



HAL
open science

Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR

Rémi Simon

► **To cite this version:**

Rémi Simon. Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR. Sciences pharmaceutiques. 2005. hal-01733314

HAL Id: hal-01733314

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733314v1>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

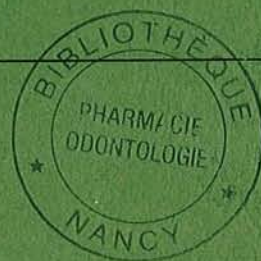
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

2005

FACULTE DE PHARMACIE



Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 07 décembre 2005

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Rémi SIMON

né le 15 septembre 1980

26 22864

Membres du Jury

Président :	M. A. NICOLAS	Professeur Faculté de Pharmacie, Nancy
Juges :	Mme N. MARTINET	Directeur de Recherche INSERM CRB Faculté de Médecine, Vandoeuvre Lès Nancy
	Mme M. DONNER	Directeur de Recherche INSERM CRB Faculté de Médecine, Vandoeuvre Lès Nancy
	Mme M.C. CARRE	Chargée de Recherche INSERM, DCPR, Nancy
	M. F. BAROS	Chargé de Recherche CNRS, DCPR, Nancy

BU PHARMA-ODONTOL



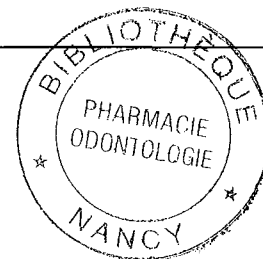
D

104 071876 9

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY 1

2005

FACULTE DE PHARMACIE



Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 07 décembre 2005

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Rémi SIMON

né le 15 septembre 1980

DS 32564

Membres du Jury

Président :	M. A. NICOLAS	Professeur Faculté de Pharmacie, Nancy
Juges :	Mme N. MARTINET	Directeur de Recherche INSERM CRB Faculté de Médecine, Vandoeuvre Lès Nancy
	Mme M. DONNER	Directeur de Recherche INSERM CRB Faculté de Médecine, Vandoeuvre Lès Nancy
	Mme M.C. CARRE	Chargée de Recherche INSERM, DCPR, Nancy
	M. F. BAROS	Chargé de Recherche CNRS, DCPR, Nancy

Membres du personnel enseignant 2005/2006

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mlle IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

Mme POCHON Marie-France

Mme ROVEL Anne

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

Mlle BATT Anne-Marie

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mlle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

Mme LARTAUD Isabelle

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LALLOZ Lucien

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand (Professeur associé)

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Toxicologie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Pharmacologie

Pharmacognosie

Chimie organique

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

Chimie analytique

Chimie Thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Droit officinal, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIYOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

Le travail présenté dans ce document a été mené à bien grâce à la bienveillance des personnes suivantes à qui je tiens à témoigner ma reconnaissance :

Alain NICOLAS, Professeur

pour avoir accepté d'assurer la présidence du jury et pour m'avoir accordé sa confiance et ses conseils tout au long de ce travail

Marie-Christiane CARRE et **Francis BAROS**, Chargés de Recherche,
pour leur aide, leur disponibilité, leur soutien et leurs précieuses explications

Mireille DONNER et **Nadine MARTINET** Directeurs de Recherche,
pour leurs propositions et conseils sur ce travail

Marie-Laure VIRIOT et **Gabriel WILD** Directeurs de Recherche,
pour leur accueil au sein du laboratoire DCPR du groupe ENSIC Nancy

Je remercie également :

Mes parents,

pour la grande confiance qu'ils m'ont témoignée et leur soutien sans faille durant toutes ces années

Mon frère,

pour m'avoir épaulé et guidé à travers ces longues études

Ma sœur,

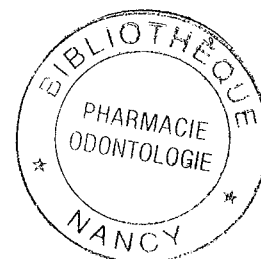
pour sa gentillesse, son affection et sa franchise

Et enfin, pour leur soutien et les excellents moments passés durant ces 7 dernières années :

Les Pinders : Juju, Poupe, Vivi, JP, Mat, Jaja, Adeline, Sarah, P'tit bout, Bézu, Ben, Stouff, Charles...

Les Pharma + : Vincent, Manu, Max, Marc, Béné, Nico, Stéphane, Nabil, Pascal, Pierre-Olivier et Aude.

Sommaire



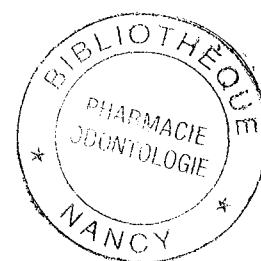
Introduction	7
I. Analyse bibliographique.....	9
I.1. Fluorescence et inhibition de fluorescence (Quenching)	9
I.1.1. Mécanisme de fluorescence	9
I.1.2. Principe de l'inhibition de fluorescence.....	12
I.2. Les balises moléculaires : principe et applications	13
I.2.1. Définition	13
I.2.2. Principe	13
I.2.3. Spécificité des balises	16
I.2.3.1. Hybridation de la sonde	16
I.2.3.2. Aspect thermodynamique de l'hybridation.....	17
I.2.3.3. Choix du fluorophore et de l'inhibiteur	17
I.2.4. Les cassettes FRET	18
I.2.5. Applications	21
I.2.5.1. PCR en temps réel (« Real Time PCR »).....	21
I.2.5.1.1. Principe de la PCR (« Polymerase Chain Reaction »)	21
I.2.5.1.2. Appareillage et méthode	26
I.2.5.1.3. Détection en temps réel : la PCR en « temps réel »	28
I.2.5.1.4. Techniques de détection en PCR en temps réel	29
I.2.5.2. Méthodes analytiques et nouveaux agents thérapeutiques	35
I.2.5.2.1. Les balises moléculaires catalytiques.....	35
I.2.5.2.2. Analyses génétiques.....	37
I.2.5.2.3. Détection de pathogènes	39
I.2.5.2.4. Interactions Acide Nucléique - Protéine	40
I.2.5.3. Autres applications et perspectives	41
II. Matériel et méthodes	43
II.1. Matériel	43
II.1.1. Spectroscopie UV-Visible	43
II.1.1.1. Définition.....	43
II.1.1.2. Principe de la technique.....	43
II.1.1.3. Appareillage	44
II.1.2. Spectrofluorimétrie	45
II.1.2.1. Principe.....	45
II.1.2.2. Description de l'appareil utilisé.....	46
II.1.2.3. Contraintes spécifiques.....	47
II.2. Présentation des expériences et exploitations	49
II.2.1. Objectifs.....	49
II.2.2. Inhibition de fluorescence.....	49
II.2.3. Transferts d'énergie radiatifs	49
II.3. Caractéristiques des solutions de travail.....	52
III. Résultats et interprétation	54

III.1. Objectifs	54
III.2. Composés étudiés	54
III.2.1. Rouge de Méthyle.....	54
III.2.2. Etude de deux coumarines en C8 et C12 (C8-Cou et C12-Cou)	56
III.2.2.1. Coumarine en C8 (C8-Cou)	56
III.2.2.2. Coumarine en C12 (C12-Cou)	57
III.2.3. O-Coumarine et N-Coumarine	60
III.2.4. CN-Coumarine	62
III.2.5. CDOH.....	64
III.2.5.1. Etude spectrale	64
III.2.5.2. Etude de stabilité	65
III.3. Etude d'inhibitions de fluorescence	68
III.3.1. Objectifs	68
III.3.2. Inhibition de fluorescence par les halogénures.....	68
III.3.2.1. Etude de l'influence de KI sur la fluorescéine	68
III.3.2.1.1. Objectif.....	68
III.3.2.1.2. Conditions expérimentales	69
III.3.2.1.3. Résultats	70
III.3.2.2. Etude de l'influence de KI sur la fluorescence d'un 'rotor' moléculaire	72
III.3.2.2.1. Objectif.....	72
III.3.2.2.2. Conditions expérimentales et résultats	72
III.3.2.3. Etude de l'influence de l'iodure de tétrabutylammonium sur la fluorescéine.....	73
III.3.2.3.1. Objectif.....	73
III.3.2.3.2. Conditions expérimentales	73
III.3.2.3.3. Résultats	74
III.3.2.4. Etude de l'influence du Bromure de Potassium (KBr) sur la fluorescéine.....	75
III.3.2.4.1. Objectif.....	75
III.3.2.4.2. Conditions expérimentales et résultats	76
III.3.2.4.2.1. Etude dans l'eau distillée.....	76
III.3.2.4.2.2. Etude dans une solution tampon pH = 10	77
III.3.3. Inhibition de fluorescence par le rouge de méthyle.....	79
III.3.3.1. Objectifs	79
III.3.3.2. Etude de l'influence du rouge de méthyle sur la C12-Cou	79
III.3.3.3. Etude de l'influence du Rouge de Méthyle sur le CDOH	81
III.4. Transferts de fluorescence	84
III.4.1. Objectifs	84
III.4.2. Interactions entre N-Cou, O-Cou et fluorescéine	84
III.4.2.1. Objectifs	84
III.4.2.2. Etude des interactions entre la N-Ethyl Coumarine et la fluorescéine	84
III.4.2.3. Etude des interactions entre la O-Coumarine et la fluorescéine.....	89
III.4.2.4. Etude des interactions entre la N-Ethyl Coumarine et la O-Coumarine.....	93
III.4.3. Etude de l'influence de la N-Coumarine sur la C12 Coumarine	99
III.4.4. Etude de l'influence de CN-Cou sur C12-Cou	101
III.4.5. Etude de l'influence de CDOH sur la N-Cou	104
III.4.6. Conclusion	108
Conclusion	110
Annexe	111
Bibliographie	116

Table des illustrations

Figure 1 : Diagramme de Jablonski.....	9
Figure 2 : Spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore	11
Figure 3 : Exemple de structure d'un « beacon » (Tyagi et al., 1996).....	14
Figure 4 : Principe de l'émission de fluorescence en cas d'hybridation (Tyagi et al., 1996).....	15
Figure 5 : Deux modes de transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur (Skene et al., 2004).....	20
Figure 6 : Modes d'actions d'une balise moléculaire simple et d'une balise possédant une structure de type « FRET ».....	21
Figure 7 : Première étape de PCR : la dénaturation	23
Figure 8 : Deuxième étape de PCR : l'hybridation	23
Figure 9 : Troisième étape de PCR : l'élongation	24
Figure 10 : Deuxième cycle de PCR : apparition des copies cibles	25
Figure 11 : Evolution de la température au cours des cycles de PCR	27
Figure 12 : Un outil de PCR en temps réel : l'appareil ICYCLER de Bio-rad	27
Figure 13 : Exemple des « balises scorpions ».....	34
Figure 14 : Exemple de la technologie <i>Sunrise Primers</i> (Nazarenko et al., 1997 ; Myakishev et al., 2001).....	34
Figure 15 : Mode d'action d'une balise moléculaire catalytique (Stojanovic et al., 2001).....	36
Figure 16 : Spectres obtenus après hybridation de la sonde (Stojanovic et al., 2001)	37
Figure 17 : Génotypages spectraux de 179 échantillons d'ADN humain pour la présence de l'allèle CCR5Δ32 (Kostrikis et al., 1998)	38
Figure 18 : Génotypages spectraux de 45 échantillons (Kostrikis et al., 1998)	39
Figure 19 : Fixation et activation d'une balise moléculaire par une protéine (Li et al., 2000)	41
Figure 20 : Etude d'isoenzymes et d'enzymes d'origines variées avec les balises moléculaires (Fang et al., 2000)	41
Figure 21 : Schéma d'un spectrophotomètre UV-Visible	44
Figure 22 : Spectrophotomètre Lambda EZ 210 Perkin Elmer	45
Figure 23 : Spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog 2, Jobin Yvon	46
Figure 24 : Exemple de recouvrement de spectres.....	50
Figure 25 : Formule développée du rouge de méthyle.....	55
Figure 26 : Spectre d'absorption du rouge de méthyle.....	55
Figure 27 : Formule développée de la C8-Coumarine	56
Figure 28 : Influence de la longueur d'onde d'excitation sur le spectre d'émission de la C8-Cou.....	57
Figure 29 : Formule développée de la C12-Coumarine	57
Figure 30 : Influence de la longueur d'onde d'excitation et du milieu	58
Figure 31 : Spectres d'excitation et d'émission de la C12-Cou	59
Figure 32 : Formules développées des coumarines utilisées.....	60
Figure 33 : Spectres UV et de fluorescence de la O-Cou.....	61
Figure 34 : Spectres UV et de fluorescence de la N-Cou.....	61
Figure 35 : Formule développée de la CN-Cou	62
Figure 36 : Spectres d'excitation et d'émission de la CN-Coumarine	63
Figure 37 : Spectres d'excitation et d'émission de la CN-Coumarine	63
Figure 38 : Formule développée de la CDOH.....	64
Figure 39 : Spectres UV et de fluorescence du CDOH 5 10 ⁻⁶ M	65
Figure 40 : Etude de stabilité de la molécule CDOH après passage à 95 °C ($\lambda_{exc} = 486 \text{ nm}$).....	66
Figure 41 : Spectre UV de la molécule CDOH avant et après passage à 95 °C (21 min)	67
Figure 42 : Formule développée de la fluorescéine	68
Figure 43 : Spectres UV et de fluorescence de la fluorescéine	69
Figure 44 : Courbe de Stern-Volmer (KI sur fluorescéine) et pente à l'origine.....	71
Figure 45 : Formule développée du rotor moléculaire utilisé, le DMAPB	72
Figure 46 : Courbe de Stern-Volmer (TBAI sur fluorescéine) et pente à l'origine.....	75
Figure 47 : Courbe de Stern-Volmer (KBr sur fluorescéine) et pente à l'origine	77
Figure 48 : Courbe de Stern-Volmer (KBr sur fluorescéine) et pente à l'origine	78
Figure 49 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / MR.....	80
Figure 50 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers MR) et pente à l'origine.....	81
Figure 51 : Spectres d'émission du mélange CDOH / MR	82
Figure 52 : Courbe de Stern-Volmer (CDOH vers MR ; solvant : éthanol).....	83
Figure 53 : Principe du transfert d'énergie entre la N-Cou et la fluorescéine	85

Figure 54 : Spectres d'émission du mélange N-Cou / Fluorescéine.....	86
Figure 55 : Mise en évidence de l'effet de filtre interne	87
Figure 56 : Inhibition de fluorescence de la N-Cou par la fluorescéine.....	88
Figure 57 : Courbe de Stern-Volmer (fluorescéine sur N-Cou) et pente à l'origine	89
Figure 58 : Principe du transfert d'énergie entre la O-Cou et la fluorescéine	90
Figure 59 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / Fluorescéine.....	91
Figure 60 : Courbe de Stern-Volmer (fluorescéine sur O-Cou).....	92
Figure 61 : Principe du transfert d'énergie entre la O-Cou et la N-Cou.....	93
Figure 62 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / N-Cou	94
Figure 63 : Courbe de Stern-Volmer (O-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine	95
Figure 64 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / N-Cou.....	97
Figure 65 : Courbe de Stern-Volmer (O-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine	98
Figure 66 : Principe du transfert d'énergie entre la C12-Cou et la N-Cou.....	99
Figure 67 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / N-Cou	100
Figure 68 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine	101
Figure 69 : Principe du transfert d'énergie entre la C12-Cou et la CN-Cou	102
Figure 70 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / CN-Cou.....	103
Figure 71 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers CN-Cou) et pente à l'origine.....	104
Figure 72 : Principe du transfert d'énergie entre la N-Cou et le CDOH	105
Figure 73 : Spectres d'émission du mélange N-Cou / CDOH.....	106
Figure 74 : Courbe de Stern-Volmer (CDOH sur N-Cou) et pente à l'origine	107



Introduction

La recherche de fragments d'ADN dans les milieux biologiques est l'objet de nombreuses études et de nouvelles avancées sont effectuées chaque jour. Le besoin de détecter ces fragments d'ADN découle directement des dernières découvertes sur les relations pouvant exister entre les gènes et de nombreuses maladies. Outre les affections génétiques, de plus en plus de chercheurs pensent que de nombreux types de cancer ont une origine génétique intrinsèque, et il semble maintenant intéressant d'être capable de détecter avant l'apparition des premiers symptômes ces facteurs génétiques prédictifs d'un risque. La possibilité d'atteindre et d'analyser le matériel génétique dans les cellules vivantes ouvre également de grands espoirs dans de nouvelles formes de thérapie.

Depuis quelques années, une nouvelle génération de sondes oligonucléotidiques est apparue : les balises moléculaires ou « Molecular beacons ». Ces sondes présentent la particularité de n'être détectables (par fluorescence) que lorsqu'elles se sont appariées avec le fragment d'ADN recherché, ce qui constitue une avancée majeure dans ce domaine. Les espoirs d'applications variées et leur relative simplicité d'obtention font d'elles une source d'engouement pour la communauté scientifique.

Notre recherche concerne l'étude de traceurs fluorescents pouvant être incorporés dans des balises moléculaires. Elle est réalisée en collaboration avec le Dr N. Martinet, DR INSERM et le Dr M. Donner, DR INSERM qui développent ces outils moléculaires (conception et validation des sondes) dans la technologie de RTPCR ("*Polymerase Chain Reaction*" en temps réel) pour détecter et mesurer les ARNm des récepteurs de rétinoïdes avec comme application la détection précoce des cancers bronchiques.

Dans la série d'expériences présentées dans cet exposé, nous nous sommes attachés dans un premier temps à tester de façon simple l'efficacité de l'extinction de fluorescence exercée par des inhibiteurs (« quencher ») sur des fluorophores divers. En effet, la technique des balises repose essentiellement sur une inhibition de fluorescence tant que la sonde n'est pas hybridée avec sa cible. Aussi, plusieurs séries d'expériences ont été réalisées afin de trouver le meilleur couple inhibiteur - fluorophore en vue de le greffer dans un deuxième temps sur une sonde oligonucléotidique adaptée. Une autre partie de cet exposé s'attache à la

recherche de couples donneur - accepteur présentant les caractéristiques optimales dans la réalisation de molécules complexes connues sous le nom de cassettes FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer »), et qui présentent plusieurs avantages sur les fluorophores simples.

I. Analyse bibliographique

I.1. Fluorescence et inhibition de fluorescence

(Quenching)

I.1.1. Mécanisme de fluorescence

Les fluorophores se trouvent à la base dans un état énergétique stable. Généralement l'excitation de la plupart des molécules s'effectue par l'absorption de photons dans une gamme de longueur d'onde s'échelonnant du visible à l'ultraviolet. La fluorescence est alors l'émission de photons qui se produit lors de la transition de la molécule de l'état électronique excité singlet S_1 vers l'état fondamental S_0 .

Le diagramme de Jablonski représenté sur la figure 1 illustre l'absorption et l'émission de photons par une molécule fluorescente.

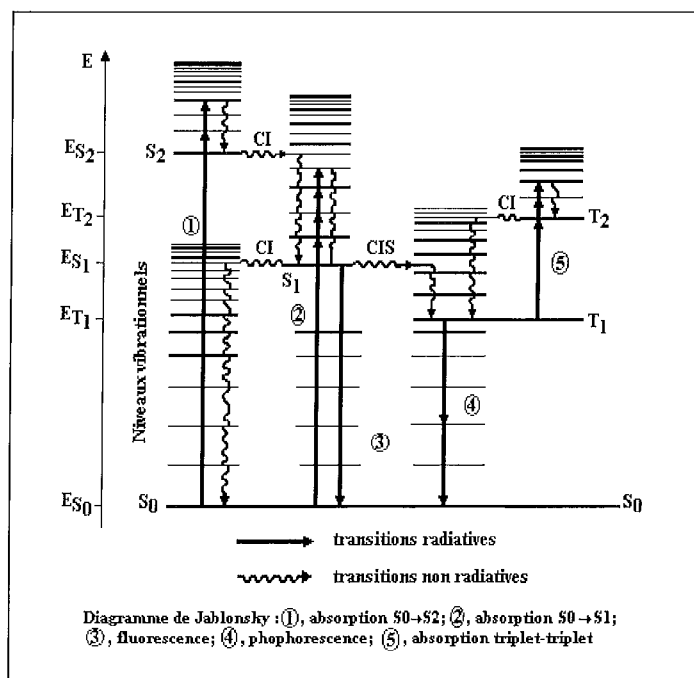


Figure 1 : Diagramme de Jablonski

Plus précisément, le processus d'absorption d'un photon (d'énergie $h\nu_{EX}$) par un fluorophore entraîne un électron sur un niveau S_1 ou S_2 . A température ambiante, la molécule retombe

rapidement vers l'état de vibration le plus bas de S_1 : ce processus est appelé conversion interne.

Plusieurs évolutions sont alors possibles :

- **la molécule retombe vers l'état fondamental S_0 et émet un photon de fluorescence** : l'état excité dure généralement un temps très limité et fini de l'ordre de la nanoseconde. Pendant ce temps la molécule subit des changements conformationnels et elle est sujette à de multiples interactions avec son environnement. L'énergie de S_1 est partiellement dissipée soit sous forme de chaleur ou bien par transfert d'énergie entre les molécules du milieu. La molécule possède donc une énergie interne plus faible que l'énergie initiale, après excitation.

Un photon ($h\nu_{EM}$) est ensuite réémis, permettant à la molécule de retourner à son état énergétique fondamental S_0 . Du fait de la dissipation d'énergie pendant l'état d'excitation, l'énergie du photon réémis est plus basse et donc la longueur d'onde est plus élevée. La différence d'énergie ($h\nu_{EX}-h\nu_{EM}$) représente *le déplacement de Stokes* qui est fondamental dans le choix des filtres de récupération de la fluorescence réémise.

- **la molécule passe vers l'état triplet T_1 par une transition non radiative**. Le retour de T_1 à S_0 peut s'accompagner de l'émission d'un photon de phosphorescence. On notera que la probabilité de passage de S_1 à T_1 est nettement plus faible que la désexcitation radiative S_1 vers S_0 .

- **la molécule revient dans son état fondamental sans émission de photons**. Ces transitions non radiatives sont plus ou moins fréquentes en fonction de divers paramètres liés à l'environnement direct de la molécule.

Les techniques de fluorescence présentent plusieurs avantages :

- Possibilité de doser des quantités très faibles de manière très sélective.
- Sensibilité 1000 à 1500 fois plus grande que l'absorbance moléculaire.
- Spécificité relative au choix des paramètres (longueurs d'onde d'excitation et d'émission de la fluorescence) : limite les effets d'interférence d'autres composés.
- Possibilité d'association avec un système d'analyse en flux.

Le fluorophore est une substance ajoutée dans le milieu et qui possède des propriétés de fluorescence et une capacité à se lier à tout ou partie des éléments recherchés dans le milieu rendant ainsi possible leur détection. Un fluorophore est caractérisé par deux spectres : son spectre d'absorption (de la lumière incidente) et son spectre d'émission de fluorescence (Figure 2).

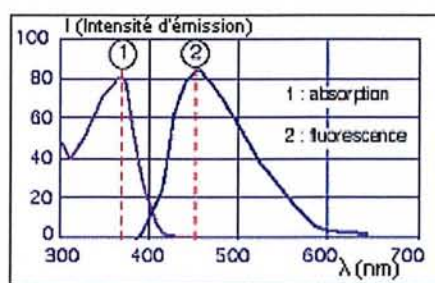


Figure 2 : Spectres d'excitation et d'émission d'un fluorophore

On remarquera une symétrie entre les spectres d'excitation (absorption) et d'émission d'un composé : en effet, la fluorescence prend toujours place à partir de l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité (Règle de Kasha). Les spectres d'absorption et d'émission sont bien évidemment caractéristiques de la molécule étudiée.

