser plus de molécules de détection. De plus, puisqu'il y aura beaucoup plus de particules en suspension, augmentant les chances de rencontres efficaces avec les cibles. Enfin, la masse de ces particules, leur taille et la chimie de surface résultent généralement en une dispersion colloïdale ou qui se sédimentera que très lentement.

Un sous-groupe des nanoparticules de détection, les points quantiques, ont plusieurs caractéristiques particulières. Tout d'abord, elles ont des spectres d'émissions très étroits, ce qui peut permettre d'augmenter les capacités de multiplexages des systèmes basés sur la fluorescence. Ces nanoparticules dont la fluorescence est intrinsèque aux matériaux choisis sont aussi très résistantes au photo-blanchiment (photo bleaching) et peuvent donc mieux résister aux changements de températures et aux expositions répétées à la source d'excitation (Li *et al.*, 2013).

Les particules d'or ont une chimie de surface particulière qui ne nécessite pas modifications particulière de leur surface pour réaliser des couplages avec des molécules biologiques. En effet, la surface forme un lien fort avec les groupements thiols. Pour des sondes de captures

nucléotidiques, il est possible d'avoir une modification thiol à l'une des extrémités, permettant un protocole de couplage simple. Les nanoparticules d'or peuvent aussi servir de catalyseur pour la déposition d'argent (Hill et Mirkin, 2006) et/ou augmenter ou éteindre la fluorescence par des phénomènes de plasmon de surface (Kang *et al.*, 2011). On peut donc utiliser les nanoparticules d'or pour faire une détection par apparition de sphères d'argent ou bien prendre avantage de ses propriétés plasmoniques pour obtenir de meilleurs contrastes signaux sur bruit de fond avec des fluorophores.

#### **1.2.3.3.2 Microparticules de détection**

Les microparticules peuvent être marquées par des fluorophores ou des agents colorants soit par encapsulation ou par immobilisation à la surface. Ces particules précipitent assez rapidement, ce qui facilite leur séparation par centrifugation. Par exemple, certains essais en flux laminaire font usage de microparticules encapsulant des agents colorants pour la détection (Nielsen *et al.*, 2007). Il est aussi possible d'utiliser des microparticules encapsulant des fluorophores pour faire de la détection par résonance optique ou « whispering gallery mode » en anglais (Yoshie *et al.*, 2011). Cette technique tire avantage des ondes évanescentes produites à la surface d'une bille, par la réflexion totale interne d'un rayon lumineux à l'intérieur d'une sphère, pour détecter des changements d'indices de réfractions causés par la présence de cibles d'intérêts. On peut donc détecter des spores présentes dans un milieu sans faire de marquage spécifique (Charlebois *et al.*, 2010).

#### **1.2.3.4 Biopuces**

La technologie des biopuces tire son origine des Southern blots discuté à la section 1.2.2.2. Cependant, la méthode est inversée. En effet, la biopuce est constituée d'une matrice de sondes de captures, connues, qui sont fixées à un support solide alors que la cible, inconnue, est libre et ira s'immobiliser sur sa sonde de capture complémentaire. Cette technique permet théoriquement de détecter autant de cibles différentes qu'il y a de sondes de capture discriminables par une coordonnée cartésienne (X, Y) ou de couleur (*e.g.* Luminex) (Sibley *et al.*, 2012). Elle est ou a été utilisée pour le génotypage, la découverte de médicaments, l'expression des gènes, l'hybridation génomique comparative, la cytogénomique, l'identification génétique, le séquençage et les interactions protéines-ADN.

Les particularités associées à l'hybridation sur support solide sont encore une fois bien présentes sur biopuce. La chimie de surface, le couplage des sondes de capture et l'accessibilité de ces dernières pour les cibles sont des facteurs essentiels à maîtriser pour obtenir de bonnes biopuces (Miller et Tang, 2009). Il existe deux stratégies pour immobiliser les sondes à la surface. On peut soit procéder à la synthèse de sondes nucléiques *in situ*, tel que réalisé avec les puces Affymetrix/Agilent ou encore immobiliser des acides nucléiques préalablement synthétisés par des méthodes chimiques ou enzymatiques. La synthèse *in situ* a pour avantage d'offrir une surface plus uniforme et permet une densité plus importante des spots sur la surface. Cependant, les coûts par réaction sont très élevés, ce qui limite son utilisation à des biopuces à très hautes densité de sondes peu utilisées à des fins diagnostiques (Mittal *et al.*, 2001). La seconde technique consiste à immobiliser des acides nucléiques sur la surface solide, généralement par un lien covalent, par des interactions streptavidine-biotine ou par des liens électrostatiques. Cette technique est généralement moins dispendieuse, cependant, la densité des spots est plus faible que pour la synthèse *in situ* (Persing, 2011). Il existe des différences importantes entre l'immobilisation par liens covalents ou par liens électrostatiques. En effet, les sondes qui sont immobilisées par lien covalent (ou synthétisées sur la surface solide) sont immobilisées par une extrémité, ce qui leur confère une certaine flexibilité alors que les sondes immobilisées par la création de liens électrostatiques entre l'ADN et la surface par l'intermédiaire d'ions chargés positivement se retrouvent fixée sur toute la longueur du fragment d'acides nucléiques, ce qui limite le mouvement de la sonde. Ces sondes immobilisées par interactions électrostatiques, dans leur contexte d'utilisation pour l'expression différentielle d'ARNm, sont typiquement de longueur supérieure (environ 70-nt) aux sondes covalentes des puces servant au diagnostic (environ 20-nt). L'influence du brin complémentaire au brin cible est donc différente entre ces deux types de sondes de biopuce. C'est pourquoi le phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture décrit précédemment à la section 1.1.2.1 n'a pas été observé avec les biopuces d'expression, le phénomène étant soit moins important ou absent avec les sondes immobilisées par un lien électrostatique.

C'est surtout le domaine de l'expression génique qui a permis une forte croissance de la popularité de la technique dans la fin des années 90 et le début des années 2000. Le fort niveau de multiplexage est particulièrement attrayant pour l'expression génique, permettant

de comparer l'expression différentielle de tous les gènes d'un organisme sous différents stimuli (*e.g.* présence de drogues, facteur de croissance, cycle cellulaire, etc...). Il est possible de marquer avec des fluorophore différents les deux conditions étudiées et d'hybrider sur une même puce les ADN complémentaires des gènes exprimés. La différence d'intensité entre les 2 fluorophores permet d'identifier les gènes surexprimés, réprimés ou dont l'expression est inchangée. Cette méthode est moins dépendante de la reproductibilité d'impression des biopuces puisque la comparaison se fait entre deux échantillons hybridés sur la même puce et que des ratios sont établis pour chaque gène, cependant, la quantité de sonde doit être dans une plage permettant de conserver une plage dynamique linéaire.

Pour les utilisations diagnostiques, les biopuces permettent un plus haut niveau de multiplexage que la PCR en temps-réel. Certains syndromes ou maladies génétiques nécessitent l'identification de plusieurs dizaines de cibles différentes. L'encodage des cibles par longueur d'onde est généralement limité à 5 ou 6 dans les systèmes de détection conventionnels alors que l'encodage spatial des biopuces n'est limité que par l'espace réactionnel disponible et la densité des sondes de capture. Il est donc possible d'immobiliser jusqu'à 50 000 sondes de captures avec des systèmes d'impressions sur surface et d'atteindre le million de sondes de capture avec les systèmes de synthèse *in situ*. Malgré tous ces avantages, les biopuces nécessitent plusieurs étapes techniques manuelles, de grands volumes réactionnels et un temps d'hybridation variant entre 1h et 24h selon les applications. Ces caractéristiques peuvent constituer un frein pour une utilisation clinique de cette technologie. C'est pourquoi des stratégies de microfluidique et d'intégration dans un système automatisé sont étudiées. La prochaine section en fait un bref résumé.

#### **1.2.3.5 Microfluidique et intégration « lab-on-chip »**

La microfluidique consiste en l'utilisation de canaux de taille micrométrique pour le déplacement de volume de l'ordre du microlitre, voir du nanolitre. Ces liquides sont déplacés dans des canaux de taille micrométriques. Les avantages de ce concept sont directs et indirects. Les petits volumes sont plus faciles à gérer dans des systèmes de type laboratoire sur puce et réduisent les coûts des réactifs. Puisque les dimensions des chambres

réactionnelles sont très petites, les réactions limitées par la diffusion entre le volume de liquide et la surface peuvent atteindre l'équilibre plus rapidement. Par contre, le mélange de réactifs se fait beaucoup plus lentement car les liquides se déplacent en flux laminaire dans les microcanaux (Lee *et al.*, 2011). Il faut donc incorporer des stratégies perturbatrices du flux laminaire pour accélérer les mélanges. De plus, comme les réactifs devraient idéalement tous être présent dans la puce préalablement ou ajoutés en une seule étape avec l'échantillon à tester dans un contexte de laboratoire sur puces, la gestion de l'espace et des liquides est un défi important pour des systèmes de laboratoire sur puce. Divers systèmes microfluidiques existent, basés sur différents principes pour le déplacement des fluides. On y retrouve des systèmes à pompes, hydrostatiques, à aspiration par le vide, électrocinétiques, thermiques et centripètes (Wang et Li, 2011). Les systèmes basés sur la force centripète, généralement sous forme de disque sont particulièrement limités pour la gestion de l'espace et des liquides, car il est très difficile de passer d'un point éloigné du centre vers un point plus rapproché sans apport d'énergie externe (piston, pression d'air, etc...). Le nombre d'étapes réactionnelles, le nombre de chambres et l'arrivée aux temps désirés des réactif dans les bonnes chambres est donc critique dans la conception des dispositifs microfluidiques. Généralement, plus la complexité est élevée, plus les coûts reliés à la conception et à la fabrication seront élevés.





## **Chapitre 2**

### **Principes directeurs de la recherche**



La thèse repose sur les principes inhérents à l'hybridation d'ADN sur surface solide, et plus particulièrement sur l'effet de l'extrémité flottante (exposée au solvant) du brin cible en présence du brin complémentaire dans le milieu réactionnel. Les travaux effectués ne sont pas intégralement rattachés à des projets de développement de système de diagnostics des maladies infectieuses, mais ont été réalisés en conservant à l'esprit cette réalité pour que ces travaux puissent servir aux futurs développements de tests diagnostiques. C'est-à-dire que lorsque possible, des choix ont été soit fait pour réduire le nombre d'étapes réactionnelles et/ou pour favoriser le potentiel d'automatisation des techniques. Plus généralement, ces travaux devraient aider et guider le développement de tests diagnostiques basé sur l'hybridation d'ADN sur support solide.

## **2.1 Objectifs**

Objectif 1 : Développer une méthode d'amplification/hybridation d'acides nucléiques permettant de prendre avantage du phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture.

Objectif 2 : Étudier l'influence du brin complémentaire au brin d'ADN cible dans les phénomènes d'hybridation sur support solide, en relation avec la position de la sonde de capture.

Objectif 3 : Éliminer le brin complémentaire de façon simple et rapide sans diminuer l'efficacité de la réaction d'amplification.

Objectif 4 : Comprendre la cinétique de compétition entre la sonde de capture et le brin complémentaire par monitoring en temps réel de l'hybridation d'ADN cible simple brin, double brin et de longues d'extrémités flottantes différentes.

## **2.2 Hypothèse de recherche**

Il est possible d'effectuer simultanément l'amplification PCR et l'hybridation sur biopuces dans un seul site réactionnel et avec un seul tampon.

La digestion spécifique du brin cible permet d'améliorer considérablement le signal d'hybridation obtenu par fluorescence.

L'hybridation en temps réel d'ADN cible sur support solide nous permettra d'approfondir nos connaissances sur le phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture immobilisée pour l'hybridation avec le brin cible.

## 2.3 Critères de développement

Tel que décrit au début du chapitre 2, bien que le but des travaux de cette thèse ne soit pas de mettre au point des tests diagnostiques, les travaux ont été effectués en gardant cette possibilité à l'esprit pour de futures étapes de ces travaux. Pour développer des systèmes de détection d'acides nucléiques, il est important de mettre en place des stratégies permettant de réaliser la détection et l'identification sans ouvrir le système, minimisant ainsi les risques de contamination. Les techniques d'amplifications enzymatiques possèdent une sensibilité très élevée, notamment, la PCR peut détecter jusqu'à une copie d'acides nucléiques cibles. L'ouverture de tubes contenant des milliards de copies par microlitres présente donc un risque très important de contaminer les surfaces de travail et de résulter en de faux positifs. Ces préoccupations sont encore plus importantes pour des tests qui visent la clinique. Un test qui risque de ne plus produire de contrôles négatif pour cause de contamination devient inutile et ne sera pas adopté par les cliniciens. Les techniques développées devraient donc pouvoir être réalisées en système fermé sans trop de modifications majeures.

Un autre aspect important des tests de détection d'acides nucléiques est son facteur-forme (form factor). L'espace qu'occupe l'objet, sa portabilité et son automatisation influencent le rôle que peut prendre un système. Pour envisager le marché des tests au chevet du patient (aussi connu sous l'appellation « point-of-care ou POC »), le système doit être complètement automatisé et d'une taille raisonnable. Pour un système visant le laboratoire clinique, ces aspects demeurent importants mais ne sont pas essentiels.

## 2.4 Choix des modèles expérimentaux

Les modèles expérimentaux ont été choisis sur deux critères :

1. Permet de répondre aux questionnements précis en ayant de bons contrôles pour chacune des étapes.
2. Opportunité : présence de matériel (ADN génomique, amorces, sondes de capture, échantillon cliniques) obtenus dans le cadre d'autres projets.

Pour les expériences réalisées dans le chapitre 3, les espèces microbiennes ont été choisies parmi une liste d'organismes causant des septicémies. *Candida krusei* et ses sondes ont été sélectionnés pour le très faible signal obtenu lors d'hybridation sur biopuce des amplicons doubles brins. De plus, des sondes d'espèces proches étaient disponibles, permettant un bon contrôle sur l'effet de la digestion du brin complémentaire. L'organisme *Listeria monocytogenes* a été sélectionné pour les tests de digestion suivit par une hybridation en microfluidique puisqu'il possédait des sondes de diverses longueurs permettant d'obtenir un signal d'hybridation facilement détectable même en utilisant une cible d'ADN double brin. Ce modèle a donc été choisi pour permettre l'observation de l'influence de la microfluidique sur l'hybridation simple brin vs double brin.

Hybridation en temps réel : La bactérie *Streptococcus agalactiae* aussi appelée Streptocoque du groupe B (SGB) a été utilisée pour faire l'hybridation en temps réel sur microbilles. Nous voulions démontrer la compatibilité de l'instrument avec des échantillons complexes et nous avions à notre disposition des écouvillons vaginal-anal provenant de femmes enceintes qui avait été recueillies dans une étude clinique préalable. Le SGB est un excellent modèle de développement, car son gène *cfb* (camp factor b) possède une séquence relativement unique sans analogues proches. De plus, la charge minimale présente chez la femme se situe à  $\sim 10^4$  copies/écouvillons. Les critères de sensibilité, spécificité et d'ubiquité sont donc relativement simples à atteindre.

Oligonucléotide structuré : La possibilité de combiner l'amplification enzymatique avec une hybridation sur biopuce est particulièrement attrayante pour une détection et identification multiplexée supérieure à 5-6 cibles (limite des cycleurs en temps-réel). Les virus

responsables des infections des voies respiratoires sont très nombreux (jusqu'à ~200 connus (Abed et Boivin, 2006). De ce nombre, environ 15-20 causent la majorité des infections. La charge virale minimale est généralement élevée, pouvant varier de l'ordre de  $10^3$  à  $10^{10}$  copies de gènes/ml (Franz *et al.*, 2010). Les virus respiratoires représentent donc un grand intérêt pour la détection et l'identification à haut multiplexage. Trois virus, parmi les plus importants en clinique, ont été sélectionnés pour faire une preuve de concept de la technologie et de son potentiel de multiplexage, soit Influenza A, Influenza B et le virus respiratoire syncytial.

## 2.5 Aperçu des résultats et contribution scientifique

Le premier volet de mon projet de doctorat a porté sur le développement d'une technique simple et rapide de production d'ADN simple brin après l'amplification PCR. Cette méthode permet d'utiliser tout le gène pour dessiner des sondes de capture sans se soucier de la longueur de l'extrémité flottante qui sera générée lors de l'hybridation de la cible sur sa sonde de capture. La méthode repose sur deux propriétés de l'enzyme choisie, soit sa préférence pour les extrémités phosphorylées et sa structure quaternaire qui possède une ouverture trop petite pour laisser passer de l'ADN double brin en absence de digestion. La taille de la molécule Cy3 est comparable à deux bases qui se font face et inhibe donc significativement la digestion. La technique développée permet d'obtenir d'excellents signaux d'hybridation avec une plus grande plage de sondes de capture. Elle est utilisée pour toutes les expériences d'hybridation sur biopuce et on essaie de l'intégrer aux systèmes de laboratoire sur puce développés au laboratoire malgré la complexité liée à la conception, au stockage et à la gestion des conditions réactionnelles nécessaire pour l'exonucléase lambda.

Pour le second volet, qui porte sur l'hybridation en temps réel, nous avons tiré profit d'un instrument, développé dans le cadre d'un autre projet, qui permet d'hybrider l'ADN sur un lit de bille formé dans une cartouche microfluidique. Bien que l'instrument n'aie pas été développé spécifiquement avec cette idée en tête, il est possible de l'utiliser pour suivre l'hybridation en temps réel. Cet outil nous a donc permis de mieux comprendre le phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture. Nous avons aussi pu démontrer la robustesse du système pour la détection de SNPs et d'échantillons complexes. Finalement, nous pensons qu'un système de ce genre, idéalement plus automatisé pourrait servir à valider les sondes de capture rapidement avant de procéder à l'impression et à l'hybridation des biopuces.

Enfin, pour le troisième volet de mon doctorat et grâce aux résultats des deux premiers projets, nous avons inventé une technologie permettant de réaliser l'amplification PCR et l'hybridation sur biopuce en une seule étape. Cette technique ne nécessite pas de digestion avec l'exonucléase lambda et viens donc simplifier grandement le nombre d'étapes et les



besoins en réactifs et leur confinement spatial et besoins en conditions réactionnelles tels la température et l'humidité.



**Chapitre 3**  
**Digestion rapide par l'exonuclease lambda de matériel**  
**génétique amplifié par PCR pour générer des cibles**  
**d'ADN simple-brin**

## **Avant propos**

### **Rapid exonuclease digestion of PCR-amplified targets for improved microarray hybridization**

Auteurs:

Karel Boissinot<sup>1,2</sup>, Ann Huletsky<sup>1,2</sup>, Régis Peytavi<sup>1,2</sup>, Sophie Turcotte<sup>1</sup>, Véronique Veillette<sup>1</sup>, Maurice Boissinot<sup>1,2</sup>, François J. Picard<sup>1,2</sup>, Eric A. Martel<sup>1</sup> and Michel G. Bergeron<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Pavillon CHUL), Quebec City, Québec, Canada;

<sup>2</sup> Division de Microbiologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Quebec City, Québec, Canada;

\* address correspondence to this author at: Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, 2705 Laurier Blvd., Quebec City, Québec, G1V 4G2 Canada; fax 418-654-2715, e-mail Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca

### **Rôle de l'étudiant**

J'ai mené l'élaboration du projet de recherche et des concepts à démontrer et à valider. J'ai réalisé une partie des expériences et j'ai participé à l'analyse des données expérimentales. J'ai rédigé la première version du manuscrit et intégré les commentaires des co-auteurs et des réviseurs.

### **Rôle des co-auteurs**

Michel G. Bergeron, Ann Huletsky, Régis Peytavi, Maurice Boissinot et François J. Picard ont participé à l'élaboration et à la supervision du projet de recherche. Ann Huletsky et Régis Peytavi ont effectué un suivi fréquent de l'avancée des travaux. Ann Huletsky, Régis Peytavi, Maurice Boissinot et François J. Picard ont contribué à l'analyse globale des résultats.

Sophie Turcotte et Véronique Veillette ont réalisé des expériences et ont participé à l'extraction et à l'analyse des données de ces expériences. Éric A Martel a préalablement développé une série d'outils pour faciliter et automatiser certaines portions du traitement des données. Il a raffiné son logiciel pour répondre aux besoins de cet article.

Tous les co-auteurs ont participé à la révision et ont commenté le manuscrit avant la soumission et ont participé à la révision.

### **Statut de l'article**

L'article : «Rapid exonuclease digestion of PCR-amplified targets for improved microarray hybridization» a été accepté pour publication dans le journal *Clinical Chemistry* le 21 août 2007.

**Boissinot K, Huletsky A, Peytavi R, Turcotte S, Veillette V, Boissinot M, Picard FJ, Martel EA, Bergeron MG.** 2007. Rapid exonuclease digestion of PCR-amplified targets for improved microarray hybridization. *Clin Chem.* **53**(11):2020-3.

### **Commentaires sur l'article inséré dans cette thèse**

L'article fait partie d'une série résumant les travaux présentés lors du Congrès Oak Ridge en 2007 à St-Louis et ne possède pas d'abstract. Cependant, nous en avons tout de même rédigé un qui se retrouve aux pages suivantes en anglais et en français.

### 3.1 Résumé

Antécédents : La technologie des biopuces représente un potentiel important en tant qu'outil dans de multiples applications diagnostiques. Par contre, l'efficacité de l'hybridation est considérablement réduite lorsque les analytes sont sous forme d'ADN double-brin. Ceci est causé par un phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture. La détection spécifique et ultra-sensible d'acides nucléiques sur biopuce est critique pour le diagnostic des maladies infectieuses où la charge microbienne peut être très faible. Nous avons mis au point une technique permettant de générer des cibles d'ADN simple brin en 5 minutes qui améliore la performance des hybridations sur biopuce grâce à la digestion sélective du brin complémentaire par l'exonucléase Lambda.

Méthodes : Les amplicons PCR ont été produits à l'aide d'amorces marquées au Cy3 en 5' pour générer les brins cibles et d'amorces phosphorylées en 5' pour générer les brins complémentaires. La digestion du brin complémentaire à l'aide de l'exonucléase Lambda s'est déroulée pendant 5 minutes, puis les produits ont été hybridés sur biopuce.

Résultats : Le signal spécifique, détecté sur biopuce, résultant de l'hybridation de l'amplicon marqué au Cy3 était 3,9 à 14,5 fois plus élevés que les signaux détectés pour les amplicons contrôles non-digérés. Les amorces marquées au Cy3 à leur extrémité 5' a protégé le brin d'ADN cible de la digestion à l'exonucléase Lambda. L'utilisation de cette enzyme a résulté en une augmentation des signaux tant pour les hybridations passives que les hybridations microfluidiques actives.

Conclusions : La digestion rapide du brin d'ADN complémentaire par l'exonucléase Lambda augmente l'efficacité de l'hybridation. Cette procédure en une seule étape ne requiert pas la dénaturation de l'enzyme ou de l'ADN cible, facilitant le développement de systèmes de biopuces passifs ou en microfluidique active.

## 3.2 Abstract

Background: Microarray technologies represent promising tools for many diagnostic applications. However, double-stranded DNA analytes often reduce the efficiency of hybridization to microarray probes due to competition between the complementary strand and the capture probe. Specific and ultra-sensitive detection of target nucleic acids on microarrays is especially critical for infectious disease diagnostics where microbial load may be extremely low. We have developed a 5-minute procedure to generate single-stranded DNA targets by selective digestion with Lambda exonuclease to improve the performance of microarray hybridization.

Methods: PCR amplicons were produced using 5' Cy3-labelled primers to generate the target strand and 5' phosphorylated primers to generate the complementary strand. Lambda exonuclease digestion of the complementary strand was conducted for 5 min and digested products were then hybridized onto microarrays.

Results: Specific hybridization signals detected on the microarray with the digested Cy3-labelled target amplicons were 3,9 to 14,5 times higher than those detected with the non-digested control amplicons. 5' Cy3-labelled primers protected the target DNA strand from Lambda exonuclease digestion. Increased hybridization signals through Lambda exonuclease digestion were observed with both passive and active microfluidic hybridizations.

Conclusions: Rapid digestion of the complementary strand by Lambda exonuclease improved hybridization efficiency. This single-step procedure does not require denaturation of the enzyme or of the target DNA, thus facilitating the development of both passive and active microfluidic microarrays.

### 3.3 Introduction

Hybridization of double-stranded DNA with nucleic acid probes is hampered by competition between the complementary nontarget strand and the probe [1]. This competition is stronger with surface-bound probes that expose a target strand with a long dangling end toward the media [2-3]. This situation is more problematic in infectious disease diagnostics, which requires high sensitivity, sometimes as low as 1 genome copy. Microarray integration into microfluidic systems results in increased speed and sensitivity while allowing automation of the whole hybridization process [4] and could lead to the development of point-of-care diagnostic devices. Actual limitations of diagnostic microarrays include the design of ultrasensitive capture probes that are highly specific and discriminant. Some techniques have been developed to produce single-stranded DNA targets for sequencing and hybridization, but these methods may necessitate additional steps or modification of the target strand or have poor sensitivities [5-8]. Degradation of the complementary strand can alleviate competition problems and allow more flexible probe design for the target strand. Therefore, we developed a simple 5-min method for rapid single-step selective digestion of the complementary strand with lambda exonuclease, which leads to increased hybridization signals and improved differentiation of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) on DNA microarrays.



### 3.4 Materials and Methods

Cy3-labeled primers were used to generate the target strands while phosphorylated primers were used to generate the complementary strands. Nonphosphorylated primers were also used to verify the protection provided by the Cy3-labeled primers. All oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technologies. Purified genomic DNA (1 ng) from *Neisseria meningitidis* (ATCC-13077), *Listeria monocytogenes* (CCRI-4862), and *Candida krusei* (ATCC-28870) were PCR-amplified using a PTC-200 thermocycler (Bio-Rad Laboratories) (1 min at 94°C and then 40 cycles of 1 sec at 95°C for the denaturation step, 10 sec at 60°C for the annealing step, and 20 sec at 72°C for the extension step) in a PCR reaction mixture containing 50 mM Tris-HCl at pH 9.1, 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 4.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.15 g/L BSA, 0.2 mM dNTPs, primers at 1.0 μM each (See Supplemental Data Table 1) and 0.05 kU/L KlenTaq (AB peptides).

Amplicons from *N. meningitidis* (42.1 mg/L), *L. monocytogenes* (37.1 mg/L) and *C. krusei* (42.5 mg/L) were digested with 10 units of lambda exonuclease (New-England Biolabs) at 37°C in the PCR buffer described above for 5 min unless otherwise noted. Nondigested control amplicons were denatured at 95°C for 5 min, and then cooled on ice for 3 min while digested products were directly used for microarray hybridization without prior heat treatment. Digestions were monitored with microfluidic gel electrophoresis performed on the Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). For the comparison between *C. krusei* phosphorylated (7.9 mg/L) and nonphosphorylated (7.6 mg/L) complementary strand digestion, amplicons were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) and then digested in lambda exonuclease buffer for 30 min. Microfluidic experiments were conducted with nonpurified amplicons from *L. monocytogenes* (23.1 mg/L) digested with the exonuclease for 5 min. Oligonucleotide probes (See Supplemental Data Table 2) with a 5' amino-linker were suspended in Microspotting solution plus (TeleChem International) and spotted at 30 μmol/L on Super Aldehyde slides (Genetix) using a VIRTEK SDDC-2 Arrayer (Bio-Rad Laboratories).