Il existe plusieurs techniques de détection de substances dans les milieux : il est souvent possible d'utiliser les propriétés intrinsèques de fixation sur sa cible du fluorophore pour effectuer cette détection. Par exemple, de nombreux fluorophores peuvent se fixer directement sur les brins d'ADN ou d'ARN ce qui permet une analyse rapide et très sensible. Parfois, certains fluorophores nécessitent d'être clivés en partie pour émettre de la fluorescence. Cette propriété est utile pour rechercher une activité enzymatique dans le milieu. Enfin, le fluorophore peut être fixé à une autre molécule douée des capacités de fixation à la cible recherchée.

On définit également le rendement quantique Φ comme étant le rapport de l'intensité émise sur l'intensité absorbée par le fluorophore. Ce rapport, compris entre 0 et 1, est caractéristique de la molécule et dépend très fortement du solvant dans lequel les mesures sont effectuées. Ainsi, il est possible d'exprimer l'intensité de fluorescence F en fonction de ce paramètre :

$$F = I_0(\lambda)(1 - 10^{-\varepsilon_\lambda cl})\Phi$$

Avec I_0 l'intensité du faisceau d'excitation incident, ε est le coefficient d'extinction molaire ($\text{L.Mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l l'épaisseur traversée par la lumière (cm), et c la concentration de la substance étudiée (Mole.L^{-1}). On remarquera que le terme entre parenthèses peut être approximé au moyen d'un développement limité en série de Taylor au voisinage de 0 (concentration c faible), l'intensité de fluorescence peut alors se réécrire :

$$F = I_0(\lambda)(2,303\varepsilon_\lambda cl)\Phi$$

Ceci montre qu'il existe une relation de proportionnalité entre l'intensité de fluorescence et la concentration tant que celles-ci sont suffisamment faibles.

I.1.2. Principe de l'inhibition de fluorescence

Dans certaines conditions, l'émission de fluorescence peut être réduite voire complètement inhibée par une autre molécule du milieu, appelée également « quencher ». Cette inhibition se fait principalement par transfert direct d'énergie entre le fluorophore venant de recevoir un photon et un composé qui ne va pas réémettre de photons (inhibiteur), ou qui va réémettre avec une autre longueur d'onde que celle du photon d'émission du fluorophore donneur. Il est possible d'utiliser cette propriété dans de nombreuses techniques d'analyse, comme nous le verrons par la suite.

L'inhibition de l'émission de fluorescence d'une particule A par une particule B, sous une excitation continue est décrite par la relation de Stern-Volmer (à faible concentration en inhibiteur) :

$$\frac{I_F^0}{I_F} = 1 + k\tau[B] = 1 + k_{SV}[B]$$

où I_F^0 et I_F sont les intensités de fluorescence respectivement en absence ou en présence de l'inhibiteur à la concentration $[B]$, τ le temps de vie de l'état excité et k la 'constante' de cette réaction (Baros et *al.*, 1990 ; Lakowicz, 1999).

En fait, de nombreux paramètres du milieu d'analyse peuvent faire varier cette inhibition : on peut citer par exemple la viscosité, la permittivité relative ou encore la force ionique du milieu.

Le facteur $k\tau$ devient ensuite dépendant de $[B]$ et la droite devient une courbe pour les grandes valeurs de concentration en inhibiteur.

Dans la série d'expériences présentées au paragraphe III, c'est en fait le produit $k\tau$ ou k_{SV} (Constante de Stern-Volmer) qui est mesuré par extrapolation graphique de cette droite tangente à l'origine.

I.2. Les balises moléculaires : principe et applications

I.2.1. Définition

Les structures moléculaires appelées beacons (Molecular Beacons ou balises moléculaires) sont une nouvelle génération de sondes oligonucléotidiques qui reconnaissent et indiquent la présence d'un acide nucléique en solution. Quand elles s'hybrident sur leur cible, ces sondes changent de conformation et fluorescent spontanément. Seule une homologie parfaite permet la fluorescence. Ces sondes sont donc parfaitement adaptées au suivi d'amplification d'acide nucléique et à la détection de gènes, le tout dans un tube scellé.

I.2.2. Principe

Cette méthode joue sur les propriétés des acides nucléiques de s'apparier avec leur complémentaire. La sonde oligonucléotidique simple brin a une structure en épingle à cheveux avec une tige et une boucle. La boucle est la séquence complémentaire de l'acide nucléique, cible à analyser (de 15 à 35 nucléotides). La tige est formée de deux brins complémentaires (de 5 à 8 nucléotides). Un fluorophore est attaché à l'extrémité de l'un des brins de la tige. Une molécule qui éteint la fluorescence (inhibiteur ou quencher) est attachée en vis-à-vis à l'extrémité de l'autre brin. L'oligonucléotide est conçu de telle sorte qu'en

l'absence de la cible, la molécule forme une épingle à cheveux qui amène le groupe fluorescent et l'inhibiteur à proximité physique ayant pour résultat l'extinction efficace du fluorophore. Quand la sonde rencontre son complémentaire, il se forme un hybride qui est plus long et plus stable que la petite partie en tige. Les deux molécules sont maintenant physiquement séparées et le fluorophore fluoresce sous UV.

Ces sondes ont été appelées «Molecular beacons» littéralement «feu d'alarme moléculaire» car il n'y a émission de lumière que s'il y a hybridation. La sonde non hybridée reste dans le milieu réactionnel sans provoquer de fluorescence parasite.

Dans l'exemple représenté sur la figure 3, la balise moléculaire forme une structure d'épingle à cheveux avec le fluorophore EDANS sur l'extrémité 5' et le quencher Dabcyl sur l'extrémité 3'. Dans cet état, le fluorophore est à proximité du quencher ; l'énergie libérée par le fluorophore est capturée par l'inhibiteur qui absorbe cette énergie sans émission de signal fluorescent.

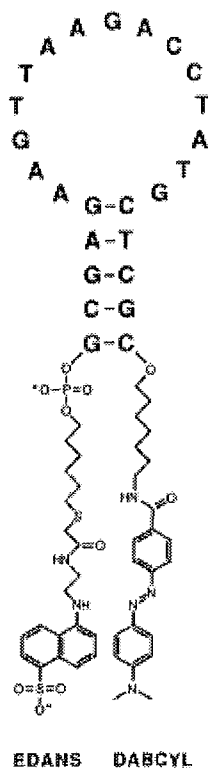


Figure 3 : Exemple de structure d'un « beacon » (Tyagi et al., 1996)

En présence de la séquence complémentaire, l'hybridation a pour résultat la rupture de la structure d'épingle à cheveux. Dans cette nouvelle conformation, le groupe fluorescent n'est plus à proximité physique du groupe inhibiteur et l'émission de fluorescence peut se faire (Figure 4).

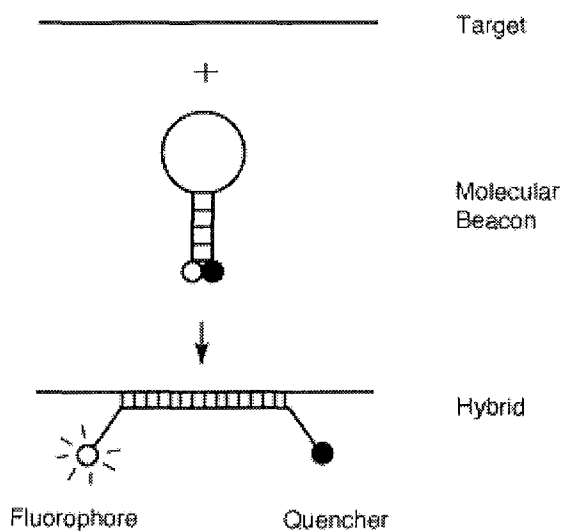


Figure 4 : Principe de l'émission de fluorescence en cas d'hybridation (Tyagi et al., 1996)

Il existe d'autres types de molécules semblables à celle-ci : par exemple, citons les « balises scorpions » qui sont utilisées en PCR (« Polymerase Chain Reaction »). Elles portent ce nom car elles se recourbent sur elles-mêmes. Une des amorces PCR et la sonde fluorescente sont liées. La fluorescence de la sonde ne sera exprimée que par un changement de structure obtenue avec la synthèse PCR (§ 1.2.5.1.4).

Les balises moléculaires ont l'avantage de pouvoir se fixer sur un tube, une plaque ou une bandelette de test. Elles offrent donc la possibilité de détecter plusieurs réactions en fonction de la position de l'émission de lumière. Ceci est très intéressant pour les diagnostics de maladie génétique impliquant plusieurs allèles spécifiques. Elles offrent aussi la possibilité de suivre l'expression d'ARN messenger dans la cellule vivante.

I.2.3. Spécificité des balises

I.2.3.1. Hybridation de la sonde

L'hybridation d'une séquence d'acides nucléiques à sa séquence complémentaire recherchée est un événement hautement spécifique. À la différence d'autres systèmes à reconnaissance fortement spécifique (tels que les complexes antigène/anticorps, par exemple), ces systèmes basés sur des sondes nucléiques peuvent être conçus pour identifier et détecter n'importe quelle cible désirée avec presque n'importe quel degré de spécificité et peuvent de plus être chimiquement produits avec une relative facilité.

Ces oligonucléotides synthétiques peuvent être rendus très spécifiques pour n'importe quelle séquence désirée : en changeant la longueur, l'ordre et les conditions d'hybridation, une sonde de cette nature peut identifier et surtout quantifier la présence de sa séquence complémentaire dans un mélange hétérogène et peut même distinguer des polymorphismes simples de nucléotide.

Pour permettre la détection de l'hybridation, il a été nécessaire d'apporter à la sonde certaines modifications. Traditionnellement, ceci a impliqué le marquage avec des 'étiquettes' moléculaires radioactives, fluorescentes ou autres petites molécules (telles que la biotine ou la digoxigénine). Dans ce cas-ci, les sondes liées et non liées sont susceptibles d'être détectées et une étape de lavage du milieu des sondes libres doit donc être effectuée. Les sondes non liées peuvent être enlevées par dilution (de la même manière que pour les étapes de lavage de post-hybridation utilisées dans les techniques Southern Blot ou Northern Blot). La sonde non liée peut également être enlevée par digestion en utilisant par exemple des nucléases. Bien qu'efficaces, ces méthodes perturbent toutefois l'état d'équilibre de l'hybridation et excluent la détection en temps réel de l'hybridation. De plus, de telles méthodes ne sont pas appropriées pour l'usage *in vivo*.

Les balises sont donc une amélioration récente dans la conception de sondes oligonucléotidiques qui permettent la détection en temps réel des hybridations d'acide nucléique *in vitro* (Tyagi et Kramer, 1996 ; Kostrikis *et al.*, 1998 ; Tyagi *et al.*, 1998). L'hybridation d'une balise à sa cible complémentaire conduit à un changement discernable de

conformation qui présente un faible bruit de fond et élimine donc la nécessité d'étapes de lavage ou de dégradation des sondes non liées.

I.2.3.2. Aspect thermodynamique de l'hybridation

La température et les effets de sels jouent un rôle important dans ces techniques de détection. En règle générale, la température de dissociation de la structure en épingle à cheveux devrait être 7 à 10°C plus élevée que la température de détection. De même, la température de dissociation de l'hybride devrait également être 7 à 10°C plus élevée que la température de détection.

Une caractéristique fondamentale des balises est qu'un hybride parfait sonde-cible sera énergétiquement plus stable que la structure en épingle à cheveux, tandis qu'un hybride mal lié sera énergétiquement moins stable que la structure en épingle à cheveux. Ainsi, thermodynamiquement, ces différentes formes ne peuvent pas coexister dans le milieu ; cette caractéristique est la base de la spécificité extraordinaire offerte par les balises (Bustin, 2000). Elle constitue donc une technologie efficace pour la détection et le criblage à grande échelle des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Tyagi et *al.*, 1998 ; Mhlanga et Malmberg, 2001).

Dans la pratique, les balises sont constituées d'une vingtaine de bases, dont 5 ou 7 servent à l'appariement formant la structure en épingle à cheveux. Les balises avec un bras d'appariement court ont des cinétiques d'hybridation plus rapides, mais le signal est plus fortement perturbé par un bruit de fond plus marqué. Le nucléotide positionné juste avant le fluorophore doit être choisi avec attention car les nucléotides présentent eux-mêmes un certain pouvoir d'inhibition : G>A>C>T (Drake et Tan, 2004).

I.2.3.3. Choix du fluorophore et de l'inhibiteur

Une première difficulté rencontrée dans la conception de ces structures est le choix de l'inhibiteur (« quencher »). En effet, celui-ci doit être capable d'inhiber correctement le fluorophore et doit évidemment posséder les fonctions permettant sa fixation sur la sonde

oligonucléotidique. Il faut souligner que l'inhibiteur doit être près ou directement en contact avec le fluorophore pour que le transfert d'énergie et donc l'extinction puissent être efficaces.

L'inhibiteur le plus utilisé est l'acide 4-(4'-diméthylaminophénylazo) benzoïque (DABCYLE). Ce composé est considéré comme un inhibiteur universel pour de nombreux fluorophores (Tyagi *et al.*, 1998) ; il inhibe de façon optimale la fluorescéine, mais son efficacité décroît largement pour des fluorophores émettant à de plus grandes longueurs d'onde. Récemment, des particules métalliques ont prouvé leur efficacité inhibitrice et plus particulièrement les particules d'Or (1-4 nm de diamètre) (Dubertret *et al.*, 2001) dont l'utilisation dans la technologie des beacons offre une plus grande sensibilité que les balises conventionnelles pour la détection des SNP (Single Nucleotid Polymorphism).

Beaucoup de fluorophores peuvent être employés avec ces inhibiteurs. Les plus généralement utilisés sont des dérivés de la fluorescéine (Fam), la Tétraméthylrhodamine (Tamra), la Tétrachloro-6-carboxyfluorescéine (Tet), l'Hexachloro-6-carboxyfluorescéine (Hex), la Rhodamine-X (Rox) et l'acide 5-(2'-aminoéthyle) aminonaphtalène-1-sulfonique (EDANS).

I.2.4. Les cassettes FRET

Un des inconvénients des balises simples est la difficulté d'utiliser certains fluorophores en raison d'une séparation trop faible entre les spectres d'excitation et d'émission pouvant poser des problèmes dans le choix des filtres d'excitation et de détection.

L'idéal serait d'obtenir une très bonne résolution entre ces deux spectres afin de pouvoir exciter la molécule au maximum de son absorption et de recueillir le maximum d'intensité lumineuse de fluorescence. Mais la plupart des fluorophores ont une plage plus ou moins importante de recouvrement de leurs spectres d'excitation et d'émission, ce qui peut conduire à la réabsorption partielle de la fluorescence émise (effet de filtre interne).

Ainsi, une nouvelle génération de traceurs fluorescents est apparue : les cassettes FRET (« Fluorescence Resonance Energy Transfer »). Ce principe correspond à un procédé probabiliste de transfert d'énergie basé sur une interaction dipôle-dipôle entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur. Les deux fluorophores sont concrètement reliés par un bras espaceur au travers duquel l'énergie émise par le donneur peut se propager jusqu'à l'accepteur qui pourra réémettre de l'énergie sous forme de fluorescence. Expérimentalement,

ceci se traduit par une baisse de la fluorescence du donneur et un accroissement de la fluorescence de l'accepteur. On peut définir une efficacité du transfert en faisant le rapport entre la constante de transfert par FRET et la somme de l'ensemble des constantes des processus entraînant une inhibition de fluorescence.

On pourra ici donner quelques exemples de processus conduisant à la réduction de l'émission de fluorescence d'un chromophore :

- Inhibition de fluorescence (ou quenching) : l'énergie est transmise à l'accepteur sans réémission de fluorescence, le transfert pouvant se faire de façon radiative ou non radiative (dissipation d'énergie par collision). Cette inhibition peut se quantifier par la constante de Stern-Volmer (§ I.1.2).

- Transfert d'énergie : l'énergie est transmise à une molécule du milieu qui est capable de générer une émission secondaire de fluorescence. Ce transfert peut se faire de façon radiative ou non radiative (FRET).

- Processus internes non radiatifs, etc.

Il est évident que plusieurs de ces processus peuvent intervenir en même temps. Ainsi, lors de l'absorption d'un photon par le donneur, des processus internes non radiatifs entraînent une perte d'énergie (sous forme de chaleur) avant l'émission de fluorescence. Le calcul des rendements quantiques (rapport de l'énergie émise sur l'énergie absorbée) permet de quantifier ce processus. De plus, il se passe le même phénomène lors de l'absorption de cette émission par l'accepteur. Sachant que le transfert peut se faire de plusieurs manières (avec une efficacité propre à chaque type de transfert), on comprend la difficulté d'interpréter les résultats expérimentaux.

On notera que l'efficacité des processus de transfert d'énergie est une fonction des caractéristiques spectrales du donneur et de l'accepteur (recouvrement des spectres) ainsi que de la distance séparant ces deux molécules. Mathématiquement, il existe une relation entre l'efficacité du transfert et la distance séparant les deux molécules :

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6}$$

où R représente la distance séparant les deux molécules (généralement entre 2 et 50, voire 100 nm) et R_0 la distance caractéristique de séparation (distance de Förster) à laquelle la probabilité de transfert d'énergie est de 50 %. Cette valeur dépend des caractéristiques spectrales (recouvrement de spectres) et structurales et peut se calculer numériquement pour un couple donneur-accepteur. En d'autres termes, les mesures de transfert d'énergie permettent de déterminer expérimentalement des distances intra- et inter-moléculaires.

Selon Skene et Dufresne (2004), il est possible de montrer que le transfert peut s'effectuer de deux manières dans la cassette (Figure 5) :

- un transfert radiatif par recouvrement spatial nécessitant un recouvrement correct des spectres et une distance inter-moléculaire pas trop élevée,
- un transfert non radiatif au travers du bras espaceur, ceci étant moins concerné par la distance inter-moléculaire et ne nécessitant pas obligatoirement un bon recouvrement spectral.

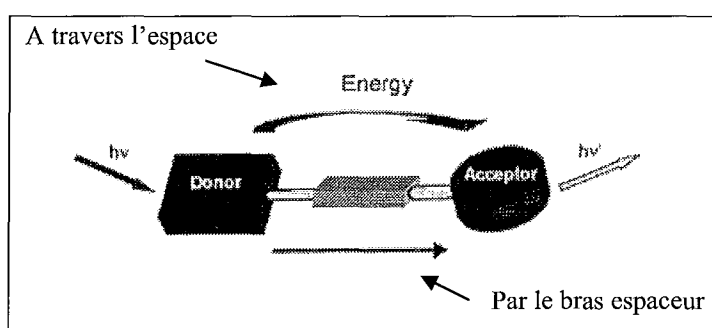


Figure 5 : Deux modes de transfert d'énergie entre un donneur et un accepteur (Skene et *al.*, 2004)

Le design de ces cassettes fait l'objet de nombreuses recherches et offre de multiples perspectives d'applications futures dans d'autres technologies (Skene et Dufresne, 2004).

La figure 6 montre un schéma comparatif des modes d'action d'une balise moléculaire simple (un fluorophore + un inhibiteur) et d'une balise pourvue d'une structure de type cassette « FRET ».

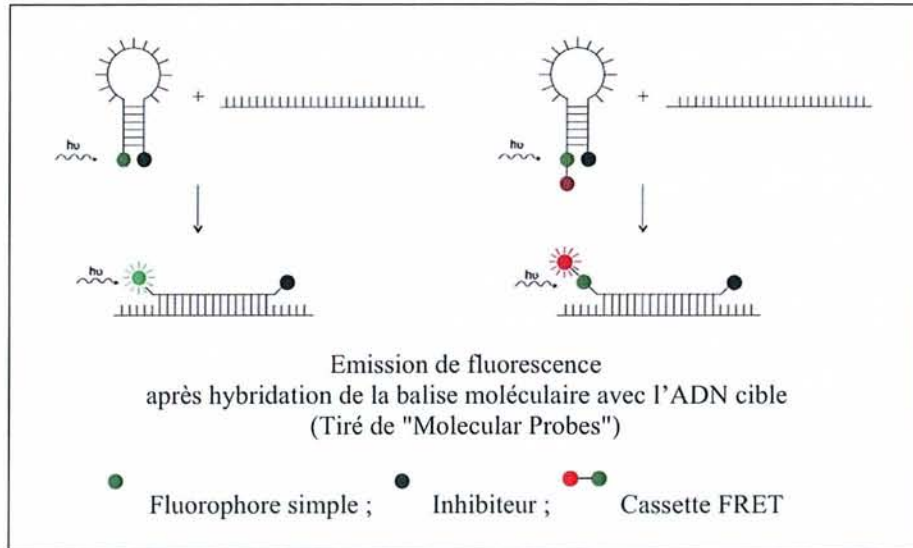


Figure 6 : Modes d'actions d'une balise moléculaire simple et d'une balise possédant une structure de type « FRET »

I.2.5. Applications

La souplesse des balises moléculaires permet leur utilisation dans beaucoup d'analyses quantitatives et qualitatives. Comme outil pour détecter les cibles issues d'amplifications, des balises moléculaires ont été adaptées à la PCR en temps réel et aux analyses de RT-PCR. Historiquement, ce fut même la première utilisation d'une balise moléculaire (Tyagi et Kramer, 1996). C'est cette application que nous allons principalement développer dans ce chapitre.

I.2.5.1. PCR en temps réel (« Real Time PCR »)

I.2.5.1.1. Principe de la PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Depuis la découverte de la structure de l'ADN, de l'ARN, des gènes et de leurs nombreux rôles dans la physiologie du vivant, il a été très vite nécessaire d'être en mesure d'en assurer la détection de la façon la plus fiable et la plus précise possible. Ainsi, depuis sa création par Mullis en 1985 (Prix Nobel en 1993), la PCR est la technique la plus utilisée en raison de sa capacité à détecter de très faibles quantités de fragments de gènes ou d'ARN. En

effet, non seulement, les quantités d'échantillons à traiter sont souvent très faibles (analyses de biologie médicale, détection de traces de bactéries ou de virus dans différents environnements, empreintes génétiques utilisées en criminologie...), mais les recherches portent le plus souvent sur un fragment de gène, le génome humain étant à lui seul constitué de plus de 30 000 gènes !

La PCR, abréviation de l'expression anglaise *Polymerase Chain Reaction* ou Réaction en Chaîne par Polymérase (le terme français équivalent, Amplification en Chaîne par Polymérisation ou *ACP*, est rarement utilisé) est un procédé d'amplification exponentielle *in vitro* d'une séquence définie d'acide désoxyribonucléique (ADN) à partir d'une quantité minimale de matériel génétique. Elle permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique et de longueur définie. L'ordre de grandeur à retenir est celui du million de copies en quelques heures.

Le principe et les conditions expérimentales qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN. Chaque réaction met en oeuvre deux amorces oligonucléotidiques dont les extrémités 3' pointent l'une vers l'autre. Les amorces ou «primers» en anglais définissent alors, en la bornant, la séquence à amplifier. Au lieu de séparer la matrice originale des produits de chaque étape, l'ensemble des éléments est conservé et servira de matrice pour l'étape suivante. Ainsi, l'amplification obtenue est exponentielle au lieu d'être linéaire.

Classiquement, on retrouve 3 étapes à 3 températures différentes dans chaque cycle d'amplification :

- 1^{ère} étape : **dénaturation**

L'ADN cible à amplifier doit être présent sous forme d'un simple brin. Cette modification de l'ADN natif bicaténaire est obtenue par chauffage à 90°C - 100°C : c'est la **dénaturation**.

A cette température, les liaisons faibles qui assuraient la cohésion de la double hélice d'ADN sont rompues pour donner deux simples brins d'ADN qui vont alors servir de matrices.

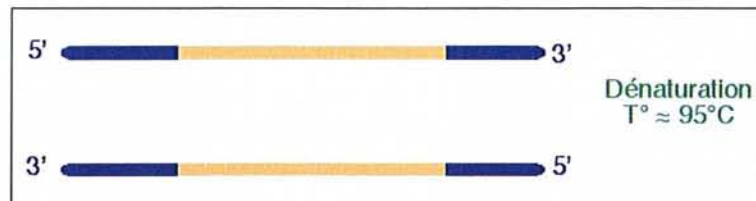


Figure 7 : Première étape de PCR : la dénaturation

- 2ème étape : **hybridation (ou anelage)**

Deux courtes séquences simple brin artificiellement synthétisées (ce sont les amorces ou 'primers') vont se positionner en face de leur séquence complémentaire respective (en 3') sur chaque simple brin : c'est **l'hybridation**.

Ces deux amorces créent une courte région double brin qui devient le point de départ de la réaction d'hybridation. Cette réaction d'hybridation est réalisée entre 40 et 60°C. Le choix de la température d'hybridation résulte d'un compromis entre plusieurs paramètres. Elle est calculée en fonction de la longueur et de la séquence des amorces. A ce niveau, il existe un risque de compétition entre cette hybridation et la renaturation des amplicons issus d'un cycle précédent.

La température d'hybridation est, de toutes façons, inférieure à la température de dénaturation.

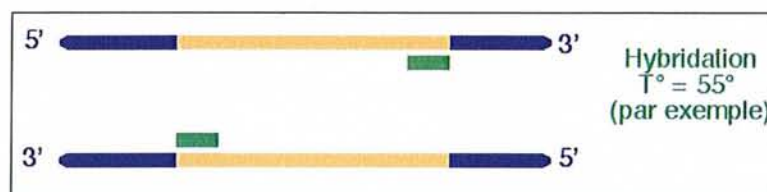


Figure 8 : Deuxième étape de PCR : l'hybridation

- 3ème étape : **élongation (ou extension)**

En faisant agir une ADN Polymérase très résistante à la chaleur en présence des 4 nucléotides en excès (désoxynucléotides libres dATP, dCTP, dGTP, dTTP, présents dans le

mélange en large excès), chaque amorce, servant de précurseur, est allongée dans le sens 5' - 3', recopiant la séquence complémentaire de la séquence cible d'origine.

Cette opération, qui s'effectue à 70 - 72°C, température d'activité optimale de la polymérase, est appelée **extension** (ou **élongation** ou encore **polymérisation**).

Il en résulte un doublement de la séquence considérée, puisque chaque brin est recopié. La séquence d'ADN générée par l'extension des 2 amorces hybridées est l'amplicon.

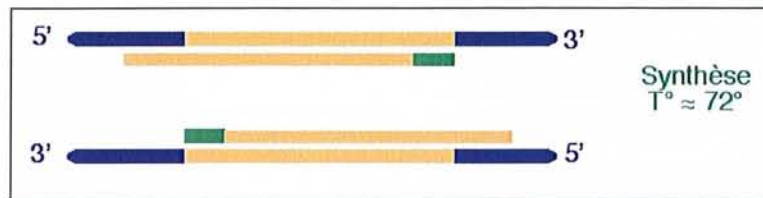


Figure 9 : Troisième étape de PCR : l'élongation

Les ADN polymérases sont des enzymes qui synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. L'ADN polymérase provient d'une bactérie thermophile (résistante naturellement à des températures élevées et vivant par exemple aux abords des sources hydrothermales du fond des océans), par exemple *Thermus aquaticus* (Taq polymérase) ou encore *Pyrococcus furiosus* (Pfu polymérase), *Thermococcus litoralis* (Vent ou Tli polymérase), *Thermus thermophilus* (Tth polymérase). La PCR est considérée comme une révolution majeure en biologie moléculaire, notamment depuis que l'on a pu isoler et commercialiser (vers 1988) la Taq-polymérase.

Il est à noter que la polymérisation ne s'arrête pas lorsque la copie est de la longueur souhaitée. La copie de l'ADN initial génère donc des copies plus longues que souhaitées.

L'opération est ensuite recommencée, avec pour chaque cycle :

- un temps de dénaturation à environ 95°C.
- un temps d'hybridation avec les amorces à 40°C - 60°C.
- un temps d'extension d'amorces à environ 70°C.

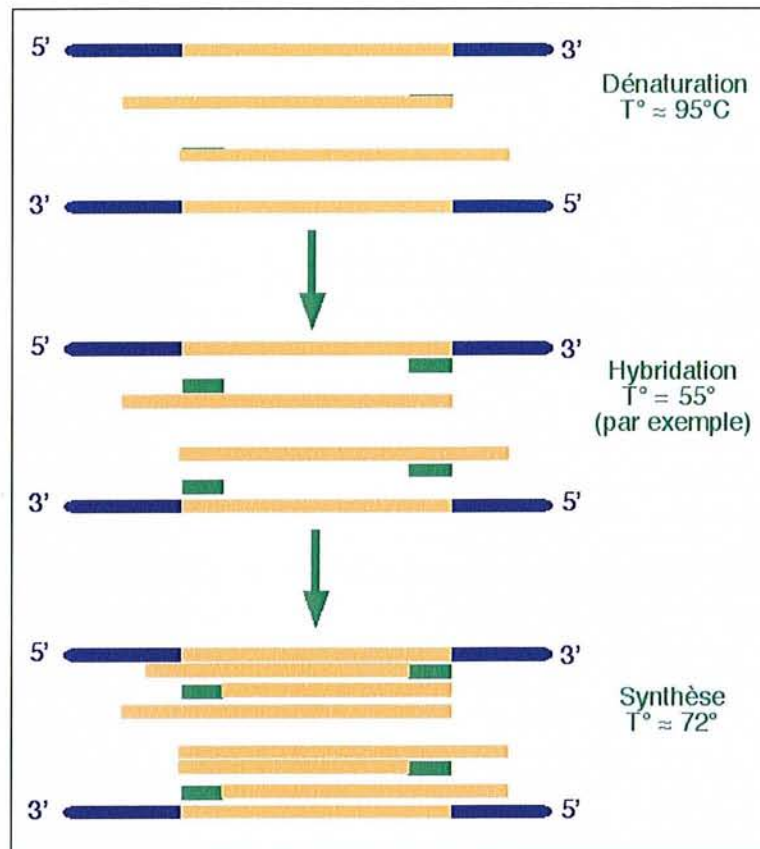


Figure 10 : Deuxième cycle de PCR : apparition des copies cibles

Chaque cycle ne dure que quelques minutes et produit un doublement de la séquence comprise entre les deux amorces.

L'amplification est donc exponentielle : au bout de N cycles, on obtient théoriquement 2^N exemplaires du segment d'ADN dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des amorces utilisées.

Il est à noter que les brins nouvellement synthétisés sont limités à leur extrémité 5' par l'amorce. Au contraire leur extrémité 3' est éventuellement plus longue car la Taq polymérase poursuit généralement au-delà de la longueur souhaitée.

L'extension des amorces à partir de l'ADN initialement présent dans le tube produit donc des brins d'ADN d'une longueur indéterminée, souvent appelés « brins longs ».

Comme leur accumulation dans le tube se fait de façon linéaire, leur quantité finale est directement proportionnelle au nombre de cycles réalisés et leur nombre devient vite négligeable par rapport à la séquence cible recherchée.

Nombre de cycles	Nombre de copies au total	Nombre de 'brins longs'	Nombre de copies cibles	Copies cibles / Copies au total (%)
1	2	2	0	0
2	4	4	0	0
3	8	6	2	25
4	16	8	8	50
5	32	10	22	68,8
6	64	12	52	81,2
7	128	14	114	89,1
15	32 768	30	32 738	99,91
25	33 554 432	50	33 554 382	99,99985

Tableau 1 : Evolution du nombre de copies d'un brin d'ADN au cours d'une opération de PCR

I.2.5.1.2. Appareillage et méthode

Tous les cycles pouvant être effectués dans le même tube, en présence d'un large excès d'amorces, de nucléotides et de Taq polymérase, il suffit d'appliquer de manière programmée une série d'oscillations thermiques correspondant aux 3 températures critiques : dénaturation, hybridation, élongation. L'appareil thermostaté utilisé est appelé *thermocycleur*.

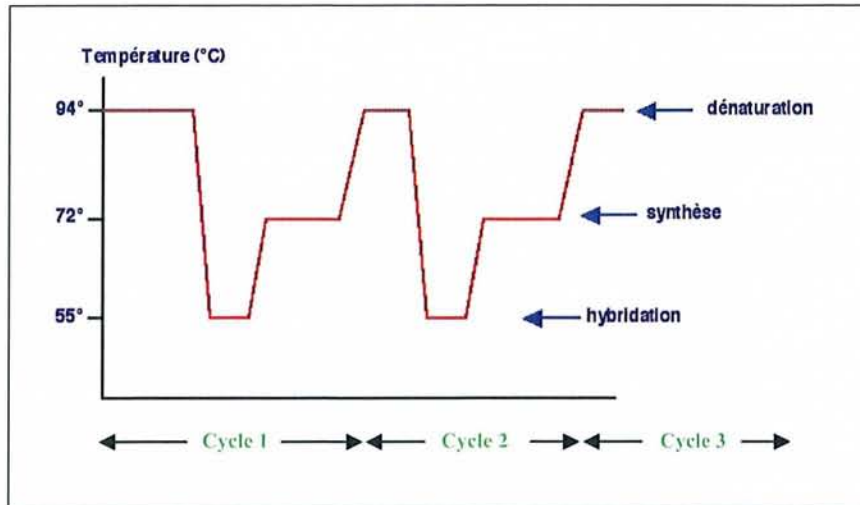


Figure 11 : Evolution de la température au cours des cycles de PCR



Figure 12 : Un outil de PCR en temps réel : l'appareil ICYCLER de Bio-rad

L'objet de ces recherches consiste à caractériser des traceurs fluorescents utilisables en PCR en temps réel, et plus particulièrement adaptables à l'appareil ICycler de Bio-rad qui est un outil de PCR couplé à un système de détection en temps réel de l'amplification des fragments de gènes recherchés. Ce suivi se fait par la mesure en continu de l'émission de fluorescence d'un traceur présent dans le milieu et capable de se fixer spécifiquement à la séquence cible recherchée. Grâce aux jeux de filtres disponibles, il est possible d'effectuer des études sur plusieurs longueurs d'onde, celles-ci étant comprises entre 400 à 700 nm. De plus, 96 échantillons peuvent être analysés en même temps et il est possible d'utiliser

simultanément 4 fluorophores différents dans la même expérience ce qui permet de diversifier les stratégies de détection (amplification simultanée de 4 cibles indépendantes et possibilité d'utilisation de diverses technologies comme les sondes TaqMan, SYBR Green I ou plus particulièrement les beacons ou balises moléculaires (§ I.2.5.1.4)).

I.2.5.1.3. Détection en temps réel : la PCR en « temps réel »

Historiquement, quelques années après l'apparition de cette technique, Higuchi *et al.* (1992) furent parmi les premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR en mettant au point un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions de PCR et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin formé au cours de l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système fournissait des courbes d'amplification montrant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination d'amplicons (produits d'amplification) accumulés en fin d'amplification (Higuchi *et al.*, 1992).

Comme le montre le tableau 1 (p. 26), il existe une relation quantitative théorique entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité de produit amplifié, et ce à chaque cycle. Il est donc théoriquement possible, connaissant le nombre de cycles effectués et la quantité de traceurs fixés aux amplicons en fin d'expérience, de déterminer le nombre initial de séquences cibles. Cependant, il est fréquent que les réactions de PCR n'obéissent pas à cette loi ce qui peut fausser considérablement les résultats d'une PCR quantitative conventionnelle qui se contente de mesurer en fin de processus le nombre d'amplicons synthétisés. Une des principales raisons de ces écarts est l'apparition d'une compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces, ce qui fait perdre le caractère exponentiel de l'amplification. Après un grand nombre de cycles, le taux d'amplification décroît et devient presque nul.

Le développement de la PCR en temps réel a éliminé cette variabilité et permet une quantification du produit de la PCR de façon aisée et fiable en s'attachant à étudier avec une grande précision la phase exponentielle initiale d'amplification, non encore perturbée par les

problèmes de renaturation. Cette quantification se fait par le suivi de la fluorescence d'un traceur indicateur de la production des amplicons. L'augmentation du signal de fluorescence est alors directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés.

Cette technique permet donc d'automatiser complètement le procédé et de s'affranchir d'opérations supplémentaires de détection en fin de processus entraînant fréquemment des contaminations diverses et un allongement du temps d'analyse (Bustin, 2000).

Remarque : La notion de cycle seuil (« Threshold cycle ») est importante en terme de quantification : en effet, plus le nombre initial de fragments à amplifier est important, moins le nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence significativement plus élevé que le bruit de fond sera grand (Gibson et al., 1996). A ce niveau, on parle de cycle seuil ; il est toujours obtenu lors de l'étape exponentielle d'amplification, qui ne se trouve donc pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs (phase plateau, nombre d'amorces trop faible). Ceci explique la très bonne reproductibilité de la PCR en temps réel. Cette valeur du cycle seuil peut être interprétée quantitativement en la comparant avec des valeurs générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000).

I.2.5.1.4. Techniques de détection en PCR en temps réel

Pour quantifier la réaction de PCR, il existe deux méthodes, basées sur la fluorescence :

- ⇒ **Les agents se liant à l'ADN double brin,**
- ⇒ **Les sondes d'hybridation oligonucléotidiques fluorescentes.**

Nous allons développer succinctement ces deux méthodes, en détaillant plus particulièrement les sondes d'hybridation oligonucléotidiques. En effet, on distingue plusieurs catégories de sondes qui se différencient par leur mode d'action mais présenteraient une sensibilité équivalente (Wittwer et al., 1997), mais avec une spécificité pouvant être plus variable (Bustin, 2000).

- *Les agents se liant à l'ADN double brin :*

Cette technique a également été la première à être développée, par Higuchi et *al.* en 1992, avec l'utilisation du bromure d'éthidium. Par la suite, d'autres agents intercalant ont été utilisés, comme le YO-PRO-1 ou le SYBR Green I (Morrison et *al.*, 1998). On peut citer également le Hoeschst 33258 qui se fixe préférentiellement au sillon mineur des brins d'ADN.

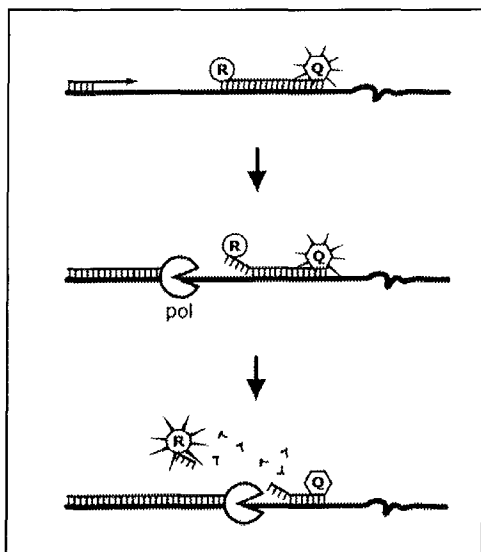
Le principe est assez simple : ces molécules sont des agents fluorescents dont l'émission augmente lorsqu'ils sont liés à l'ADN double brin, alors que celle-ci reste faible en solution. En plus de cette particularité et en vue d'une utilisation en PCR, ces agents ne doivent pas perturber la réaction d'amplification.

L'émission de fluorescence est visible durant la troisième étape de PCR (élongation) et devient quasiment nulle au début du cycle suivant (dénaturation). Aussi, il est nécessaire de mesurer cette fluorescence uniquement à la fin de chaque cycle, c'est-à-dire après l'étape d'élongation.

Cependant, il est à noter que ces agents se fixent à n'importe quel double brin d'ADN sans spécificité. Ceci peut constituer un avantage dans la mesure où la détection n'est pas altérée par une mutation du brin d'ADN (c'est ce qui se passe avec les sondes oligonucléotidiques qui sont très spécifiques à leur séquence cible) ; mais cette particularité présente plutôt des désavantages : l'ADN double brin total émet également de la fluorescence, ce qui empêche de s'assurer de la spécificité des amplicons et ne permet également pas de différencier des amplicons issus de cibles différentes (multiplexage). De plus, il arrive que des mauvais appariements génèrent des brins d'ADN superflus, entraînant une mauvaise estimation de la quantité réelle d'amplicons désirés.

- *La technologie Taq Man :*

La première utilisation des sondes oligonucléotidiques fluorescentes utilise l'activité 5'-exonucléase de la Taq Polymérase (étape 3 : élongation). Les sondes présentent à leur extrémité 5' un fluorophore émetteur (R), et à l'extrémité 3' un inhibiteur de fluorescence.



Comme dans le cas des balises moléculaires, la proximité immédiate de l'inhibiteur éteint l'émission de fluorescence selon le même principe que les cassettes FRET, le bras espaceur étant en fait la courte séquence oligonucléotidique de la sonde (une vingtaine de bases). Ainsi, en solution, la sonde n'est que peu fluorescente. Lors de l'étape d'hybridation, les amorces et la sonde se fixent à leurs séquences cibles respectives. Puis, la Taq Polymérase débute l'élongation jusqu'à rencontrer la sonde fixée qui sera hydrolysée et déplacée. Le fluorophore se retrouve donc séparé de l'inhibiteur et

on peut alors observer une émission de fluorescence. Celle-ci est alors proportionnelle au taux d'hydrolyse de la sonde, lui-même proportionnel au nombre d'amplicons créés.

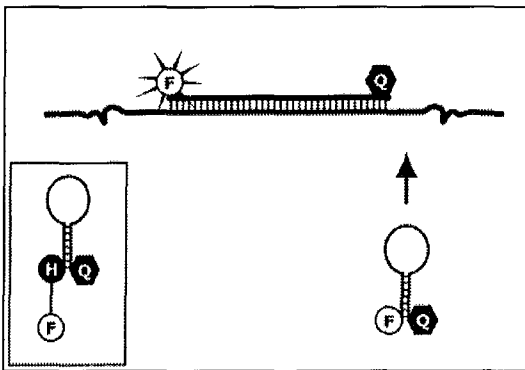
On notera que l'enzyme est spécifique à l'ADN double brin, elle n'hydrolyse que les sondes fixées sans toucher aux sondes libres en solution. De plus, les conditions de température doivent être adaptées afin de permettre à la sonde de rester associée à l'ADN durant l'élongation, et d'obtenir une activité 5'exonucléase maximale. Ceci oblige à travailler à une température inférieure à la température optimale d'élongation, ce qui diminue l'efficacité de polymérisation de l'enzyme.

Le design de ces sondes est une des difficultés de cette technique, car leurs conditions d'utilisation sont assez contraignantes. Par exemple, il est nécessaire d'éviter la présence d'un G à l'extrémité 5' de la sonde (proximité du fluorophore) car cet élément est lui-même un inhibiteur de fluorescence (Drake et Tan, 2004). De même, la répétition de séquences ou un chevauchement avec la séquence cible des amorces doivent être évités et la température de dissociation doit être telle que les sondes s'hybrident avant les amorces et restent fixées pendant l'élongation.

Cette technologie permet le multiplexage (utilisation de plusieurs sondes différentes en même temps) et présente une meilleure efficacité par rapport aux agents se liant à l'ADN ainsi qu'une spécificité accrue, sans toutefois permettre la détection de mutations spécifiques.

- ***Les balises moléculaires ou Molecular Beacons :***

Après avoir détaillé le principe des balises (§ 1.2.2), nous allons envisager leur utilisation dans la PCR en temps réel. Durant l'étape d'hybridation des amorces (étape 2), la balise pourra se lier préférentiellement à sa séquence complémentaire, éloignant l'extrémité



portant le fluorophore (F) de l'extrémité portant l'inhibiteur (Q). Il en résulte une émission de fluorescence détectable alors que les autres balises conservent leur structure en épingle à cheveux. Si la séquence cible recherchée ne correspond pas exactement à celle de la boucle de la balise, il ne se produira aucune hybridation et donc aucune émission de fluorescence (§ 1.2.3.2) ce qui permet

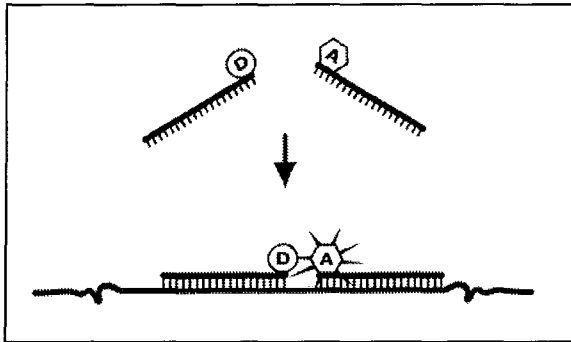
de détecter des différences ne touchant qu'un seul nucléotide, ce qui était très difficile avec les sondes linéaires (Giesendorf et *al.*, 1998 ; Marras et *al.*, 1999 ; Abravaya et *al.*, 2003).

Un avantage certain par rapport aux sondes Taq Man est la préservation de l'intégrité de sondes qui peuvent se réhybrider aux cycles suivants, ce qui n'est pas le cas pour les sondes hydrolysées.

Tout comme les sondes Taq Man, le design est ici également un élément crucial à prendre en compte lors de la conception des balises. L'inhibiteur doit être à proximité immédiate du ou des fluorophores (balise fermée) sous peine d'obtenir un bruit de fond trop important et les forces d'hybridation du tronc du beacon ne doivent pas contrecarrer une bonne hybridation des sondes avec leurs cibles. Là encore, une étude thermodynamique doit être réalisée.

- *Autres techniques :*

⇒ *Hybridation de deux sondes :* Cette technologie, aussi connue sous le nom de HybProbes, met en jeu deux sondes linéaires différentes : l'une porte un premier



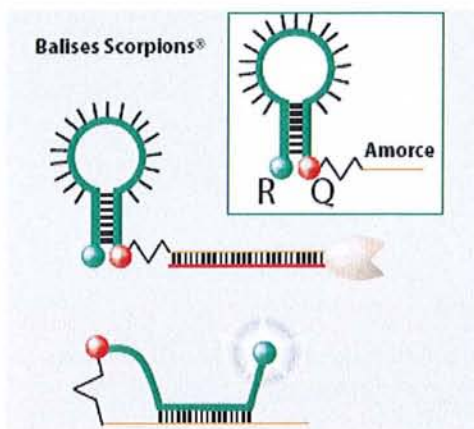
fluorophore à son extrémité 3' (D pour donneur) et l'autre porte à son extrémité 5' un autre fluorophore (A pour accepteur). Leurs sites d'hybridation sont très proches (une dizaine de nucléotides) et permettent de rapprocher les deux fluorophores pendant l'étape d'hybridation. Le principe est finalement le

même que pour les cassettes FRET, le premier fluorophore est excité et transmet son énergie au deuxième qui va émettre sa fluorescence. En solution, il existe une fluorescence naturelle du donneur, mais à une longueur d'onde différente de celle utilisée pour la détection de l'émission de l'accepteur. Par contre, cette fluorescence peut être captée par l'accepteur, toujours en solution, ce qui entraîne un léger bruit de fond.