All amplicons were subjected to hybridization at room temperature (22-25°C) in 6X SSPE (EMD Biosciences), 0.03% polyvinyl-pyrrolidone (Sigma), and 30% formamide (Sigma). Passive hybridizations were conducted with 20 µL volumes containing 1.75-10 mg/L of target amplicons. Passive hybridization (1 h) was performed using a glass lifterslip (Erie Scientific) apposed to the microarray slide. Active hybridization (5 min) was achieved using a CD-based poly-dimethylsiloxane microfluidic device, as previously described (Peytavi *et al.*, 2005b). Washing was performed in 0.2X SSPE + 0.1% sodium dodecyl-sulfate, followed by rinsing in 0.2X SSPE. Slides were scanned using a ScanArray 4000XL (PerkinElmer), and the hybridization signals were quantified using Genepix 6 (MDS Analytical Technologies). A Cy3-labelled control oligonucleotide (See Supplemental Data Table 3) was used to validate the microarray subarrays. Subarrays with a median signal of 5000 fluorescence units or more for the control oligonucleotide were considered valid, and those with lower signals were discarded. All hybridization signals were corrected for background (the median background was 100 fluorescence units or less) and were then expressed as a percentage of the control oligonucleotide signal.

### 3.5 Results

Hybridization of amplicons from *N. meningitidis*, *L. monocytogenes*, and *C. krusei* digested directly in PCR buffer with the lambda exonuclease all yielded signal enhancements (up to 14.5-fold) (Table 1). Microfluidic electrophoresis has shown that around 90% of double-stranded DNA with phosphorylated complementary strands and Cy3-labeled target strands was digested compared to an undigested control (data not shown).

To monitor the influence of the Cy3 label on lambda exonuclease digestion, *C. krusei* amplicons produced with Cy3/phosphorylated or Cy3/nonphosphorylated primers were purified and then digested with lambda exonuclease. Passive 1-hour hybridization of the digested *C. krusei* amplicons with nonphosphorylated complementary strands yielded a significant hybridization signal increase of 5-fold or more (Figure 1A). A higher signal increase (15-fold) was obtained by digestion of the phosphorylated complementary strand using lambda exonuclease. Selective digestion of the complementary strand yielded a strong hybridization signal with the *C. krusei*-specific capture probe ECKruH715, whereas no signal was measured with nondigested control amplicons (Figure 1A). Digested amplicons yielded higher hybridization signals, facilitating the differentiation of SNPs, as exemplified by the signal with the perfectly matched *C. krusei* probe ECKruH703, which is at least twice as strong as the signal with the single-mismatched *C. albicans* probe ECalbH596. Nondigested amplicons could not distinguish this SNP.

For active hybridization, amplicons were introduced into the microfluidic unit juxtaposed to a microarray slide [4]. Microfluidic hybridization of the digested product showed a 6- to 9-fold increase in the measured hybridization signals compared to nondigested control amplicons (Figure 1B).

### 3.6 Discussion

Selective digestion of complementary strands with lambda exonuclease directly in PCR buffer yielded up to a 14.5-fold increase in microarray hybridization signals compared to nondigested control amplicons. Because the complementary strand is eliminated from the hybridization material, little or no interaction with the dangling end occurs, thus preventing displacement of the target strand hybridized to the microarray capture probe [2].

A number of investigators have used exonuclease digestion of the complementary strand to produce single-stranded DNA targets for hybridizations [8-16]. These methods are more cumbersome than our 5-min method, however, because they require additional steps, longer digestion times (15-45 min), and in some cases, more complex modifications of the target strand. Although most investigators have suggested that single-stranded DNA targets can yield better hybridization signals, only a few [9-10] directly compared digested products with nondigested controls. Under optimal conditions, investigators observed at most a 2-fold increase in hybridization signals with purified DNA targets compared to a 14.5-fold increase with our simple 5-min method.

We have investigated how Cy3 label at the 5' end of the target strand influences lambda exonuclease digestion. Because the lambda exonuclease has 20X more affinity for a phosphorylated 5' end than a hydroxylated 5' end [17], we compared the digestion of both of these substrates paired with a 5' Cy3-labelled target strand. We conducted the digestion in lambda exonuclease buffer at 37°C for 30 min for optimal enzymatic activity. The combination of a 5' Cy3-labelled target primer with a phosphorylated complementary strand yielded the best signal increase. Amplicons produced by Cy3/non-phosphorylated primer combination also yielded an increased hybridization signal suggesting that lambda exonuclease has less affinity for the Cy3-labelled 5' end than for the hydroxylated 5' end, thereby somehow protecting the target strand.

Competition for the target strands between the complementary strands and the capture probes during passive hybridization has been previously reported by our group [2]. Even though

hybridization time is shortened with the microfluidic platform [4] and the hybridization kinetics is increased, competition between complementary strands and capture probes also occurs. Digestion of the complementary strands by lambda exonuclease resulted in a 6- to 9-fold increase of the hybridization signals using the microfluidic platform as compared to the nondigested control amplicons. This finding confirms that the generation of single-stranded DNA targets results in increased fluorescence signals both with passive and active microfluidic microarray hybridizations.

The 1-step digestion procedure presented here increases hybridization signals and facilitates SNP differentiation without any further modification for protection of the target strand, such as incorporation of phosphorothioate nucleotide analogs [8]. Protection of the target strand likely comes from the Cy3 label used for microarray detection as suggested above. Increased hybridization signal allows the use of more stringent washing conditions along with the use of shorter microarray probes for better SNP differentiation. This digestion step eliminates the need for high-temperature denaturation and can be performed directly in a standard PCR buffer. The low complexities of our digestion and hybridization procedures make them amenable to integration into fully automated compact diagnostic devices.

### **3.7 Acknowledgements**

Grant/funding support: This research was supported by Génome Québec and Genome Canada.

Financial Disclosures: None declared

Acknowledgments: We thank Dominique Boudreau, Richard Giroux and Isabelle Martineau for their help in capture probe design.

### 3.8 References

1. Holloway B, Erdman DD, Durigon EL, Murtagh JJ, Jr. An exonuclease-amplification coupled capture technique improves detection of PCR product. *Nucleic Acids Res* 1993;21:4990.
2. Peytavi R, Liu-Ying T, Raymond FR, Boissinot K, Bissonnette L, Boissinot M, *et al.* Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *Biotechniques* 2005;39:89-96.
3. Stedtfeld RD, Wick LM, Baushke SW, Tourlousse DM, Herzog AB, Xia Y, *et al.* Influence of dangling ends and surface-proximal tails of targets on probe-target duplex formation in 16S rRNA gene-based diagnostic arrays. *Appl Environ Microbiol* 2007;73:380-389.
4. Peytavi R, Raymond FR, Gagné D, Picard FJ, Jia G, Zoval J, *et al.* Microfluidic device for rapid (<15 min) automated microarray hybridization. *Clin Chem* 2005;51:1836-1844.
5. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:7652-7656.
6. Higuchi RG, Ochman H. Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 1989;17:5865.
7. Hultman T, Stahl S, Hornes E, Uhlen M. Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Res* 1989;17:4937-4946.
8. Nikiforov TT, Rendle RB, Kotewicz ML, Rogers YH. 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* 1994;3:285-291.
9. Germini A, Mezzelani A, Lesignoli F, Corradini R, Marchelli R, Bordoni R, *et al.* Detection of genetically modified soybean using peptide nucleic acids (PNAs) and microarray technology. *J Agric Food Chem* 2004;52:4535-4540.

- 10 Ho-Pun-Cheung A, Choblet S, Colineau T, Abaibou H, Zsoldos D, Brengel-Pesce K, *et al.* Detection of single nucleotide polymorphisms by minisequencing on a polypyrrole DNA chip designed for medical diagnosis. *Lab Invest* 2006;86:304-313.
- 11 Slunt KM, Grace JM, Macdonald TL, Pearson RD. Effect of mitonafide analogs on topoisomerase II of *Leishmania chagasi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:706-709.
- 12 Martin V, Perales C, Abia D, Ortiz AR, Domingo E, Briones C. Microarray-based identification of antigenic variants of foot-and-mouth disease virus: a bioinformatics quality assessment. *BMC Genomics* 2006;7:117.
- 13 Michel D, Trembleau A, Moyse E, Brun G. Optimization of PCR/lambda exonuclease-mediated synthesis of sense and antisense DNA probes for in situ hybridization. *Histochem J* 1997;29:685-693
- 14 Knuchel MC, Graf B, Schlaepfer E, Kuster H, Fischer M, Weber R, *et al.* PCR-derived ssDNA probes for fluorescent in situ hybridization to HIV-1 RNA. *J Histochem Cytochem* 2000;48:285-294.
- 15 Stickney HL, Schmutz J, Woods IG, Holtzer CC, Dickson MC, Kelly PD, *et al.* Rapid mapping of zebrafish mutations with SNPs and oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2002;12:1929-1934.
- 16 Hannon K, Johnstone E, Craft LS, Little SP, Smith CK, II, Heiman ML, *et al.* Synthesis of PCR-derived, single-stranded DNA probes suitable for in situ hybridization. *Anal Biochem* 1993;212:421-427.
- 17 Little JW. An exonuclease induced by bacteriophage lambda. II. Nature of the enzymatic reaction. *J Biol Chem* 1967;242:679-686.



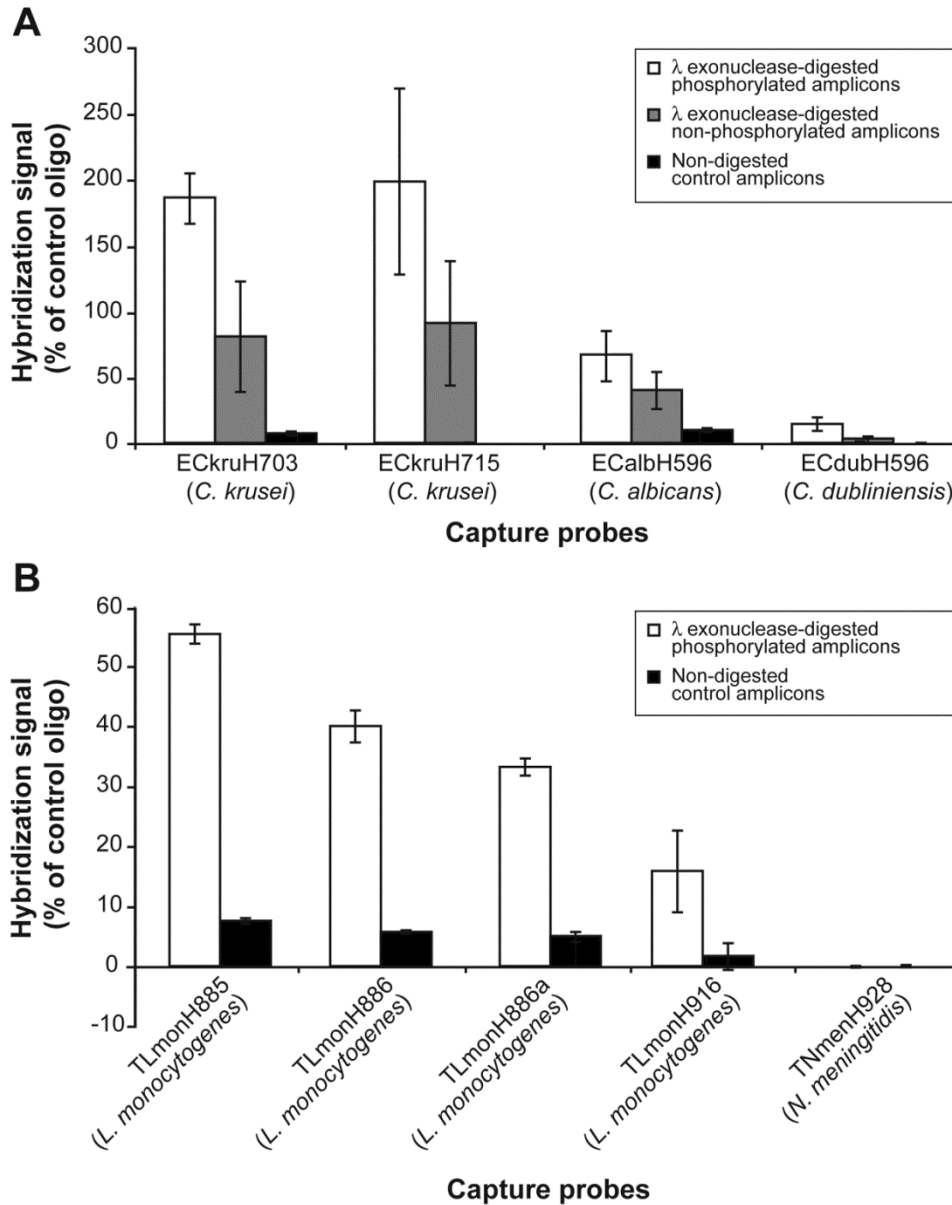
### 3.9 Tables

**Chapitre 3 - Table 1 : Passive hybridization efficiencies with species-specific 20-mer capture probes.**

Microbial species (probe name)	Digested amplicons signal <sup>a</sup>	Non-digested control amplicons signal <sup>a</sup>	Ratio (digested/non- digested)
<i>Neisseria meningitidis</i> (TNmenH928)	158.4%	41.1%	3.9
<i>Listeria monocytogenes</i> (TLmonH916)	28.9%	2.0%	14.5
<i>Candida krusei</i> (ECkruH678)	84.2%	7.1%	11.9

<sup>a</sup>: Signal intensity is the mean signal from separate hybridizations performed on 2 different slides printed with 8 spots for each capture probe expressed as a percentage of the control oligonucleotide signal.

### 3.10 Figures



**Chapitre 3 - Figure 1:**

A) Comparison between signal intensities for passive hybridization of digested phosphorylated and nonphosphorylated complementary strands from *C. krusei* amplicons. B) Active microfluidic hybridization of *L. monocytogenes* amplicons digested by lambda exonuclease. Each graph illustrates the mean signal from separate hybridizations performed on 2 different slides printed with 8 spots for each capture probe. Target microbial species for each capture probe are indicated in parenthesis. The bars represent the SD.

### 3.11 Supplemental data

Chapitre 3 - Supplemental data - Table 1 : Primer sequences

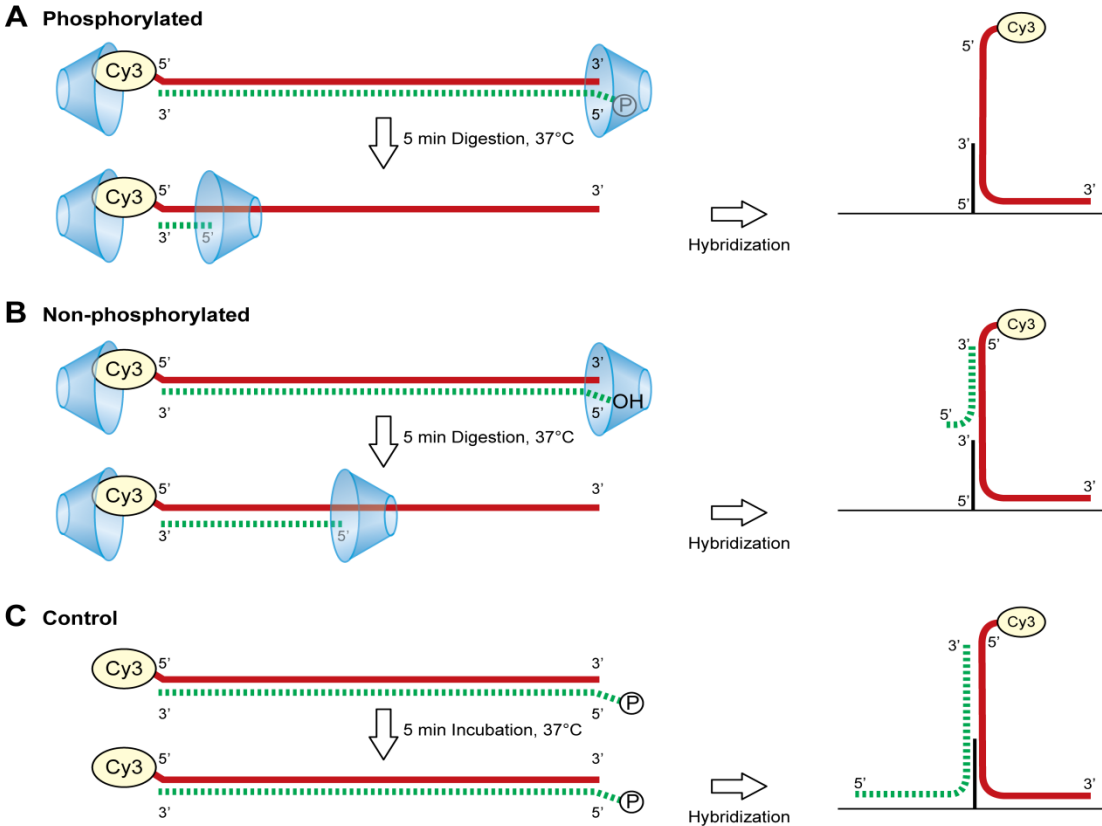
Target microbial species	Primer name	Sequence (5' → 3')	Amplicon length (bp)
<i>Neisseria meningitidis</i>	Tplaq769	ACTGGYGTTGAIATGTTCCGYAA	245
	Tplaq991	ACGTCAGTIGTACGGAARTAGAA	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tbsi863	AACGTGGTCAAGTWTTAGC	142
	Tbsi985	GTACGGAARTAGAATTGWGG	
<i>Candida krusei</i>	ECanG459a	CAAGATGGAYTCYGTAAITGGGA	293
	ECanG728b	CATCTTGTAATGGTAATCTTAATG	

Chapitre 3 - Supplemental data - Table 2 : Capture probe sequences

Target microbial species	Capture probe name	Sequence (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Neisseria meningitidis</i>	TNmenH928	TACGTACTGAGCAAAGAAGA	56.3
<i>Listeria monocytogenes</i>	TLmonH885	GTGGAGTAATCGAACCTGGT	60.4
	TLmonH886	TGGAGTAATCGAACCTGG	57.6
	TLmonH886a	GGAGTAATCGAACCTGG	57.2
	TLmonH916	AAAACATAAGTTTCAGCTTT	50.2
<i>Candida krusei</i>	EckruH678	ATTAGAAGCAATCGATGCTA	54.3
	EckruH703	GTTGGTCTGACAGGTGG	62.2
	EckruH715	TAATGGCTTTTCGGTTGG	55.3
<i>Candida dubliniensis</i>	ECdubH596	GTTGGTGGAAGCTICAATCA	58.4
<i>Candida albicans</i>	EcalbH596	GTTGGTGIATGGTTCAATCA	56.3

Chapitre 3 - Supplemental data - Table 3 : Control oligonucleotide sequences

Oligonucleotide name	Sequence (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
bbc1 (capture probe)	AGGATAGGCAGACCATACTC	60.4
bbc1a (Cy3-labelled target)	GAGTATGGTCTGCCTATCCT	



**Chapitre 3 - Supplemental data - Figure 1. Schéma représentant la structure et le fonctionnement de la digestion spécifique du brin complémentaire par l'exonucléase Lambda.**

Amplicons produits par PCR à l'aide d'amorces marquées au Cy3 pour le brin cible ■■.

**A)** Le brin complémentaire ■■■ est produit à l'aide d'amorces modifiés par un phosphate en 5'(P). L'exonucléase Lambda digère préférentiellement le brin phosphorylé. Le brin cible s'hybride sur biopuce. **B)** Le brin complémentaire est produit par une amorce non-modifiée possédant un groupement hydroxyle en 5' (OH). L'exonucléase lambda digère de façon sous-optimale le brin complémentaire. Le brin cible est protégé de la digestion par le fluorophore Cy3. Le produit de digestion est hybridé sur biopuce. **C)** Les amplicons contrôles non-digérés sont dénatures puis hybridés sur biopuce. Cette figure ne fait pas partie de l'article publié dans Clinical Chemistry. Elle a été réalisée par la suite pour une affiche présentée au Human Genome Meeting en mai 2007. Elle facilite cependant la compréhension du phénomène de digestion à l'exonucléase et est insérée à la fin du présent chapitre.

**Chapitre 4**  
**Hybridation en temps réel sur lit de billes monocouche**  
**d'échantillons cliniques et d'amplicons possédant des**  
**extrémités 5' de longueur variable**



## **Avant propos**

### **Real-time DNA hybridization on microbead-bed microfluidic cartridge; study of amplicon hybridization behaviour onto solid support**

Auteurs:

Karel Boissinot<sup>1,2</sup>, Régis Peytavi<sup>1,2</sup>, Sébastien Chapdelaine<sup>3</sup>, Matthias Geissler<sup>4</sup>, Maurice Boissinot<sup>1,2</sup>, Eric A. Martel<sup>1</sup>, David Béliveau-Viel<sup>3</sup>, Jean-François Gravel<sup>3</sup>, Denis Boudreau<sup>3</sup>, Michel G. Bergeron<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche en infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Pavillon CHUL), Québec, Québec, Canada;

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada;

<sup>3</sup> National Research Council of Canada, Boucherville, Québec, Canada;

<sup>4</sup> Département de chimie and Centre d'optique, photonique et laser (COPL), Université Laval, Québec, Québec, Canada

\* address correspondence to this author at: Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, 2705 Laurier Blvd., Quebec City, Québec, G1V 4G2 Canada; fax 418-654-2715, e-mail Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca

### **Rôle de l'étudiant**

J'ai élaboré le projet de recherche et défini les concepts à démontrer et ainsi que la manière de les valider. J'ai réalisé la totalité des expériences et j'ai participé à l'analyse des données expérimentales. J'ai rédigé la première version du manuscrit et intégré les commentaires des co-auteurs.

## **Rôle des co-auteurs**

Michel G. Bergeron, Régis Peytavi et Maurice Boissinot ont participé à l'élaboration et à la supervision du projet de recherche. Régis Peytavi et Maurice Boissinot ont effectué un suivi technique hebdomadaire de l'avancée des travaux afin d'aider à définir les protocoles et contrôles requis. Régis Peytavi et Maurice Boissinot ont contribué à l'analyse globale des résultats.

Sébastien Chapdelaine, Jean-François Gravel, Matthias Geissler et Denis Boudreau ont contribué à l'élaboration du projet de recherche. Sébastien Chapdelaine et David-Béliveau Viel ont contribué à l'optimisation des paramètres expérimentaux reliés à l'optique et à l'analyse des données optiques. Eric A Martel a contribué à l'analyse statistique des données de fluorescence.

Tous les co-auteurs ont participé à la révision et ont commenté le manuscrit avant la soumission et ont participé à la révision.

## **Statut de l'article**

L'article : «Real-time DNA hybridization on microbead-bed microfluidic cartridge; study of amplicon hybridization behaviour onto solid support» est en révision par les co-auteurs avant la soumission.

## **Commentaires sur l'article inséré dans cette thèse**

Sera soumis prochainement.



## 4.1 Résumé

L'hybridation d'ADN sur support solide n'est pas encore aussi bien comprise que l'hybridation en phase aqueuse et les modèles mathématiques établis ne permettent pas de prédire tous les comportements observés empiriquement. Les recherches récentes ont identifié certains paramètres importants, mais demeurent incomplètes pour prédire avec précision toutes les interactions. Il a été décrit précédemment qu'une corrélation existe entre la longueur de l'extrémité du brin d'ADN cible exposée au solvant et les interactions avec le brin complémentaire. Ces interactions peuvent se traduire par décrochage de la cible de la surface de puce à microdamier. Nous avons développé un outil permettant d'observer en temps réel l'hybridation de l'ADN sur un lit de billes fonctionnalisées avec des sondes de capture. Premièrement, nous avons comparé ce système à une puce traditionnelle et une puce microfluidique centripète afin d'établir le niveau de performance du système, principalement pour la détection de SNPs. La détection en temps réel de l'hybridation sur lit de billes des amplicons provenant d'échantillons clinique a permis d'identifier les échantillons positifs en 5 à 15 minutes. Enfin, nous avons observé en temps réel l'effet de la longueur de l'extrémité du brin cible exposée à la phase aqueuse en présence du brin complémentaire. Les résultats suggèrent que si la longueur de l'extrémité exposée à la phase aqueuse est suffisante, le décrochage de la cible depuis le support solide se produira à une vitesse approchant celle de la liaison initiale de la cible sur les billes. L'instrument démontre un potentiel important pour améliorer notre compréhension de l'hybridation sur support solide et permettra la validation rapide de sondes de capture pour biopuces à microdamier.

## 4.2 Abstract

DNA hybridization phenomena occurring on solid supports are not understood as clearly as aqueous phase hybridizations and mathematical models cannot predict some empirically obtained results. Ongoing research has identified important parameters but remains incomplete to accurately predict all interactions. It was previously described that the length of immobilized target DNA strand exposed to the solvent is correlated to interactions with the complementary strand which can result in unbinding of the target and its release from the surface. We have developed an instrument for real-time monitoring of DNA hybridization on spherical particles functionalized with capture probes and arranged in the form of a dense monolayer bead bed. First we compared this system to traditional (passive) microarray hybridization and a centripetal microfluidic microarray to establish performance levels on SNP detection. Real-time detection of bead-bed hybridization of amplicons from clinical samples further allowed for identification of positive samples within 5 to 15 min. Finally, the effect of the dangling end's length from the immobilized target strand in the presence of the complementary strand was studied in real-time. Results suggest that if the dangling end's length is sufficient, unbinding of target from capture probes will happen at a rate approaching initial binding of target. The instrument shows promise for understanding solid surface hybridization and rapid validation of microarray capture probes.

### 4.3 Introduction

Hybridization is a biological process that relies on the recognition of complementary base pairs in nucleic acid strands that can link through the formation of hydrogen bonds, yielding a double-helix configuration. This phenomenon can occur with both strands suspended in aqueous phase or with one or both strands immobilized on a solid support. Surface-bound hybridizations allow for the detection of numerous targets using nucleic acid probes arranged in microarray format. This technology has proven useful in differential gene expression analyses, genotyping, cytogenetic and diagnostic applications [1–3]. However, microarrays have not yet been employed to their full potential notably because of design complexity and reproducibility issues [4].

Surface-bound hybridizations are affected by distinctive parameters different from those of well-understood aqueous phase hybridizations. Notably, one of the reaction partners is immobilized (capture probe) on a solid support, hence only the nucleic acid target will move throughout the reaction chamber in a process that effectively becomes two-dimensional [5], considerably slowing the hybridization process [6]. Furthermore, Erickson *et al.* [7] have demonstrated that microarray hybridizations do not depend only on the aqueous phase target to capture probe migration, but also that the targets will reach the solid surface then diffuse on that surface until it finds its complementary probe. However, some factors affecting surface-bound hybridization are not yet fully understood. Parameters such as the nature of the ions present in the surrounding medium, their strength/concentration [8,9] and their impacts in relation to capture probe density [5], surface chemistry [10], secondary structure of capture probes [11] and dangling end length of targets exposed to the aqueous phase [12] have been studied as to better control hybridization of targets to surface-bound capture probes.

Accurate and robust detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) remains a challenge in microarray assay design, in part due to the difficulty in predicting the efficacy of discrimination by the capture probes [13]. In silico determination of predictive hybridization parameters such as secondary structure and  $\Delta G$  from nearest neighbor

calculations do not correlate with experimental data under certain constraints, limiting their use [14]. Real-time detection has been described as advantageous for microarray hybridization studies, allowing, for example, to better understand the fundamental limitations of spotting which can result in heterogeneity of surface probes [15] assess competition between two targets differing by a single nucleotide [16] and quantify SNPs species [17]. Through use of surface plasmon resonance, real-time monitoring of oligonucleotides hybridization and more importantly its subsequent melting curve analysis has been used to detect SNPs and create a predictive model, however, it does not address the presence of the complementary strand and its competition with the capture probe or the interactions of targets significantly longer than the capture probe [18]. It could also be useful to gain a better understanding of other competition mechanisms involved in DNA hybridization, especially in the presence of the strand complementary to the target.

Peytavi et al. described, based on end-point fluorescence, the influence of the overhanging length of targets exposed to the aqueous phase, heretofore referred as “dangling end”, in relation to hybridization signal [12]. Briefly, it was found that longer dangling ends accessible to aqueous phase will rehybridize with the complementary strand, resulting in displacement of the capture probe and release of the target from the surface. Stedfeld et al. [19] demonstrated that Gibbs free energy was a better predictor than dangling end lengths alone. In both cases, hybridizations were monitored after they happened, though Stedfeld et al. performed multiple washes with increasing stringency inbetween fluorescence acquisitions. Recently, we have developed a detection platform capable of monitoring bead-based DNA hybridizations inside a microfluidic cartridge in real-time [20]. Using this instrument, we compared DNA hybridizations on polystyrene beads with traditional Cartesian (spotted) microarrays. Moreover, genetic material amplified from clinical samples containing non-specific DNA was randomized and identified using this real-time hybridization instrument. Finally, we took advantage of the real-time detection capabilities of the instrument to analyse the competition between the complementary strand and the capture probes. We confirmed that this competition is dependent on the dangling end of the target strand.

## **4.4 Materials and methods**

### **4.4.1 Microfluidic cartridge and hybridization instrument**

The microfluidic system and fluorescence detection instrument used in this study have been previously described in detail by Gravel et al. [20]. The cartridge is fabricated from transparent thermoplastic polymers and allows for conducting up to 8 assays in parallel. Beads are stacked against a weir confining the passage of flow within the fluidic conduit, measuring 200  $\mu\text{m}$  in width and 27  $\mu\text{m}$  in depth at the detection area. The instrument is equipped with a pneumatic module (providing a pressure output of 9 psi) and a manifold lid serving as a movable interface to mediate fluid displacement on the cartridge. The fluorescence signal deriving from each assay is recorded by a semi-confocal fluorescence reader embedded in the detection platform. A LED (emitting at  $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) and a PMT were used for excitation and detection, respectively. Fluorescence was integrated over 50 ms and was recorded in time intervals of 0.5 s.

### **4.4.2 Probe grafting of microbeads**

Streptavidine-coated polystyrene microbeads (22.7  $\mu\text{m}$  in diameter; Spherotech, Lake Forest, IL) were functionalized with biotin-labeled DNA capture probes of 17-nt (Table 1). Capture probe sequences were based on the camp-factor (*cfb*) gene of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci, GBS). One mismatch was artificially introduced in the middle of the probe sequence using each possible nucleotide permutation. Biotinylated capture probes (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) were immobilized on microbeads using the protocol described previously by Gravel et al. [20]. Beads were resuspended in water and stored at 4°C for up to one week before use.

### **4.4.3 PCR amplification**

Primer sequences for amplification of clinical samples targeting the *cfb* gene of *S. agalactiae* were adapted from previous work [21]. Three other primers were designed to study the

influence of amplicon length and, more specifically, the length of the dangling end generated by hybridization to the capture probe (Table 2). PCR reactions were conducted with an annealing temperature of 56°C on a PTC-200 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Purified genomic DNA from *S. agalactiae* strain ATCC 13813 was used at 1 ng/reaction. Primers were either Cy3-modified or phosphorylated on their 5' end for selective strand digestion by lambda exonuclease [22]. Target and complementary strands were produced by lambda exonuclease digestion for 10 min at 37°C followed by a 5 min enzyme inactivation at 95°C. In all cases, single-stranded DNA was Cy3-labeled. Gel electrophoresis of DNA and quantification of the amplified material were used to adjust all amplicons to a concentration of  $3.4 \times 10^{10}$  copies/ $\mu$ l. Amplicons were filtered on 0.1  $\mu$ m Ultrafree-MC Centrifugal Filter device (EMD Millipore, Billerica, MA) at 11,800 g for 2 min. Amplicons were stored at 4°C for up to one week prior to use in hybridization.

#### **4.4.4 Clinical samples preparation**

We used vaginal-anal swabs which were collected from pregnant woman at the onset of labor during NIH clinical trial DMID 05-0107 and stored at -80°C in 1X TE buffer. A purified batch of *Bacillus atrophaeus* subsp. *globigii* spores [23] was added to each sample to obtain a final calculated concentration of 500 lysed spores/tube, which served as a process control. A volume of 100  $\mu$ l was taken from 6 different samples as to produce high charge, low charge or negative samples in duplicates. DNA extraction was performed using BD GeneOhm lysis kit (BD Diagnostics, Quebec, QC). Triplicates of fresh lysates were then amplified using primer pair Cy3cfbSag59:cfbSag190 before being blinded by random numerical identification. All experiments were conducted in compliance with the recommendations of the internal ethical review board of the Centre hospitalier universitaire de Québec.

#### **4.4.5 Hybridization procedures**

Microbead-based hybridization assays were conducted in three or five steps. First, 40  $\mu$ l of beads (at 60 beads/ $\mu$ l) were injected in each channel of the microfluidic cartridge to form the bead bed. Then a solution entailing 5  $\mu$ l target amplicons and 15  $\mu$ l hybridization buffer (8X SSPE, 40% formamide and 0.04% PVP; all purchased from EMD Chemicals, Gibbstown,

NJ) was pushed through the bead bed. For evaluating the effect of amplicon and dangling end lengths, 20  $\mu$ l of DNA sample containing complementary strands were injected, followed by re-addition of 20  $\mu$ l of target strand solution. Finally, a wash step was performed using 20  $\mu$ l of 0.1X SSPE buffer. Fluorescence signals were recorded in real-time during each experiment.

Passive and microfluidic glass slide hybridizations were performed as described by Peytavi et al. [24]). Capture probes from Table 1 were spotted at 30  $\mu$ M onto Aldehyde Plus array slides (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) using an Omnigrid microarray spotter (Digilab, Marlborough, MA). Fluorescence acquisition was performed using an Agilent GB2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA).

#### **4.4.6 Data analysis**

Glass slide microarrays were analysed using GenePix Pro 6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Median background signal was subtracted from median fluorescence signal. The signal deriving from hybridization between complementary strands was defined as 100%. Signals obtained from hybridization between mismatched strands were expressed relative to the perfect match capture probe signal. Hybridization behaviour in real-time experiments was determined using slope (in a.u./s) and/or endpoint fluorescence (in a.u.). Slopes were calculated using linear regression of fluorescence recorded during passage of the DNA strands through the bead bed. After preliminary experiments with oligonucleotide targets, a threshold of 1 a.u./s was found to clearly delimitate a positive sample. Below that threshold, endpoint fluorescence was also observed to confirm the result in the case of weak-load positive samples. Endpoint fluorescence was calculated by subtraction of the background fluorescence (bead bed) from the average fluorescence near the end of the wash step. A threshold of 100 a.u. was set to discriminate positive and negative samples based on experimental data.

## 4.5 Results

### 4.5.1 SNP detection

We monitored the evolution of fluorescence intensity in real-time for bead-based hybridization using target strands produced with the single-stranded amplicons generated using the Cy3cfbSag59:cfbSag190 primer pair (Figure 1). Beads were modified with capture probes containing one of each possible nucleotide permutation in the central position. The accumulation of beads at the constriction (step a) is accompanied by a slight elevation of fluorescence with respect to the empty channel. When targets are flown through the bead bed (step b) an immediate increase in fluorescence is observed. In the case of a perfect match (black trace) the signal continues to increase in a quasi-linear fashion. A mismatch probe (grey trace) or a non-complementary strand, on the other hand, lead to stagnant signals and plateau formation. After exposure to DNA, the bead bed is washed (step c) to remove weakly adsorbed strands and decrease non-specific fluorescence. Each step of the hybridization process is clearly delimited by a spike resulting from the passage of air through the bead-bed after each injection is completed. Fluorescence of the bead bed was considered as background level and was subtracted from the fluorescence signal at the end of the wash step for endpoint detection. Using the same probe-target systems we performed both active (based on centrifugal microfluidics) and passive hybridization on a glass microarray slide for comparison. Table 3 shows the fluorescence (expressed as a percentage of the perfect match capture probe) resulting from hybridization of target nucleic acids to capture probes for all three systems. For each of them, the match capture probe gave a clear fluorescence signal while the 3 possible mismatches yielded only faint hybridization signals. A bilateral Student test gave a p-value of  $<0.01$  for all hybridization systems under the hypothesis that the perfect match probes gives a different result from the mismatch probes. This confirms that the three systems can discriminate SNPs. A faster (e.g., 5 min) result could be obtained by real-time analysis of the fluorescence curve (Figure 1).



#### **4.5.2 Detection of amplicons from randomized clinical samples on microbeads**

After validation of the specificity of the microfluidic real-time hybridization, clinical samples were tested to demonstrate the detection capabilities among a background of non-specific DNA. Resuspensions of vaginal-anal swabs previously tested for the presence of GBS by real-time PCR were spiked with spores of *B. globigii* CCRI-9827 (Collection du Centre de recherche en infectiologie, [http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by\\_id/861](http://www.wfcc.info/ccinfo/index.php/collection/by_id/861)) serving as internal control. The spiked samples were randomized and hybridized either to capture probes specific to GBS or to capture probes specific to the internal control to validate hybridization experiments. Samples with a fluorescence slope  $>1$  a.u./s (Table 4) for GBS were identified as positive. Samples with a fluorescence slope  $<1$  a.u./s were equally considered positive if the difference in endpoint fluorescence was 100 a.u. or more. All blinded tubes were correctly identified using either the slope from step b for 10 positive samples while endpoint detection was used for validation of 2 weak-load samples and negative samples. More specifically, slopes for tubes 3b and 2b (Table 4) were very similar, needing endpoint fluorescence for discrimination.

#### **4.5.3 Hybridization of amplicons with varying dangling end lengths**

Heat-denatured double-stranded amplicons were hybridized onto bead-bed based capture probes, resulting in small ( $<1$  a.u./s) fluorescence increase and low ( $<500$  a.u.) endpoint fluorescence for all dangling end lengths tested (as calculated using hybridization curves from supplementary figure 1). First we hybridized single-stranded targets of varying dangling end lengths to the capture probe. The short (54-nt) dangling end amplicon produced a continuous fluorescence increase of 13.3 a.u./s throughout step b while the long (264-nt) dangling end amplicon caused the signal to increase at 4.3 a.u./s (Table 5). We subsequently injected the complementary strand to the bead-bed previously hybridized with the target strand (step c). The initial concentration of DNA was maintained the same in each of these steps to measure the competitive effect in relation to the dangling end length. Hybridization of the complementary strand resulted in a decrease of fluorescence as can be observed in

Figure 2, step c. This fluorescence decrease in Table 5 was expressed as a negative slope that was used to calculate a ratio with the fluorescence increase of step b for each amplicon (slope of step c/slope of step b  $\times$  100). The amplicon presenting a short (54-nt) dangling end resulted in a 22,3% fluorescence decrease ratio during flow-through of the complementary strand (step c in Figure 2) while the amplicon with the long (264-nt) dangling end resulted in a 77% fluorescence decrease ratio, reducing fluorescence to near initial level (beginning of step b). The target strand was then added again, resulting in a fluorescence increase rate within 10% of step b for both short and long dangling end amplicons.

To confirm that the single-stranded hybridization results were not simply a result of variation in total length of the amplicons (154-nt vs 364-nt), we amplified a target using the primer pair cfbSag-341: Cy3cfbSag190, generating a long amplicon (554-bp) while producing a short dangling end (54-nt) when hybridized to the capture probe. For this long amplicon with a short dangling end, hybridization of the target strand (step b) resulted in a fluorescence increase rate of 6.5 a.u./s, while addition of the complementary strand resulted in a 10% fluorescence decrease ratio throughout step c. Finally, re-addition of the target strand resulted in a fluorescence increase rate within 2% of the rate observed for step b.

## 4.6 Discussion

We were able to establish comparable performances for discrimination of SNPs using the three hybridization systems considered herein (Table 3). It's worth noting that the  $\Delta G$  predicted by nearest neighbor model [25] and experimental values for single mismatches [26] showed a significant difference that might allow for SNP discrimination, which was confirmed experimentally. It seems that nearest neighbor is a better predictor of discrimination than Preparata in this case. Under simple conditions (one target, low concentration, 1 or 2 non-consecutive mismatches), a clear correlation can be established between the nearest neighbor model and experimental data [27]. However, more complex hybridization protocols revealed that surface hybridization with multiple targets, some of which contain consecutive mismatches of purines did not follow the nearest neighbor model and solution-measured  $\Delta G$  [14]. Though we have limited probe-target combinations, it is interesting to note that hybridization results were comparable for the three methodologies that were tested herein. Passive, diffusion-limited hybridization was allowed to proceed for one hour while the process in both microfluidic systems was typically completed within 3–5 min. Results presented in this study highlight the potential of this rapid real-time hybridization platform as a tool to screen for optimal microarray capture probes.

After validating real-time monitoring for SNPs discrimination, we performed experiments using amplicons produced from clinical samples originating from vaginal-anal swabs. All randomized samples were identified correctly using either the fluorescence increase (slope) produced by immobilization of the target onto capture probes or endpoint fluorescence. Detection of a slope was sufficient to declare a sample as positive in 10 of 12 cases; however two samples (tubes 3a and 3b) with a low-charge of GBS required end-point detection to be identified as positive. For negative samples, endpoint detection was necessary to confirm they were truly negative samples and not weak-load samples. Intrinsic variation of the detection instrument from one data point to another might explain the profiles observed for tubes 2b, 3a and 3b. If the slope is very faint, it could be lost amidst that noise, though the endpoint data confirms that DNA strands present in tubes 3a and 3b did hybridize to the capture probes while no significant amount of fluorescence from tube 2b was observed. This finding reveals a limitation to the real-time detection using our system, where samples near

the detection threshold can be masked by noise. However, a ROC curve analysis of the limited data set shows that even if some samples produce slopes as close as 2b and 3b, placing a threshold at 0.46 a.u./s would allow for separating negative from positive slopes. A larger dataset would help to establish a clear and reliable delimitation of slope values for positive targets.

Previously, we have demonstrated that the length of the DNA dangling end exposed to solution greatly influenced hybridization signals on microarrays [12]. It was postulated that the complementary strand could rehybridize to the solution-exposed dangling end of the target strand and displace the capture probe. Others have observed the same phenomenon and came up with a similar conclusion [19,28] or with different explanations [29]. These models were elaborated with data obtained using a conventional microarray scanner, thus they are limited to endpoint fluorescence. However, using our hybridization system and strand-specific exonuclease digestion, we were able to observe the phenomenon in real-time. We used the *cfb* gene from GBS and produced amplicons of varying lengths to obtain different overhangs without introducing a sequence variable for the capture probe.

Comparison of real-time hybridization results for single- and double-stranded amplicons confirmed previous observations that single-stranded targets hybridize more efficiently to capture probes than double-stranded targets [22,28]. The hybridization phenomenon described by Peytavi et al [12] should be a 3-step process that involves hybridization of target strand to capture probe hybridization of complementary strand to target dangling end, and subsequent release. As such, we would expect a single capture probe to result in a fluorescence increase, followed by a similar fluorescence increase and finally a sharp fluorescence decrease to initial background levels. In our real-time measurement system, we were not able to observe a 3-step hybridization process resulting in displacement of the capture probe. There are three main factors to consider: acquisition speed, data noise from the detector and rate of fluorescence increase. First, for the acquisition speed, the detector integrates fluorescence during 50 ms each 0.5 s. Second, on average the detector has a variation of  $\pm 42$  a.u. as its background noise. Finally, for the two double-stranded amplicons with the short and medium dangling ends, fluorescence increased by  $\sim 0.9$  and  $0.4$  a.u./s, respectively, as determined by the slope of step b (using hybridization curves from supplementary figure 1). Using these numbers, for our system to be able to observe an

increase in fluorescence for the long dangling end amplicon, the complementary strand would have to find the target strand and displace the capture probe in more than 47 s to produce a signal above the noise threshold. Taking into account the precision of the instrument, we can conclude that the system cannot observe the competition phenomenon in such detail because it happens faster than is possible to observe.

Real-time hybridization of single-stranded targets followed by hybridization of single-stranded complementary strands permitted a deeper comprehension of the competition process. Dangling end length and overall amplicon length were varied to insure that the observed phenomenon was not strictly related to diffusion effects and molecular weight. Hybridization slopes of the two long amplicons were similar, yet they increased more slowly than those observed for the short amplicon, which can be explained by differences in the diffusion rate [30]. The addition of the complementary strand was monitored in real-time and did not show considerable reduction in fluorescence for the short and long amplicons with short dangling ends (22% and 10% decrease of fluorescence, respectively) while the long amplicon with the long dangling end showed a sharp (77%) decrease in fluorescence from the bead-bed. This observation suggests that the difference in fluorescence variation is not only related to diffusion, but that long dangling ends are likely to interact significantly with the complementary strand in a way that results in displacement of the capture probe. These findings, acquired in real-time, are in accordance with the model published by Peytavi et al. [12] that studied the competition phenomenon post microarray hybridization by confocal microscopy. Our data also suggests that for dangling ends of the same length, longer amplicons, with short dangling ends, might be less susceptible to the presence of the complementary strand, though the shorter amplicon should still result in more hybridized target strands and higher overall fluorescence. Since fluorescence increases throughout hybridization of the target strand (step b), independently of the length, it is unlikely that the phenomenon of dangling end length can be explained by quenching of the fluorophore caused by its movement during fluorescent acquisition, as proposed by Zhang et al. [29]. Even though these real-time hybridization curves would, in principle, enable elucidation of reaction kinetics in relation to the dangling ends, the system was not initially designed for such purposes and limits the quality of information that can be obtained from those curves. One reason is that the cartridge is prone to displacement when opening and closing the

manifold lid which can affect the position of the bead bed with respect to the detection head. Another reason is that the density of the bead bed can vary under the conditions of pressure-driven flow. Furthermore, the length of bead beds is not consistent for all experiments. For example, we observed up to 20% variation (data not shown), which can lead to different degrees of depletion and variation in contact time between beads and sample solution. Finally, equilibrium conditions are not reached for which the flowing reagent is kept at a constant concentration above the immobilized/hybridized nucleic acids. The shape of the curves formed by hybridization of the target (steps b and d, Figure 2) clearly shows that saturation of the capture probes is not attained for any of the assays performed herein. Hybridization of higher concentrations of targets (step b) resulted in a sharper fluorescence increase that reached the cut-off of the PMT before an inflection point was observed (data not shown). The experimental setup would need to be improved in order to comply with the stringent requirements for kinetic analysis. Nevertheless, our system as used within this study can quickly reveal tendencies of complex hybridization kinetics.

## 4.7 Conclusion

In this work, we studied amplicon hybridization behavior on the surface of spherical particles within a microfluidic cartridge in real-time using a home-built optical detection platform. The ability to confirm SNP in GBS detection assays was consistent with the results obtained from control experiments using standard (spotted) microarrays subjected to active and passive hybridization methods. The instrumental setting therefore can be considered as a valuable tool for validation of capture probes to be used in different microarray formats. We further demonstrated identification of blinded PCR-amplified clinical samples, showing a high degree of tolerance in respect to the type of nucleic acids involved and the ability to perform detection in the presence of non-specific DNA. These findings qualify the detection platform as a robust and versatile instrument than can facilitate real-life analytical tasks that are beyond purely academic relevance. While slope analysis could fasten identification of positive samples with a high charge, end point detection was still necessary to discriminate amplicons at low content from negative samples. Finally, we were able to further our understanding of competition mechanisms between the complementary strand and the capture probe in regard to the target. Globally, these results confirm and expand previous studies emphasizing the importance of the dangling end length in the presence of DNA strands complementary to the target. Further work is required to fully elucidate and elaborate a robust mathematical model to quantify this phenomenon.

## **4.8 Acknowledgements**

This work was supported in part by Defence Research and Development Canada, Centre for Security Science, Chemical, Biological, Radiological/Nuclear, and Explosives Research and Technology Initiative (CRTI) under the program Portable Biological Agent Detection System (06-0187TD). We thank our colleagues Marthe Bernier (CRI) and Chantal Fauvel (CRI) for their help with clinical samples, as well as Richard Giroux (CRI) and Isabelle Martineau (CRI) for assistance in the design of capture probes. We are grateful to Teodor Veres (NRC) for his continuous support.



## 4.9 References

1. Miller, M.B. and Y.W. Tang. 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 22:611-633.
2. Weile, J. and C. Knabbe,. 2009. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal. Bioanal. Chem.* 394:731-742.
3. Yeo, L.Y., et al., 2011. Microfluidic devices for bioapplications. *Small* 7:12-48.
4. Carletti, E., E. Guerra, and S. Alberti. 2006. The forgotten variables of DNA array hybridization. *Trends Biotechnol.* 24:443-448.
5. Gong, P. and R. Levicky. 2008. DNA surface hybridization regimes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:5301-5306.
6. Singh, R., J. Nitsche, and S.T. Andreadis. 2009. An integrated reaction-transport model for DNA surface hybridization: implications for DNA microarrays. *Ann. Biomed. Eng.* 37:255-269.
7. Erickson, D., Li, D. and Krull U.J., Modeling of DNA hybridization kinetics for spatially resolved biochips. *Anal Biochem*, 2003. 317(2):186-200.
8. Owczarzy, R., et al., Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry*, 2008. 47(19): p. 5336-53.
9. Springer, T., et al., Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(20): p. 7343-51.
10. Ambia-Garrido, J., A. Vainrub, and B.M. Pettitt, A model for Structure and Thermodynamics of ssDNA and dsDNA Near a Surface: a Coarse Grained Approach. *Comput Phys Commun*, 2010. 181(12): p. 2001-2007.
11. Chen, C., et al., Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(11): p. 3756-65.
12. Peytavi, R., et al., Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *Biotechniques*, 2005. 39(1): p. 89-96.
13. Suzuki, S., et al., Experimental optimization of probe length to increase the sequence specificity of high-density oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*, 2007. 8: p. 373.
14. Fish, D.J., et al., DNA multiplex hybridization on microarrays and thermodynamic stability in solution: a direct comparison. *Nucleic Acids Res*, 2007. 35(21): p. 7197-208.

15. Rao, A.N., C.K. Rodesch, and D.W. Grainger, Real-time fluorescent image analysis of DNA spot hybridization kinetics to assess microarray spot heterogeneity. *Anal Chem*, 2012. 84(21): p. 9379-87.
16. Bishop, J., A.M. Chagovetz, and S. Blair, Competitive displacement: a sensitive and selective method for the detection of unlabeled molecules. *Opt Express*, 2007. 15(8): p. 4390-7.
17. Fiche, J.B., et al., Point mutation detection by surface plasmon resonance imaging coupled with a temperature scan method in a model system. *Anal Chem*, 2008. 80(4):1049-57.
18. Chagovetz, A. and S. Blair, Real-time DNA microarrays: reality check. *Biochem Soc Trans*, 2009. 37(Pt 2): p. 471-5.
19. Stedtfeld, R.D., et al., Influence of Dangling Ends and Surface-Proximal Tails of Targets on Probe-Target Duplex Formation in 16S rRNA Gene-Based Diagnostic Arrays. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007. 73(2): p. 380-389.
20. Gravel, J.-F., et al., Portable bead-based fluorescence detection system for multiplex nucleic acid testing: a case study with *Bacillus anthracis*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2013: p. 1-13.
21. Ke, D., et al., Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem*, 2000. 46(3): p. 324-31.
22. Boissinot, K., et al., Rapid exonuclease digestion of PCR-amplified targets for improved microarray hybridization. *Clin Chem*, 2007. 53(11): p. 2020-3.
23. Isabel, S., et al., Rapid filtration separation-based sample preparation method for *Bacillus* spores in powdery and environmental matrices. *Appl Environ Microbiol*, 2012. 78(5): p. 1505-12.
24. Peytavi, R., et al., Microfluidic device for rapid (<15 min) automated microarray hybridization. *Clin Chem*, 2005. 51(10): p. 1836-44.
25. SantaLucia, J., Jr., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(4): p. 1460-5.
26. Preparata, F.P. and J.S. Oliver, DNA sequencing by hybridization using semi-degenerate bases. *J Comput Biol*, 2004. 11(4): p. 753-65.
27. Hooyberghs, J., P. Van Hummelen, and E. Carlon, The effects of mismatches on hybridization in DNA microarrays: determination of nearest neighbor parameters. *Nucleic Acids Res*, 2009. 37(7): p. e53.

28. Brinker, A., et al., Lambda exonuclease pre-treatment for improved DNA-chip performance depends on the relative probe-target position. *Biosens Bioelectron*, 2010. 26(2): p. 898-902.
29. Zhang, L., T. Hurek, and B. Reinhold-Hurek, Position of the fluorescent label is a crucial factor determining signal intensity in microarray hybridizations. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(19): p. e166.
30. Lukacs, G.L., et al., Size-dependent DNA Mobility in Cytoplasm and Nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(3): p. 1625-1629.

## 4.10 Tables

**Chapitre 4 - Table 1. Capture probes**

Capture probes	Sequence	$\Delta G$ Preparata <sup>a</sup>	$\Delta G$ Nearest neighbor <sup>b</sup>
cfbSagH142	CAGCAAATGGCTCAAAA	-12.96	-18.77
cfbSagH142b	CAGCAAATAGCTCAAAA	-11.24	-15.46
cfbSagH142c	CAGCAAATTGCTCAAAA	-10.95	-14.90
cfbSagH142e	CAGCAAATCGCTCAAAA	-10.89	-15.24

<sup>a</sup>:  $\Delta G$  calculated using the Preparata *et al.* formula and data, expressed in kcal/mol

<sup>b</sup>:  $\Delta G$  calculated using the nearest neighbor model from SantaLucia Jr *et al.* at 40°C, 0.9 M Na<sup>+</sup>, 0 mM Mg<sup>++</sup>, 2x10<sup>5</sup> pM oligonucleotides.

**Chapitre 4 - Table 2. Primer pairings for amplicon production and resulting dangling end lengths**

Forward primers	Reverse primers		
	cfbSag190	cfbSag234	cfbSag400
cfbSag-341	554-bp (54-nt)	NT	NT
cfbSag59	154-bp (54-nt)	198-bp (98-nt)	364-bp (264-nt)

NT: not tested

**Chapitre 4 - Table 3. Fluorescence endpoints and slopes of target hybridization to all permutations of central nucleotide capture probes**

Method	Capture probe (mean fluorescence* [standard deviation])			
	Perfect match	Mismatch "A"	Mismatch "T"	Mismatch "C"
Passive microarray	100 [15.15]	0.33 [0.082]	0.34 [0.24]	0.29 [0.04]
Microfluidic microarray	100 [6.78]	0.71 [0.64]	0.46 [0.31]	0.47 [0.43]
Bead-bed hybridization (endpoint)	100 [0.81]	4.09 [4.57]	0.96 [4.07]	3.22 [2.02]
Bead-bed hybridization(real-time**)	100 [27.53]	0.95 [2.33]	2.30 [1.8]	-1.01 [1.54]

\*: Fluorescence is expressed as percentage of the mean signal of perfect match capture probe

\*\* : Real-time hybridization analyses are expressed as percentage of the slopes (variation of arbitrary fluorescence units/s) with respect to the perfect match capture probe.