Ceci est évité en utilisant une variante de cette technique par l'utilisation de deux balises différentes portant les deux fluorophores précédemment cités à une de leur extrémité et un inhibiteur approprié à l'autre extrémité. Ce principe permet d'éliminer deux causes de bruit de fond : celui produit par l'absorption de la fluorescence du donneur par l'accepteur en solution (recouvrement de spectres, mais limité par les faibles concentrations généralement utilisées) et celui produit par une dégradation naturelle des balises en solution dans le cas d'une utilisation simple de ces sondes.

Là encore, en fin de PCR, il se produit une compétition entre l'hybridation des sondes et la renaturation des amplicons, réduisant ainsi le signal.

⇒ *Amorces scorpions* (« Scorpion primer ») : ces sondes sont une variante de la technologie des balises moléculaires. La figure 13 montre que l'amorce de PCR et la sonde oligonucléotidique sont liées au niveau de l'inhibiteur (Q pour Quencher, généralement le rouge de méthyle).



Lors de l'étape d'hybridation, l'amorce se lie à son site et l'élongation peut commencer. La balise conserve alors sa structure en épingle à cheveux et on n'observe pas de fluorescence. C'est lors du cycle suivant, après la dénaturation que la balise se déplie et vient s'hybrider sur l'amplicon simple brin généré au cycle précédent, permettant l'émission de fluorescence et donc la détection de l'amplification.

Figure 13 : Exemple des « balises scorpions »

Bien évidemment, la séquence de la boucle de la balise doit correspondre à une séquence proche de la zone complémentaire de l'amorce utilisée. On notera l'utilisation d'un bloqueur de polymérisation entre la sonde et l'amorce afin d'empêcher la réplification de la balise par l'ADN Polymérase. Cette technologie semble plus efficace que les balises moléculaires classiques dans les PCR possédant des cycles très courts. (Whitcombe et *al.*, 1999 ; Thelwell et *al.*, 2000).

Il existe d'autres technologies de détection basées sur ces principes. On pourra citer par exemple les cyclicons (Kandimalla et Agrawal, 2000) ou encore les Sunrise Primers où la balise est ouverte au cours de la répllication par l'enzyme (Figure 14) (Nazarenko et *al.*, 1997 ; Myakishev et *al.*, 2001).

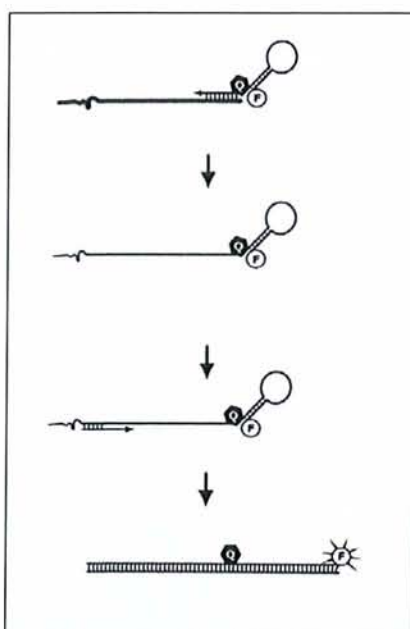


Figure 14 : Exemple de la technologie *Sunrise Primers* (Nazarenko et *al.*, 1997 ; Myakishev et *al.*, 2001)

Les applications de la PCR en temps réel sont extrêmement nombreuses. On pourra citer par exemple les études de modifications d'expressions génétiques dans les expériences drogues/réponses, les études de transcription in vivo en ARNm, les analyses de mutations génétiques ou encore la détection d'agents pathogènes divers : bactéries (*Escherichia Coli*, *Salmonella...*), virus (*HIV...*) ou parasites (*Toxoplasma Gondii...*).

I.2.5.2. Méthodes analytiques et nouveaux agents thérapeutiques

I.2.5.2.1. Les balises moléculaires catalytiques

Les applications précédentes faisaient appel à une certaine stoechiométrie entre la quantité de balises moléculaire et celle de sa cible. Ceci permettait de suivre en temps réel l'évolution quantitative d'une réaction de PCR.

Une variante assez originale des balises moléculaires a été proposée par Stojanovic *et al.* (2001) : les balises moléculaires catalytiques. Ce système permet la détection de fragments nucléotidiques sans avoir recours à un système d'amplification nucléaire et de mettre en évidence des mutations touchant un seul acide nucléique.

Cette approche est différente des précédentes techniques dans la mesure où ce sont deux agents qui sont utilisés et couplés afin d'obtenir un signal analysable : une balise moléculaire modifiée et un substrat oligonucléotidique :

- La *balise moléculaire* n'est cette fois-ci plus marquée par des fluorophores donneurs ou accepteurs, mais est prolongée par une partie catalytique appelée module 'déoxyribosyme' ayant une activité RNase. Cette activité permet le clivage d'un substrat oligonucléotidique contenant un ribonucléotide.

- Le *substrat oligonucléotidique* marqué fait office de source de fluorescence ; ce substrat est en fait une courte séquence oligonucléotidiques (12 – 15 bases) marqué à une extrémité par un fluorophore donneur (Fluorescéine) et à l'autre extrémité par un fluorophore accepteur (Tetraméthylrhodamine). Ce substrat a la capacité de s'apparier avec la balise moléculaire modifiée et possède un ribonucléotide dans sa séquence.

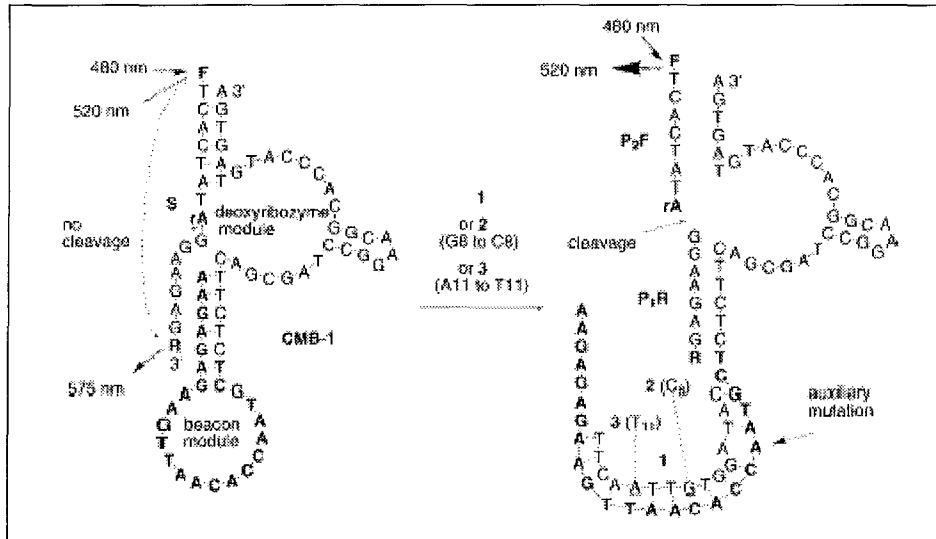


Figure 15 : Mode d'action d'une balise moléculaire catalytique (Stojanovic et *al.*, 2001)

- | | |
|---|---|
| S : Substrat marqué | P₁R : Fragment rhodamine du substrat |
| CMB-1 : Balise moléculaire catalytique | P₂F : Fragment fluorescéine du substrat |
| rA : Ribonucléotide | 1 : Séquence cible |
| F : Fluorophore donneur | 2 et 3 : Séquences cibles présentant une mutation |
| R : Fluorophore accepteur | |

En l'absence de la séquence cible complémentaire de la boucle de la balise, l'activité RNase n'est pas ou peu observée car la structure en épingle à cheveux n'est pas ouverte. Le Substrat (S) reste donc intact et l'excitation à 480 nm de la fluorescéine (F) entraîne une émission de fluorescence à 520 nm partiellement transmise au travers de la chaîne oligonucléotidique du substrat vers le fluorophore accepteur qui va réémettre une fluorescence à 575 nm. L'absence de la séquence cible se traduit donc par une émission à 575 nm avec une excitation à 480 nm.

En présence de la séquence cible (Figure 15), la structure en épingle à cheveux s'ouvre, permettant l'exacerbation de l'activité RNase du module 'déoxyribosyme', ceci aboutissant au clivage du substrat S et donc à la diminution de l'absorption par le fluorophore accepteur de la fluorescence émise par le fluorophore donneur (éloignement du donneur et de l'accepteur). L'intensité de fluorescence à 520 nm augmente donc au détriment de l'émission à 575 nm. Ainsi, en mesurant le rapport de l'intensité de fluorescence à 520nm et 575 nm ($R_{520/575}$), il est possible de mettre en évidence la présence de la séquence cible recherchée.

A noter qu'il est possible de différencier des séquences cibles voisines de la séquence complémentaire exacte en comparant les différentes valeurs d'intensité de fluorescence (I)

obtenues sur les spectres d'émission du mélange, une homologie non parfaite mais très voisine n'entraînant qu'une activation partielle, mais non nulle de ces balises moléculaires catalytiques (Figure 16) (Le suivi du rapport $R_{520/575}$ permet également d'apprécier ces différences).

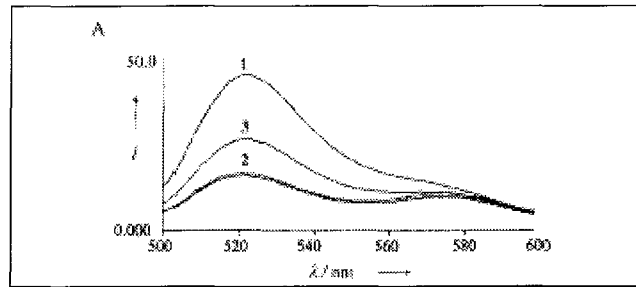


Figure 16 : Spectres obtenus après hybridation de la sonde (Stojanovic et al., 2001)

I : Intensité de fluorescence après excitation à 480 nm ; 1, 2 et 3 : Différentes séquences oligonucléotidiques cibles : 1 : homologie parfaite ; 3 : homologie partielle ; 2 : faible homologie.

Nous pouvons enfin constater que la quantité de balises moléculaires à ajouter au milieu n'est pas déterminante, de même que la quantité de séquence cible. En effet, la simple fixation d'une sonde sur sa séquence cible suffit à cliver de nombreuses molécules du substrat (en excès) et cette évolution peut de plus être suivie dans le temps.

Les applications sont possibles dans deux voies différentes :

- Détection hautement spécifique de fragments oligonucléotidiques (possibilité de détecter des mutations portant sur un seul nucléotide),
- Création de nouveaux agents thérapeutiques activés spécifiquement dans les cellules atteintes des mutations recherchées.

I.2.5.2.2. Analyses génétiques

Habituellement, la détermination de variations génétiques impliquait des procédures comme le séquençage, mais demandait des méthodes assez longues et complexes. Peu de temps après leur découverte, les balises moléculaires ont été utilisées pour effectuer des 'génotypages spectraux' (Kostrikis et al., 1998). Par simple comparaison du nombre de cycles seuils (Threshold cycle, voir § I.2.5.1.3, p 28) obtenus avec deux balises correspondantes à

l'allèle sauvage ou mutant d'un gène, il est possible de déterminer un caractère homozygote ou hétérozygote (Figure 17).

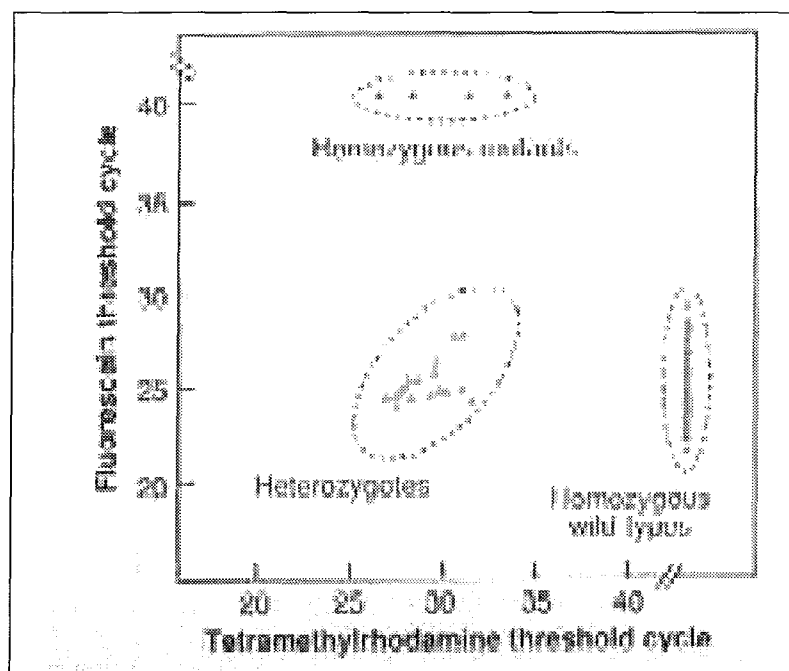


Figure 17 : Génotypages spectraux de 179 échantillons d'ADN humain pour la présence de l'allèle CCR5Δ32 (Kostrikis et al., 1998)

La balise 'fluorescéine' est complémentaire de l'allèle sauvage, et la balise 'tétraméthylrhodamine' est complémentaire de l'allèle mutant. Les trois génotypes sont alors aisément discernables.

La technologie des balises moléculaires a également été utilisée pour analyser une région de 81 paires de bases sur le gène *rpoB* en vue de rechercher une mutation permettant la résistance à la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* (Piatek et al., 1998 ; El-Hajj et al., 2001).

Enfin, nous pourrions citer l'utilisation des balises moléculaires pour la détection d'une mutation (C/T) sur le gène de la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR, rôle dans le métabolisme de l'homocystéine) qui augmente notamment le risque de maladies cardiovasculaires (Giesendorf et al., 1998) (Figure 18).

Ces différents exemples de génotypages utilisant les balises moléculaires montrent les réelles possibilités analytiques et surtout diagnostiques qu'offre cette nouvelle technologie.

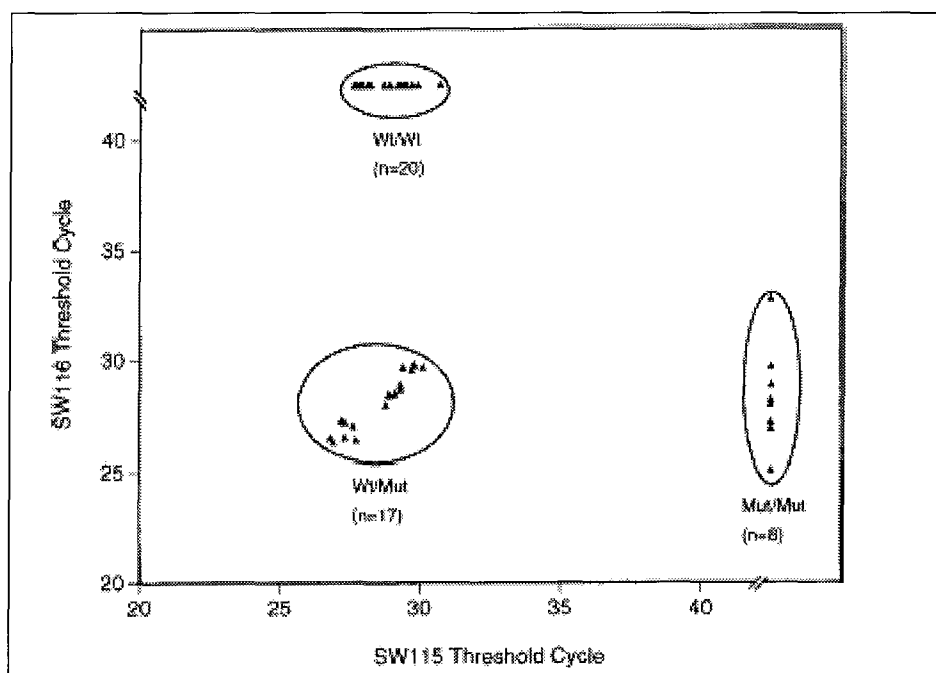


Figure 18 : Génotypes spectraux de 45 échantillons (Kostrikis et al., 1998)

La balise SW116 est complémentaire de l'allèle mutant,
la balise SW115 est complémentaire de l'allèle sauvage.

I.2.5.2.3. Détection de pathogènes

L'incapacité de certains pathogènes à se développer sur des milieux sélectifs nécessite l'utilisation de méthodes moléculaires de détection et d'identification, et les balises moléculaires ont trouvé ici une application fondamentale durant ces cinq dernières années.

Cette technique, grâce à sa grande sensibilité et sa spécificité permet la détection des pathogènes les plus communs (*Bordetella pertusis*, *Chlamydia trachomatis*, *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoea*, *Salmonella*, *Legionella pneumophila*, EBV, Cytomegalovirus, HIV-1, Virus de l'Hépatite B, Papillomavirus...).

A côté de la détection de pathogènes, les balises moléculaires ont également été utilisées dans l'identification des marqueurs génétiques de résistance aux substances médicamenteuses. Nous avons déjà cité la résistance à la rifampicine de *Mycobacterium tuberculosis* (Piatek et al., 1998 ; El-Hajj et al., 2001), mais il existe de nombreuses autres applications :

- Résistance à la chloroquine chez *Plasmodium falciparum* associée à une mutation sur l'allèle Pfcrt K76T (Durand et al., 2002) : étant vouée à prendre le relais des quelques méthodes de détection de cette résistance, cette nouvelle technique beaucoup moins coûteuse doit permettre d'améliorer la détermination des zones géographiques de résistance à la chloroquine dans les zones d'endémie paludique.

- Résistance à la méthicilline chez *Staphylococcus aureus* associée aux gènes *mecA* et *mec* (Elsayed et al., 2003).

- Résistance à l'itraconazole associée à une mutation sur le gène CYP 51A de *Aspergillus fumigatus* (Nascimento et al., 2003).

1.2.5.2.4. Interactions Acide Nucléique - Protéine

Les balises moléculaires ont été également utilisées dans l'étude des interactions entre protéines et ADN (Tan et al., 2000). Plus précisément, ce sont les protéines se fixant à l'ADN simple brin qui ont été étudiées (SSB : Single-stranded DNA binding protein). Ces protéines ont la particularité de se fixer à l'ADN lors des phases de réplication du matériel génétique afin de permettre de stimuler l'ADN polymérase et de faciliter le chargement de l'hélicase.

Les interactions entre ces protéines et les balises moléculaires ont révélé une augmentation très nette de la fluorescence, preuve de l'ouverture de la structure en épingle à cheveux des balises. Il a même été noté que l'intensité de fluorescence observée était très comparable à celle obtenue avec le fragment oligonucléotidique complémentaire (cible) de la balise (Li et al., 2000) (Figure 19).

Il a été montré que des protéines différentes montraient des efficacités de liaison différentes et donc des intensités de fluorescence variables : ceci pourrait donc permettre d'élaborer des balises permettant de reconnaître spécifiquement une protéine particulière. De plus, le seuil de détection des SSB a été de $2 \cdot 10^{-10}$ M.

Là encore, des applications thérapeutiques sont déjà envisagées. Heyduk et Heyduk (2002) ont d'ailleurs utilisé cette approche pour détecter la protéine p53, impliquée dans plus de 50% des cancers.

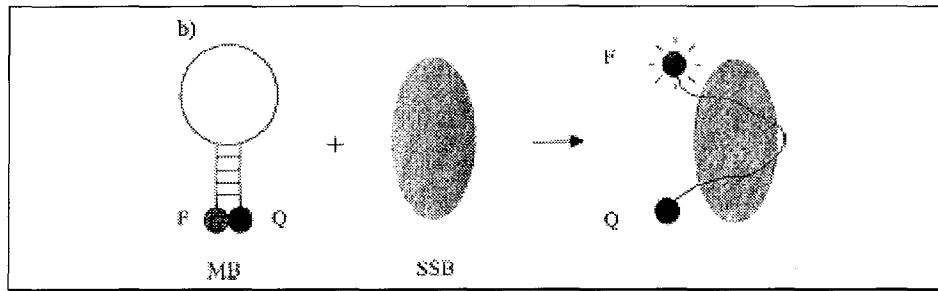


Figure 19 : Fixation et activation d'une balise moléculaire par une protéine (Li *et al.*, 2000)

MB : Balise Moléculaire ; SSB : Protéine se fixant à l'ADN simple brin ; F : Fluorophore ; Q : Quencher

D'autres applications ont également vu le jour, notamment l'étude des interactions entre la lactate déshydrogénase (LDH) et l'ADN simple brin (Fang *et al.*, 2000). Les balises moléculaires ont confirmé leur capacité à quantifier ce genre de protéine, à discerner les isoenzymes ou les enzymes provenant de différentes espèces animales (Figure 20) et à étudier leurs interactions avec l'ADN simple brin. De plus, des perspectives d'études des protéines en temps réel et dans des cellules vivantes sont actuellement discutées.

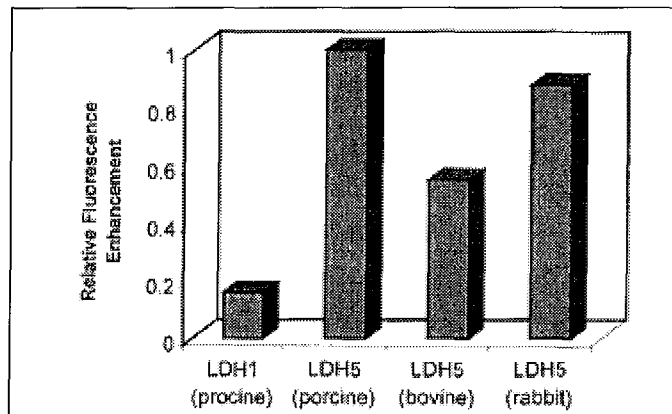


Figure 20 : Etude d'isoenzymes et d'enzymes d'origines variées avec les balises moléculaires (Fang *et al.*, 2000)

I.2.5.3. Autres applications et perspectives

A l'instar des applications citées précédemment en PCR en temps réel, les balises moléculaires ont été également employées dans la détection de l'ARN dans la technique en temps réel NASBA (« Nucleic Acid Sequence-Based Amplification ») (Leone *et al.*, 1998).

Exploitant la possibilité d'utiliser différents colorants, les balises ont également été utilisées dans la détection simultanée de quatre rétrovirus pathogènes différents dans des échantillons cliniques (Vet et *al.*, 1999).

La spécificité des balises permet leur usage dans la détection du polymorphisme de nucléotides (« Single Nucleotid Polymorphism » ou SNP) (Marras et *al.*, 1999). Leur simplicité et sensibilité permet leur utilisation dans des études thermodynamiques des transitions d'état des sondes elles-mêmes (Bonnet et *al.*, 1999). La nature non toxique et homogène des sondes permet leur usage *in vivo*. Des balises moléculaires ont été utilisées pour détecter des transcriptions dans des cultures de cellules de tissu après micro-injection (Sokol et *al.*, 1998). Des applications à la visualisation en temps réel de la migration de l'ARNm (ARN messenger) sont envisagées.

Ces exemples qui ne représentent qu'une partie des nombreuses applications décrites dans la littérature traduisent déjà le potentiel important de cette nouvelle technologie.

II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Spectroscopie UV-Visible

II.1.1.1. Définition

La région du visible s'étend de 400 à 800 nm. La région ultraviolette s'étend de 10 à 400 nm mais les spectromètres UV usuels ne permettent le tracé des spectres que pour les longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm (proche UV).

Les deux gammes de mesure sont atteintes avec le même spectromètre par la simple commutation d'une lampe halogène (visible) à une lampe à deutérium (UV).

II.1.1.2. Principe de la technique

Cette technique est basée sur la propriété de la matière, et plus particulièrement de certaines molécules, d'absorber certaines longueurs d'ondes du spectre UV-visible.