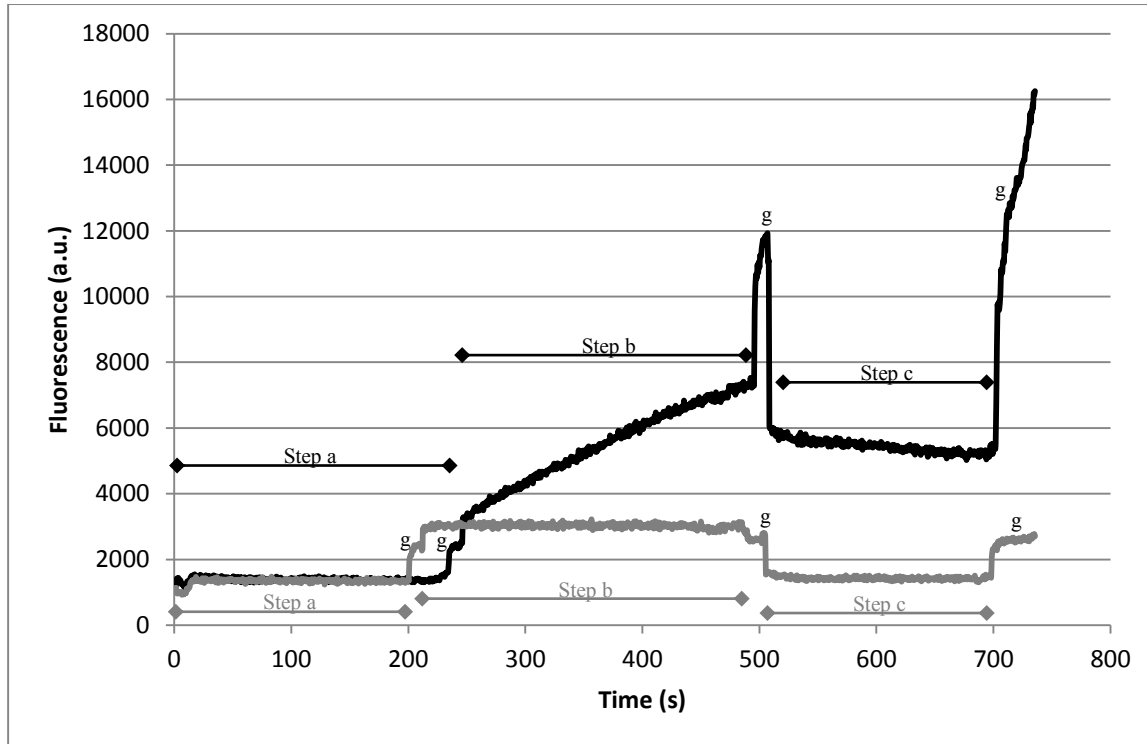
**Chapitre 4 - Table 4. Fluorescence endpoints and slopes of clinical samples hybridized to bead-based capture probes**

Clinical sample type	Slope	Endpoint
Negative sample 1	0.02	14.21
	0.04	1.11
	0.15	44.83
Negative sample 2	-0.07	-46.35
	0.37	59.39
	-0.08	37.85
Weak load sample 3	0.70	283.07
	0.46	446.99
	1.50	405.32
Weak load sample 4	1.9	1288.70
	1.25	750.49
	1.94	1159.68
High load sample 5	4.4	3580.92
	4.37	1717.94
	3.78	2723.46
High load sample 6	12.17	7454.59
	20.32	13785.04
	13.78	7896.91

**Chapitre 4 - Table 5. Hybridization rate of amplicons varying in overall and dangling end lengths**

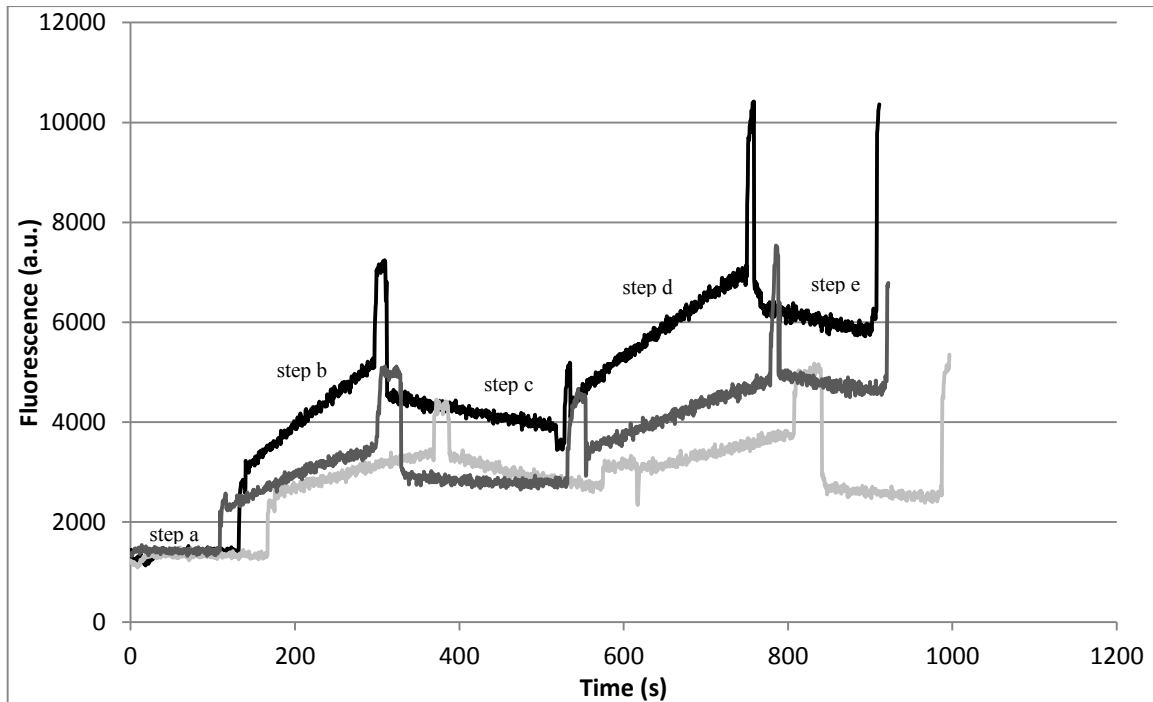
Amplicon lengths (dangling end lengths)	Slope of step b	Slope of step c	Ratio step c/step b (%)	Slope of step d
Short (short)	13.3	-3.0	22.7	12.1
Long (long)	4.3	-3.3	77.1	3.9
Long (short)	6.5	-0.7	10.5	6.4

## 4.11 Figures



**Chapitre 4 - Figure 1. Plot of recorded fluorescence intensity as a function of assay time for DNA hybridization performed on a monolayer bead bed.**

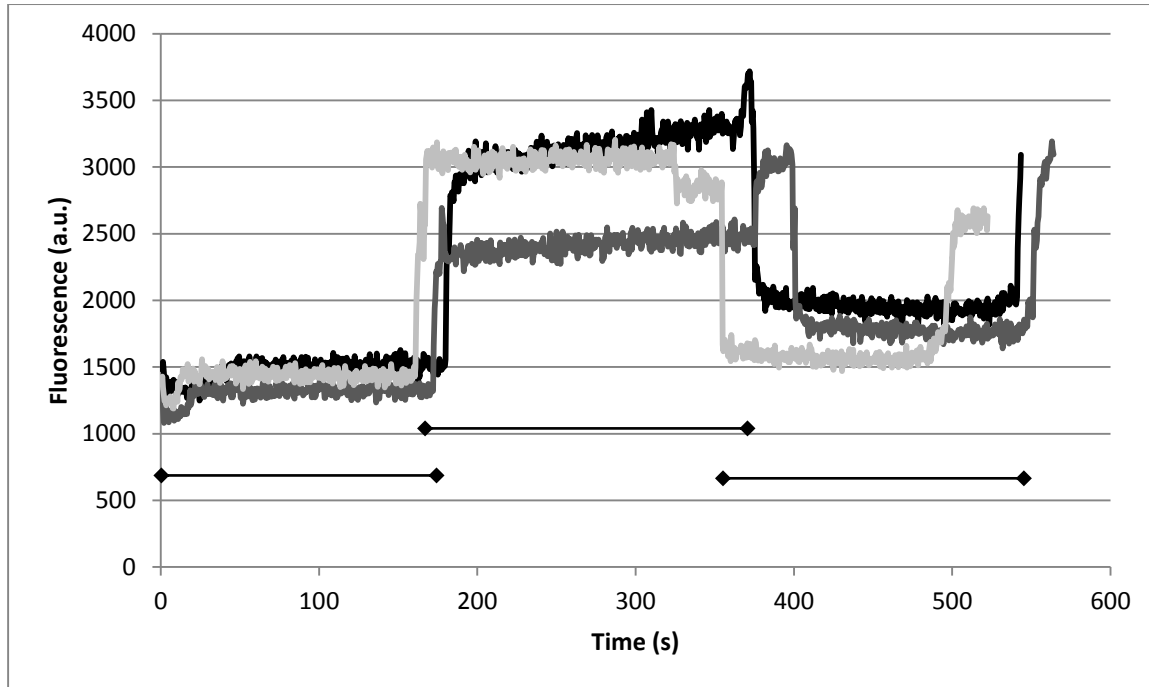
Step a: Formation of the bead-bed. Step b: Flow-through of nucleic acid target. Step c: Wash. Endpoint fluorescence was measured at the end of step c. Spikes between steps (identified as “g” on the figure) are caused by passage of air across the bead bed and mark the end of each step. The black trace represents hybridization between complementary strands using beads that were modified with probe cfbSagH142. A constant increase in fluorescence signal recorded during flow-through of the target (step b) indicates hybridization of amplicons to the capture probe. The gray trace reveals hybridization behaviour when beads are modified with probe cfbSagH142e, containing one mismatch (C instead of a G) in the middle position of the strand (Table 1).



**Chapitre 4 - Figure 1. Evolution of recorded fluorescence signal for multi-step hybridization involving single-stranded amplicons of variable overall and dangling end length.**

Step a: Formation of the bead-bed. Step b: Flow-through of target strand. Step c: Flow-through of complementary strand. Step d: Second flow-through of target strand. Step e: Wash. Spikes between steps are caused by passage of air across the bead bed. Black trace: Short amplicon (154-bp) and short dangling end (54-nt). Light gray trace: Long amplicon (364-nt) and long dangling end (264-nt). Medium gray trace: Long amplicon (554-bp) and short dangling end (264-nt).

## 4.12 Supplemental data



**Chapitre 4 – Supplemental Figure 1. Evolution of recorded fluorescence signal for multi-step hybridization involving double-stranded amplicons of variable overall and dangling end length.**

Step a: Formation of the bead-bed. Step b: Flow-through of heat-denatured double-stranded target. Step c: Wash. Spikes between steps are caused by passage of air across the bead bed. Black trace: Short amplicon (154-bp) and short dangling end (54-nt). Light gray trace: Long amplicon (364-nt) and long dangling end (264-nt). Medium gray trace: Long amplicon (554-bp) and short dangling end (264-nt).



**Chapitre 5**  
**Oligonucléotide synthétique structuré permettant la**  
**combinaison de la PCR et de l'hybridation sur biopuce**  
**dans un seul contenant et un seul tampon.**



## **Avant propos**

### **Structured oligonucleotide for one-step single vessel liquid amplification and surface-bound microarray hybridization**

Auteurs:

Karel Boissinot<sup>1,2,‡</sup>, Laurie Girard<sup>1,2,‡</sup>, Régis Peytavi<sup>1,2</sup>, Maurice Boissinot<sup>1,2</sup>, Michel G. Bergeron<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Centre de recherche en infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec (Pavillon CHUL), Québec, Québec, Canada;

<sup>2</sup> Département de Microbiologie-infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada;

<sup>‡</sup> These authors have contributed equally to this manuscript

\* address correspondence to this author at: Centre de Recherche en Infectiologie de l'Université Laval, Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, 2705 Laurier Blvd., Quebec City, Québec, G1V 4G2 Canada; fax 418-654-2715, e-mail Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca

### **Rôle de l'étudiant**

J'ai collaboré à l'élaboration du projet de recherche et des concepts à démontrer et à valider. J'ai réalisé une partie des expériences et j'ai participé à l'analyse des données expérimentales. J'ai co-rédigé la première version du manuscrit et intégré les commentaires des co-auteurs.

### **Rôle des co-auteurs**

Laurie Girard a participé à la conception du projet de recherche, à la réalisation des expériences et à l'analyse des résultats. Michel G. Bergeron, Régis Peytavi et Maurice Boissinot ont participé à l'élaboration et à la supervision du projet de recherche, ont effectué un suivi fréquent de l'avancée des travaux et ont contribué à l'analyse globale des résultats.

Tous les co-auteurs ont participé à la révision et ont commenté le manuscrit avant la soumission et ont participé à la révision.

### **Statut de l'article**

Une version révisée de l'article : «Structured oligonucleotide for one-step single vessel liquid amplification and surface-bound microarray hybridization» a été accepté dans Analyst, 2014, DOI : 10.1039/c4an01352b.

### **Commentaires sur l'article inséré dans cette thèse**

Cet article a aussi fait l'objet d'une demande de brevet, déposé au bureau des brevets en 2013.

## 5.1 Résumé

Les tests d'amplification d'acides nucléiques nécessitent de plus en plus un niveau de multiplexage élevé pour la détection et l'identification d'ADN cibles indisponible par des techniques de rtPCR traditionnelles. Plus récemment, certains tests d'amplification d'acides nucléiques ont pu surmonter les limitations de multiplexage, souvent en combinant en série différentes stratégies moléculaires nécessitant plusieurs tampons, des réactifs et des chambres de réaction qui résultent cependant en des dispositifs complexes et coûteux. Nous avons mis au point un oligonucléotide structuré (OS) capable de combiner l'amplification d'acide nucléique et l'hybridation sur biopuces à ADN dans un site unique en utilisant seulement le tampon de PCR. L'OS sert de sonde d'amplification et sera modifié de façon irréversible en présence de la cible, libérant un «tag» pour l'hybridation sur biopuce à microdamier. Chaque balise est composée d'un segment de 3 nucléotides appartenant à la cible et d'un segment unique de 14 nucléotides, indépendant de la séquence cible, permettant une hybridation optimale avec hybridation croisée minimale. Tout d'abord, nous avons validé 5 tampons PCR comme milieu d'hybridation sur biopuce en le comparant à un tampon d'hybridation contrôle. Enfin, comme preuve de concept, nous avons développé un test multiplexé pour l'amplification, la détection et l'identification de 3 cibles d'ADN. Cette nouvelle technologie facilitera la conception d'appareils microfluidiques de type laboratoire-sur-puce, tout en réduisant les coûts des consommables. À terme, cette invention permettra l'automatisation rentable de tests hautement multiplexés pour la détection et l'identification de cibles génétiques.

## 5.2 Abstract

The combination of molecular diagnostic technologies is increasingly used to overcome limitations on sensitivity, specificity or multiplexing capabilities, and provide efficient lab-on-chip devices. Two such techniques, PCR amplification and microarray hybridization are used serially to take advantage of the high sensitivity and specificity of the former combined with high multiplexing capacities of the latter. These methods are usually performed in different buffers and reaction chambers. However, these elaborate methods have a high complexity cost related to reagent requirements, liquid storage and the number of reaction chambers to integrate into automated devices. Furthermore, microarray hybridizations have a sequence dependent efficiency not always predictable. In this work, we have developed the concept of a structured oligonucleotide (SO) capable of indexing the target sequence to a tag sequence. The SO also allows the combination of nucleic acid amplification and microarray hybridization in a single vessel in presence of the PCR buffer only. The SO serves as an amplification probe that is irreversibly modified in presence of the target, releasing a single-stranded DNA tag for microarray hybridization. Each tag is composed of a 3-nucleotide sequence-dependent segment and a unique "target sequence-independent" 14-nucleotide segment allowing for optimal hybridization with minimal cross-hybridization. We evaluated the performance of five (5) PCR buffers to support microarray hybridization, compared to a conventional hybridization buffer. Finally, as a proof of concept, we developed a multiplexed assay for the amplification, detection, and identification of three (3) DNA targets. This new technology will facilitate the design of lab-on-chip microfluidic devices, while also reducing consumable costs. At term, it will allow the cost-effective automation of highly multiplexed assays for detection and identification of genetic targets.

## 5.3 Introduction

Since the invention of PCR, research in the field of nucleic acid detection technologies has progressed tremendously, allowing for rapid and precise identification of genetic targets. These technologies have resulted in significant advances in infectious disease diagnostics, epidemiology, food safety, and bio-threats detection [1, 2]. The use of molecular biology methods in biomedical applications has led to improvements in both the management of patients and their health outcome. Nucleic acid detection methods, mainly in human genetics and for infectious diseases, accelerate the detection and/or identification of genetic biomarkers or targets and improve the chances of patient survival [3, 4].

Nucleic acids amplification tests are important tools enabling sensitive, specific, and rapid detection of genetic targets [5]. Of these techniques, real-time polymerase chain reaction (rtPCR) is the basis for a majority of molecular assays [6]. However, the usefulness of rtPCR can be limited by the specificity of primers and probes, and also by the genetic variability and number of targets that can be simultaneously detected and identified in a single reaction (typically no more than six) due to overlap of fluorescence spectra [3-5, 7].

The number of targets detected and identified can be increased by hybridizing amplicons generated by multiplex PCR on an array of capture probes [6, 8]. Microarrays have become a preferred multiparametric method for the detection of multiple targets and these tools are expected to become a significant part of clinical diagnostic testing in the future along with next generation nucleotide sequencing methods [9, 10]. A major limitation to the implementation of microarrays in a clinical setup derives from its workflow, requiring numerous steps to process a sample until clear results are available [5, 11]. Furthermore, PCR produces double-stranded DNA targets requiring denaturation or preferably digestion of the complementary strand prior to hybridization onto capture probes immobilized on a solid support [12, 13]. The nucleotide length of microarray targets is directly correlated to the time to reach hybridization equilibrium. If equilibrium is not reached, the microarray hybridization results in a stochastic distribution of targets on capture probes leading to variability and reproducibility issues [14]. Thus, for rapid and reproducible hybridizations, short targets are desirable. Furthermore, microarray probe design is dependent of the target

DNA sequence which can result in cross-hybridization with closely related microorganisms [15, 16], not predictable by existing models [17, 18].

The integration of PCR and microarray technologies onto a microfluidic device is desirable to take advantage of each technique while enabling the automation of these complex processes [19]. However, these technologies generally require separate steps due to specific reagents and conditions [5, 11]. This requires separate liquid handling and reaction chambers resulting in complex design and manufacturing of the device, thereby complicating low-cost integration.

Real-time PCR has become a standard method in the field of molecular diagnostics. However, it is not always suitable for some applications where detection of more than 5-6 targets is necessary. Real-time PCR has traditionally been limited to 5-6 targets because of optical physics limitation in relation to fluorophore specters and filters [20] whereas technically microarray based detection are limited by the size of the feature and the overall size of the microarray surface itself. New PCR-based technologies have been recently introduced on the market to overcome those limits. One such technology, the FilmArray of BioFire Diagnostics (Salt Lake City, UT) first performs a PCR with the complete sample, then automatically dilutes and splits the resulting mixture into up to 102 wells where a real-time nested PCR reaction can identify the target(s) present in the sample [21]. Partly because there are many reagents and reaction chambers to manage, the cost per reagent/test is relatively high at 129\$ [22] which could be a limiting factor to its adoption and implementation in clinical setups [23]. Others have developed oligonucleotide based strategies to increase multiplexing capabilities or to have target sequence independent detection strategies allowing use of universal components. Seegene [24] has designed a serial, two amplifications method where a fragment of a nucleic acid probe then serves as a primer for a second amplification with a single-stranded DNA template. Detection and identification is performed by high resolution melting of the second amplicon, which can be custom-made to allow for optimal discrimination of melting curves. However, the reaction mixture contains a significantly higher quantity of DNA sequences than other detection methods which can limit the multiplexing capabilities by creating nonspecific amplification. Faltin et al. [25] have developed a system using a universal reporter comprised of an



amplification probe containing a target independent sequence and a separate hairpin oligonucleotide labeled with fluorophore and quencher moieties. The sequence independent segment of the amplification probe serves as a primer for the hairpin structure. Elongation of this secondary primer causes opening of the hairpin resulting in the physical separation of the quencher and fluorophore moieties and emission of fluorescence. However, multiplexing capabilities are not superior to real-time PCR.

In this work, we report a new approach to perform PCR amplification and microarray hybridization in the same reaction chamber and with a single buffer. To achieve this, we have designed labeled structured oligonucleotides (SOs) which adopt a particular secondary structure comprising a first moiety that recognizes a specific target sequence and a second moiety that enables the specific efficient hybridization on a surface-immobilized capture probe (Fig. 1). These SOs are used as specific probes during PCR amplification which, upon recognition of their specific complementary sequence, trigger their irreversible structural modification. Modified SOs hybridize to microarray capture probes exposed to the reaction medium. Multiplex detection is possible through the use of multiple SOs and spatial localization of different capture probes on the microarray.

A test capable of identifying multiple targets is an important prerequisite for pathogen detection in clinical situations where different organisms can produce serious and similar symptoms such as low respiratory tract infection [3, 26]. We present a proof-of-concept multiplex amplification and hybridization assay with SO technology for the detection of three important human respiratory viruses: influenza A (FluA) virus, influenza B (FluB) virus, and respiratory syncytial virus (RSV).

## 5.4 Materials and methods

### 5.4.1 Function of structured oligonucleotide

A SO is composed of three (3) main segments forming a hairpin structure (Fig. 1). One segment, complementary (C) to the target strand, constitutes one half of the stem, while the second segment is also complementary to the target strand but forms the main loop (L) of the SO. The third segment serves two functions: 1° it completes the stem part with the first segment, and 2° it contains a tag (T) sequence complementary to the microarray capture probe. The tag and capture probe possess a different sequence than the target recognized by the SO. Microarray hybridization is thus independent from target sequences since the SO serves as an indexing probe between aqueous phase targets and solid-support capture probes. A fluorophore and a quencher moieties are present on the SO and are within FRET distance in the sequence and secondary structure [27, 28]. This proximity ensures sufficient quenching in all conformations. Finally, a phosphate moiety is added at the 3'-end of T1.2 to prevent elongation [29, 30].

Figure 2 illustrates the concept of the indexing probe, as well as the use of the secondary structure when the probe is subjected to PCR reaction either containing a target (Fig. 2A) or not (Fig. 2B). When a target is present, segments C and L are digested, separating the quencher from the fluorophore, and concomitantly releasing an indexed tag for microarray hybridization. When no target is present, the SO is not digested and the quencher remains in close proximity to the fluorophore. Furthermore, in microarray hybridization conditions, the probe is designed to preferentially adopt a hairpin conformation over hybridization of T2 and the first three nucleotides 5' of T1.2 to the capture probe. This limits the number of undigested SOs hybridized on capture probes and keeps Q in close proximity to F1 for optimal quenching.

## 5.4.2 Design of SO

The C+L segments sequences are designed using conserved regions found on the genetic target. It should be approximately 27 to 31 nucleotides long. Its  $T_m$  should be of approximately 70°C, i.e. at least 10°C above the annealing temperature of the primers. The C segment was fixed at the minimal length to form a hairpin structure in the presence of T1.1+T1.2 from the same oligonucleotide while limiting intermolecular interactions with T1.1+T1.2 from another identical SO. The optimal length for C was set at 16 to 18 nucleotides. The T1.1 and T1.2 segments are complementary to the full length of the C segment. They are separated by the T2 segment in roughly equal lengths. The T2 segment bears an artificial sequence carefully selected for having minimal interactions with other sequences on the microarray. It consists of 14 nucleotides with a G+C content of 35-40%. These sequences were inserted between the T1.1 and T1.2 segments. All SOs are described in Table 1.

## 5.4.3 Modeling the theoretical hybridization behavior of SOs

The resulting assemblies and the PCR primers were loaded in Plexiglad, a homemade software designed to calculate intermolecular interactions based on the model of Preparata and Oliver [31]. This was done to select the best T2 sequence showing minimal SO-SO interactions ( $\Delta G > -8$  kcal/mol,  $\Delta G > -6$  kcal/mol for 3' interactions) and minimal primer-SO interactions ( $\Delta G > -5$  kcal/mol). The best T2 sequence could be modified manually to limit undesirable interactions. The chosen T2 sequence was submitted to BLAST to ensure that it is not significantly complementary to a sequence present in the genome of the target organism. Afterwards, the chosen SO sequence was tested using Mfold [32] to confirm the folding pattern and calculate  $T_m$  and  $\Delta G$  of putative secondary structures. The hairpin structure must have a  $T_m$  5 to 8°C below that of C+L  $T_m$  and  $\Delta G < -2$  kcal/mol. Parameters used for Mfold were: 50 mM Na<sup>+</sup>, 2.5 mM Mg<sup>2+</sup> and folding temperature of 57°C. The position of T2 between T1.1 and T1.2 could be adjusted to ensure proper folding by moving 1 or 2 nucleotides from one segment to another. In some cases, a GG stretch was added at the 5'-end of the C segment, while a CC stretch was added to the 3'-end of T1.2 for SOs that did not properly fold on the extremities. Capture probes were designed to have a lower  $T_m$

than that at which the SO structure opens. They are complementary to T2 plus the first 3 nucleotides at the 5' end of T1.2.

#### **5.4.4 Model targets**

Approximately 200 viruses are known to cause respiratory symptoms nearly indistinguishable by clinical diagnosis [8, 33]. Clearly, rapid multiparametric diagnostics is essential to precisely identify the pathogen(s) associated with a respiratory tract infection, for adequate and timely treatment selection and epidemiological purposes. As a proof of concept of our technology, we have developed an assay targeting respiratory viruses FluA, FluB, and RSV. FluA and FluB are the most prevalent viruses in adults [34] while RSV is the most prevalent virus in children [35].

#### **5.4.5 PCR**

PCR mixtures were made with 5 different commercially-available buffers to validate their compatibility with microarray hybridization. The buffers used were those provided with the GoTaq (Promega, Madison, WI), HotGoldStar (Eurogentec, Liège, Belgium), KlenTaq (PC2 buffer, DNA Polymerase Technology, St-Louis, MO), AptaTaq (Roche Applied Sciences, Laval, QC), and One-step RT-PCR (Life Technologies, Burlington, ON) enzymes or reagent kits (Table 4). All other amplifications were performed with the GoTaq buffer and enzyme. A master mix for the multiplex assay targeting FluA FluB and RSV was prepared with the three specific SOs at 0.1  $\mu\text{M}$ /reaction and with three specific primer pairs (Table 2) at 0.4  $\mu\text{M}$ /reaction. DNA plasmids containing either the cloned matrix gene of human FluA, human FluB, or the nucleocapsid gene of RSV were used at 104 copies/reaction. Concentrated plasmids at 1010 copies/ $\mu\text{l}$  were serially diluted to a final concentration of 104 copies/ $\mu\text{l}$  in TE 1X, then 1  $\mu\text{l}$  of that mixture was added to PCR reactions for a final volume of 25  $\mu\text{l}$ . A reaction mix containing SOs and probes without target DNA was used as a negative control. Amplifications were carried in Rotor-Gene 6000 thermal cycler (Corbett Research, Mortlake, Australia) under the following conditions: a denaturation step of 3 min at 94°C followed by 40 cycles of 5 sec at 95°C, 20 sec at 57°C, and 20 sec at 72°C.