Dans les régions UV et visible, les longueurs d'onde correspondent à des différences d'énergie $\Delta E = E_2 - E_1 = hc / \lambda$ (avec λ longueur d'onde de la radiation) qui affectent le domaine des transitions électroniques : passage d'une orbitale d'énergie E_1 à une orbitale d'énergie E_2 plus élevée.

Les solvants :

- Ils doivent dissoudre le produit et être transparents dans la région examinée.
- Les solvants ont des effets : la molécule dont on réalise le spectre est susceptible d'interagir avec le solvant. Il s'agit généralement de stabilisation par liaison hydrogène. La polarité changeant, on observe des changements quant à la longueur d'onde et à l'intensité du maximum d'absorption.

Les cuves :

Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance A d'une solution relativement diluée est proportionnelle à sa concentration.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot C$$

où ε est le coefficient d'extinction molaire ($\text{L.Mole}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l l'épaisseur traversée par la lumière (cm), et C la concentration de la substance étudiée (Mole.L^{-1}).

La plupart du temps, on utilise des cuves dont le trajet optique est égal à 1cm. Ainsi, l'expression de la loi de Beer-Lambert devient :

$$A = \varepsilon C$$

Les cuves doivent être maintenues très propres, particulièrement les faces polies car elles sont placées sur le trajet lumineux.

II.1.1.3. Appareillage

Les spectromètres UV- visible comportent basiquement une source de rayonnement et un dispositif de réception associé à un dispositif de restitution de la mesure.

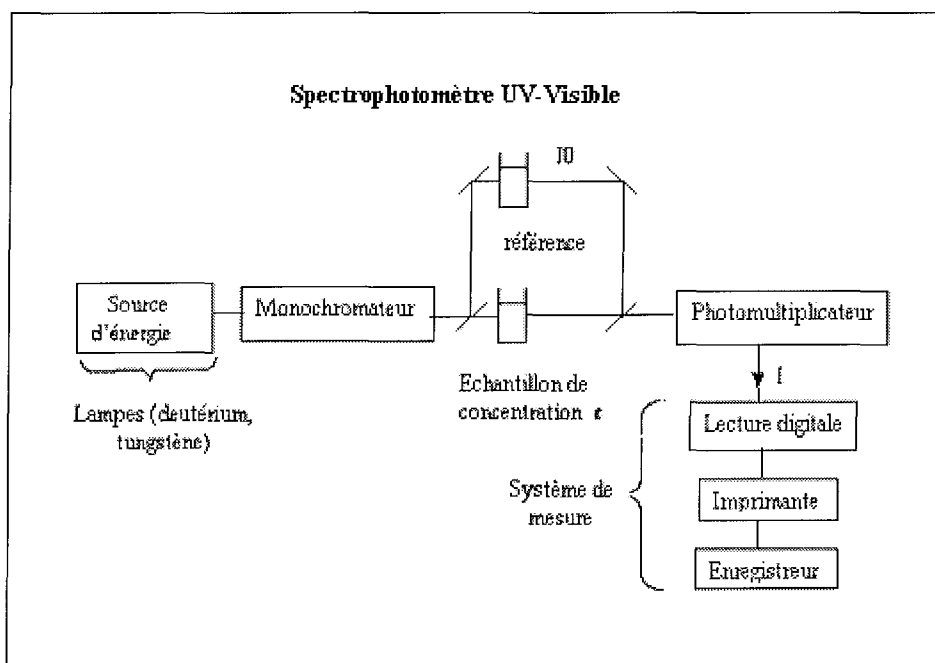


Figure 21 : Schéma d'un spectrophotomètre UV-Visible

Au cours des expériences présentées par la suite, le spectrophotomètre *Lambda EZ 210 Perkin Elmer* a été utilisé. Il est équipé de deux lampes : une lampe au deutérium (D2) et une lampe à iodure de tungstène (WI). La plage de longueurs d'onde mesurables va de 190 à 1100 nm et la bande passante est de 2 nm. Le détecteur est constitué par des photodiodes en silicone.



Figure 22 : Spectrophotomètre Lambda EZ 210 Perkin Elmer

Le spectrophotomètre est couplé à un ordinateur (HP Vectra) permettant l'acquisition et le traitement des données.

II.1.2. Spectrofluorimétrie

II.1.2.1. Principe

Une lampe excitatrice émet un rayon lumineux de longueur d'onde déterminée (après passage à travers un monochromateur) sur la cuve contenant la solution à analyser. Celle-ci est placée dans un compartiment isolé des perturbations lumineuses extérieures.

Le faisceau de fluorescence émergeant à 90° passe à travers un second monochromateur. Le signal lumineux est amplifié par un photomultiplicateur permettant d'obtenir un signal interprétable par un système informatique approprié.

II.1.2.2. Description de l'appareil utilisé

Les mesures de fluorescence ont été réalisées sur un spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog 2, piloté par ordinateur. Le principe est schématisé figure 23.

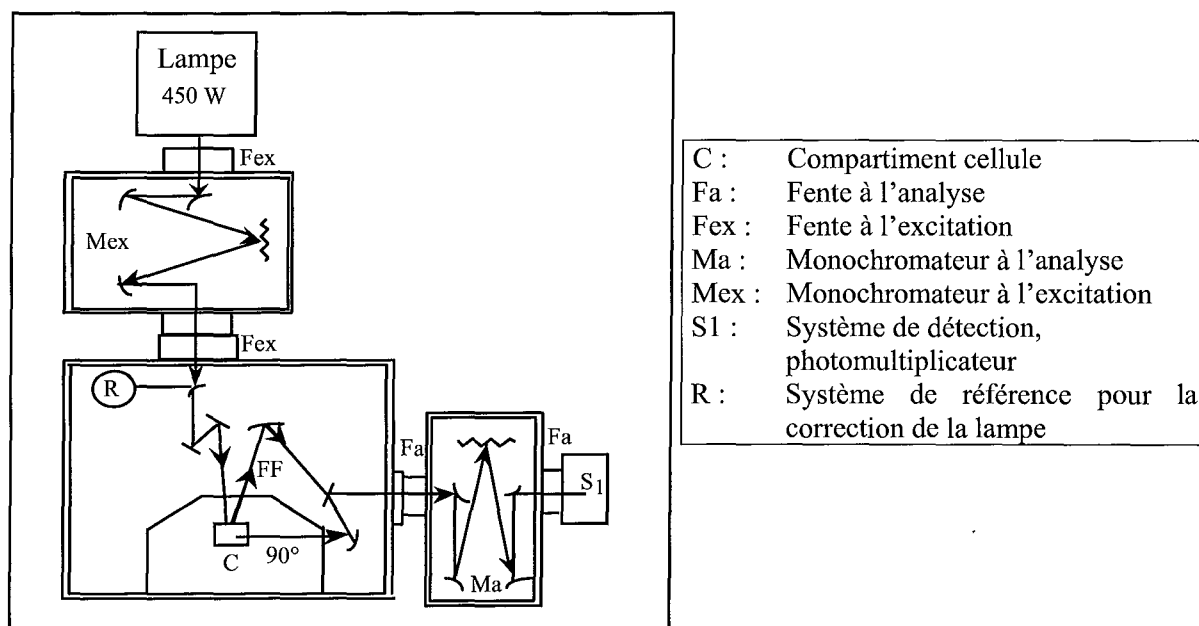


Figure 23 : Spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog 2, Jobin Yvon

Le spectrofluorimètre *SPEX, Fluorolog 2* est équipé d'une lampe à Xénon, de puissance 450 W, dont l'image est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation : celui-ci permet en effet de sélectionner la longueur d'onde λ_{ex} , qui va exciter l'échantillon. Un système de référence composé d'une solution de Rhodamine B (0,02 M) dans l'éthylène glycol est utilisé pour corriger les fluctuations de la lampe.

Les monochromateurs d'excitation et d'analyse sont de type 1681 (bande passante en nm = largeur de la fente en mm x 3,77), et permettent de choisir respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse. Une fraction de la luminescence émise par l'échantillon est renvoyée vers la fente d'entrée du monochromateur d'émission (ou d'analyse). Ce dernier transmet une étroite bande spectrale centrée sur la longueur d'onde d'émission λ_{em} .

Le système de détection est un photomultiplicateur de type Hamamatsu R928 utilisé en compteur de photons. Placé à la sortie du monochromateur d'analyse, il détecte la quantité de

lumière correspondant à λ_{em} et génère un signal qui, après amplification peut être utilisé de différentes façons.

Cet appareil permet de réaliser soit des spectres d'excitation, soit des spectres d'émission de fluorescence qui affichent la variation d'intensité de luminescence en fonction d'une longueur d'onde d'observation, pour une excitation à une longueur d'onde donnée. Cette longueur d'onde d'excitation correspond soit à la longueur d'onde d'absorption maximale du fluorophore, soit à une autre longueur d'onde d'absorption définie par les exigences liées aux expériences menées, par exemple pour la détermination de rendements quantiques de fluorescence.

Inversement les spectres d'excitation représentent la variation d'intensité de l'émission mesurée à une longueur d'onde fixée, pendant que la longueur d'onde d'excitation parcourt le spectre d'absorption.

Enfin, le logiciel de traitement lié à cet appareil permet d'effectuer différents traitements mathématiques sur les spectres, ainsi que d'enregistrer l'émission en fonction du temps (voire de la température pour un temps programmé).

II.1.2.3. Contraintes spécifiques

Les conversions internes qui se produisent lors de la désexcitation d'une molécule, sont à l'origine de pertes d'énergie entre les photons d'excitation et les photons d'émission. Ainsi on remarque que la longueur d'onde centrale d'émission est toujours supérieure à la longueur d'onde centrale d'absorption. Ce phénomène est appelé déplacement (shift) de Stokes. Le déplacement de Stokes est une caractéristique importante : en effet si ce déplacement est faible, il sera difficile de séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission au moyen de filtres. De plus si le recouvrement entre les deux spectres est important, une réabsorption des photons de fluorescence émis peut se produire et provoquer des distorsions dans le spectre d'émission.

Généralement le spectre d'émission de fluorescence est une image inversée (effet miroir) du spectre d'absorption. Ces spectres doivent être considérés en terme de distribution de probabilités de transition et sont caractéristiques de la structure énergétique des molécules. Chaque molécule peut être définie par des spectres d'absorption et d'émission qui lui sont propres et qui reflètent les transitions énergétiques autorisées par le principe de Pauli.

Les différentes caractéristiques de l'émission de fluorescence : spectre, rendement quantique et durée de vie de fluorescence ne constituent la signature d'une molécule que sous certaines conditions. En effet ces paramètres dépendent fortement de l'environnement local de la molécule. Des changements plus ou moins importants peuvent se manifester sous l'effet de divers facteurs. Les plus courants d'entre eux sont le pH, la viscosité, la polarité du solvant, la température, le potentiel électrique, la présence d'ions, d'oxygène ou les éventuelles interactions avec d'autres molécules.

II.2. Présentation des expériences et exploitations

II.2.1. Objectifs

Les différentes études qui vont suivre ont permis d'étudier dans un premier temps une inhibition de fluorescence sans réémission de photons (« Quenching »). Les substances employées sont des halogénures divers avec des contre-ions divers. Leur présence dans le milieu entraîne des pertes d'énergie de fluorescence principalement par collisions. Leur action peut se quantifier par une constante de Stern-Volmer (§ I.1.2, pages 12-13). De plus, d'autres études d'inhibition de fluorescence sont effectuées en utilisant comme inhibiteur le rouge de méthyle (analogue du DABCYLE).

La suite des études s'attache à étudier des transferts d'énergie entre différentes molécules, principalement des dérivés coumariniques déjà étudiés au laboratoire (DCPR).

II.2.2. Inhibition de fluorescence

L'inhibition de fluorescence sans réémission de photons a été étudiée avec différents types de composés inhibiteurs. Le principe de ces expériences a été de soumettre un fluorophore en concentration fixe à des quantités croissantes en inhibiteur de manière à mettre en évidence l'inhibition, mais également de la quantifier lorsque cela était possible.

L'utilisation de différents solvants durant ces études découle principalement des critères de solubilité des différents composés testés.

II.2.3. Transferts d'énergie radiatifs

Plusieurs expériences visant à observer un transfert de fluorescence entre deux fluorophores ont été réalisées. Ces expériences ont été effectuées en solutions, dans différents solvants (principalement pour des raisons de stabilité physico-chimique des composés). Ces transferts sont basés sur le principe de recouvrement de spectres nécessaire à la technologie FRET précédemment décrite (§ I.2.4, page 18). Ce transfert s'effectue entre deux fluorophores dont l'un est donneur et l'autre accepteur et dont les spectres respectifs d'émission et d'absorption présentent un recouvrement plus ou moins important (Figure 24).

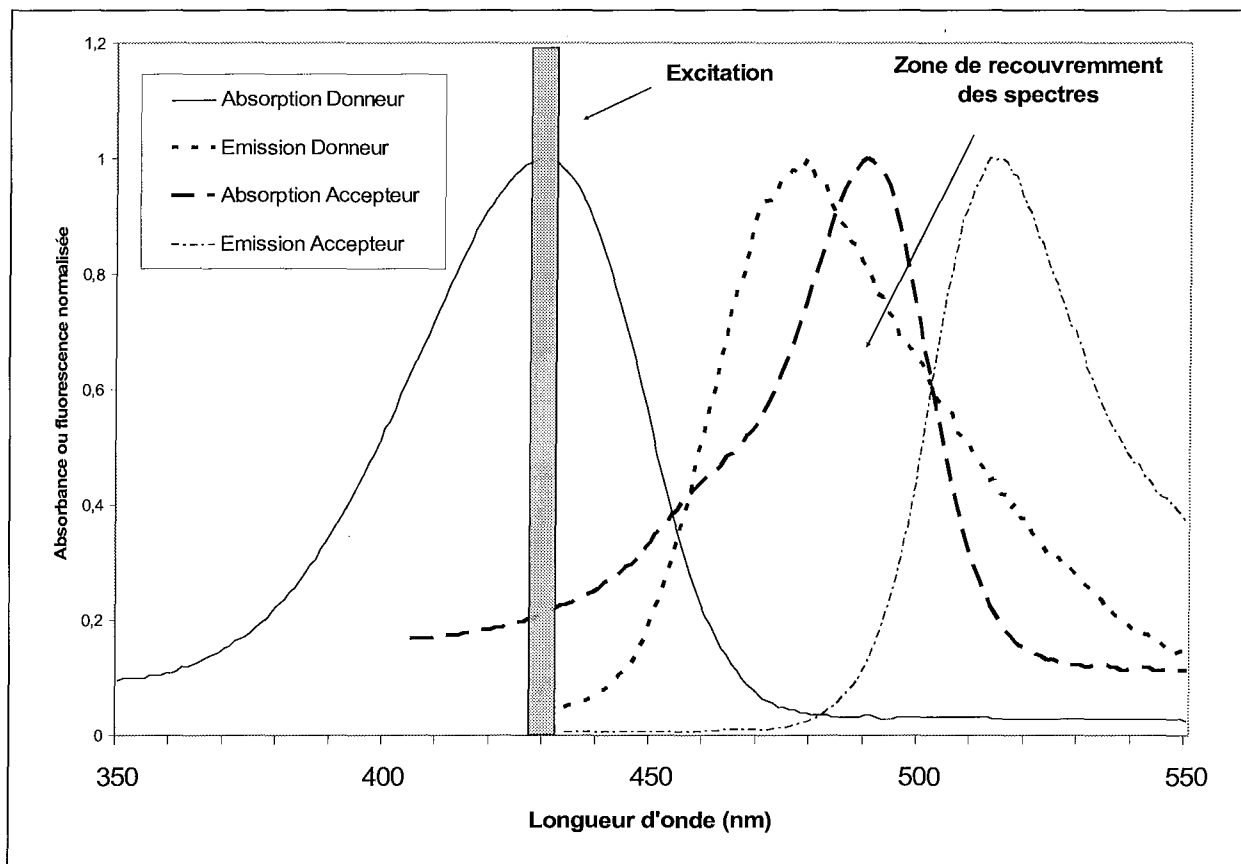


Figure 24 : Exemple de recouvrement de spectres

A partir de ces spectres, il est possible de déterminer une probabilité de transfert d'énergie entre les deux molécules : celle-ci est définie comme le rapport entre l'énergie pouvant être captée par l'accepteur (recouvrement vrai des spectres) et l'énergie totale émise par le donneur. Cette probabilité se calcule (pour de faibles concentrations en accepteur) à l'aide de la relation suivante :

$$a_{D \rightarrow A} = \frac{2,303[A]x \int_0^{\infty} F_D(\bar{\nu}) \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}}{\int_0^{\infty} F_D(\bar{\nu}) d\bar{\nu}} \quad (\text{Birks, 1970})$$

D représente le donneur de fluorescence, A l'accepteur, x le trajet optique (1 cm dans notre cas), F_D l'intensité de fluorescence du donneur, ε le coefficient d'extinction molaire ($L \cdot \text{Mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) et $\bar{\nu}$ est le nombre d'onde (inverse de la longueur d'onde, en cm^{-1}). Ainsi, la simple détermination des aires sous les courbes d'émission du donneur et sur la partie

commune au donneur et à l'accepteur donne une estimation de l'efficacité du transfert à laquelle on peut s'attendre.

Comme il n'est pas possible de synthétiser facilement des cassettes FRET, les études seront menées en solution en testant les interactions qui existent entre différents fluorophores réunissant potentiellement les conditions d'obtention d'une cassette FRET efficace (notamment au niveau du recouvrement des spectres).

Pour des raisons expérimentales, il est ici impossible de reproduire en solution la proximité physique entre le donneur et l'accepteur qu'on retrouve dans les cassettes. Aussi, la très grande efficacité de transfert de ces structures sera mimée en augmentant simplement la concentration en accepteur dans la solution. Le donneur sera donc entouré d'une grande population d'accepteur, augmentant ainsi les possibilités de transfert d'énergie.

Une autre considération à prendre en compte dans nos expériences est l'effet de filtre interne. En effet, nous avons remarqué qu'il existait systématiquement un certain recouvrement des spectres d'absorption et d'émission pour une molécule donnée (Figure 2, page 11). Ainsi, le fluorophore a tendance à absorber sa propre émission de fluorescence. Ceci se traduit concrètement par une modification du spectre d'émission qui voit son intensité diminuer vers les faibles longueurs d'onde (zone de recouvrement des spectres). Bien évidemment, il faut distinguer ce recouvrement (pouvant être gênant pour l'analyse de l'émission de l'accepteur) de celui désiré dans les cassettes FRET où on cherche justement à obtenir le maximum d'absorption de la lumière émise par le donneur.

Enfin, nous noterons que nous nous sommes placés dans des conditions où l'accepteur absorbe peu le faisceau de lumière excitatrice incidente, car il pourrait se produire dans ce cas un phénomène connu sous le nom d'effet de peau. En effet, si l'accepteur est en trop forte concentration et qu'il absorbe une grande partie de l'énergie du faisceau incident, le principe d'additivité des absorbances issu de la loi de Beer-Lambert ne peut plus s'appliquer et on constate que le donneur reçoit moins d'énergie et émet donc moins de fluorescence pouvant faire croire à une exacerbation du transfert classique. De plus, la majeure partie du faisceau étant absorbée dans les premiers millimètres des cuves de mesure (d'où le nom de l'effet), on constate que l'émission de fluorescence de l'accepteur diminue (sans modification de la forme du spectre) alors que sa concentration augmente (à cela peut s'ajouter l'effet de filtre interne et d'autres phénomènes comme celui de la formation d'excimères).

II.3. Caractéristiques des solutions de travail

Le tableau 2 donne les caractéristiques principales des solutions et constituants utilisés durant les expériences présentées au chapitre suivant.

Elément	Formule brute	Masse molaire (g/Mole)	Provenance	Autres renseignements
Fluorescéine (Sel de Sodium)	$C_{20}H_{10}Na_2O_5$	376,28	FLUKA Chemica AG	Poudre brune
DMAPB*	$C_{14}H_{13}N_3$	223,28	DCPR	Poudre brune
Hydroxy-Coumarine	$C_{12}H_{10}O_5$	234	DCPR	Poudre cristalline blanche
N-Ethyl-Coumarine	$C_{16}H_{19}NO_4$	289	DCPR	Poudre cristalline jaune
C8-Coumarine	$C_{20}H_{26}O_5$	346	DCPR	Poudre cristalline blanche
C12-Coumarine	$C_{24}H_{34}O_5$	402	DCPR	Poudre cristalline beige
CN-Coumarine	$C_{19}H_{20}N_2O_4$	340	DCPR	Poudre orange
CDOH **	$C_{22}H_{27}N_3O_4$	397	DCPR	Poudre orange
Iodure de potassium	KI	166,01	FLUKA Chemica AG	Pureté : 99,5 %
Iodure de tétrabutylammonium	$C_{16}H_{36}IN$	369,38	FLUKA Chemica AG	Pureté : 99 % Poudre cristalline blanche
Bromure de potassium	KBr	119,01	FLUKA Chemica AG	Pureté : 99,5 % Poudre cristalline blanche
Rouge de Méthyle	$C_{15}H_{15}N_3O_2$	269,29	Riedel De-Haën	Cristaux violets
Carbonate de sodium anhydre	Na_2CO_3	105,99	ACROS ORGANICS	Poudre blanche, hygroscopique
Hydrogénocarbonate de sodium	$NaHCO_3$	84,01	FLUKA Chemica AG	Poudre blanche
Ethanol Absolu	C_2H_6O	46,07	SDS	Pureté : 99,8 %

* 1,1-dicyano-4(*p*-diméthylaminophenyl)-1,3-butadiène

** Synthèse réalisée selon la méthode décrite par Even et Muller (2001)

Tableau 2 : Caractéristiques des constituants chimiques utilisés

Une *solution tampon* pH 10 (0,1 Mole/L de carbonate de sodium et d'hydrogénocarbonate de sodium) a également été utilisée durant les expériences qui vont suivre, mais sa préparation ne sera pas détaillée à chaque fois.

Les cuves de spectroscopie utilisées sont soit en plastique (trajet optique : 1 cm), lorsqu'il n'a pas été nécessaire de travailler à de trop faibles longueurs d'onde, soit en quartz pour les excitations à moins de 350 nm.

Sauf indication contraire, les largeurs de fente sont fixées à 1,5 mm, ce qui correspond à une bande passante de 5,7 nm autour de la valeur cible d'excitation.

III. Résultats et interprétation

III.1. Objectifs

Notre étude vise à rechercher les couples fluorophore/inhibiteur susceptibles de présenter une bonne inhibition de fluorescence en vue d'utiliser ces couples pour le greffage sur des balises moléculaires. Par ailleurs, avec l'idée de préparer des composés de type cassette « FRET » (voir p18), nous avons étudié les transferts de fluorescence entre différents fluorophores appropriés.

Plusieurs expériences successives portant sur l'inhibition de fluorescence d'un fluorophore ont été effectuées en testant divers inhibiteurs et composés fluorescents. Puis, des expériences visant à déterminer les interactions entre divers fluorophores ont été réalisées.

Lors de chacune de ces expériences, une gamme est réalisée, le fluorophore (en concentration fixe) étant mis en contact avec une quantité croissante d'inhibiteur ou de fluorophore accepteur. Avant de procéder à l'analyse, un spectre UV de la solution de fluorophore est effectué afin de déterminer la densité optique maximale de la solution.

Avant les différentes mesures sur les gammes préparées, les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence sont réalisés afin d'obtenir le couple de longueur d'onde d'excitation et d'émission correspondant à un maximum d'intensité de faisceau émis. C'est ce couple qui sera utilisé pour faire les mesures sur les échantillons de la gamme.