### **5.4.6 Microarray fabrication**

Capture probes (Table 3) were spotted at 30  $\mu\text{M}$  in Arrayit printing buffer (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA) onto Aldehyde Plus array slides (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) or custom-made Zeonor® 1060R using an Omnigridd microarray spotter (Digilab, Marlborough, MA) and SMP2 Pins (Arrayit Corporation, Sunnyvale, CA). Zeonor® microarrays were cut into subarrays small enough (approximately 2 x 5 mm) to fit into 0.2-mL microcentrifuge tubes. Labeled probes were printed on the microarray at a specific concentration of 7.5  $\mu\text{M}$  to control printing and to compare microarrays fluorescence on the optical set-up.

### **5.4.7 Hybridization**

To evaluate the efficiency of amplification buffers to enable DNA hybridization, Aldehyde Plus array glass slides (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) were used. The five PCR buffers listed previously were used as hybridization buffers. Hybridizations were performed at 40°C to compensate for the absence of formamide. We compared the results to a hybridization buffer (Hyb buffer) with a final concentration of 6X saline-solution-phosphate-EDTA (SSPE), 30% formamide, 0.03% polyvinyl-pyrrolidone previously used in other experiments [12, 36]. A synthetic oligonucleotide (F1-T.1-T2-T1.2) representing the digested form of the FluB SO was used at a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$ /reaction for each tested buffer, which was also the concentration used for undigested SOs in multiplex assays. This concentration was selected after optimization and is comparable to concentrations of Taqmans or molecular beacons in rt-PCR assays. HybriWell hybridization chambers (Grace Bio-Lab, Bend, OR) were used to perform hybridization on Aldehyde Plus array glass slides. For each buffer mix, we loaded 20  $\mu\text{L}$  of their respective master mix in a hybridization chamber in triplicate. Non-specific capture probes were printed on the microarray to validate the specificity of amplification buffers. Amplification buffer hybridizations were carried in a MJ Research PTC 200 thermal cycler (GMI Inc, Ramsey, MN) using a slide hybridization module under the following conditions: 72°C during 3 min and finally 40°C during 10 min. PCR hybridization buffers were used at 40°C while Hyb buffer was used at 23°C. After hybridization, the reaction mixture was removed followed by the disposable chamber, before

the microarray slides were spun to dry in a centrifuge. No washing was performed. For SO digestion and hybridization experiments, Zeonor® 1060R subarrays were deposited inside the 0.2 mL amplification tubes after PCR. Hybridization was performed for 10 min at 40°C. The subarrays were spun dried before fluorescence acquisition. A schematic of the experimental design is shown on Fig.3.

### 5.4.8 Fluorescence acquisition and analysis

Glass slide microarrays were scanned with an Agilent GB2565BA Microarray Scanner System (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA). Plastic microarrays were scanned using a custom setup. The excitation source consists of a 627 nm LED (Luxeon Star Red, Quadica Developments, Brantford, ON) with a 615-635 nm bandpass interference filter (Semrock, Rochester, NY). The detector consists of an Apogee Alta U32 camera (Apogee Imaging System, Roseville, CA) with a 696-736 nm bandpass interference filter (also from Semrock). The excitation source and the detector are placed on opposite sides of the plastic microarray. Data acquisition is performed using  $\mu$ Manager which runs as a plugin of ImageJ, an open-source image processing and analysis software [37]. Microarray images were analysed using GenePix Pro software (version 6.1.0.4; MDS Analytical Technologies, Downingtown, PA). From GenePix Pro 6.0 analyses, the foreground raw median signal ( $F_{med}$ ) of the spot and the background raw median signal ( $B_{med}$ ) around the spot are obtained. The rest of the analyses are performed with homemade software called MINABLE (data mining and analysis, version 6.0/3744). The raw median fluorescence signal ( $F_{med} - B_{med}$ ) is calculated for each spot and the interquartile range (IQR) are used to filter data. The outliers (outside of  $Q2 \pm 1.5 \times IQR$ ) were eliminated.

For a given assay, printing control spots of negative controls are filtered using IQR. Negative controls having a mean fluorescence from printing control spots outside of  $Q2 \pm 1.5 \times IQR$  were eliminated from further analyses. The fluorescence of the mean printing control spots from positive assays are compared to IQR calculated for the negative control. The mean printing control spots from positive assays outside of the negative  $Q2 \pm 1.5 \times IQR$  are eliminated from analyses. Printing controls from different slides should theoretically produce the same mean fluorescence. Differences between fluorescence intensity from these printing

control spots can be attributable to variability in excitation conditions of the optical set-up. Extreme results presenting a mean fluorescence of printing control spots outside of  $Q2 \pm 1.5 \times IQR$  are eliminated from microarray analysis. For each capture probe, the mean fluorescence of a positive assay is compared to that of the negative control, and a Student's *t*-test is performed to establish if a significant difference is observed between a positive assay and a negative control. A ratio (mean fluorescence from positive assay capture probes divided by the mean fluorescence from negative control capture probes) is calculated for each capture probe. Finally, a threshold ratio was calculated using the mean ratio of capture probes recognizing viruses absent from the reaction (example: FluB and RSV capture probes in the FluA assay) and adding 2 standard deviations to establish the analytical limit of detection at 95% confidence.

## 5.5 Results and discussion

To demonstrate the potential of this new technology, we first describe how the design enables the SO to adopt a hairpin-like structure through specific recognition of the T1.1 and T1.2 segments to the C segment (fig. 1). In this conformation, the T2 segment is unavailable for microarray hybridization. This secondary structure must be adopted for temperatures of at least up to 60°C so it only ever opens during thermal cycling of PCR amplifications. During elongation, the SO opens and C+L segments are available for hybridization to the target DNA. It is only through specific recognition of the target DNA that the opened SO will be digested, irreversibly changing its conformation so the T2 segment is freely available for hybridization onto the microarray surface at temperatures lower than 60°C (fig. 2). This enables coupling of specific PCR amplification with Cartesian coordinates based multiplexed microarray detection. Furthermore, because the tag segment T2 is an artificially chosen sequence, independent of target DNA, microarray hybridization is never dependent on discrimination of closely related sequences. To confirm the SO technology functions as intended through design, we validated microarray hybridization of the Tag segment in PCR buffers, which are magnesium ions based instead of sodium ions based in traditional hybridization buffers. Finally, as a proof of concept, we demonstrated the SO could be used to identify one of three respiratory viruses in a multiplexed assay. This new technology combines PCR amplification and microarray hybridization into a single reaction chamber, that reduces the risk for cross hybridization on immobilized capture probes by using single-stranded indexed tags and that is amenable to a single-step procedure.

### 5.5.1 Design of structured oligonucleotides

SOs are complex biodetection macromolecules which must be designed to accommodate different considerations such as synthesis, chemical bonding with other SOs, and biomolecular interactions with PCR primers and target genomic DNA. Target sequences must also be considered to obtain C+L segments with sufficiently high melting temperature while being relatively short (maximum length of approximately 30 nucleotides; see Fig. 1). Melting temperature for the double loop hairpin must also be sufficiently high, while the Gibbs free energy must be sufficiently low to favor the closed conformation in absence of



target and minimize the background noise caused by hybridization of the T2 segment from an undigested SO. To allow more flexibility in the design, the introduction of locked nucleic acids (LNA) in the sequence should be investigated since these nucleotide analogs induce a higher  $T_m$  than the standard bases [38]. A computer program is also under construction to automate the design of SOs while taking into account sequence alignments to obtain desired specificity and ubiquity. The protocol for the design of SOs was applied to respiratory viruses as a proof of concept, but it can be easily and quickly adapted for the detection of other microbial targets.

### **5.5.2 Hybridization in amplification buffers**

Five different amplification buffers were used to determine if they can also provide ionic conditions supporting molecular hybridization of amplification products to immobilized oligodeoxyribonucleotide capture probes. Amplification buffers generally contain monovalent and divalent cations in the low millimolar range (Table 4) while hybridization buffers contain monovalent cations in the low molar range (previously described in Materials and methods). Hybridization signals obtained for each amplification buffer were compared to the hybridization signal obtained with the Hyb buffer (Fig. 4) using the synthetic tag segment of FluB. While the RT-Invitrogen buffer yields a hybridization signal (~3500 arbitrary fluorescence units [a.u.]) comparable to that of the Hyb buffer (~2500 a.u.), the AptaTaq (~20000 a.u.), HGS (~20000 a.u.), Promega (~20000 a.u.) and PC2 (~40000 a.u.) buffers yielded much stronger hybridization signals. Non-specific capture-probes did not yield any signal distinguishable from background noise of the microarray.

Hybridization seems influenced by the concentration of  $MgCl_2$ ; indeed, AptaTaq, GoTaq, and HGS buffers have similar concentrations of  $MgCl_2$  and the fluorescence signals observed after hybridization in their presence is also similar (~20000 a.u.). PC2 buffer has roughly twice the concentration of  $MgCl_2$  of AptaTaq, HGS, and GoTaq buffers, and which results in a ~2-fold increase in hybridization signal (~40000 a.u.). The RT-Invitrogen buffer has approximately half the concentration of  $MgCl_2$  of the AptaTaq, HGS, and GoTaq buffers, thereby negatively affecting hybridization signal which are five times lower (~3500 a.u.) than

those observed after molecular hybridization in AptaTaq, HGS, and GoTaq buffers. The capture probes specific to the other two SO tags as well as negative control capture probes did not yield fluorescence signals above the background and could not be detected by the GenePix software.

Experiments performed with short oligonucleotides hybridizing to a glass slide microarray suggest that PCR buffers are compatible with the molecular hybridization process. However, the concentration of Mg<sup>2+</sup> ions is critical to yield an optimal hybridization signal and a careful adjustment of magnesium concentration should be done to provide the best amplification and hybridization conditions of each assay. Furthermore, other researchers [39, 40] suggest that magnesium ions in the low millimolar range (1.5-15 mM) and the absence or presence of sodium ions in low concentration (0-50 mM) are optimal for mismatch discrimination. This suggests that traditional hybridization solutions and washing buffers devoid of magnesium are not as efficient for hybridization specificity. However, PCR amplification is not compatible with the presence of 30% formamide (used for room temperature hybridization), thereby introducing the requirement of a heat source to perform hybridization. In our system, this limitation is inconsequential since our SO-based hybridization procedure can be performed within the operational confines of the PCR thermal cycler instrument immediately at the end of the amplification.

### **5.5.3 Single-vessel multiplexed amplification and hybridization**

SOs targeting respectively one of three different respiratory viruses (FluA, FluB, and RSV) were added to a PCR reaction containing primers capable of producing amplicons specific to each virus. Amplification in the presence of one viral target gene was performed prior to the addition of a Zeonor® subarray to prevent the temperature-induced warping of the plastic substrate. Hybridization occurred within the same reaction vessel using the amplification buffer. The amplification of targets resulted in the irreversible modification of SOs which can be observed by a significant fluorescence increase when the specific target is present while no significant increase can be observed in absence of SO targets. For target-specific capture probes, statistically significant differences in fluorescence and ratios of positive assays over negative control assays of 1.8, 2.5, and 2.1 were obtained respectively for FluA,

FluB, and RSV (Fig. 5). In contrast, SOs and capture probes recognizing targets absent from the reaction mixture were not significantly different between positive and negative assays, except for FluA capture probes in the RSV assay. However, the ratio for this capture probe was only 1.23, which is under the analytical limit of detection ratio of 1.31. These results also further confirmed that the GoTaq PCR buffer is compatible with microarray hybridization. Although further work should improve the fluorescence ratio of positive assays over negative control targets by offering a more robust optical detection platform and enabling temperature control of the microarray surface until fluorescence acquisition, it is worth comparing these ratios to traditionally accepted ratios to differentiate between overexpression and underexpression of genes for in expression analysis microarray. A ratio of 1.5 or more typically 2 is considered sufficient to differentiate with certainty the level of expression of a gene in a reliable fashion [41, 42]. Ratios currently observed with our structured oligonucleotide technique are within ranges of accepted microarray differentiation ratios.

Multiplexing capabilities have up to now been demonstrated with only 3 different targets, however, the size of the microarray could allow for over 100 features which can translate to 20-30 different targets with replicates. Considering our fluorescence ratios are comparable to ratios obtained with microarrays containing up to 106 features [43]. We are confident we will reach multiplexed levels of 20 to 30 targets. Limitations to the number of targets will not come from the microarray or the amplification techniques themselves, but from intermolecular interactions between the SOs and primers. Furthermore, since the C+L segments are relatively long (27-31-nt), it is unclear whether single nucleotide polymorphism detection will readily be achievable considering the design constraints of the SO. The detection of targets possessing signature genes that are sufficiently diverging from the other targets such as is the case for respiratory viruses does seem very promising however. The SO technique will also need to explore its capacity to detect coinfections of viruses which can happen in between 11 to 20% of the time. However, some studies have shown that most of these co-infections (over 75%) are caused by adenoviruses and picornaviruses. Codetection will be tested when these viruses will be added to the assay [44].

The sensitivity of the method remains to be tested and optimized since  $10^4$  copies of target DNA were used for nucleic acid amplification. Further optimization of reaction conditions is still required. However, a more robust detection system allowing for constant, reproducible, and stable immobilization of microarrays at a fixed distance from the source and the detector must be developed before optimization can advance. The SO amplification and hybridization procedure is presently performed in two steps since the shape of the Zeonor subarray is modified when immersed in a liquid solution at  $95^\circ\text{C}$ , thus it must be added only after thermal cycling is over. There are other technologies trying to integrate enzymatic amplification and microarray hybridization into single vessels such as Li *et al.* [9] and Alere Technologies GmbH. However, these approaches use amplification products and capture probe sequences are thus dependent from target sequences whereas our technology allows for most of the capture probes sequences to be independent from target sequences for optimal hybridization parameters. Furthermore, these existing technologies require costly molds for injection molding not commercially available or are not resistant to PCR temperature conditions. We are aware that further collaborations with thermoplastic scientists and molding investments are necessary to fully integrate amplification and hybridization as a single step reaction. With such a device, the entirety of the assay could be performed in closed tubes which reduce amplicon contamination risks.

## 5.7 Conclusion

We have modeled and designed a structured oligonucleotide that can be irreversibly modified by a thermostable DNA polymerase in presence of its specific target. This modification results in the indexing of targets into short oligonucleotides complementary to capture probes immobilized on a surface. Partial selection of capture probes independently from target sequences facilitates microarray designs. The main advantages of the SO technology in comparison to other existing multiplexed technologies are the following: specificity is derived from a triple recognition event during PCR amplification, microarray cross-hybridization can be minimized by selecting capture probe sequences independently from target sequences, microarray hybridization is performed between a single-stranded oligonucleotide target and a single-stranded capture probe, a single fluorophore is necessary for detection of multiplexed assays. And finally, combination of PCR amplification with microarray hybridization into a single reaction vessel with minimal reagent handling and storage requirements will simplify the design of an integrated diagnostic device and should drive down the cost of consumables. Furthermore, we have determined that several PCR buffers with magnesium concentrations ranging from 1.6 to 6 mM are compatible with microarray hybridization. Optimization, automation of SO design, and compatibility with RNA templates are ongoing.

## **5.8 Acknowledgements**

We thank Jean-Luc Simard and Dominique Boudreau for their help in designing oligodeoxyribonucleotides, and Luc Bissonnette for critical reading of the manuscript. We thank Professor Denis Boudreau, Hugo Lemieux and David Béliveau-Viel for their help and use of a custom optical setup to acquire microarray fluorescence. Finally, we thank Frédéric Raymond and Gale Stewart for their input in statistical analysis. This work was supported by Grant #5R01 AI089541-02 of the National Institutes of Health (NIH) and SOVAR, Inc.

Financial Disclosures: None declared

## 5.9 References

1. Q. Liu, Y. Bai, Q. Ge, S. Zhou, T. Wen and Z. Lu, *Clinical chemistry*, 2007, 53, 188-194.
2. Z. Zhao, G. A. Diaz-Quijada, R. Peytavi, É. LeBlanc, J. Frenette, G. Boivin, J. V. Zoval, M. Madou, M. M. Dumoulin, T. Veres and M. G. Bergeron, *MRS Online Proceedings Library*, 2006, 950, null-null.
3. L. Bissonnette and M. G. Bergeron, *Clinical Microbiology Newsletter*, 2012, 34, 159-168.
4. L. E. Lehmann, B. Herpichboehm, G. J. Kost, M. H. Kollef and F. Stuber, *Crit Care*, 2010, 14, R186.
5. T. Ullrich, E. Ermantraut, T. Schulz and K. Steinmetzer, *PloS one*, 2012, 7, e35438.
6. A. Endimiani, K. M. Hujer, A. M. Hujer, S. Kurz, M. R. Jacobs, D. S. Perlin and R. A. Bonomo, *Clin Infect Dis*, 2011, 52 Suppl 4, S373-383.
7. M. Avolio, P. Diamante, S. Zamparo, M. L. Modolo, S. Grosso, P. Zigante, N. Tosoni, R. De Rosa, P. Stano and A. Camporese, *Shock*, 2010, 34, 27-30.
8. M. B. Miller and Y. W. Tang, *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22, 611-633.
9. X. Li, R. J. Quigg, J. Zhou, W. Gu, P. Nagesh Rao and E. F. Reed, *Curr Genomics*, 2008, 9, 466-474.
10. C. D. Sibley, G. Peirano and D. L. Church, *Infect Genet Evol*, 2012, 12, 505-521.
11. C. Cooney, D. Sipes, N. Thakore, R. Holmberg and P. Belgrader, *Biomed Microdevices*, 2012, 14, 45-53.
12. K. Boissinot, A. Huletsky, R. Peytavi, S. Turcotte, V. Veillette, M. Boissinot, F. J. Picard, A. E. m and M. G. Bergeron, *Clinical chemistry*, 2007, 53, 2020-2023.
13. A. Brinker, H. Schulze, T. Bachmann and R. Moller, *Biosens Bioelectron*, 2010, 26, 898-902.

14. E. Carletti, E. Guerra and S. Alberti, *Trends Biotechnol*, 2006, 24, 443-448.
15. S. L. Carter, A. C. Eklund, B. H. Mecham, I. S. Kohane and Z. Szallasi, *BMC Bioinformatics*, 2005, 6, 107.
16. Z. Tezak, D. Ranamukhaarachchi, E. Russek-Cohen and S. I. Gutman, *Hum Genomics*, 2006, 2, 236-243.
17. L. S. Yilmaz, A. Loy, E. S. Wright, M. Wagner and D. R. Noguera, *PloS one*, 2012, 7, e43862.
18. A. Pozhitkov, P. A. Noble, T. Domazet-Loso, A. W. Nolte, R. Sonnenberg, P. Staehler, M. Beier and D. Tautz, *Nucleic Acids Res*, 2006, 34, e66.
19. B. R. Schudel, M. Tanyeri, A. Mukherjee, C. M. Schroeder and P. J. Kenis, *Lab Chip*, 2011, 11, 1916-1923.
20. G. Fu, A. Miles and L. Alphey, *PloS one*, 2012, 7, e30340.
21. M. A. Poritz, A. J. Blaschke, C. L. Byington, L. Meyers, K. Nilsson, D. E. Jones, S. A. Thatcher, T. Robbins, B. Lingenfelter, E. Amriott, A. Herbener, J. Daly, S. F. Dobrowolski, D. H. Teng and K. M. Ririe, *PloS one*, 2011, 6, e26047.
22. FilmArray, *The Evidence: Cost Analysis*, <http://www.filmarray.com/the-evidence/cost-analysis>, Accessed 2013-10-31, 2013.
23. P. Allibert, R. Peytavi and M. Boissinot, *MEMS' Trends*, 2013, January, 12-13.
24. E. Shin, H. Bae, W.-K. Song, S.-K. Jung and Y. S. Hwang, in *Lab Med Online*, Korea Med Synapse, Neodin Medical Institute, Seoul, Korea, Korean Association of Medical Journal edn., 2013, vol. 3, ch. October pp. 234-241.
25. B. Faltin, S. Wadle, G. Roth, R. Zengerle and F. von Stetten, *Clinical chemistry*, 2012, 58, 1546-1556.



26. A. M. Foudeh, T. Fatanat Didar, T. Veres and M. Tabrizian, *Lab Chip*, 2012, 12, 3249-3266.
27. K. Lymperopoulos, A. Kiel, A. Seefeld, K. Stohr and D. P. Herten, *Chemphyschem*, 2010, 11, 43-53.
28. S. Weiss, *Nat Struct Biol*, 2000, 7, 724-729.
29. D. Proudnikov, V. Yuferov, Y. Zhou, K. S. LaForge, A. Ho and M. J. Kreek, *J Neurosci Methods*, 2003, 123, 31-45.
30. N. von Ahsen, M. Oellerich, V. W. Armstrong and E. Schutz, *Clinical chemistry*, 1999, 45, 2094-2101.
31. F. P. Preparata and J. S. Oliver, *J Comput Biol*, 2004, 11, 753-765.
32. M. Zuker, *Nucleic Acids Res*, 2003, 31, 3406-3415.
33. Y. Abed and G. Boivin, *Antiviral Res*, 2006, 70, 1-16.
34. N. A. Molinari, I. R. Ortega-Sanchez, M. L. Messonnier, W. W. Thompson, P. M. Wortley, E. Weintraub and C. B. Bridges, *Vaccine*, 2007, 25, 5086-5096.
35. J. Papenburg and G. Boivin, *Rev Med Virol*, 2010, 20, 245-260.
36. R. Peytavi, T. Liu-Ying, F. R. Raymond, K. Boissinot, L. Bissonnette, M. Boissinot, F. J. Picard, A. Huletsky, M. Ouellette and M. G. Bergeron, *Biotechniques*, 2005, 39, 89-96.
37. A. Edelstein, N. Amodaj, K. Hoover, R. Vale and N. Stuurman, *Computer Control of Microscopes Using  $\mu$ Manager*, John Wiley & Sons, Inc., 2010.
38. A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen and J. Wengel, *Tetrahedron*, 1998, 54, 3607-3630.
39. R. Owczarzy, B. G. Moreira, Y. You, M. A. Behlke and J. A. Walder, *Biochemistry*, 2008, 47, 5336-5353.

40. T. Springer, H. Sipova, H. Vaisocherova, J. Stepanek and J. Homola, *Nucleic Acids Res*, 2010, 38, 7343-7351.
41. N. Sinha, S. Sharma, P. Tripathi, S. Negi, K. Tikoo, D. Kumar, K. Rao and S. Chatterjee, *BMC systems biology*, 2014, 8, 104.
42. H. L. Jia, C. H. He, Z. Y. Wang, Y. F. Xu, G. Q. Yin, L. J. Mao, C. W. Liu and L. Deng, *BMC infectious diseases*, 2014, 14, 506.
43. Agilent, Agilent Microarray Technology, <http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=2011>.
44. F. Raymond, J. Carbonneau, N. Boucher, L. Robitaille, S. Boisvert, W. K. Wu, G. De Serres, G. Boivin and J. Corbeil, *J Clin Microbiol*, 2009, 47, 743-750.