III.2. Composés étudiés

Ce chapitre a pour but de présenter les différents composés (inhibiteurs et fluorophores) qui ont été utilisés dans la suite des expériences. Nous rappellerons la formule développée et les caractéristiques spectrales qui ont été étudiées.

III.2.1. Rouge de Méthyle

De formule brute $C_{15}H_{15}N_3O_2$, le rouge de méthyle (ou acide 2-((4-Diméthylamino)phénylazo)benzoïque) se présente sous forme de cristaux violets, inodores.

Sa masse molaire est : $M = 269,29$ g/Mole et sa formule développée est représentée sur la figure 25.

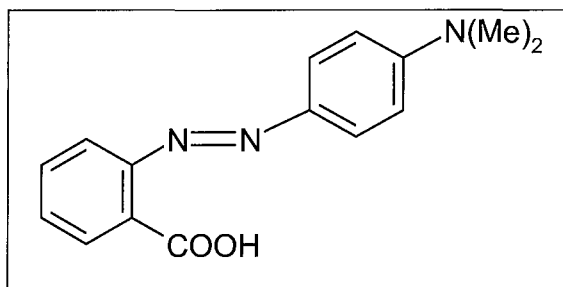


Figure 25 : Formule développée du rouge de méthyle

Une solution à 10^{-3} Mole/L est préparée en dissolvant 2,6 mg de rouge de méthyle dans 10 mL d'eau distillée. A noter que la dissolution est assez difficile dans l'eau distillée. Une dilution au 1/10 (dans le tampon pH 10, voir p52) est analysée au spectromètre UV-Visible. Les résultats montrent un maximum d'absorption vers 432 nm (Figure 26).

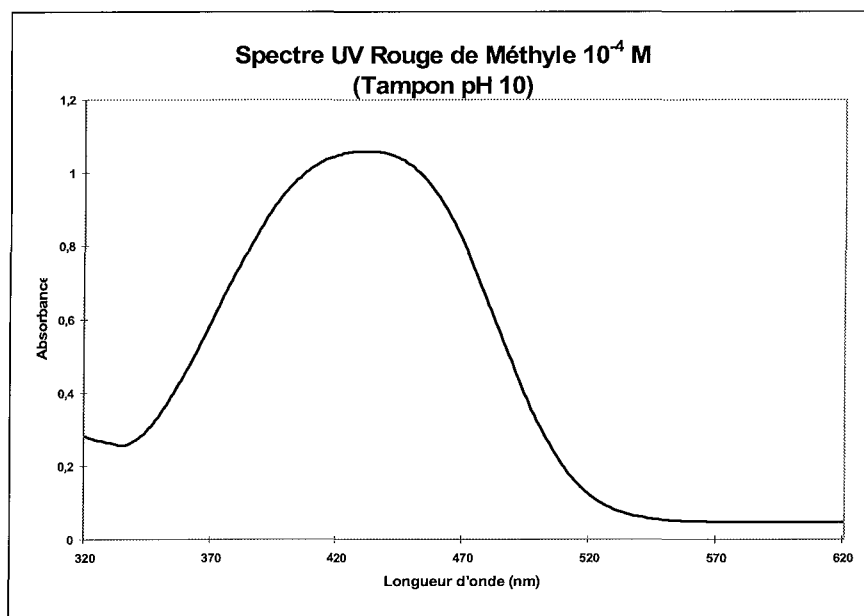


Figure 26 : Spectre d'absorption du rouge de méthyle

($\lambda_{\text{exc max}} = 432$ nm ; solvant : tampon pH 10)

Nous avons vérifié que le composé n'était pas fluorescent : par excitation à son maximum d'absorption, l'émission de fluorescence est pratiquement nulle.

Nous pouvons remarquer que cette molécule absorbe dans une large gamme de longueurs d'onde, ce qui en fait un inhibiteur de fluorescence intéressant à étudier dans notre cas, puisqu'il pourrait à priori interagir avec plusieurs fluorophores.

III.2.2. Etude de deux coumarines en C8 et C12 (C8-Cou et C12-Cou)

De la même manière que dans le paragraphe III.2.1, nous allons étudier deux coumarines, porteuses d'une chaîne carbonée en C8 pour l'une et en C12 pour l'autre.

III.2.2.1. Coumarine en C8 (C8-Cou)

Le composé coumarinique en C8 de masse molaire $M = 346$ g/Mole est représenté sur la figure 27.

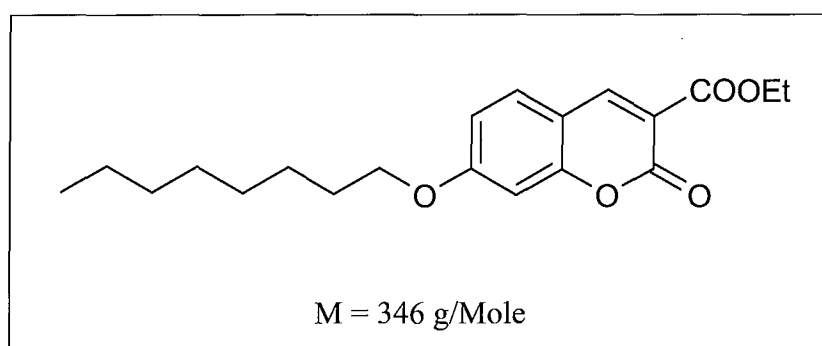


Figure 27 : Formule développée de la C8-Coumarine

Dans un premier temps, une solution mère à environ 10^{-3} Mole/L de C8-Cou a été préparée en dissolvant 3,4 mg de Coumarine dans 10 mL d'éthanol absolu.

Une solution à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L de C8-Cou a été préparée en diluant 250 μ L de solution mère dans 50 mL d'eau distillée.

Cette solution a été analysée au spectrophotomètre UV-Visible. Le spectre présente deux maxima d'absorption à 264 nm et 342 nm.

Ainsi, la solution sera analysée au spectrofluorimètre à ces longueurs d'onde d'excitation. A noter que l'évaluation des maxima a nécessité d'augmenter la largeur des fentes du spectrofluorimètre.

Les résultats sont présentés sur la figure 28.

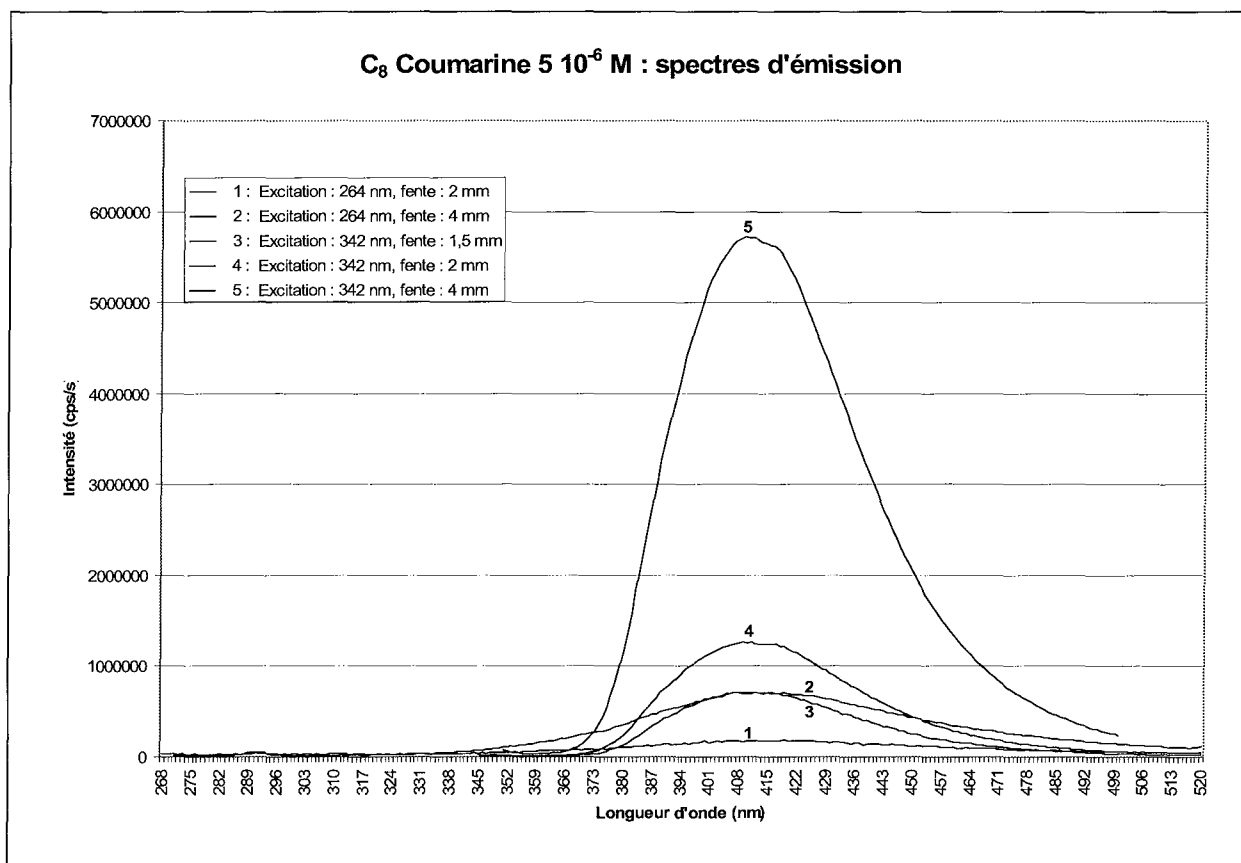


Figure 28 : Influence de la longueur d'onde d'excitation sur le spectre d'émission de la C₈-Cou (solvant : eau distillée)

Lorsque la molécule est excitée à 342 nm, on observe que la longueur d'onde correspondante au maximum d'émission vaut 411 nm, alors qu'elle est de 416 nm environ pour une longueur d'onde d'excitation de 264 nm.

III.2.2.2. Coumarine en C12 (C12-Cou)

Le composé coumarinique en C12 de masse molaire $M = 402$ g/Mole est représenté sur la figure 29.

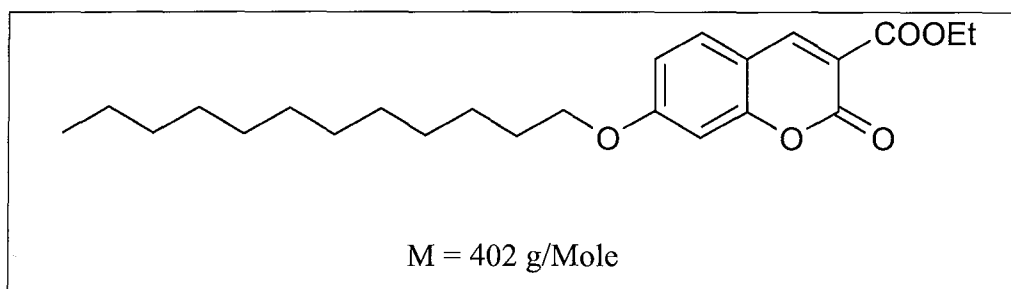


Figure 29 : Formule développée de la C12-Coumarine

Une solution mère à environ 10^{-3} Mole/L de C12-Cou a été préparée en dissolvant 3,9 mg de Coumarine dans 10 mL d'éthanol absolu.

Puis, une solution à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L de C12-Cou a été préparée en diluant 250 μ L de solution mère dans 50 mL d'eau distillée (ou dans du glycérol pour l'expérience n°4 de la figure 30).

Cette solution a été analysée au spectrophotomètre UV-Visible. Le spectre présente deux maxima d'absorption à 342 nm et 407 nm, les spectres de la C12-Cou et de la C8-Cou étant superposables.

La solution est analysée au spectrofluorimètre à ces longueurs d'onde d'excitation en utilisant successivement l'eau distillée et le glycérol comme solvant.

Les résultats sont présentés sur la figure 30.

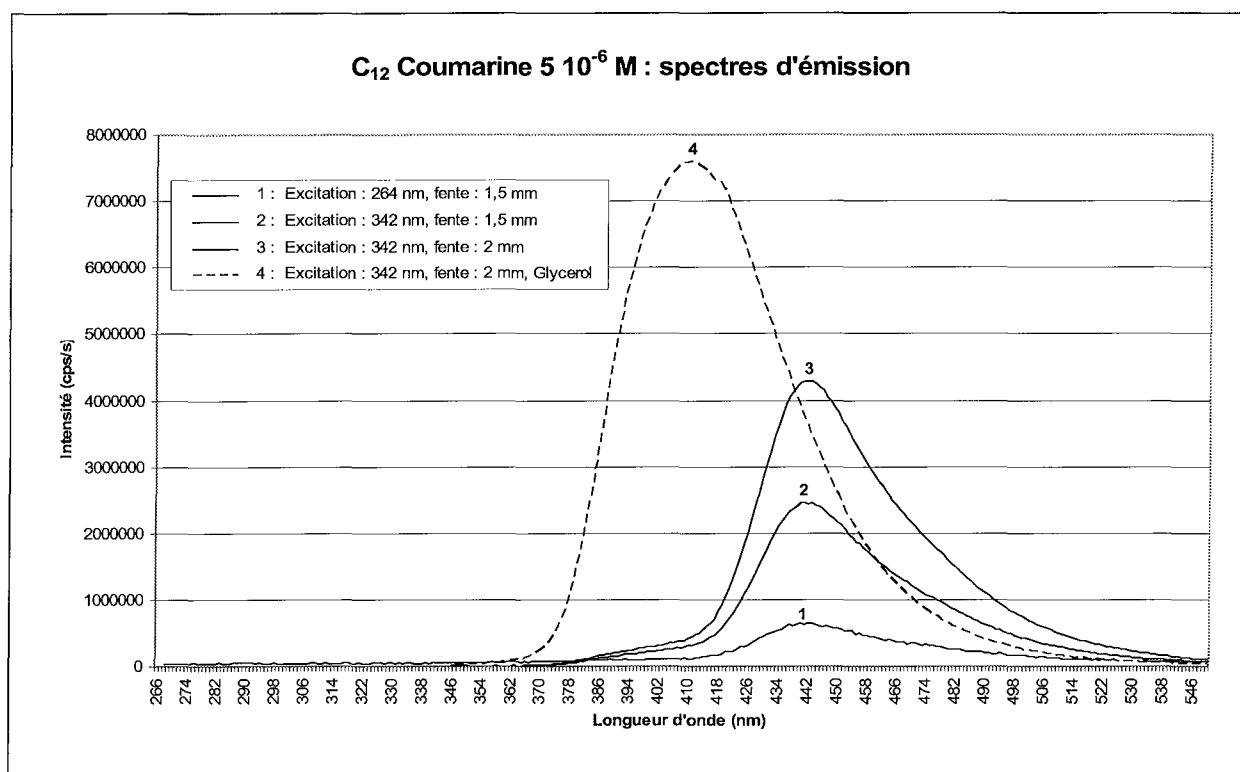


Figure 30 : Influence de la longueur d'onde d'excitation et du milieu sur le spectre d'émission de la C12-Cou (solvants : eau distillée et glycérol)

On remarque que le maximum d'émission se situe à 442 nm environ, et ce quelle que soit la longueur d'onde d'excitation dans l'eau distillée. Par contre, on note un fort déplacement du spectre vers les longueurs d'onde courtes lorsqu'on utilise le glycérol comme solvant avec un nouveau maximum à 410 nm.

Cette molécule ayant été utilisée dans la suite des expériences, la figure 31 regroupe les données la concernant.

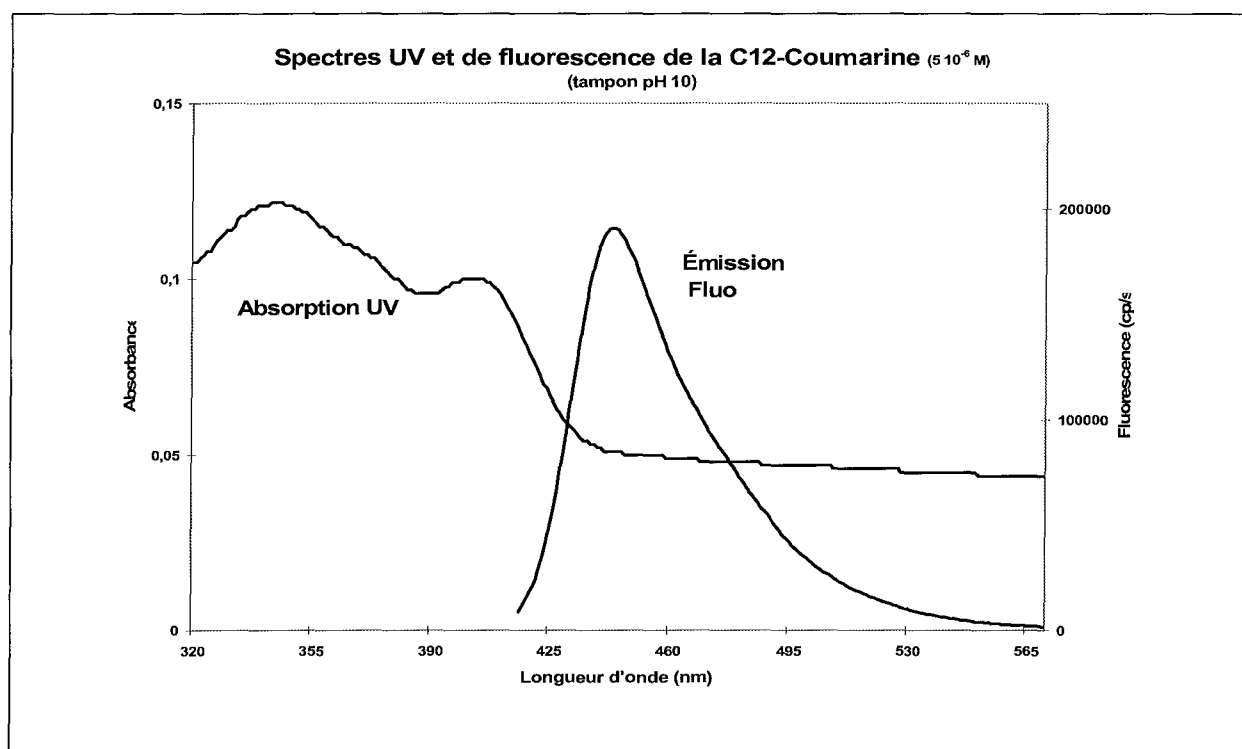


Figure 31 : Spectres d'excitation et d'émission de la C12-Cou

($\lambda_{exc\ max} = 342 - 407\ nm$; $\lambda_{em\ max} = 442\ nm$; solvant : tampon pH 10)

On remarquera la présence de deux pics d'absorption : 342 nm et 407 nm. Des essais ont été réalisés en prenant les deux longueurs d'onde. Pour la fin des expériences de transfert avec ce fluorophore, nous avons privilégié la longueur d'onde d'excitation correspondant au deuxième pic pour deux raisons : ce pic correspond à celui observé avec le composé O-Cou, analogue à la C12-Cou ; de plus, l'appareil ICYCLER[®] de Biorad (ces expériences visant en effet à trouver de nouveaux traceurs fluorescents utilisables avec cet appareil) ne permet pas d'exciter une molécule à 342 nm car il possède une lampe Halogène-Tungstène avec un domaine d'excitation compris entre 400 et 700 nm.

III.2.3. O-Coumarine et N-Coumarine

L'objet de cette étude est de s'intéresser à deux coumarines dont les formules sont reportées sur la figure 32.

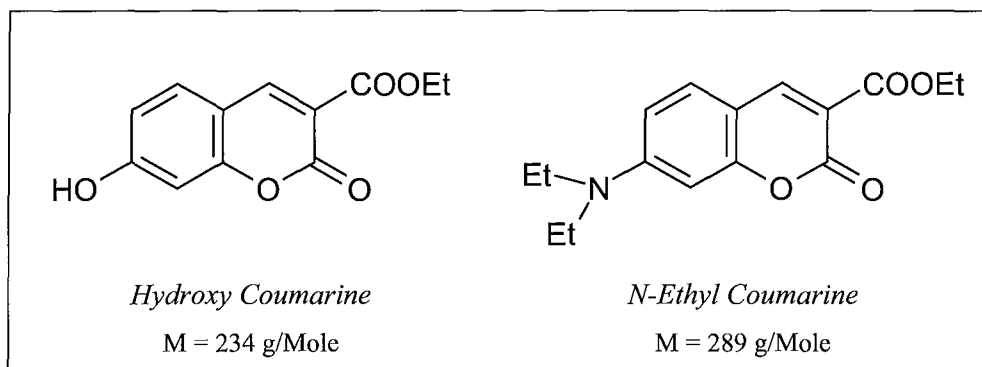


Figure 32 : Formules développées des coumarines utilisées

Par souci de clarté, les noms de ces deux composés seront abrégés respectivement O-Cou et N-Cou.

Les solutions mères des deux coumarines sont réalisées dans 10 mL d'éthanol absolu, de façon à obtenir des solutions de concentration voisines de 10^{-3} Mole/L :

- **O-Cou** : pesée de 2,4 mg ; dilution dans 10 mL d'éthanol absolu.

$$C_{\text{O-Cou}} = m/(V.M) = 1,03 \cdot 10^{-3} \text{ Mole/L}$$

- **N-Cou** : pesée de 3,1 mg ; dilution dans 10 mL d'éthanol absolu.

$$C_{\text{N-Cou}} = m/(V.M) = 1,07 \cdot 10^{-3} \text{ Mole/L}$$

Une dilution à $5 \cdot 10^{-6}$ M de ces deux solutions est préparée en diluant 500 μL de solution mère dans 100 mL d'eau distillée.

Les 2 échantillons (O-Cou, N-Cou) sont ensuite analysés au spectrophotomètre UV-Visible afin de déterminer la longueur d'onde correspondant à leur maximum d'absorption ($\lambda_{\text{exc max}}$) puis au spectrofluorimètre afin de déterminer la longueur d'onde correspondant à leur maximum d'émission ($\lambda_{\text{em max}}$) après excitation à leur $\lambda_{\text{exc max}}$ respectives.

Les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence de la O-Cou et de la N-Cou sont présentés respectivement sur les figures 33 et 34.