## 5.10 Tables

**Chapitre 5 - Table 1. Structural and thermodynamic properties of the structured oligonucleotides used for amplification and hybridization**

Virus	Genetic target	Nucleotide sequence <sup>a</sup>	Length (nt)	SOs		T <sub>m</sub> on target <sup>c</sup> (°C)
				T <sub>m</sub> <sup>b</sup> (°C)	ΔG (kCal/mol)	
FluA	Matrix	5'-GGAAAGAGGGCCTTCACGGAAGGAGTGAGAAGGATACAACATACTTCCCCTTTCC-3'	59	62.7	-2.21	69.2
FluB	Matrix	5'-GGTGTCTCATGGTCATGTACCTGAATCCTGGACATGACCAATTTCTCTTCGGGATGAGACACC-3'	63	64.0	-2.70	67.5
RSV	Nucleocapsid	5'-GTGGCTCCAGAAACAGGCATGACTCTCCTGTATTCTACTTTCCAAGAATGGGAGCCAC-3'	59	64.4	-2.29	70.3

<sup>a</sup> highlighted nucleotides represent labeled nucleotides (quencher and fluorophore)

<sup>b</sup> T<sub>m</sub>: melting temperature

<sup>c</sup> T<sub>m</sub> of the C and L part on the genetic target

**Chapitre 5 - Table 2. Primers used for PCR amplification**

Genetic target	Primer name	Nucleotide sequence <sup>a</sup>	Length (nt)	T <sub>m</sub> <sup>b</sup> (°C)
FluA matrix	mxHinfA796b	5'-GCACCTGATATTGTGGATTACTGAT-3'	25	61.0
	mxHinfA896i	5'-GATAYTCTTCCCTCATRGACTC-3'	22	58.9
FluB matrix	mxHinfB328	5'-CATGAAGCATTGATAGCAGA-3'	23	57.4
	mxHinfB457a	5'-CTGTGTGARTGTGATGCTTGTTT-3'	23	59.2
RSV nucleocapsid	nuHRSV399	5'-GAATCTAGAAARTCCTACAAAAAATGCT-3'	29	59.0
	nuHRSV510a	5'-CCTGCTGCTAATTTTRGTTATTAC-3'	23	57.4

<sup>a</sup> Y : C or T R : A or G

<sup>b</sup> T<sub>m</sub>: melting temperature

Chapitre 5 - Table 3. Capture probes used for microarray hybridization

<b>Complementary</b>	<b>Capture probe name</b>	<b>Nucleotide sequence</b>	<b>Length (nt)</b>	<b>T<sub>m</sub><sup>a</sup> (°C)</b>
FluA SO tag	A-S-FluA-T2-T1.2r	5'-GGGGAAGTATGTTGTAT-3'	17	52.4
FluB SO tag	A-S-FluB-T2-T1.2a	5'-CATCCCGAAGAGAAATT-3'	17	52.4
RSV SO tag	A-S-HRSV-T2-T1.2a	5'-TCCCATTCTTGAAAGT-3'	17	52.4
Not applicable	Negative control	5'-TTCGCTGAACAGGTAAAAGT-3'	20	56.3

<sup>a</sup> T<sub>m</sub>: melting temperature

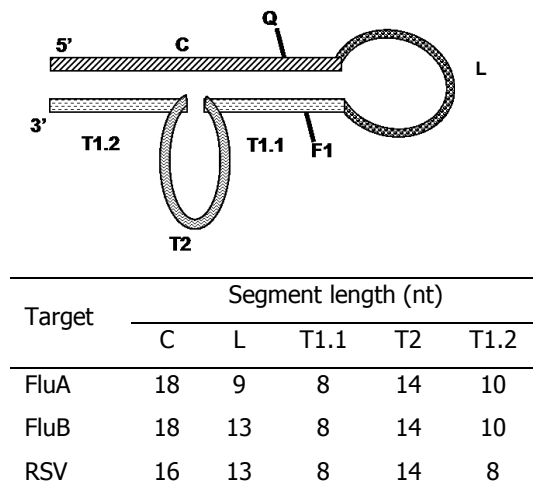
Chapitre 5 - Table 4. Composition of master mix and PCR buffer

		<b>GoTaq buffer</b>	<b>PC2 buffer</b>	<b>AptaTaq buffer</b>	<b>HotGoldStar buffer</b>	<b>RT-Invitrogen buffer</b>	<b>Homemade RT-buffer <sup>a</sup></b>
<b>Buffer composition</b>	Tris-HCl (mM)	10	50	50	15	na	-
	Tris-SO <sub>4</sub> (mM)	-	-	-	-	na	60
	KCl (mM)	50	-	10	50	na	40
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	-	16	5	-	na	18
	MgCl <sub>2</sub>	-	3.5	-	-	na	-
	Triton (%)	0.1	-	-	-	na	-
	Tween 20 (%)	-	-	-	0.01	na	-
	DTT (mM)	-	-	-	-	na	1
pH	9.0	9.1	8.3	8.0	na	9.1	
<b>Added to master mix</b>	MgCl <sub>2</sub> (mM)	2.5	2.5	3.5	3.5	-	1.6
	BSA (mg/ml)	3.3	3.3	3.3	0.3	-	0.66
	dNTPs (mM)	0.2	0.2	0.2	0.2	-	0.2
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mM)	-	-	-	-	8	-
	KCl (mM)	-	-	-	-	14	-
	Rnasin Inhibitor (U) <sup>b</sup>	-	-	-	-	0.3	-
	Superscript 111/platinum (U) <sup>b</sup>	-	-	-	-	0.04	-

<sup>a</sup>Homemade RT-buffer is the deducted composition of Onestep RT-PCR using patent data and empirical testing

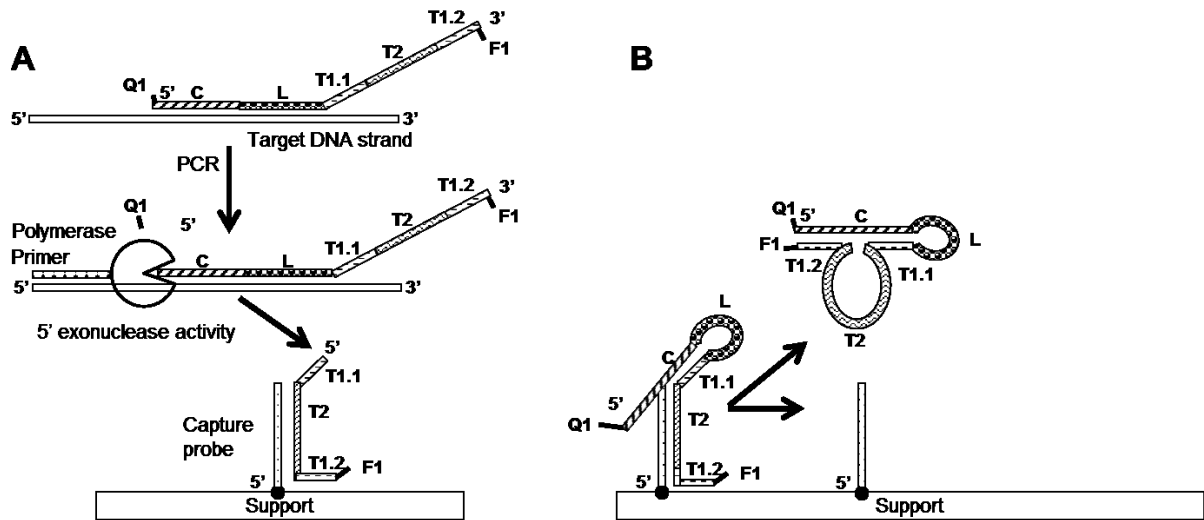
<sup>b</sup>No enzymes were added to the master mixes except for Onestep RT-PCR because hybridization did not work without Rnasin Inhibitor and Superscript 111/platinum.

## 5.11 Figures



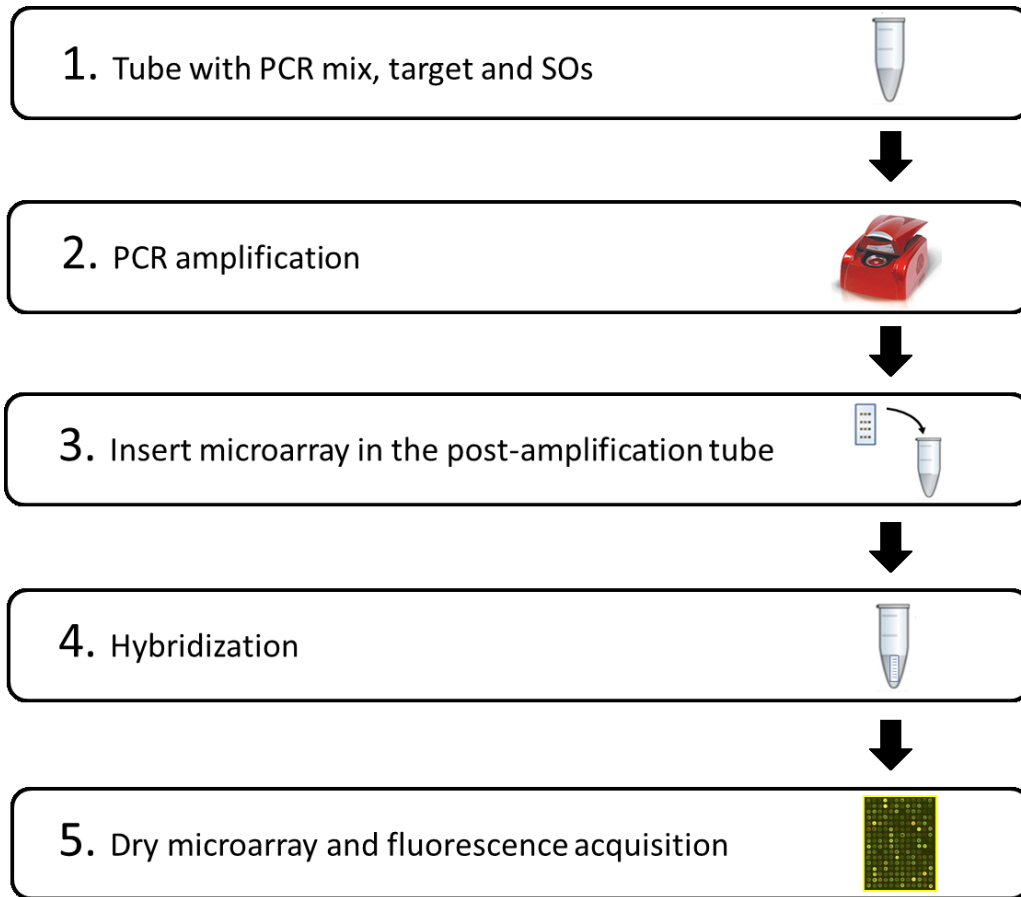
### Chapitre 5 – Figure 1 : Structured Oligonucleotide.

Complementary arm C (slashes) is the reverse-complement to the amplification target and T1.1+T1.2 segment (dashes). Loop L (spheres) is complementary to the amplification target but not to other parts of the SO. Tag segment T divided in three parts: T1.1 (dashes), T2 (waves) and T1.2 (dashes). T1.1 and T1.2 are complementary to the C segment. T2 is complementary to a portion of the microarray capture probe and its sequence can be designed to ensure unique encoding for each amplicon species while ensuring optimal hybridization with immobilized capture probes. Three nucleotides from the 5' end of T1.2 are also complementary to the capture probe. A quencher (Q = BHQ-2) is positioned on a thymine of the C segment, while a fluorophore (F1 = Quasar-670) is positioned on a thymine of segment T1.1 within at most 17 nucleotides and in close secondary structure proximity to the quencher. For each target the SO's length segments are described in the table underneath the SO schematic.



**Chapitre 5 - Figure 2. Schematics of the structured oligonucleotide biodetection system.**

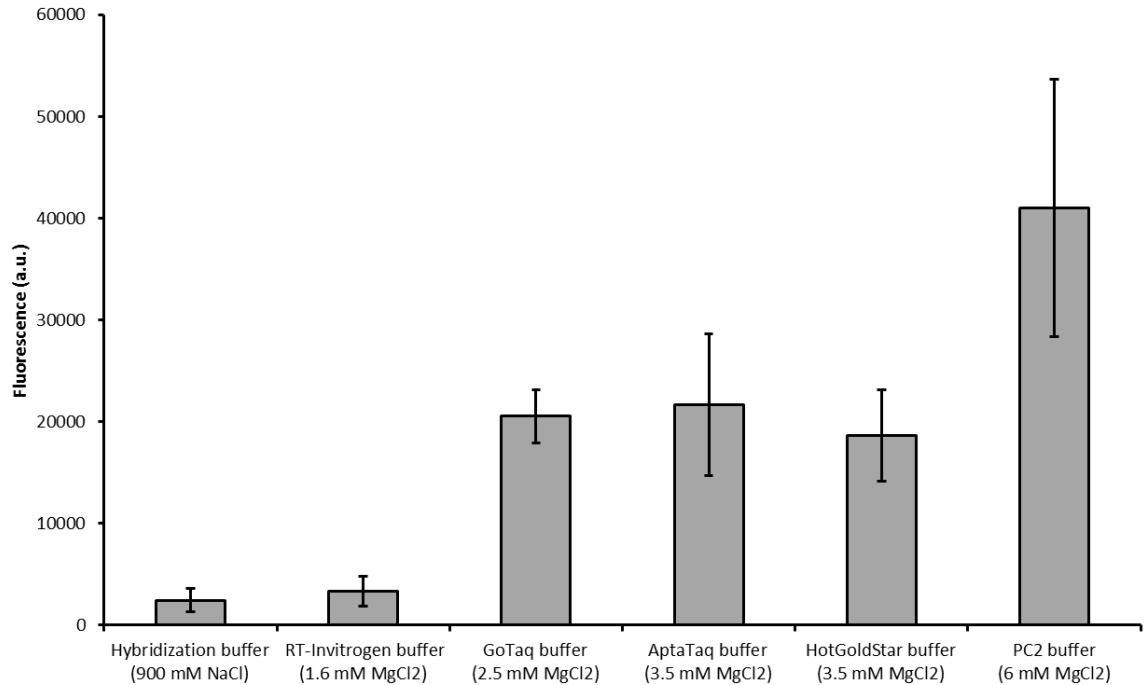
- A) When an amplification target is present (white), the SO opens and the C (slash) and L (spheres) parts hybridize to the target. A thermo stable DNA polymerase with both extension and 5'→3' exonuclease activities (circle with missing sector) recognizes the primer (diamonds) and extends (vertical hashes) the strand until it reaches the SO-target complex and digests the C and L segments, releasing the quencher and releasing the T segment. The released segment T1.1+T2+T1.2 then hybridizes to a microarray capture probe (dots) and fluorescence from F1 is read.
- B) No amplification target is present; the SO is not digested. During thermal cycling, the SO opens and may hybridize with the microarray capture probe, theoretically creating an equilibrium between the open (T2+ 3 first nt in 5' of T1.2 available for hybridization with capture probe) and the structured conformation (when segment C is hybridized to T1.1+T1.2) where quencher Q1 is in close proximity to fluorophore F1. The structured conformation is favored, resulting in low fluorescence from F1 on the microarray.



**Chapitre 5 - Figure 3. Experimental design for multiplexed amplification and hybridization assay with SO.**

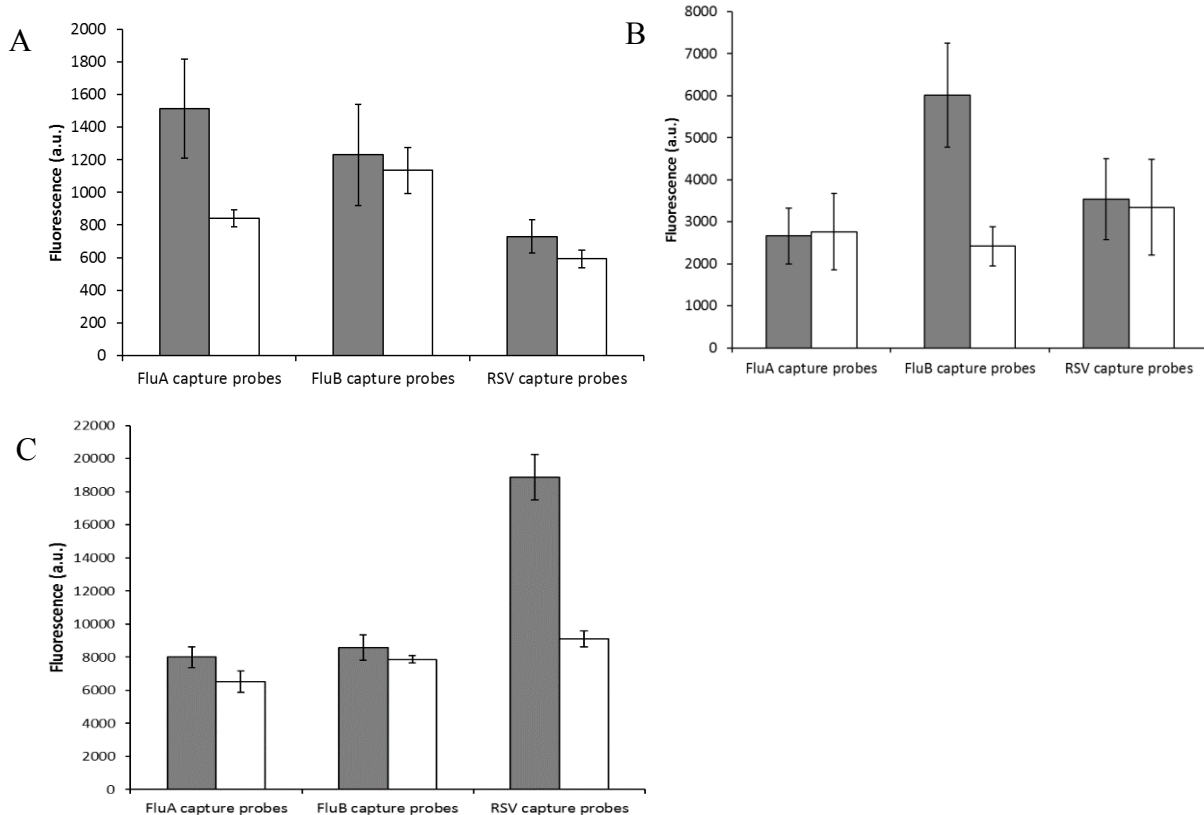
1) Tube with PCR reagents, FluA, FluB, RSV SOs and target. 2) Thermocycling (95°C, 5 sec; 57°C, 20 sec; 72°C, 20 sec; 40 times) to perform PCR amplification and SO digestion. 3) Insert microarray in the PCR tube. 4) Hybridization (40°C, 10 min) in the PCR tube. 5) Drying and fluorescence acquisition.





**Chapitre 5 - Figure 4. Fluorescence signal for hybridization of the tag segment in five amplification buffers.**

Hybridization of 0.1  $\mu$ M T1.1+T2+T1.2-F1 segment representing the digested SO form in five PCR master mixtures with buffers having different compositions, notably with regards to the Mg<sup>2+</sup> concentration. Hybridization on glass slides were performed in triplicate. Mean fluorescence is shown for each buffer and error bars represent the standard deviation. The interquartile range (IQR) was used to filter data. Aberrant data located outside of  $Q2 \pm 1.5 \times IQR$  were eliminated prior to analysis. \* The difference between these buffers and the Hybridization buffers or the RT-Invitrogen buffer is statistically significant ( $p$ -value  $\leq 0.01$ ). \*\* The difference between the PC2 buffer and all other buffers is statistically significant ( $p$ -value  $\leq 0.01$ ).



**Chapitre 5 - Figure 5. Microarray fluorescence signal obtained for FluA, FluB, and RSV multiplex assays.**

For each graph, the gray columns represent the mean fluorescence signals obtained for each capture probe used for positive assays. The white columns represent the means fluorescence signal obtained on each of the three capture probe for negative controls (no target). It represents the background.

- A)** FluA multiplex assay: For the three graphs the gray columns n=4 and for the white columns n=2.
- B)** FluB multiplex assay: For the three graphs the gray columns n=3 and for the white columns n=3.
- C)** RSV multiplex assay: For the three graphs the gray columns n=3 and for the white columns n=3. \* The difference between positive and background signal are statistically significant (p-value  $\leq 0.04$ ).

## **Chapitre 6 Discussion**



## 6.1 Discussion

Les différents projets qui ont été menés au cours de ces recherches visaient à approfondir nos connaissances quant à l'influence du brin complémentaire sur l'hybridation d'ADN cible sur une sonde de capture immobilisée sur une surface solide. J'ai tout d'abord travaillé sur un système simple et rapide permettant de générer des ADNs cibles simple brin, permettant d'utiliser librement des sondes de capture peu importe leur localisation sur l'amplicon. La méthode développée est très simple et tire profit de la taille du fluorophore (Cy3), qui est comparable à 2 acides nucléiques hybridés, bloquant ainsi la digestion par l'exonucléase Lambda. Cette enzyme est compatible avec le tampon PCR et ne nécessite donc pas d'étape de purification ou d'ajout de réactifs supplémentaire.

Le développement d'un instrument de détection des acides nucléiques sur lit de bille par le COPL nous a par la suite permis d'étudier en temps-réel l'hybridation d'ADN simple brin vs double brin. Pour l'ADN double brin, ce système nous a permis de conclure que le phénomène de compétition se produit en continu dès l'instant où l'amplicon circule au-dessus des sondes de capture, confirmant l'importance du brin complémentaire à la fois en utilisant un système microfluidique ou l'hybridation passive. L'hybridation de brins cibles ou de brins complémentaires générés par l'exonucléase lambda a permis de visualiser l'effet de compétition entre la sonde de capture et le brin complémentaire en fonction de la longueur de l'extrémité flottante 5', mais aussi en fonction de la longueur totale de l'amplicon. Finalement, grâce aux connaissances acquises, nous avons mis au point une technique inspirée du phénomène de compétition qui nous a permis de combiner l'amplification PCR et l'hybridation sur biopuce en une seule étape. La technique repose sur un oligonucléotide synthétique structuré et 3 facteurs : soit la digestion d'ADN double brin par l'exonucléase 5'→3' de la Taq, la compétition du brin complémentaire contre la sonde de capture en absence de cible et l'hybridation de courts oligonucléotides qui diffusent rapidement en présence de cible.

## **6.2 Digestion rapide par l'exonucléase lambda de matériel génétique amplifié par PCR pour générer des cibles d'ADN simple-brin**

### **6.2.1 Exonucléases**

Pour développer la technique de digestion, nous avons regardé plusieurs options. Tout d'abord, il existe des modifications qui remplacent les liens phosphates entre les acides nucléiques et qui diminuent grandement voire stop complètement la digestion par les exonucléases, soit les liens phosphorothioates (Eckstein et Gish, 1989). Ces molécules-liens possèdent un soufre à la place d'un oxygène non-liant, changeant les propriétés électrophiles du phosphate et partiellement la conformation de l'ADN. Ces différences résultent en une moins bonne liaison aux phosphorothioates et/ou un clivage déficient, conférant ainsi une résistance accrue aux nucléases (Campbell *et al.*, 1990). Les liens phosphorothioates ont une affinité différente des liens phosphodiester envers certaines protéines (Weidner *et al.*, 1995) et une spécificité plus faible lors de l'hybridation avec un autre brin d'ADN (Deverre *et al.*, 1997). Il existe aussi une exonucléase du virus T7 qui permet, à l'aide des liens phosphorothioates, de protéger un brin, résultant en la digestion spécifique du brin non protégé un brin (Nikiforov *et al.*, 1994). Cependant, elle n'est pas inhibée par la présence de Cy3 en 5', contrairement à l'exonucléase lambda. Ceci est fort probablement dû, en partie, à la structure tridimensionnelle des enzymes. La figure supplémentaire 1, au chapitre 3 illustre la forme d'entonnoir que possède l'exonucléase lambda. La forme et la taille de l'enzyme permet l'entrée d'ADN double brin jusqu'au site actif, mais ne permet que la sortie d'ADN simple brin (Kovall et Matthews, 1997). La molécule de Cy3 possédant des dimensions similaires à deux acides nucléiques face à face, bloque la sortie de l'enzyme et empêche la digestion. Avec la T7 exonucléase, il faut absolument utiliser les phosphorothioates, ajoutant donc une modification supplémentaire aux amorces PCR. Un article récent par Civit et collaborateurs (Civit *et al.*, 2012) a comparé les différentes techniques de production d'ADN simple brin, Ils concluent que pour de l'ADN purifiée avant digestion, l'exonucléase lambda est la meilleure méthode, produisant un rendement de 70%, un faible coût et court temps de réaction. Ils commentent toutefois sur un rendement moins important avec de l'ADN non-purifié qui est beaucoup moins avantageux.

Il faut noter que dans tous les cas, ils ont dilué les produits PCR dans un tampon spécifique à chaque enzyme, alors que nous manipulons les amplicons directement dans le tampon PCR. Il est difficile de se comparer directement avec ce résultat puisque nous n'avons pas déterminé avec précision le rendement de récupération d'ADN simple brin. Nous avons plutôt comparé les résultats d'hybridation des différentes conditions testées. Il est clair que la digestion à l'exonucléase lambda, directement dans le tampon PCR, sans purification préalable donne de meilleurs résultats d'hybridation que la dénaturation thermique, malgré la possibilité d'un rendement de récupération sous-optimal. Il est aussi possible que la combinaison du phosphate 5' sur le brin à digérer, le tampon PCR utilisé (GoTaq Promega) et l'encombrement stérique causé par le Cy3 au site de sortie de l'exonucléase lambda contribue à de meilleurs rendements de récupération que ceux décrits par Civit et collaborateurs. Il serait intéressant de comparer leurs conditions et les nôtres avec un même amplicon non purifié pour vérifier d'où provient la différence d'efficacité de digestion observée.

### **6.2.2 Alternative à l'ADN simple brin**

Dans le cadre des travaux qui ont mené à l'article sur la digestion avec l'exonucléase lambda, nous avons tout d'abord observé l'effet inhibiteur du Cy3 lorsqu'on génère des amplicons incorporant des nucléotides marqués (soit dUTP-Cy3 ou dCTP-Cy3). La digestion du brin complémentaire n'était pas complète. C'est-à-dire que les sondes de capture situées du côté 3' du brin cible pouvaient s'hybrider librement à la cible, sans subir de compétition du brin complémentaire, partiellement digéré. Cependant, les sondes de capture situées au milieu de l'amplicon ne produisaient peu ou pas de signal, puisque le brin complémentaire n'aurait pas été digéré jusqu'à cet endroit. Cette observation nous a donc lancé sur la piste du rôle du Cy3 comme interférant avec l'exonucléase lambda. Cependant, ces résultats ont soulevé une autre possibilité, soit celle d'utiliser un oligonucléotide-aide qui représente une portion du brin cible, adjacente à la sonde de capture, mais qui ne possède pas la séquence de cette dernière. Nous n'avons pas exploré cette possibilité, mais l'utilisation d'un oligonucléotide-aide lors de l'hybridation pourrait stabiliser l'hybridation de la cible avec la sonde de capture. L'utilisation d'oligonucléotides-aides a d'ailleurs déjà été étudiée dans d'autres

circonstances (Peplies *et al.*, 2003). Cette option pourrait être approfondie dans de futurs travaux et serait utile pour des tests à faible densité de biopuce.

### **6.2.3 Impact de la technique**

La digestion à l'exonucléase lambda, directement dans le tampon PCR, du brin complémentaire est utilisée de routine dans le laboratoire du Dr Bergeron pour faire les hybridations sur biopuce. Elle a aussi été utilisée par d'autres équipes (Brinker *et al.*, 2010; Quinones *et al.*, 2011; SenGupta et Cookson, 2010). Dans notre équipe de recherche, les projets de développement de dispositifs intégrés de laboratoire sur puce utilisant la technologie de biopuce incorporent tous l'étape de traitement à l'exonucléase, malgré les défis liés à son utilisation en système microfluidique. En effet, l'enzyme n'est pas thermostable, elle doit donc être ajoutée à la réaction PCR après le thermocyclage et doit être stockée à un endroit peu affecté par les changements de température. Ceci nécessite donc dans le design de systèmes microfluidiques au minimum une chambre de stockage supplémentaire et une gestion des fluides pour délivrer l'enzyme au bon moment.



## **6.3 Hybridation en temps réel de brins d'ADN avec extrémités 5' flottantes de longueur variable.**

### **6.3.1 Utilisations actuellement possibles**

L'instrument, tel qu'utilisé dans le chapitre 4 pour la détection en temps réel de l'hybridation sur sonde de captures fixées à un support solide, pourrait avoir plusieurs utilisations d'intérêt scientifique. Tout d'abord, il reste encore plusieurs aspects à étudier en lien avec la cinétique lors de l'hybridation de l'ADN sur support solide. Le phénomène de compétition entre la sonde de capture et le brin complémentaire dans ces conditions n'est pas encore bien quantifié. En effet, bien qu'on ait une idée de l'influence de la longueur de l'extrémité flottante du brin cible, il nous est présentement impossible de prédire le point de rupture entre une cible qui restera hybridée ou une qui sera décrochée en fonction de la longueur de cette extrémité et du contenu GC. Par exemple, il serait possible, avec l'instrument de détection en temps réel de l'hybridation, de tester l'utilisation d'oligonucléotide-aide qui pourrait permettre d'amoindrir l'effet de l'extrémité flottante tel que suggéré à la section 6.2.2. Il serait aussi intéressant de valider l'importance de l'extrémité 3' (proximale à la surface) sur l'hybridation avec des billes de polystyrènes. Nous avons déjà démontré que, sur lame de verre, cette extrémité avait peu d'effet sur l'hybridation, mais les résultats présentés au Chapitre 4 ne sont pas suffisants pour pouvoir conclure à ce sujet avec les lits de bille de polystyrène. De plus, bien que les progrès en recherche permettent de concevoir de meilleurs sondes qu'auparavant, il reste encore certains défis à surmonter pour avoir des modèles de design de sonde de capture *in silico* plus prédictibles (Tulpan, 2010). Enfin, sa facilité et sa rapidité de fonctionnalisation et d'hybridation des billes fait de cet instrument un outil idéal pour la validation des sondes de capture, principalement pour des biopuces de faible densité. Cet instrument prototype pourrait être modifié de plusieurs façons afin de répondre à des questions ou des demandes différentes et les sections suivantes de ce chapitre traiteront de quelques-unes d'intérêt au sein de notre laboratoire.