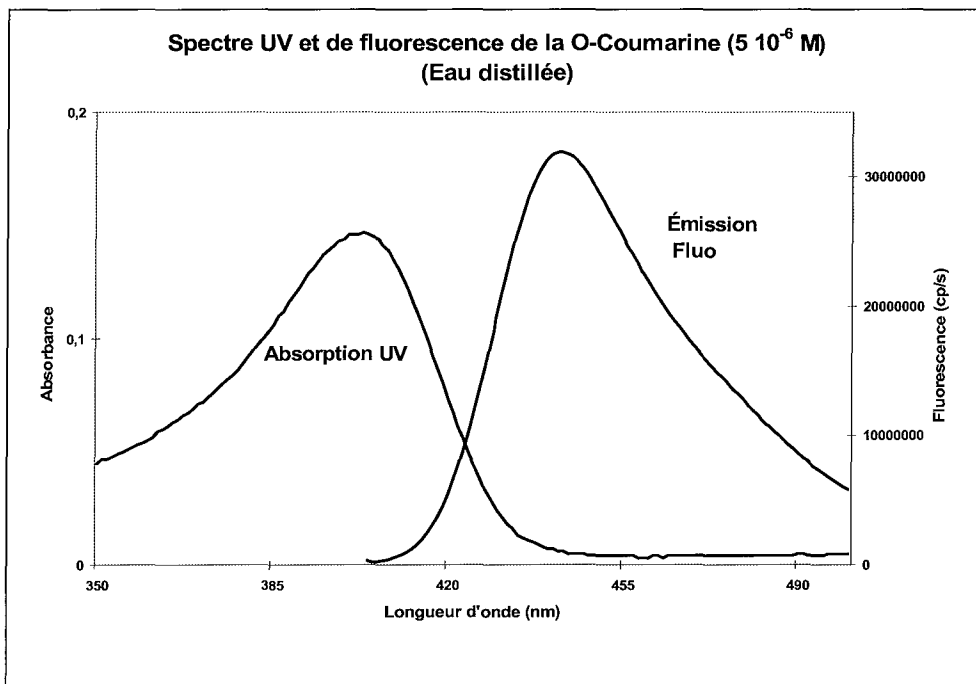


Figure 33 : Spectres UV et de fluorescence de la O-Cou

($\lambda_{exc\ max} = 402\ nm$; $\lambda_{em\ max} = 442\ nm$; solvant : eau distillée)

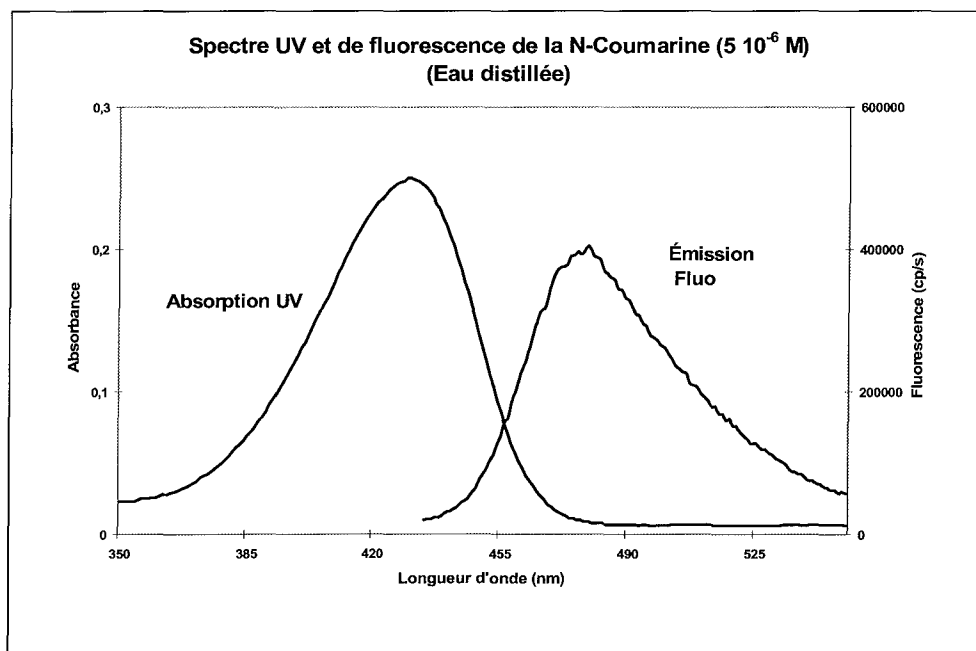


Figure 34 : Spectres UV et de fluorescence de la N-Cou

($\lambda_{exc\ max} = 430\ nm$; $\lambda_{em\ max} = 477\ nm$; solvant : eau distillée)

Les résultats en terme de maximum d'excitation et d'émission de fluorescence sont regroupés dans le tableau 3.

Echantillon	$\lambda_{\text{exc max}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em max}}$ (nm)
O-Cou	402	442
N-Cou	430	477

Tableau 3 : Caractéristiques physiques des constituants utilisés : O-Cou et N-Cou (solvant : eau distillée).

III.2.4. CN-Coumarine

Le composé CN-Cou de masse molaire $M = 340$ g/Mole représenté sur la figure 35 possède un système conjugué plus important comparé à la N-Cou, conduisant à un déplacement vers les grandes longueurs d'onde (déplacement bathochrome) des domaines d'absorption/émission.

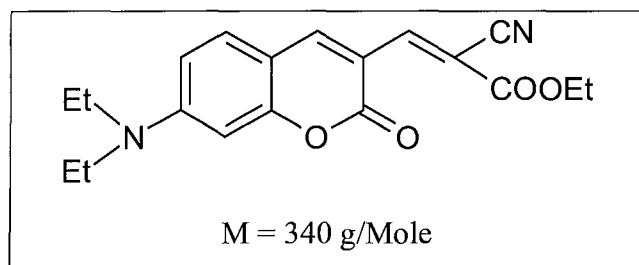


Figure 35 : Formule développée de la CN-Cou

Une solution mère à environ 10^{-3} Mole/L ($1,032 \cdot 10^{-3}$ Mole/L exactement) de CN-Cou a été préparée en dissolvant 3,51 mg de Coumarine dans 10 mL d'éthanol absolu.

Puis, une solution à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L de CN-Cou a été préparée en diluant 250 μ L de solution mère dans 50 mL de *tampon* pH 10.

Cette solution a été analysée au spectrophotomètre UV-Visible. Le maximum d'absorption se situe à 514 nm. Le spectre d'émission de fluorescence à cette longueur d'onde d'excitation présente un maximum à 566 nm. Les résultats sont regroupés sur la figure 36.

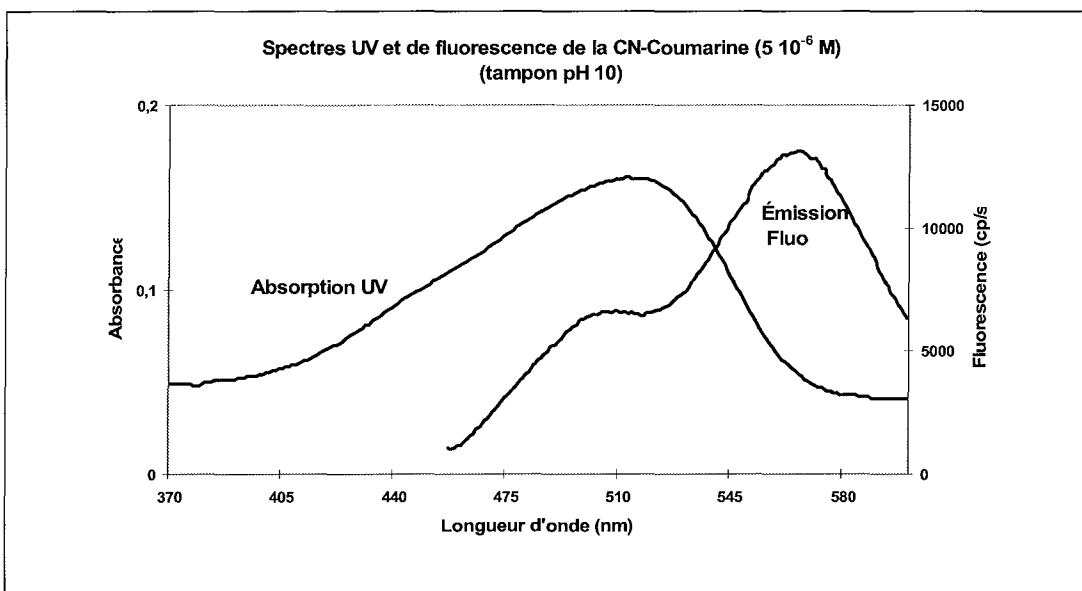


Figure 36 : Spectres d'excitation et d'émission de la CN-Coumarine

($\lambda_{\text{exc max}} = 514 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em max}} = 566 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10)

Dans les expériences suivantes, il a été remarqué une instabilité de la CN-Cou dans un milieu aqueux basique, peut-être due à une saponification de la fonction COOEt du composé. Par la suite, l'ensemble des travaux sera réalisé avec l'éthanol absolu comme solvant. Les spectres d'absorption et d'émission dans ce solvant sont représentés sur la figure 37 (le spectre UV est bruité en raison de la faible concentration utilisée pour le réaliser).

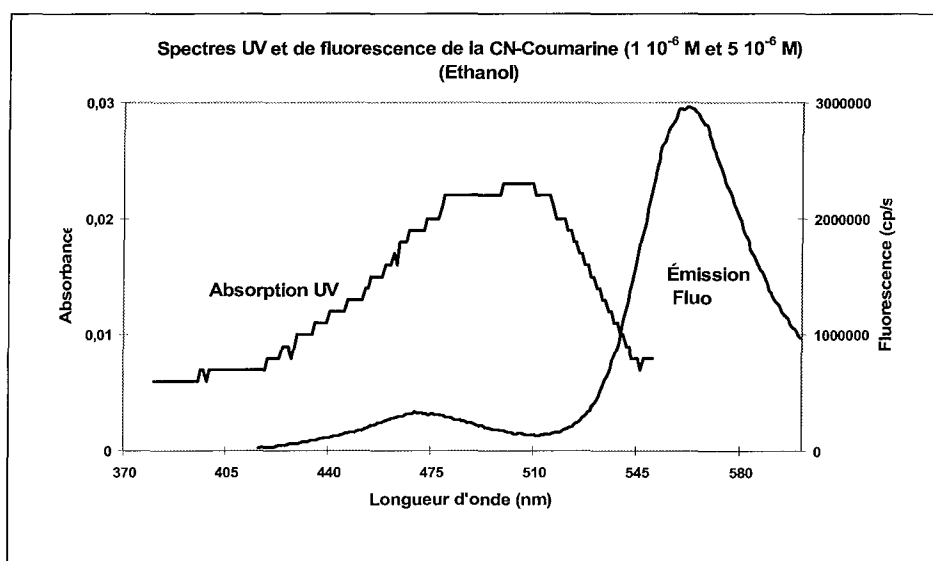


Figure 37 : Spectres d'excitation et d'émission de la CN-Coumarine

($\lambda_{\text{exc max}} = 504 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em max}} = 566 \text{ nm}$; solvant : éthanol).

III.2.5. CDOH

L'objectif final de ces études est de préparer un fluorophore directement incorporable à l'extrémité d'une structure de type balise moléculaire au moyen d'un synthétiseur automatique. Pour cela, il est nécessaire de greffer un bras espaceur sur le fluorophore permettant d'introduire un groupement phosphoramidite afin de pouvoir directement l'incorporer dans l'appareil de synthèse au même titre qu'un nucléotide classique. Sur la CN-Coumarine, un premier bras espaceur destiné à être prolongé par un groupement phosphoramidite a été greffé. Le composé CDOH précurseur du composé phosphoramidite a été préparé selon Even et Muller (2001) (Figure 38).

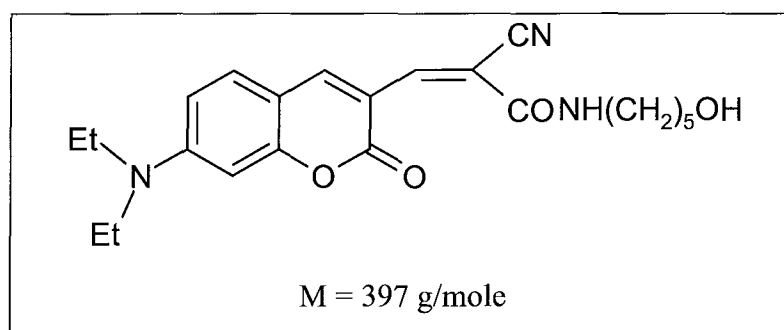


Figure 38 : Formule développée de la CDOH

Les propriétés spectroscopiques ont été étudiées ainsi que sa stabilité à 95°C en vue d'une possible application en PCR.

III.2.5.1. Etude spectrale

Dans l'optique d'effectuer par la suite des études de quenching et de transfert avec cette molécule, les spectres d'absorption et de fluorescence dans l'éthanol absolu ont été réalisés.

Une solution de CDOH à environ 10^{-3} Mole/L (exactement $0,997 \cdot 10^{-3}$ Mole/L) a été réalisée en dissolvant 3,96 mg de CDOH dans 10 mL d'éthanol absolu. Une dilution à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L a été analysée au spectrophotomètre UV-Visible puis au spectrofluorimètre (excitation au maximum d'absorption). Les résultats sont présentés figure 39.

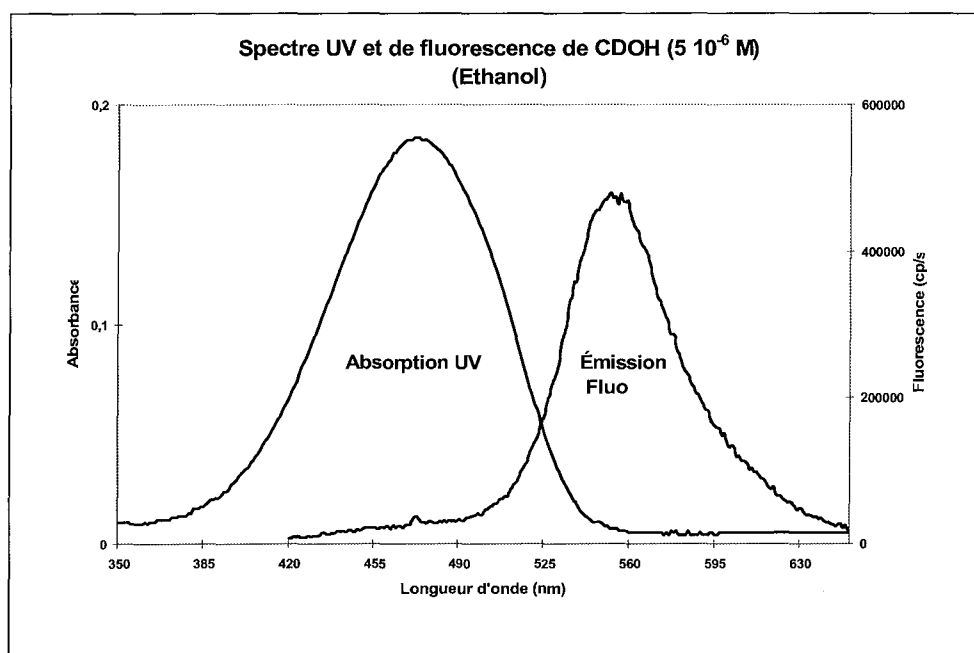


Figure 39 : Spectres UV et de fluorescence du CDOH $5 \cdot 10^{-6}$ M
 ($\lambda_{\text{exc max}} = 468 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em max}} = 552 \text{ nm}$; solvant : éthanol)

Le composé présente un maximum d'absorption dans l'éthanol à $\lambda_{\text{exc max}} = 468 \text{ nm}$ et un maximum d'émission à $\lambda_{\text{em max}} = 552 \text{ nm}$.

III.2.5.2. Etude de stabilité

Afin d'étudier la stabilité thermique de cette molécule, une solution à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L est préparée dans un tampon PCR (tampon Tris, MgCl_2 5mM, Amersham Biosciences) afin de se rapprocher au mieux des conditions opératoires. La solution est analysée au spectrophotomètre (en début et fin d'expérience) et au spectrofluorimètre après plusieurs passages à $95 \text{ }^\circ\text{C}$ (Bain d'huile thermostaté). Les résultats sont présentés sur la figure 40 (les temps donnés sont des temps cumulés des passages successifs à $95 \text{ }^\circ\text{C}$).

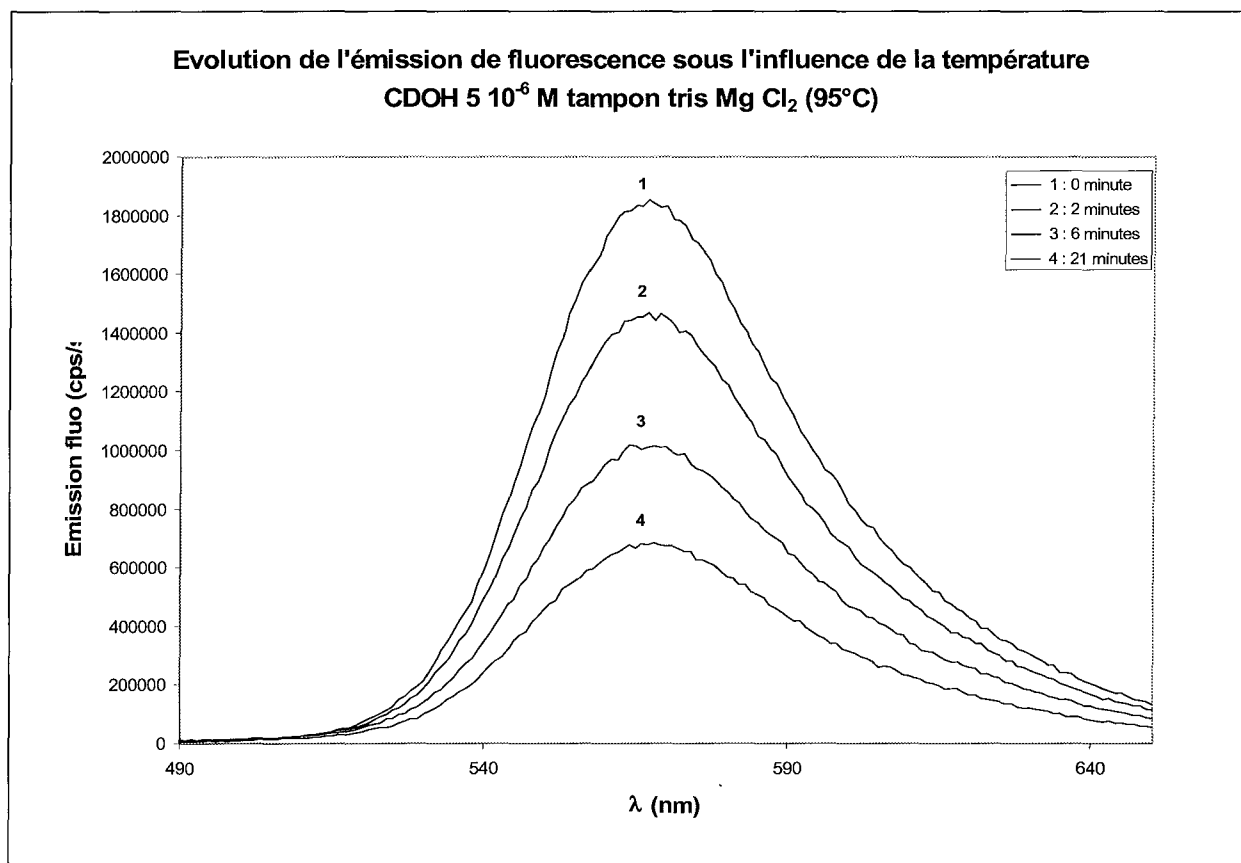


Figure 40 : Etude de stabilité de la molécule CDOH après passage à 95 °C ($\lambda_{exc} = 486$ nm)

On remarque une baisse de l'émission de fluorescence au cours du temps traduisant une instabilité certaine du produit en solution. Par contre, la forme du spectre de fluorescence ne change pas. On notera également que le maximum d'émission se situe maintenant à 567 nm (contre 552 nm dans l'éthanol). Les spectres UV avant et après cette expérience sont présentés sur la figure 41.

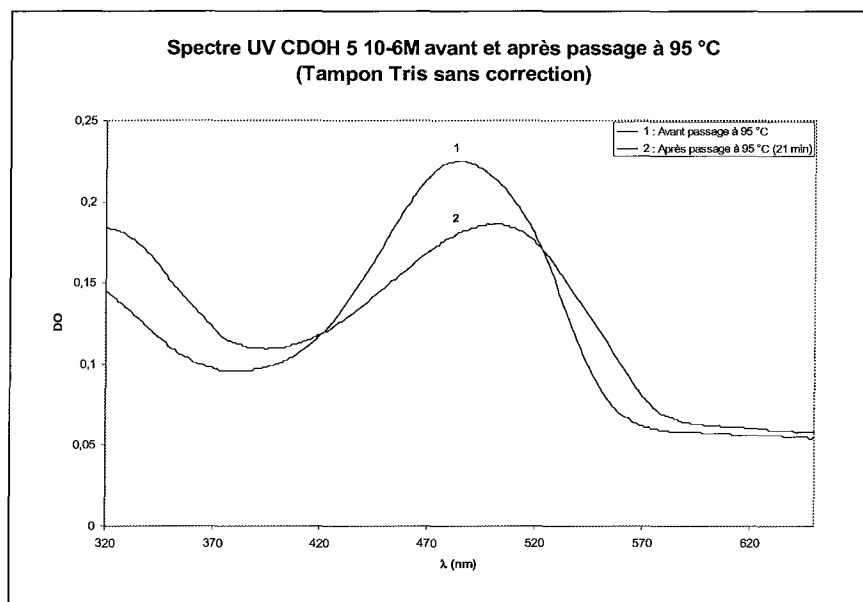


Figure 41 : Spectre UV de la molécule CDOH avant et après passage à 95 °C (21 min)

On remarque immédiatement une modification nette du spectre d'absorption traduisant une évolution de la composition de la solution. A noter également que le maximum d'absorption passe de 486 nm à 502 nm (contre 468 nm dans l'éthanol). Ceci peut également expliquer la baisse de la fluorescence observée sur la figure 40.

III.3. Etude d'inhibitions de fluorescence

III.3.1. Objectifs

Ces premières expériences visent à inhiber la fluorescence de divers fluorophores. Cette inhibition peut se faire par perte d'énergie suite à des collisions au sein de la solution. Nous étudierons ce phénomène en testant divers halogénures sur plusieurs fluorophores. Les influences du solvant et de la nature du contre-ion seront abordées.

Des inhibitions de fluorescence ont également été testées avec le rouge de méthyle, composé inhibiteur qui n'émet pas de fluorescence lorsqu'il capte l'énergie issue du fluorophore.

III.3.2. Inhibition de fluorescence par les halogénures

Dans cette série d'expériences, plusieurs halogénures ont été testés dans différentes conditions et leur capacité d'inhibition a été évaluée.

III.3.2.1. Etude de l'influence de KI sur la fluorescéine

III.3.2.1.1. Objectif

Cette expérience permet de vérifier l'influence de l'iodure de potassium (KI) sur la fluorescence d'une solution diluée de fluorescéine (figure 42). Cette inhibition est connue et a déjà été étudiée dans notre laboratoire (Baros et *al.*, 1990).

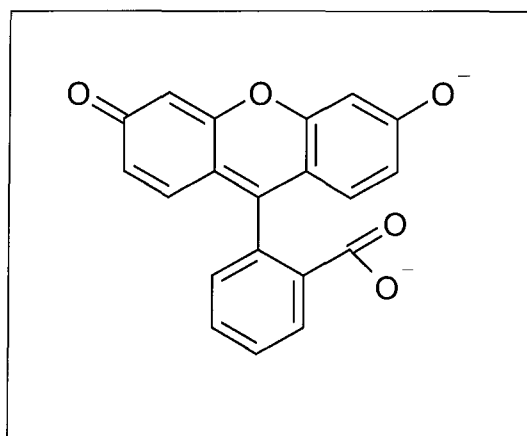


Figure 42 : Formule développée de la fluorescéine

III.3.2.1.2. Conditions expérimentales

Pour des raisons de solubilité de la fluorescéine, nous avons travaillé avec une *solution tampon* pH 10 (0,1 M de carbonate de sodium et d'hydrogénocarbonate de sodium) (cf. p52).

Deux solutions sont préparées, l'une ne contenant que le fluorophore (solution 1) et l'autre contenant le fluorophore à la même concentration et l'inhibiteur à une concentration voisine de 1 Mole/L (solution 2). Les expériences successives ont été réalisées en gardant la concentration de fluorophore fixe et en augmentant celle de l'inhibiteur (§ II.2.2, p49).

Solution 1 : fluorescéine diluée dans le tampon pH 10 : environ $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 2 : fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + KI à 1,03 Mole/L

L'analyse de la solution 1 au spectrophotomètre UV donne une longueur d'onde maximale d'absorption ($\lambda_{exc\ max}$) de 491 nm. La solution a ensuite été analysée au spectrofluorimètre à cette même longueur d'onde d'excitation. Les spectres d'absorption et d'émission de la fluorescéine sont représentés sur la figure 43.