### **6.3.2 Système fermé**

Les expériences décrites au chapitre 4 ont été réalisées dans une équipe possédant une grande expérience avec la gestion des amplicons et les risques de contamination. Des contrôles rigoureux et un environnement dédié ont été consacrés à l'instrument optique pour s'assurer de la validité des résultats. Cependant, si on veut utiliser l'appareil de façon plus large, il faudra trouver un moyen de rendre étanche le système fluide. Sous sa forme actuelle, le système de déplacement des fluides par pression positive d'air peut entraîner une dissémination importante d'amplicons dans l'environnement de travail, rendant une utilisation clinique impossible sans modifications majeures. En effet, si le système n'est pas parfaitement étanche et que les produits d'amplification peuvent s'échapper du dispositif, les tests subséquents risquent d'être faussement identifiés comme positifs. La PCR possédant une sensibilité jusqu'à une copie d'ADN par réaction, il est facile de se contaminer à partir de surfaces ou de vêtements de protection exposés aux ADN préalablement amplifiés. C'est pourquoi il est important d'avoir un système fermé qui ne relâchera pas d'acides nucléiques dans l'environnement. Pour les développements futurs de l'instrument et du système fluide, il faudra donc trouver un moyen de gérer en système fermé les liquides contenant de fortes concentrations d'ADN pour limiter au maximum les risques de contamination.

### **6.3.3 Automatisation**

Sous sa forme actuelle, l'instrument est complètement manuel, c'est-à-dire qu'il faut positionner la cartouche au bon endroit dans le réceptacle, puis aligner la tête de lecture sur le canal d'intérêt, injecter la suspension de bille dans la chambre de chargement, fermer le couvercle et démarrer la pompe. Il faut simultanément activer le système d'acquisition de données et l'arrêter lorsque le lit de bille est formé et asséché. On doit ensuite répéter les étapes pour l'ajout d'amplicons puis de solution de lavage. Ce processus devra être réalisé pour chacun des 8 canaux de la chambre d'hybridation. Dans un cadre de recherche, c'est une procédure convenable, mais toutefois lourde, qui est susceptible d'introduire de la variabilité dans l'acquisition de données. Il serait intéressant de simplifier les manipulations de l'instrument pour obtenir des résultats plus constants et en moins de temps de manipulation. Tout d'abord, nous avons fait quelques tests préliminaires qui nous permettent

de croire qu'il serait possible de préparer des billes fonctionnalisées et de préformer un lit de bille au moins une semaine avant utilisation sans perte de sensibilité. Il est possible que les billes soit stables, une fois asséchés, plus longtemps et ce serait une piste simple et facile à tester pour des travaux futurs, qui aurait une implication importante pour le développement de tests basés sur lit de billes. Bien que simple et facile à gérer pour des ajouts subséquents de liquides, les déplacements par pression d'air sont difficilement compatible avec le pré-chargement de plusieurs liquides. Si le système conserve un fonctionnement à pression positive pour le déplacement des réactifs, il faudra probablement continuer de faire deux injections séparées. Ensuite, la détection simultanée de multiples canaux a déjà été envisagée par les concepteurs de l'instrument, l'Équipe du Professeur Denis Boudreau au COPL, pour de futurs développements. Il faudrait probablement un remaniement complet de l'optique pour permettre l'excitation des 8 lits de billes d'un seul coup tout en préservant la qualité du signal obtenu, mais des solutions existent pour surmonter ce défi technique.

#### **6.3.4 Améliorations pour l'obtention de données de cinétique**

Le système optique utilisé dans le chapitre 4 nous a permis d'observer en temps réel le phénomène de compétition entre le brin complémentaire et la sonde de capture pour l'hybridation avec le brin cible. Cependant, il est important de se rappeler que cet instrument n'avait pas été conçu à la base pour répondre à cette question et ne nous a pas permis de pleinement analyser cette cinétique réactionnelle. Afin d'optimiser les capacités d'analyse de l'appareil, il faudrait modifier certains de ses paramètres. Une modification relativement simple qui pourrait nous donner plus d'information sur le système serait l'utilisation du FRET pour mesurer de façon distincte les cibles fluorescentes circulantes des cibles immobilisées sur les sondes de captures. Il faudrait utiliser des sondes de captures portant un fluorophore accepteur de l'énergie émise par le fluorophore de la cible. L'ajout d'un second filtre d'émission et d'un canal de détection dédié permettrait donc de monitorer plus précisément la déplétion des cibles en phase aqueuse vers la surface des billes. De plus, il serait bénéfique de pouvoir contrôler avec plus grande précision la longueur du lit de bille et s'assurer de toujours prendre les lectures de fluorescence au même endroit pour éviter les effets chromatogéniques (déplétion d'ADN par le début du lit de bille). On pourrait par exemple entrevoir un système qui permettrait de couper le lit de bille à une longueur donnée.

Ensuite il faudrait idéalement pouvoir atteindre l'équilibre, donc injecter un plus grand volume et aussi changer le détecteur (tube photomultiplicateur ou PMT) pour éviter la saturation de ce dernier aux concentrations de sondes utilisées sur les billes. On pourrait aussi optimiser la fonctionnalisation des billes non pas pour avoir la détection la plus sensible possible, mais afin d'éviter la saturation aux conditions d'utilisation. Enfin, le temps d'intégration et la fréquence d'acquisition (50 ms et chaque 0,5 s) pourraient être optimisés pour permettre de mesurer des changements plus rapides. La possibilité de chauffer les lits de bille serait aussi très intéressante pour observer et caractériser les phénomènes d'hybridation des acides nucléiques. En somme, des travaux considérables devraient être réalisés sur l'appareil pour le transformer en instrument de mesure dédié à la cinétique.

## 6.4 Oligonucléotide synthétique pour l'amplification et l'hybridation sur biopuce en une seule étape

### 6.4.1 Digestion de l'oligonucléotide synthétique structuré

L'enzyme *Taq* polymérase possède naturellement une activité enzymatique exonucléase 5' → 3', qui est critique pour notre méthode. Il est important de noter que cette activité permet de cliver les fourches en 5', et non pas seulement les extrémités collées (Holland et al PNAS 1991). Il n'est donc pas essentiel que l'extrémité 5' soit complémentaire à la cible pour que l'oligonucléotide synthétique soit digéré. La position du fluorophore et de l'extincteur de fluorescence pourrait être étudiée avec plus de précision, en relation avec l'activité exonucléase. En effet, il serait intéressant de voir si l'oligonucléotide synthétique est relâché avant la digestion complète du segment complémentaire à la cible en utilisant un même SO avec un extincteur de fluorescence localisé à différents endroits du segment s'hybridant à la cible. Si le fragment se décroche avant la digestion complète du segment complémentaire, l'extincteur demeurera potentiellement sur l'OS, empêchant une conversion efficace en tag fluorescent. D'un point de vue de synthèse, il serait probablement plus judicieux de pouvoir immobiliser l'extincteur de fluorescence en 3', pour s'assurer qu'il est toujours présent sur l'oligonucléotide avant-même l'ajout du fluorophore, considérant que la synthèse chimique se déroule de l'extrémité 3' vers 5'. En plaçant l'extincteur moléculaire à l'intérieur de la séquence C, on diminue aussi les risques d'avoir des OSs ne possédant pas de fluorophore. De plus, il est connu que des séries de guanosines consécutives peuvent avoir un effet d'extincteur de fluorescence (Edman *et al.*, 1996). Il pourrait être intéressant d'explorer cette voie dans de futurs travaux

### 6.4.2 Structure

Bien que nous ayons actuellement une forme fonctionnelle avec un protocole de design relativement simple. Il y a toujours de la place à l'amélioration de la structure. Tout d'abord, en plaçant l'extincteur et le fluorophore à l'intérieur de la séquence plutôt qu'aux 2 extrémités, on peut s'assurer que la distance entre les deux soit toujours compatible avec l'extinction de la fluorescence (Lymperopoulos *et al.*, 2010; Weiss, 2000) que l'oligonucléotide se retrouve sous sa forme ouverte ou structurée. Ceci nous permet une plus

grande liberté, possiblement même jusqu'à éliminer la nécessité d'une structure secondaire, diminuant grandement la longueur de l'oligonucléotide et les possibilités d'interactions non-spécifiques. Ces changements pourraient avoir des impacts importants sur la simplicité de multiplexage des OSs. Il faut aussi rester bien informé des progrès et des avancées de nucléotides synthétiques. En effet, il existe plusieurs analogues de nucléotides qui ont des propriétés uniques. Tout d'abord, on retrouve l'inosine, une base qui peut s'apparier en ordre de préférence à C, A et G ou T, plutôt faiblement (Case-Green et Southern, 1994). Une paire d'analogues de C et de G, appelés isodC et isodG est commercialisée par Glen Research Inc. Ces deux analogues s'hybrident ensemble, cependant, ils ne peuvent pas s'hybrider avec les C ou les G conventionnels. Il existe plusieurs autres analogues de bases traditionnelles utilisées dans les phénomènes biologiques, les compagnies de synthèses en ont plusieurs de disponibles sur demande. Enfin, il existe aussi des analogues d'acides nucléiques complètement synthétiques, mais qui sont constituées des mêmes bases. Leur différence principale vient au niveau de leur squelette de sucre et de phosphate. Les locked nucleic acids ou LNA ont un ribose modifié qui comporte une liaison entre l'oxygène en position 2' et le carbone en position 4' (Koshkin *et al.*, 1998). Ce lien chimique supplémentaire permet un empilement plus stable des bases, résultant en une augmentation du  $T_m$ . Cependant, un mésappariement sera plus déstabilisé et permettra donc de mieux discriminer les SNPs. De plus, la structure modifiée des LNAs les rend résistants aux exo et endonucléases (Wang *et al.*, 2005). Il est aussi possible d'utiliser des LNAs pour faire l'invasion d'acides nucléiques double brin (Arzumanov *et al.*, 2001). Généralement, quelques LNA sont insérés dans une séquence d'ADN traditionnelle à des positions clés. Par exemple, dans un taqman, un LNA positionné en face d'un SNP augmentera le pouvoir de discrimination. En ajoutant un autre LNA de part et d'autre du SNP, on peut en maximiser la reconnaissance (Owczarzy *et al.*, 2011). Les peptides nucleic acids ou PNA quant à eux possède un squelette peptidique, constitué d'un enchaînement de N-(2-aminoéthyl)-glycine attachées par un lien peptidique. Cet analogue permet aussi d'obtenir des  $T_m$  plus élevés et de discriminer plus efficacement les SNPs. Ils ne sont pas reconnus par la majorité des enzymes digestives des acides nucléiques ou des protéines, ce qui leur confère une haute résistance à la dégradation enzymatique. Puisque la chimie de polymérisation est différente du lien phosphate traditionnel des acides nucléiques, les PNAs sont utilisés exclusivement dans une séquence

d'ADN donnée, c'est-à-dire que certaines séquences ne permettent pas la construction d'un PNA. De plus, leur synthèse est généralement limitée à une quinzaine de bases de long. Les sondes de type PNA sont particulièrement utilisées avec la technique d'hybridation avec fluorescence *in situ* (FISH). Dans la séquence des OSs, le positionnement de LNA en face d'un SNP ainsi que deux autres LNA de part et d'autre pourrait permettre d'augmenter considérablement le pouvoir de discrimination des mésappariements. Cependant, il faudra les positionner dans la deuxième moitié (portions côté 3') du segment C (complémentaire à la cible) pour permettre une digestion suffisante de l'OS puisque les LNAs sont résistants à la digestion.

### **6.4.3 Possibilités d'optimisation**

Plusieurs avenues restent à être explorées pour optimiser la digestion des OSs et/ou la non-hybridation de la forme non-digérée. Le but serait d'augmenter le ratio de signal d'OS digéré (en présence de cible) sur le bruit de fond produit par les OSs non-digérés. Évidemment, les améliorations apportées à la structure tel que décrit en 6.4.2 pourraient avoir un impact sur ce ratio. Il est aussi possible d'optimiser les conditions de cyclages et les concentrations de réactifs pour favoriser une digestion plus efficace des OSs. La quantité d'enzyme utilisée, des amorces et des OSs reste en effet à être optimisée. De plus, les expériences avec les différents tampons montrent bien l'effet du magnésium sur l'hybridation de l'ADN sur une sonde de capture fixée à un support solide. Ce sera aussi un paramètre qui devra être ajusté. D'une part, une concentration plus élevée en magnésium devrait résulter en des signaux plus importants d'hybridation (Springer *et al.*, 2010), permettant potentiellement une plus grande sensibilité. En contrepartie, une quantité plus importante de magnésium peut potentiellement diminuer la spécificité et résulter en la formation d'amplicons non-spécifiques. Il serait aussi intéressant de tester différentes sondes de capture avec des contenus GC faibles et élevés. En effet, il a été décrit que contrairement à l'hybridation avec sodium, le magnésium a une préférence élevée pour les paires de bases G-C (Li *et al.*, 2011).

### **6.4.4 Développements futurs de la technologie**

Cette invention a été brevetée par l'Université Laval, croyant en un potentiel de valorisation de cette technologie. À terme, il serait possible de surpasser la détection et identification

multiplexée de la PCR en temps réel. Des travaux d'automatisation de designs des OSs devront être réalisés en ayant des valeurs minimales et maximales de  $T_m$  et de  $\Delta G$  pour chaque segment. Il devrait être relativement facile de mettre au point un logiciel permettant un design efficace avec de bon taux de succès d'OSs fonctionnels. Il faudra bien évidemment démontrer que le multiplexage est réellement supérieur à la PCR, avec une sensibilité et spécificité adéquate pour les applications ciblées. De plus, il faudra consacrer des ressources au développement d'un dispositif intégrant de façon élégante la biopuce à la chambre d'amplification. Actuellement, la biopuce est découpée à l'aide d'un X-acto puis insérée à l'intérieur d'un tube PCR de 0,2 ml. Pour une preuve de concept, c'est une procédure adéquate, mais qui est difficilement adaptable pour l'industrie. Les plateformes de microfluidique centripète développées par l'équipe du Dr. Bergeron pourraient servir de base pour la technologie des oligonucléotides structurés. En effet, certains projets ont déjà incorporé une biopuce à un disque microfluidique capable de réaliser une réaction PCR. Cependant, la biopuce est installée en aval de la chambre PCR, et il sera important de s'assurer que les changements de température engendrés par le cyclage PCR ne résultent pas en un décollage de la biopuce, résultant en des fuites. Il serait aussi intéressant de pouvoir faire la lecture de la biopuce sans devoir assécher celle-ci préalablement. Ceci permettrait de simplifier grandement la conception de la microfluidique, limitant les échecs de déplacement des fluides. Pour limiter la contribution des fluorophores présent en phase aqueuse, le transfert d'énergie entre molécule fluorescentes pourrait être utilisé. En effet, l'utilisation de sondes de captures marquées par un fluorophore qui peut interagir avec le fluorophore de l'OS, en tant que donneur ou accepteur d'énergie pourrait aider à diminuer le bruit de fond, soit en n'excitant plus directement le fluorophore des OSs ou en ne faisant plus l'acquisition à cette longueur d'onde de fluorescence. Il serait aussi possible de changer la méthode d'excitation pour diminuer le bruit de fond. Par exemple, l'utilisation d'un guide d'onde parallèle à la surface d'attachement des sondes de capture pourrait permettre de générer des ondes évanescentes à portée courte (environ 5-10 nm) qui permettraient d'exciter seulement les fluorophores immobilisés à proximité de la surface, diminuant ainsi considérablement le bruit de fond causé par les fluorophores en solution (Bedu *et al.*, 2010; Duveneck *et al.*, 2002).



### 6.4.5 Besoins du marché

Dans le cadre du processus de valorisation de la technologie de l'oligonucléotide structuré, nous avons analysé le marché du diagnostic moléculaire. En effet, les besoins scientifiques et mercantiles d'une technologie sont bien différents. L'intérêt scientifique provient de la nouveauté de la méthode, qui combine plusieurs connaissances pour permettre de réaliser en une seule étape PCR et hybridation sur puce. Pour le marché, il faut cependant démontrer en quoi l'invention permet d'obtenir des résultats supérieurs aux technologies concurrentes, quels sont les possibilités de fabrication et les coûts impliqués. Une technologie peut donc être un succès scientifique, mais un échec commercial si on ne peut répondre adéquatement à ces questions. Il faut donc bien cibler le marché d'intérêt et les concurrents qui s'y trouvent. Dans le cas de notre technologie, nous avons ciblé le marché du diagnostic moléculaire pour développer la technologie vers un niveau commercialisable. Le diagnostic moléculaire (DM) est un segment du marché des diagnostics *in vitro* (DIV). En 2011, les DIVs représentaient plus de 40,3 G\$ avec une croissance annuelle de 4,4% (StrategicConsulting, 2009b). De ce marché, le DM possède la plus forte croissance, à hauteur de 15,4% en 2010. Toujours dans cette année, ce segment était estimé à 4,1 G\$ et présumé grimper à 6,2 G\$ en 2014 (Beyda, 2009; Jasson *et al.*, 2010).

Le segment du DM est à son tour sous-divisé en diverses spécialités. La détection des maladies infectieuses en constitue la plus grande partie, à 60%. On y retrouve bien sûr la détection et l'identification des pathogènes, mais aussi la quantification de ces derniers. Généralement les tests quantitatifs se chargent aussi de la détection et l'identification, par contre, l'inverse n'est pas nécessairement vrai. Certains tests de détection mesurent seulement l'absence ou la présence du ou des pathogènes ciblés. Tel que discuté précédemment, les facteurs de forme, de complexité et de localisation (où se fait le test) sont importants pour l'adoption d'un test, c'est pourquoi les tests au chevet du patient (point de service ou point of care (POC)) sont en pleine expansion (Jasson *et al.*, 2010). Selon Frost & Sullivan, analystes de nouvelles technologies depuis 50 ans (Frost&Sullivan), pour que l'adoption des tests au chevet du patient soit efficace, il faut que ceux-ci soient abordables, d'une sensibilité adéquate, rapides et simple d'utilisation pour pouvoir être utilisés par un personnel non-spécialiste en biologie moléculaire. L'invention de l'oligonucléotide structuré vise particulièrement à simplifier les

étapes techniques pour simplifier l'automatisation du test. Enfin, Le marché de la médecine personnalisée représentait, en 2011, 730 millions de dollars avec une croissance annuelle estimée à 20% (Jasson *et al.*, 2010).

De plus, il est aussi important de connaître les compagnies clés qui œuvrent dans le domaine ainsi que les produits qu'ils mettent en marché. Neuf compagnies représentent plus de 75% du marché, soit Roche Diagnostics, Qiagen NV, Gen-Probe Inc., Abbott Diagnostics, Siemens, BD Biosciences, Cepheid, bioMérieux et Beckman Coulter. C'est la firme Roche qui occupe la plus grande part du marché avec 30%. Pour qu'un produit fasse sa place, il faut qu'il soit nettement supérieur ou qu'il capte l'intérêt d'une grosse compagnie qui licenciera la technologie.

Les produits commerciaux qui entre en compétition avec notre technologie, de par leur capacité à détecter plus de 5 cibles, sont Luminex (8 à 71 cibles), Biofire (20 à 28), Nanosphere (8 à 16). Ces produits ciblent des virus respiratoires, des pathogènes de la septicémie et leurs gènes de résistance et des mutations impliquées dans les maladies humaines comme la fibrose kystiques. Cependant, ces tests nécessitent soit une culture préalable (18-24h), un long temps d'exécution (jusqu'à 5 à 8 heures selon les tests) ou une division de l'échantillon et nécessitent donc une préamplification. La complexité est donc trop élevée pour en faire des tests au chevet du patient (POC) et les délais entre la prise d'échantillon et le résultat (cycle diagnostic) sont trop longs. Il reste donc un espace pour des technologies multiplexées, simples et rapides. Pour plusieurs applications ne nécessitant pas la détection et identification de plus de 4-5 cibles, la PCR en temps réel demeure une alternative de choix, qui a fait ses preuves et qui est de plus en plus simple à utiliser. Sans être un compétiteur direct pour plusieurs tests, cette technologie demeure un standard qu'il faut surpasser pour faire sa marque.

#### **6.4.6 Analyse MOFF**

Après avoir repéré le marché et les principaux compétiteurs, on peut aussi produire une analyse MOFF, pour menaces, opportunités, forces et faiblesses. Ceci permettra de mettre en relief les aspects positifs et négatifs provenant autant de la technologie que de l'environnement externe.

#### **6.4.6.1. Menaces**

Les défis technologiques et les processus réglementaires nécessaires à la mise en marché de produits automatisés, rapides et avec de bonnes valeurs prédictives positives et négatives sont importants et peuvent constituer de nombreuses embûches à la commercialisation. Il est estimé qu'une technologie peut nécessiter 5 ans et coûter plus de 40 millions US\$ avant d'être mis en marché (Luong *et al.*, 2008). La réglementation des produits médicaux étant stricte, même les compagnies expérimentées peuvent avoir de la difficulté à mettre en marché une nouvelle technologie (StrategicConsulting, 2009a). Le diagnostic basé sur la détection et l'identification de séquences d'acides nucléiques connues est aussi menacé par la montée du séquençage à haut débit, qui permet une identification sans connaissances a priori des séquences ou des organismes impliqués dans la maladie. Ces technologies sont présentement encore trop coûteuses et trop lente, surtout lorsqu'on y inclue le temps d'assemblage des séquences et des données. De plus, elles nécessitent des échantillons purifiés, augmentant la complexité et le temps de préparation. Cependant, c'est un domaine en pleine expansion et très prometteur, tout particulièrement en recherche. À moyen terme, le séquençage pourrait entrer en compétition avec les technologies d'amplification enzymatiques déjà établies.

#### **6.4.6.2 Opportunités**

Selon PricewaterhouseCoopers, la médecine personnalisée constitue un marché en pleine expansion, introduisant de nouveaux participants dans l'équation, les consommateurs. Ces produits changent la façon dont les soins de santé sont dispensés et change la dynamique entre les consommateurs, les fournisseurs de soins et les manufacturiers. Il faut donc développer notre technologie en gardant en tête ces transformations qui sont en cours. Il est aussi important de considérer qu'actuellement, il y a environ 800 laboratoires d'analyse médicale qui utilisent actuellement des tests de DMs, selon Frost & Sullivan (McLeod, 2012). Avec des tests simplifiés qui peuvent être réalisés hors laboratoire, le nombre d'hôpitaux et de cliniques qui pourrait se mettre à utiliser ces tests est beaucoup plus important, soit 22 000 aux États-Unis. Juste au Québec, on compte près de 95 centres de soins de santé (MSSS-Qc, 2008). Il y a donc un potentiel important de ressources qui pourront tirer profit des tests au chevet du patient.

### 6.4.6.3 Forces et faiblesses

La détection multiplexée d'acides nucléiques peut prendre plusieurs formes, mais les méthodes ne nécessitant pas la culture préalable repose généralement sur l'amplification enzymatique. La partie détection se fait ensuite soit en temps réel par encodage de couleur, soit par encodage cartésien. La PCR en temps réel est une des techniques utilisée par certaines compagnie, tel que Cepheids et son produit GeneXpert™. La complexité du système est relativement faible, mais le niveau de multiplexage l'est aussi. Le BD Max™ de Becton-Dickinson est également une technologie prometteuse qui envahie le marché. Tel qu'expliqué précédemment, la biopuce se veut une alternative intéressante pour la détection et l'identification de plusieurs cibles (Bissonnette et Bergeron, 2012). Pour ajouter une détection sur puce, il faudra généralement ajouter plusieurs réactifs et obtenir des biopuces, intégrées au dispositif, hautement reproductibles. La force de notre technologie est de combiner les avantages de chacune des techniques, soit l'amplification exponentielle et la reconnaissance de plusieurs séquences différentes de la PCR pour une bonne sensibilité et spécificité avec la détection cartésienne de la biopuce pour un multiplexage élevé. Cette combinaison n'est pas une simple addition des deux procédés, mais plutôt une fusion de ces derniers, réalisable à l'aide d'un seul tampon de réaction et en une seule étape. Ceci permet de conserver une complexité relativement faible et devrait donc permettre de produire des dispositifs à coûts concurrentiels. De plus, notre approche consiste en l'indexation des cibles d'intérêts par un court oligonucléotide unique qui sert à l'hybridation sur biopuce. L'avantage de cette technique est de diminuer considérablement le temps de diffusion des acides nucléiques réagissant avec la sonde de capture immobilisée à la surface. La résultante est une cinétique d'hybridation favorable minimisant les effets stochastiques partiellement responsables de la variabilité observée avec les hybridations sur biopuce.

La technologie nécessite des oligonucléotides synthétiques d'une longueur importante (50-60) avec 2 modifications pour le fluorophore et l'extincteur de fluorescence. La conception de ces derniers est complexe et potentiellement incompatible ou difficilement réconciliable avec la séquence de certains gènes avec un pourcentage GC faible. En quelque sorte, la complexité d'ingénierie liée à la fabrication du dispositif est transférée en amont au niveau de la conception biologique. En plus de la longueur des SOs, on y retrouve aussi des

modifications internes pour un fluorophore et un extincteur molaire, qui doivent être localisés sur des T à une distance de 17 nucléotides ou moins. Les rendements de synthèses sont faibles et ne permettent pas actuellement de tester des analogues d'acides nucléiques tel que discuté en 6.4.2. Enfin, les interactions intra et intermoléculaire doivent être évaluées lors du design et complexifie l'ajout de nouvelles cibles. Les avancées en chimie de synthèse (rendements, nouvelles molécules, etc...) et/ou de nouvelles structures de SOs pourraient diminuer énormément la complexité de conception.

## 6.5 Perspectives générales du projet doctoral

Mon doctorat dans le domaine du diagnostic rapide des maladies infectieuses m'a amené à dépasser la limite de la conception des tests pour parfaire notre compréhension des mécanismes sous-jacent à l'hybridation d'acides nucléiques tant en phase aqueuse qu'à l'interface liquide-solide. Bon nombre d'articles à ce sujet ont été publiés et sont cités tout au long de cet ouvrage, cependant, il nous est toujours impossible de prédire avec certitude et précision toutes les interactions qui résulteront d'un mélange de 2 acides nucléiques et analogues ou plus. Tel que démontré par d'autres (Bochman *et al.*, 2012; Charlebois *et al.*, 2013), certaines séquences adopteront des comportements différents, parfois prévisibles, parfois moins. Certains chimistes travaillant sur les polymères aiment bien nous rappeler que chaque séquence d'acides nucléiques différents constitue un polymère différent qui aura des propriétés différentes.

L'ADN est une molécule très stable, en partie grâce à sa structure secondaire de double hélice en présence d'un brin complémentaire. Cet avantage se transforme parfois en désavantage pour les technologies de diagnostic moléculaire, qui doivent composer avec la présence de ces deux brins. Il faut donc trouver des stratégies pour être capable de gérer le brin complémentaire. Pendant mes travaux de doctorat, nous avons développé deux façons de gérer le double brin, soit par la digestion et la protection spécifique du brin complémentaire et du brin cible respectivement ou soit par la génération de tags synthétiques simple brin en utilisant l'activité exonucléase 5'→3' de la Taq polymérase.

Lors du développement des biopuces, les tampons utilisés ont été choisis en fonction des travaux précédemment effectués avec les Southern blots plutôt que de tester plusieurs types de tampons. Les tampons utilisés pour le Southern blot sont généralement constitué d'une solution saline (NaCl) à haute concentration (0,9 M) (Sambrook et Russell, 2001b) alors que les tampons PCR sont constitués principalement d'une faible quantité de potassium (50 mM KCl) et une faible concentration de magnésium (1,6-6,5 mM) (voir tableau 4 du chapitre 5). Les expériences d'hybridation d'ADN sur puce nous ont permis de déterminer que les tampons d'amplifications sont compatibles avec l'hybridation sur puce. Il faut tirer une leçon

importante de ces résultats : sans vouloir toujours réinventer la roue, il faut cependant se demander pourquoi les choses sont faites d'une façon plutôt qu'une autre et être prêt à tester des hypothèses moins conventionnelles, surtout si on possède quelques évidences que ces hypothèses ont du potentiel. Dans le cas de l'hybridation dans le tampon PCR, tous les acteurs impliqués au laboratoire ont été agréablement surpris à des degrés divers. Pourtant, quand on y pense, il faut bien que le tampon PCR soit permissif à l'hybridation qui s'y produit un nombre incroyable de fois au cours des 40-45 cycles.





## **Conclusion**



L'hybridation d'ADN sur support solide implique de multiples phénomènes physiques, chimiques et biologiques d'une complexité impressionnante. Cependant les travaux effectués dans ces domaines permettent lentement, mais sûrement de comprendre et de prédire un peu mieux ce processus. C'est dans cette voie que c'est engagé mon doctorat, les travaux réalisés ayant permis de mettre en évidence 2 facteurs importants pour l'hybridation de l'ADN sur support solide, le brin complémentaire au brin cible et la nature du ou des contre-ions.

Premièrement, les travaux des chapitres 3 et 4 ont permis de mieux comprendre l'influence du brin complémentaire au brin cible sur l'hybridation sur support solide. L'observation en temps réel de ce phénomène nous a permis de réaliser à quel point le brin complémentaire peut décrocher le brin cible de la surface de la biopuce et qu'il est donc critique de trouver une façon d'éliminer ou de gérer ce brin complémentaire. La technique que nous avons développée fait appel à l'exonucléase Lambda, à ses propriétés chimiques et à ses dimensions pour digérer sélectivement le brin complémentaire de façon simple et rapide. Le produit simple brin résultant de cette digestion permet une plus grande souplesse dans la conception des sondes de captures et maximise les signaux de fluorescence générés lors de l'hybridation.

En second lieu, les travaux effectués avec les tampons PCR pour réaliser les hybridation sur support solide ont permis de redécouvrir l'importance du choix des contre-ions pour faciliter le rapprochement des deux brins d'ADN chargés négativement. En effet, le magnésium est plus efficace que le sodium pour faciliter le rapprochement des deux brins d'ADN. L'impact de ces résultats pourrait entraîner un changement important dans la conduite des expériences d'hybridation sur support solide. L'utilisation du magnésium comme contre-ion devra être étudié plus en profondeur pour maîtriser ses avantages et ses limites.

Enfin, la combinaison de ces deux facteurs nous a permis de développer une nouvelle technologie combinant les avantages de l'amplification PCR et des biopuces à microdamier tout en minimisant les inconvénients. Cette technologie a le potentiel de faciliter le développement d'essais moléculaires hautement multiplexés à coûts concurrentiels.

Cette thèse démontre bien l'importance de la recherche fondamentale comme moteur de la recherche appliquée. Pour le diagnostic moléculaire, il est essentiel de maîtriser les phénomènes liés à l'hybridation pour mettre au point les meilleurs tests possibles.



## Bibliographie

- Abed, Y., et G. Boivin. 2006. Treatment of respiratory virus infections. *Antiviral research* 70:1-16.
- Arzumanov, A., A.P. Walsh, V.K. Rajwanshi, R. Kumar, J. Wengel, et M.J. Gait. 2001. Inhibition of HIV-1 Tat-dependent trans activation by steric block chimeric 2'-O-methyl/LNA oligoribonucleotides. *Biochemistry* 40:14645-14654.
- Bedu, M., G. Sagarzazu, T. Gacoin, P. Audebert, C. Weisbuch, et L. Martinelli. 2010. Sol-gel planar waveguides for improved fluorescence microarrays. *Thin Solid Films* 518:4450-4457.
- Beyda, N.E.I., E.H. 2009. Rapid Molecular Testing in Bloodstream Infections. *US Pharmacist* 34:HS9-HS13.
- Biofire. FilmArray The Panels: Blood Culture Identification Panel. In.
- Bissonnette, L., et M.G. Bergeron. 2012. Multiparametric technologies for the diagnosis of syndromic infections. *Clinical Microbiology Newsletter* 34:159-168.
- Bochman, M.L., K. Paeschke, et V.A. Zakian. 2012. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature reviews. Genetics* 13:770-780.
- Brinker, A., H. Schulze, T. Bachmann, et R. Moller. 2010. Lambda exonuclease pre-treatment for improved DNA-chip performance depends on the relative probe-target position. *Biosensors & bioelectronics* 26:898-902.
- Campbell, J.M., T.A. Bacon, et E. Wickstrom. 1990. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *Journal of biochemical and biophysical methods* 20:259-267.
- Case-Green, S.C., et E.M. Southern. 1994. Studies on the base pairing properties of deoxyinosine by solid phase hybridisation to oligonucleotides. *Nucleic acids research* 22:131-136.
- Charlebois, I., C. Gravel, N. Arrad, M. Boissinot, M.G. Bergeron, et M. Leclerc. 2013. Impact of DNA sequence and oligonucleotide length on a polythiophene-based fluorescent DNA biosensor. *Macromolecular bioscience* 13:717-722.
- Charlebois, M., A. Paquet, L.S. Verret, K. Boissinot, M. Boissinot, M.G. Bergeron, et C.N. Allen. 2010. Toward Automatic Label-Free Whispering Gallery Modes Biodetection with a Quantum Dot-Coated Microsphere Population. *Nanoscale research letters* 5:524-532.
- Chen, C., W. Wang, J. Ge et X.S. Zhao. 2009. Kinetics and thermodynamics of DNA hybridization on gold nanoparticles. *Nucleic acids research* 37(11):3756-65.
- Civit, L., A. Frago, et C.K. O'Sullivan. 2012. Evaluation of techniques for generation of single-stranded DNA for quantitative detection. *Analytical biochemistry* 431:132-138.
- Clausen-Schaumann, H., M. Rief, C. Tolksdorf, et H.E. Gaub. 2000. Mechanical stability of single DNA molecules. *Biophysical journal* 78:1997-2007.
- Cosnier, S., et P. Mailley. 2008. Recent advances in DNA sensors. *The Analyst* 133:984-991.
- Deverre, J.-R., V. Boutet, D. Boquet, E. Ezan, J. Grassi, et J.-M. Grognet. 1997. A competitive enzyme hybridization assay for plasma determination of phosphodiester and phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Nucleic acids research* 25:3584-3589.

- Duveneck, G.L., A.P. Abel, M.A. Bopp, G.M. Kresbach, et M. Ehrat. 2002. Planar waveguides for ultra-high sensitivity of the analysis of nucleic acids. *Analytica chimica acta* 469:49-61.
- Eckstein, F., et G. Gish. 1989. Phosphorothioates in molecular biology. *Trends in biochemical sciences* 14:97-100.
- Edman, L., U. Mets, et R. Rigler. 1996. Conformational transitions monitored for single molecules in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6710-6715.
- Franz, A., O. Adams, R. Willems, L. Bonzel, N. Neuhausen, S. Schweizer-Krantz, J.U. Rugeberg, R. Willers, B. Henrich, H. Schrotten, et T. Tenenbaum. 2010. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *Journal of Clinical Virology* 48:239-245.
- Frost&Sullivan. In Vitro Diagnostics Market. In.
- Gao, Y., L.K. Wolf, et R.M. Georgiadis. 2006. Secondary structure effects on DNA hybridization kinetics: a solution versus surface comparison. *Nucleic acids research* 34:3370-3377.
- Gross, P., N. Laurens, L.B. Oddershede, U. Bockelmann, E.J.G. Peterman, et G.J.L. Wuite. 2011. Quantifying how DNA stretches, melts and changes twist under tension. *Nature physics* 7:731-736.
- Guo, X., A.A. Gorodetsky, J. Hone, J.K. Barton, et C. Nuckolls. 2008. Conductivity of a single DNA duplex bridging a carbon nanotube gap. *Nature nanotechnology* 3:163-167.
- Hill, H.D., et C.A. Mirkin. 2006. The bio-barcode assay for the detection of protein and nucleic acid targets using DTT-induced ligand exchange. *Nature protocols* 1:324-336.
- Holloway, B., D.D. Erdman, E.L. Durigon, et J.J. Murtagh, Jr. 1993. An exonuclease-amplification coupled capture technique improves detection of PCR product. *Nucleic acids research* 21:4990.
- Illumina. 2013. HiSeq 2000 System User Guide. In.
- Isabel, S., M. Boissinot, I. Charlebois, C.M. Fauvel, L.E. Shi, J.C. Levesque, A.T. Paquin, M. Bastien, G. Stewart, E. Leblanc, S. Sato, et M.G. Bergeron. 2012. Rapid filtration separation-based sample preparation method for Bacillus spores in powdery and environmental matrices. *Appl Environ Microbiol* 78:1505-1512.
- Ivey, M.L., et T.G. Phister. 2011. Detection and identification of microorganisms in wine: a review of molecular techniques. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 38:1619-1634.
- Jasson, V., L. Jacxsens, P. Luning, A. Rajkovic, et M. Uyttendaele. 2010. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food microbiology* 27:710-730.
- Kang, K., J. Wang, J. Jasinski, et S. Achilefu. 2011. Fluorescence Manipulation by Gold Nanoparticles: From Complete Quenching to Extensive Enhancement. *Journal of Nanobiotechnology* 9:16.
- Koshkin, A.A., S.K. Singh, P. Nielsen, V.K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C.E. Olsen, et J. Wengel. 1998. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 54:3607-3630.

- Kovall, R., et B.W. Matthews. 1997. Toroidal structure of lambda-exonuclease. *Science* 277:1824-1827.
- Larsson, C., J. Koch, A. Nygren, G. Janssen, A.K. Raap, U. Landegren, et M. Nilsson. 2004. In situ genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nature methods* 1:227-232.
- Lee, C.Y., C.L. Chang, Y.N. Wang, et L.M. Fu. 2011. Microfluidic mixing: a review. *International journal of molecular sciences* 12:3263-3287.
- Lessard-Viger, M., M. Rioux, L. Rainville, et D. Boudreau. 2009. FRET enhancement in multilayer core-shell nanoparticles. *Nano letters* 9:3066-3071.
- Li, L., G. Wu, G. Yang, J. Peng, J. Zhao, et J.J. Zhu. 2013. Focusing on luminescent graphene quantum dots: current status and future perspectives. *Nanoscale* 5:4015-4039.
- Li, W., L. Nordenskiöld, et Y. Mu. 2011. Sequence-specific Mg<sup>2+</sup>-DNA interactions: a molecular dynamics simulation study. *The journal of physical chemistry. B* 115:14713-14720.
- Li, Y., H. Schluesener, et S. Xu. 2010. Gold nanoparticle-based biosensors. *Gold Bull* 43:29-41.
- Luminex. xTAG® Cystic Fibrosis Assays. In Luminex website.
- Luong, J.H., K.B. Male, et J.D. Glennon. 2008. Biosensor technology: technology push versus market pull. *Biotechnology advances* 26:492-500.
- Lymperopoulos, K., A. Kiel, A. Seefeld, K. Stohr, et D.P. Herten. 2010. Fluorescent probes and delivery methods for single-molecule experiments. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry* 11:43-53.
- McLeod, P.S. 2012. Frost & Sullivan Report Identifies Molecular Diagnostics as Fastest-Growing Sector of Clinical Pathology Laboratory Testing. In Dark Daily.
- Miller, M.B., et Y.W. Tang. 2009. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews* 22:611-633.
- Mittal, V., J. Sambrook, et D.W. Russell. 2001. Appendix 10: DNA microarray technology. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, A10.10.
- MSSS-Qc. 2008. Le système de santé et de services sociaux au Québec. In L.D.d.c.d.m.d.l. Santé, et e.d.S.s.d. Québec, editors. Site web du ministère de la santé.
- Nam, J.M., S.I. Stoeva, et C.A. Mirkin. 2004. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *Journal of the American Chemical Society* 126:5932-5933.
- Nielsen, K., W.L. Yu, M. Lin, S.A. Davis, C. Elmgren, R. Mackenzie, J. Tanha, S. Li, G. Dubuc, E.G. Brown, L. Keleta, et J. Pasick. 2007. Prototype single step lateral flow technology for detection of avian influenza virus and chicken antibody to avian influenza virus. *Journal of immunoassay & immunochemistry* 28:307-318.
- Niemz, A., T.M. Ferguson, et D.S. Boyle. 2011. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases. *Trends in biotechnology* 29:240-250.
- Nikiforov, T.T., R.B. Rendle, M.L. Kotewicz, et Y.H. Rogers. 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 and applications* 3:285-291.
- Noh, J., H.C. Kim, et T.D. Chung. 2011. Biosensors in microfluidic chips. *Topics in current chemistry* 304:117-152.

- Owczarzy, R., B.G. Moreira, Y. You, M.A. Behlke, et J.A. Walder. 2008. Predicting stability of DNA duplexes in solutions containing magnesium and monovalent cations. *Biochemistry* 47:5336-5353.
- Owczarzy, R., Y. You, C.L. Groth, et A.V. Tataurov. 2011. Stability and Mismatch Discrimination of Locked Nucleic Acid–DNA Duplexes. *Biochemistry* 50:9352-9367.
- Parham, N.J., F.J. Picard, R. Peytavi, M. Gagnon, G. Seyrig, P.A. Gagne, M. Boissinot, et M.G. Bergeron. 2007. Specific magnetic bead based capture of genomic DNA from clinical samples: application to the detection of group B streptococci in vaginal/anal swabs. *Clinical chemistry* 53:1570-1576.
- Peplies, J., F.O. Glöckner, et R. Amann. 2003. Optimization Strategies for DNA Microarray-Based Detection of Bacteria with 16S rRNA-Targeting Oligonucleotide Probes. *Appl Environ Microb* 69:1397-1407.
- Persing, D.H. 2011. Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practices. Amer Society for Microbiology,
- Peytavi, R., T. Liu-Ying, F.R. Raymond, K. Boissinot, L. Bissonnette, M. Boissinot, F.J. Picard, A. Huletsky, M. Ouellette, et M.G. Bergeron. 2005a. Correlation between microarray DNA hybridization efficiency and the position of short capture probe on the target nucleic acid. *BioTechniques* 39:89-96.
- Peytavi, R., F.R. Raymond, D. Gagne, F.J. Picard, G. Jia, J. Zoval, M. Madou, K. Boissinot, M. Boissinot, L. Bissonnette, M. Ouellette, et M.G. Bergeron. 2005b. Microfluidic device for rapid (<15 min) automated microarray hybridization. *Clin Chem* 51:1836-1844.
- Quinones, B., M.S. Swimley, A.W. Taylor, et E.D. Dawson. 2011. Identification of Escherichia coli O157 by using a novel colorimetric detection method with DNA microarrays. *Foodborne pathogens and disease* 8:705-711.
- Rahman, M.M., et A. Elaissari. 2012. Nucleic acid sample preparation for in vitro molecular diagnosis: from conventional techniques to biotechnology. *Drug discovery today* 17:1199-1207.
- Roche. cobas® EGFR Mutation Test In Roche website.
- Sambrook, J., et D.W. Russell. 2001a. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, A8.20.
- Sambrook, J., et D.W. Russell. 2001b. Southern Hybridization of Radiolabeled Probes to Nucleic Acids Immobilized on Membranes. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, A6.51.
- SantaLucia, J., Jr. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(4): p. 1460-5.
- SenGupta, D.J., et B.T. Cookson. 2010. SeqSharp: A general approach for improving cycle-sequencing that facilitates a robust one-step combined amplification and sequencing method. *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 12:272-277.
- Sibley, C.D., G. Peirano, et D.L. Church. 2012. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: current and potential application in diagnostic microbiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 12:505-521.
- Sidoti, F., M. Bergallo, C. Costa, et R. Cavallo. 2013. Alternative molecular tests for virological diagnosis. *Molecular biotechnology* 53:352-362.



- Siegrist, J., R. Peytavi, M.G. Bergeron, et M. Madou. 2009. Microfluidics for IVD analysis: Triumphs and hurdles of centrifugal platforms, Part 1: Molecular fundamentals. *In Vitro Diagnostics Technology*
- Siegrist, J., R. Peytavi, M.G. Bergeron, et M. Madou. 2010. Microfluidics for IVD analysis: Triumphs and hurdles of centrifugal platforms, Part 3: Challenges and solutions. *In Vitro Diagnostics Technology* 22-26.
- Singh, R., J. Nitsche, et S.T. Andreadis. 2009. An integrated reaction-transport model for DNA surface hybridization: implications for DNA microarrays. *Annals of biomedical engineering* 37:255-269.
- Song, Q., H. Yang, B. Zou, T. Kajiyama, H. Kambara, et G. Zhou. 2013. Improvement of LATE-PCR to allow single-cell analysis by pyrosequencing. *The Analyst* 138:4991-4997.
- Southern, E., K. Mir, et M. Shchepinov. 1999. Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics* 21:5-9.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98:503-517.
- Springer, T., H. Sipova, H. Vaisocherova, J. Stepanek, et J. Homola. 2010. Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study. *Nucleic acids research* 38:7343-7351.
- StrategicConsulting. 2009a. Industrial Microbiology Market Review 3rd Edition. In.
- StrategicConsulting. 2009b. Rapid Micro Methods are Growing at Twice the Rate of Market Growth. In.
- Teles, F.R.R., et L.P. Fonseca. 2008. Trends in DNA biosensors. *Talanta* 77:606-623.
- Tulpan, D. 2010. Recent patents and challenges on DNA microarray probe design technologies. *Recent patents on DNA & gene sequences* 4:210-217.
- Voet, D., et J. Voet. 2005. Biochimie. In Biochimie. D. Boeck, editor 1046.
- Wang, L., et P.C. Li. 2011. Microfluidic DNA microarray analysis: a review. *Analytica chimica acta* 687:12-27.
- Wang, L., C.J. Yang, C.D. Medley, S.A. Benner, et W. Tan. 2005. Locked nucleic acid molecular beacons. *Journal of the American Chemical Society* 127:15664-15665.
- Wang, L., W. Zhao, et W. Tan. 2008. Bioconjugated silica nanoparticles: Development and applications. *Nano Res.* 1:99-115.
- Watson, J.D., et F.H. Crick. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171:737-738.
- Weidner, D.A., B.C. Valdez, D. Henning, S. Greenberg, et H. Busch. 1995. Phosphorothioate oligonucleotides bind in a non sequence-specific manner to the nucleolar protein C23/nucleolin. *Febs Lett* 366:146-150.
- Weiss, S. 2000. Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy. *Nature structural biology* 7:724-729.
- Wong, M.L., et J.F. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39:75-85.
- Yin, Y., et X.S. Zhao. 2011. Kinetics and dynamics of DNA hybridization. *Accounts of chemical research* 44:1172-1181.
- Yoshie, T., L. Tang, et S.-Y. Su. 2011. Optical Microcavity: Sensing down to Single Molecules and Atoms. *Sensors* 11:1972-1991.

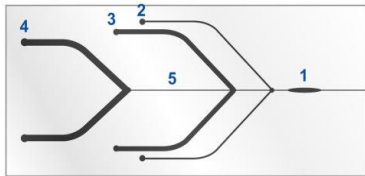


## **Annexe**

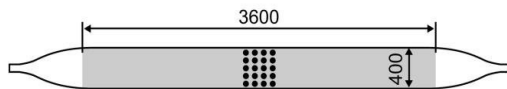


## Systèmes microfluidiques utilisés lors des expériences des chapitres 3, 4 et 5 :

**A**

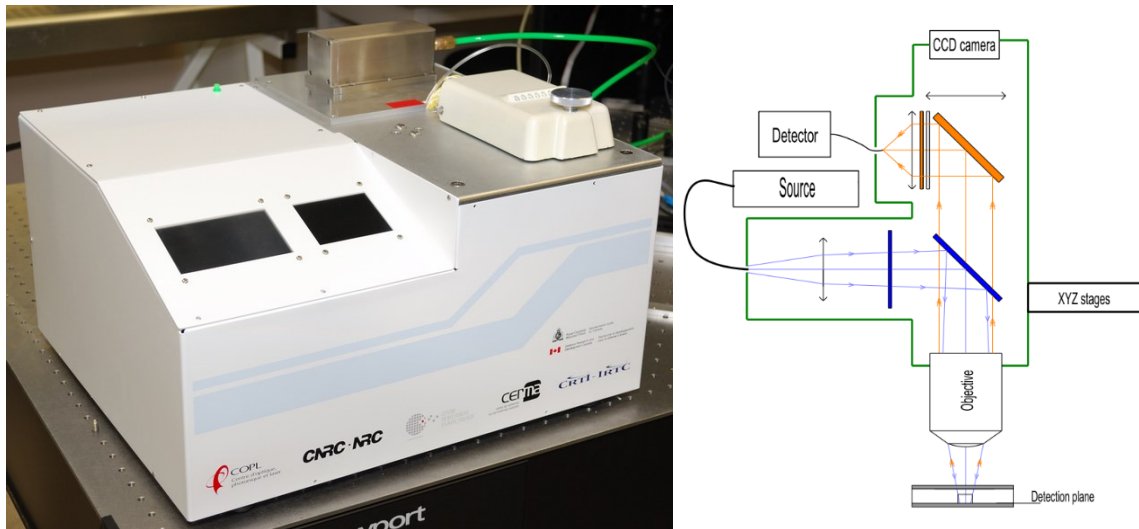


**B**

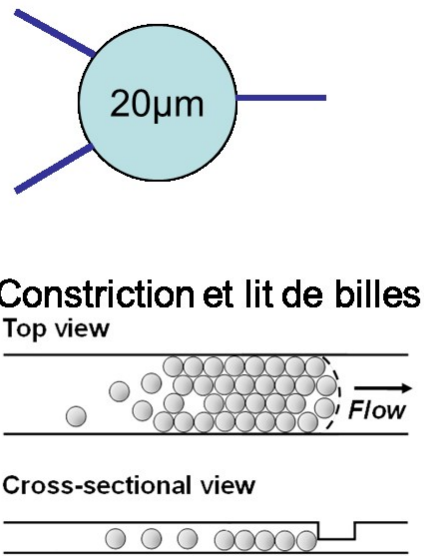


**Figure A1. Unité microfluidique.** **A**-Unité microfluidique en PDMS contenant une chambre d'hybridation (1), un réservoir de cibles à hybrider (2), un réservoir de solution de lavage (3), un réservoir de solution de rinçage (4) et un canal reliant toutes ces chambre vers une sortie du système microfluidique. **B**-Dimension en micromètre de la chambre d'hybridation et représentation à l'échelle des spots de biopuces.

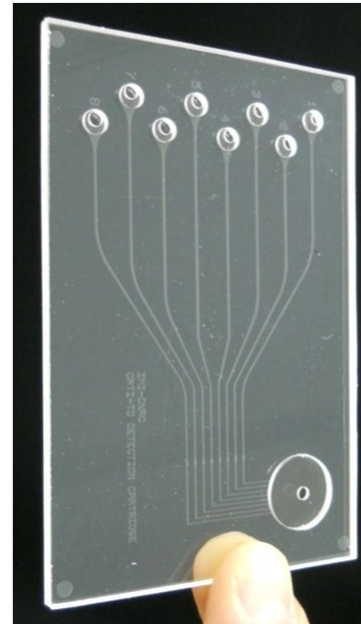
Les réservoirs 2, 3 et 4 possèdent des valves passives capillaires permettant de faire circuler séquentiellement les réactifs de ces chambres en utilisant la force centripète. L'unité microfluidique est apposée sur une lame de verre sur laquelle une biopuce a préalablement été imprimée. Le système microfluidique est par la suite inséré dans un disque de plastique qui servira à le faire tourner à des vitesses précises pendant un temps prédéterminé. Cette technologie a été utilisée pour certaines expériences des chapitres 3 et 4.



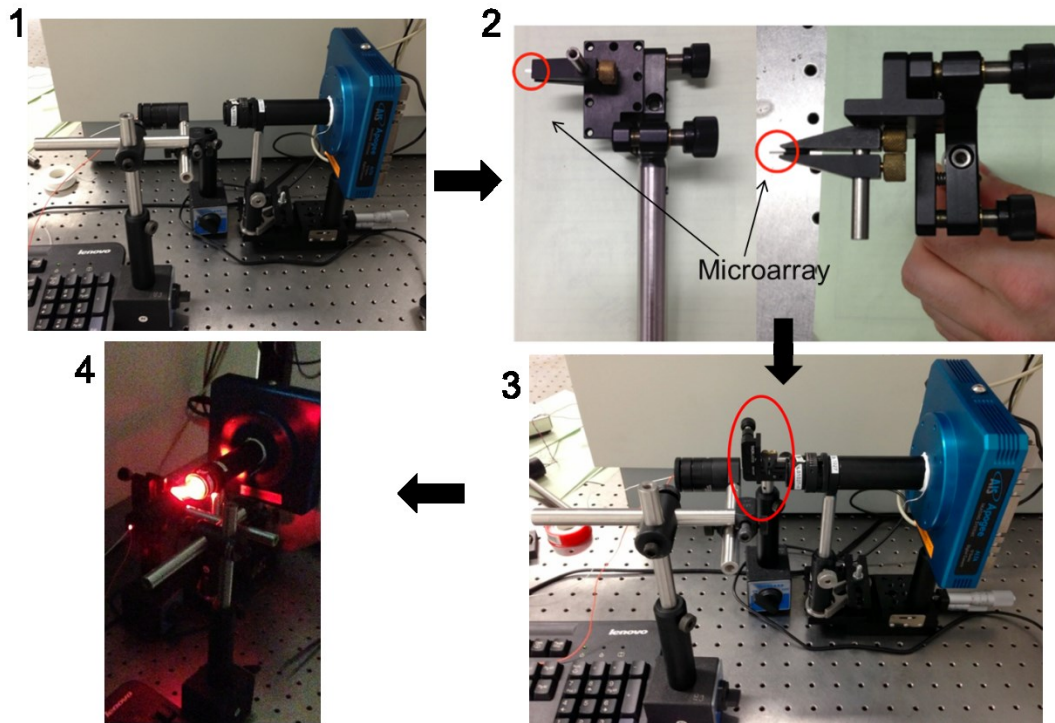
**Figure A2 : Instrument optique pour la détection en temps-réel d'hybridation sur microbilles.** Cet instrument a été conçu par l'équipe du Pr. Boudreau du COPL. Un écran tactile permet de sélectionner les paramètres de l'appareil. Un second écran permet de visualiser la formation du lit de bille et la présence/absence de liquide au niveau du site d'hybridation. Une entrée d'air pressurisée permet de contrôler le déplacement des liquides et billes en suspension dans les canaux microfluidiques. À droite de la figure est illustré le chemin optique de l'instrument. Cet instrument a été utilisé pour les expériences du chapitre 4



**Cartouche microfluidique**



**Figure A3 : Microbilles et cartouche microfluidique.** Représentation schématique d'une microbille de polystyrène couplée aux sondes de capture. Les microbilles fonctionnalisées sont par la suite inséré dans l'un des huit canaux d'une cartouche préalablement installée dans le système optique de la figure A2. Les billes forment un lit monocouche à la rencontre de la constriction présente dans le canal microfluidique. C'est ce lit de bille qui sert à l'hybridation et détection des cibles. Ce système fluide a servi aux expériences du chapitre 4.



**Figure A3 : Système de détection de l'OS. 1) Montage optique. 2) Pinces pour biopuce 3) Montage optique avec pinces et biopuces 4) Acquisition de fluorescence**

Ce montage optique a servi aux expériences du chapitre 5