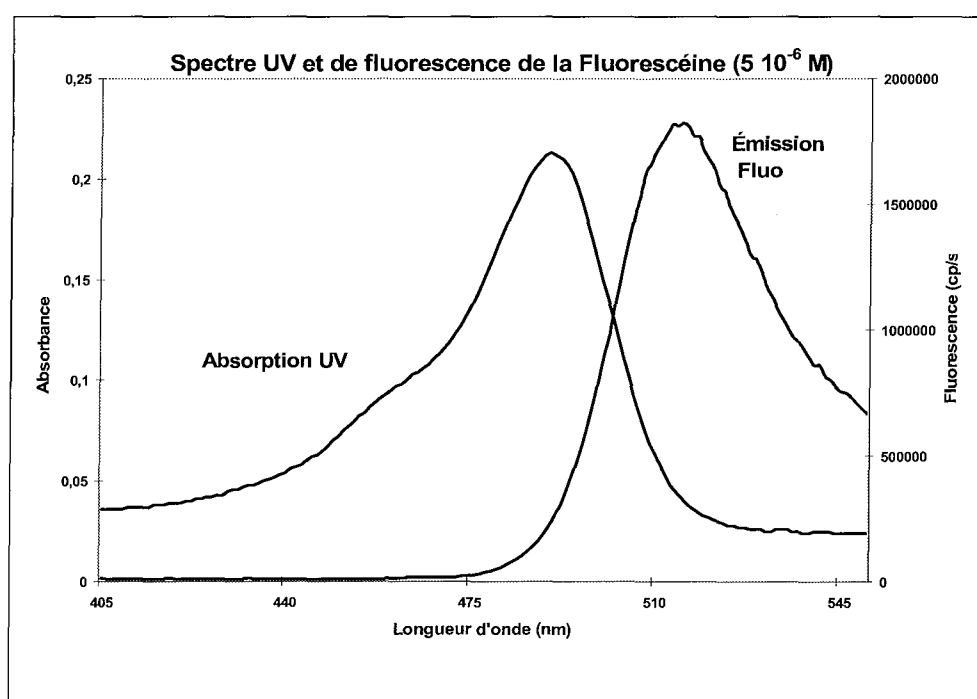


Figure 43 : Spectres UV et de fluorescence de la fluorescéine

($\lambda_{exc\ max} = 491\ nm$; $\lambda_{em\ max} = 513\ nm$; solvant : *tampon* pH 10)

Une gamme est préparée à partir de ces solutions 1 et 2 selon le tableau 4. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 491 nm et une longueur d'onde d'émission de 513 nm.

Les résultats sont présentés au paragraphe III.3.2.1.3.

III.3.2.1.3. Résultats

Le tableau 4 récapitule les compositions des cuves (en plastique) et donne les intensités de fluorescence I (en coups/seconde ou cps) mesurées au spectrofluorimètre. Les valeurs de I_0/I sont également fournies, I_0 étant l'intensité d'émission de la solution ne contenant pas d'inhibiteur, c'est-à-dire celle du tube 1.

Tube	Solution 1 (mL)	Solution 2 (mL)	KI (Mole/L)	I (10^5 cps)	I/I	I_0/I
1	3	0	0,0000	9,189	0,1088	1,0000
2	2,7	0,3	0,1027	4,657	0,2147	1,9732
3	2,4	0,6	0,2053	2,854	0,3504	3,2197
4	2,1	0,9	0,3080	1,933	0,5173	4,7538
5	1,7	1,3	0,4448	1,277	0,7831	7,1958
6	1,4	1,6	0,5475	0,990	1,0101	9,2818
7	1	2	0,6843	0,746	1,3405	12,3177
8	0,7	2,3	0,7870	0,615	1,6260	14,9415
9	0,3	2,7	0,9239	0,491	2,0367	18,7149
10	0	3	1,0265	0,434	2,3041	21,1728

Tableau 4 : Influence de quantités croissantes de KI sur l'intensité de fluorescence de la fluorescéine
(λ_{exc} = 491 nm ; solvant : tampon pH 10)

La figure 44 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience. L'inhibition de fluorescence apparaît nettement sur ce graphe. Une interpolation graphique permet d'avoir accès à la « constante » de Stern-Volmer (cf. p12) :

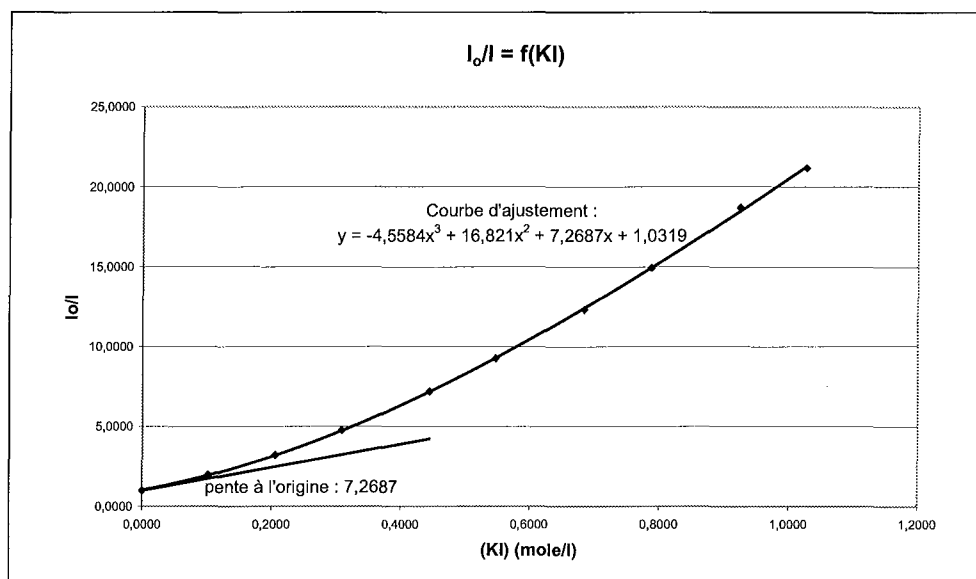


Figure 44 : Courbe de Stern-Volmer (KI sur fluorescéine) et pente à l'origine

Ainsi, le coefficient de Stern-Volmer (k_{SV}) vaut pour cette expérience : **7,269 L.Mole⁻¹**.

Aucun problème particulier n'a été rencontré lors de cette expérience.

Cette expérience confirme bien que l'inhibition de fluorescence de la fluorescéine par l'iodure de potassium est assez marquée.

III.3.2.2. Etude de l'influence de KI sur la fluorescence d'un 'rotor' moléculaire

III.3.2.2.1. Objectif

Par cette expérience, nous cherchons à mettre en évidence l'influence de KI sur d'autres fluorophores que la fluorescéine afin d'avoir à disposition un même inhibiteur pour plusieurs fluorophores (Figure 45) :

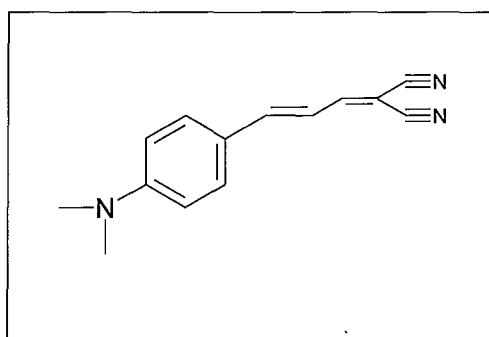


Figure 45 : Formule développée du rotor moléculaire utilisé, le DMAPB (1,1-dicyano-4(*p*-diméthylaminophenyl)-1,3-butadiène)

III.3.2.2.2. Conditions expérimentales et résultats

Le travail s'est effectué avec l'eau distillée comme solvant.

Deux solutions sont préparées, l'une ne contenant que le fluorophore (solution 3) et l'autre contenant le fluorophore à la même concentration et l'inhibiteur à une concentration voisine de 0,2 Mole/L (solution 4) :

Solution 3 : Solution de fluorophore ('rotor') à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 4 : Solution de fluorophore à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + KI à 0,2 Mole/L

L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm.

L'intensité d'émission pour la solution 3 est de **73 300 cps** et l'intensité d'émission pour la solution 4 est de **74 200 cps**. Cette première expérience ne fait donc pas apparaître d'inhibition de fluorescence

L'expérience est reconduite en augmentant la concentration de KI jusqu'à 2 Mole/L :

Solution 5 : Solution de fluorophore à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + KI à 2 Mole/L

L'analyse de la fluorescence se fait dans les mêmes conditions.

L'intensité d'émission pour la solution 3 est de **77 700 cps** (une nouvelle mesure a été faite pour ne pas avoir de différences dans les conditions opératoires) et l'intensité d'émission pour la solution 5 est **78 300 cps**.

Cette deuxième expérience ne fait donc toujours pas apparaître d'inhibition de fluorescence, même à forte concentration de KI.

Remarque : L'addition de KI à la solution de fluorophore (Solutions 4 et 5) s'est traduite par un phénomène endothermique avec un spectre UV décalé vers les grandes longueurs d'ondes. L'inhibition par les ions iodure n'est donc pas réalisable sur les fluorophores de type rotors moléculaires.

III.3.2.3. Etude de l'influence de l'iodure de tétrabutylammonium sur la fluorescéine.

III.3.2.3.1. Objectif

Dans cette expérience, nous avons utilisé une autre source d'ions iodure pour inhiber la fluorescence d'une solution de fluorophore. L'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) a été étudié car il représente grossièrement une molécule organique qui pourrait être greffée en fin de synthèse automatique d'un oligonucléotide.

III.3.2.3.2. Conditions expérimentales

La dissolution de l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) étant très délicate dans l'eau, nous avons travaillé avec des solutions diluées dans **l'éthanol absolu**.

Deux solutions sont préparées, l'une ne contenant que le fluorophore (solution 6) et l'autre contenant le fluorophore à la même concentration et l'inhibiteur (TBAI) à une concentration voisine de 0,25 Mole/L (solution 7) :

Solution 6 : fluorescéine diluée dans l'éthanol absolu : environ $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 7 : fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + TBAI à environ 0,25 Mole/L

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 5. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 521 nm.

III.3.2.3.3. Résultats

Le tableau 5 récapitule les compositions des cuves (en plastique) et donne les intensités de fluorescence I (en cps) mesurées au spectrofluorimètre. Les valeurs de I_0/I sont également fournies, I_0 étant l'intensité d'émission de la solution ne contenant pas d'inhibiteur, c'est-à-dire celle du tube 1.

Tube	Solution 6 (mL)	Solution 7 (mL)	TBAI (Mole/L)	I (10^5 cps)	I/I_0	I_0/I
1	3	0	0	12,14	0,082	1,000
2	2,7	0,3	0,025	14,28	0,070	0,850
3	2,3	0,7	0,058	11,85	0,084	1,024
4	2	1	0,083	8,41	0,119	1,444
5	1,7	1,3	0,108	6,8	0,147	1,785
6	1,3	1,7	0,142	5,42	0,185	2,240
7	1	2	0,167	4,72	0,212	2,572
8	0,7	2,3	0,192	4	0,250	3,035
9	0,3	2,7	0,225	3,14	0,318	3,866
10	0	3	0,25	2,88	0,347	4,215

Tableau 5 : Influence de quantités croissantes de TBAI sur la fluorescence de la fluorescéine

(λ_{exc} = 492 nm ; solvant : éthanol)

La figure 46 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience.

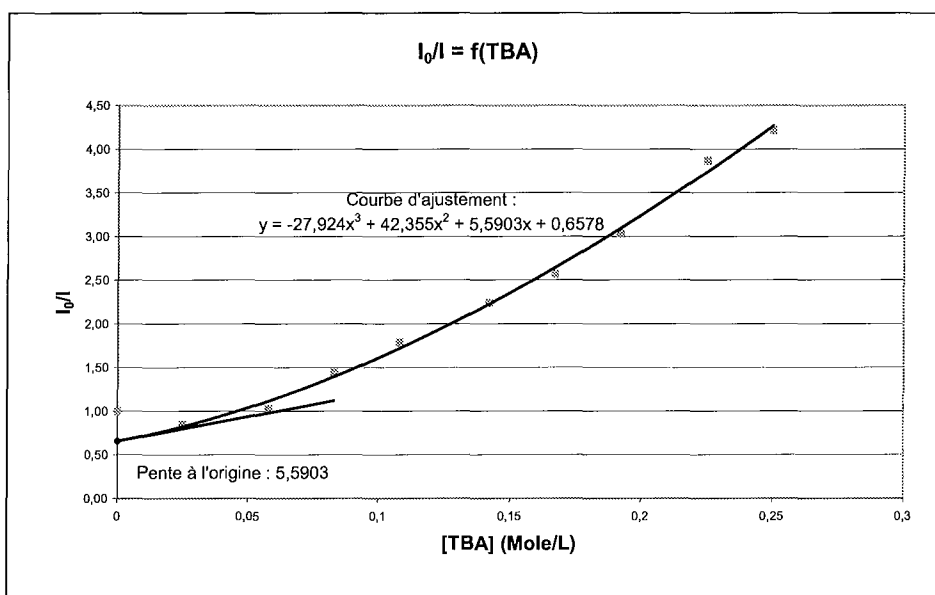


Figure 46 : Courbe de Stern-Volmer (TBAI sur fluorescéine) et pente à l'origine

L'inhibition de fluorescence est cette fois-ci assez nette, alors que la concentration en inhibiteur est faible (0,25 Mole/L) en rapport avec celle utilisée dans la première expérience pour le KI (1 Mole/L).

Pour obtenir une approximation de la constante de Stern-Volmer, le premier point de cette courbe a été éliminé, ce qui nous permet de calculer une pente à l'origine (Figure 46) : ainsi, le coefficient de Stern-Volmer vaut ici **5,59 L.Mole⁻¹**, ce qui représente 77 % de l'inhibition de KI sur la fluorescéine à concentration égale. L'inhibition observée peut donc être considérée comme étant très efficace.

III.3.2.4. Etude de l'influence du Bromure de Potassium (KBr) sur la fluorescéine

III.3.2.4.1. Objectif

Dans cette étude, les ions iodure sont remplacés par des ions bromure (bromure de potassium, KBr) afin de mettre en évidence l'influence de la nature des halogénures sur la fluorescence de la fluorescéine.

III.3.2.4.2. Conditions expérimentales et résultats

L'étude s'est faite dans un premier temps avec de l'eau distillée comme solvant, puis avec une solution tampon pH 10.

III.3.2.4.2.1. Etude dans l'eau distillée

Deux solutions sont préparées, l'une ne contenant que le fluorophore (solution 8) et l'autre contenant le fluorophore à la même concentration et l'inhibiteur (KBr) à une concentration voisine de 1 Mole/L (solution 9), ces deux solutions étant préparées dans l'eau distillée :

Solution 8 : Solution de fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 9 : Solution de fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + KBr à 1 Mole/L (pesée de 5,95 g de KBr dans 50 mL de solution 8)

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 6. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et une longueur d'onde d'émission de 512 nm.

Tube	Solution 8 (mL)	Solution 9 (mL)	KBr (Mole/L)	I (cps)	I/I ₀	I ₀ /I
1	3	0	0,0000	319844	3,12652E-06	1
2	2,7	0,3	0,1000	312419	3,20083E-06	1,02376616
3	2,3	0,7	0,2333	306872	3,25869E-06	1,0422717
4	2	1	0,3333	303654	3,29322E-06	1,05331726
5	1,7	1,3	0,4333	299374	3,3403E-06	1,06837601
6	1,3	1,7	0,5667	293596	3,40604E-06	1,08940176
7	1	2	0,6667	288227	3,46949E-06	1,10969479
8	0,7	2,3	0,7667	281778	3,54889E-06	1,13509216
9	0,3	2,7	0,9000	273714	3,65345E-06	1,16853358
10	0	3	1,0000	268825	3,71989E-06	1,18978518

Tableau 6 : Influence de quantités croissantes de KBr sur la fluorescéine

(λ_{exc} = 490 nm ; solvant : eau distillée)

La figure 47 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience ainsi qu'une interpolation graphique permettant de déterminer une pente à l'origine.

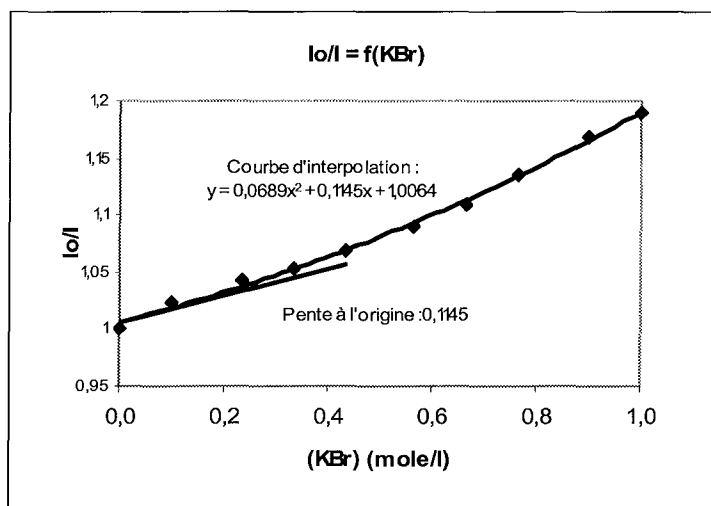


Figure 47 : Courbe de Stern-Volmer (KBr sur fluorescéine) et pente à l'origine

L'inhibition de fluorescence est assez nette. La constante de Stern-Volmer ainsi calculée vaut **$0,1145 \text{ L.Mole}^{-1}$** . Ceci représente une inhibition 60 fois plus faible que l'action de KI sur la fluorescéine.

Afin de mettre en évidence les différences éventuelles dues au milieu, l'expérience a été recommencée en se plaçant dans le *tampon* pH = 10.

III.3.2.4.2.2. Etude dans une solution *tampon* pH = 10

Deux solutions sont préparées, l'une ne contenant que le fluorophore (solution 10) et l'autre contenant le fluorophore à la même concentration et l'inhibiteur (KBr) à une concentration voisine de 1 Mole/L (solution 11), ces deux solutions étant préparées dans le *tampon* pH 10 :

Solution 10 : Solution de fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 11 : Solution de fluorescéine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + KBr à 1 Mole/L (pesée de 5,96 g de KBr dans 50 mL de solution 10)

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 7. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 490 nm et une longueur d'onde d'émission de 512 nm.

Tube	Solution 10 (mL)	Solution 11 (mL)	KBr (Mole/L)	I (10 ⁶ cps)	I/I ₀	I ₀ /I
1	3	0	0,000	1,509	0,663	1,000
2	2,7	0,3	0,100	1,500	0,667	1,006
3	2,3	0,7	0,233	1,473	0,679	1,024
4	2	1	0,333	1,457	0,686	1,036
5	1,7	1,3	0,433	1,435	0,697	1,052
6	1,3	1,7	0,567	1,403	0,713	1,076
7	1	2	0,667	1,377	0,726	1,096
8	0,7	2,3	0,767	1,342	0,745	1,124
9	0,3	2,7	0,900	1,311	0,763	1,151
10	0	3	1,000	1,290	0,775	1,170

Tableau 7 : Influence du KBr sur la fluorescéine

($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10)

La figure 48 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience.

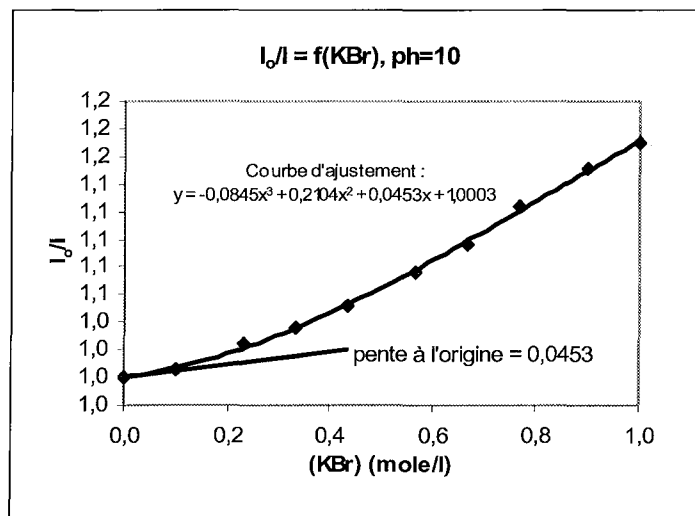


Figure 48 : Courbe de Stern-Volmer (KBr sur fluorescéine) et pente à l'origine

(solvant = tampon pH 10)

Ainsi, le coefficient de Stern-Volmer vaut ici : **0,0453 L.Mole⁻¹**, ce qui représente une inhibition environ 160 fois plus faible que pour le KI, à même concentration.

Comparés aux ions iodure, les ions bromure apparaissent très peu efficaces pour être utilisés comme inhibiteurs.

III.3.3. Inhibition de fluorescence par le rouge de méthyle

III.3.3.1. Objectifs

Ce paragraphe présente deux expériences portant sur l'inhibition de fluorescence exercée par le rouge de méthyle sur deux fluorophores. Contrairement au DABCYLE, le rouge de méthyle (cf. § I.2.3.3 p 17) est très peu utilisé comme inhibiteur dans les structures de type balise moléculaire. Le fait qu'il soit commercial et très peu cher nous a incité à étudier son comportement vis-à-vis de deux fluorophores dérivés des coumarines.

III.3.3.2. Etude de l'influence du rouge de méthyle sur la C12-Cou

Dans cette expérience, la C12-Cou est maintenue à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et est excitée à 342 nm, afin de minimiser l'absorption par le rouge de méthyle. On peut s'attendre à ce que l'émission de fluorescence (à 442 nm) soit en grande partie absorbée par l'inhibiteur.

Deux solutions sont préparées, l'une contenant la C12-Cou (solution 14) à environ $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et l'autre contenant la C12-Cou à la même concentration et le MR (rouge de méthyle) à une concentration voisine de $4 \cdot 10^{-5}$ Mole/L (solution 15), ces deux solutions étant préparées dans le *tampon* pH 10 (un essai dans l'eau distillée n'a pas été concluant en raison des propriétés acido-basiques du rouge de méthyle) :

Solution 14 : Solution de C12-Coumarine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L, solvant : *tampon* pH 10.

Solution 15 : Solution de C12-Coumarine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et MR à $4 \cdot 10^{-5}$ Mole/L, solvant : *tampon* pH 10.

La réalisation d'une gamme a été faite selon le tableau 8, les résultats étant représentés sur la figure 49.

Tube	Solution 14 (mL)	Solution 15 (mL)	MR (Mole/l)	C12-Cou (Mole/l)	I (cps)	1/I	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	131875,766	7,58E-06	1,00
2	2,7	0,3	4,00E-06	5,00E-06	118088,438	8,47E-06	1,12
3	2,3	0,7	9,33E-06	5,00E-06	104470,578	9,57E-06	1,26
4	2	1	1,33E-05	5,00E-06	92193,5938	1,08E-05	1,43
5	1,7	1,3	1,73E-05	5,00E-06	81544,1797	1,23E-05	1,62
6	1,3	1,7	2,27E-05	5,00E-06	69645,5781	1,44E-05	1,89
7	1	2	2,67E-05	5,00E-06	62283,4297	1,61E-05	2,12
8	0,7	2,3	3,07E-05	5,00E-06	55160,9531	1,81E-05	2,39
9	0,3	2,7	3,60E-05	5,00E-06	47189,7266	2,12E-05	2,79
10	0	3	4,00E-05	5,00E-06	41133,9023	2,43E-05	3,21

Tableau 8 : Influence du rouge de méthyle sur la C12-Coumarine

($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10)

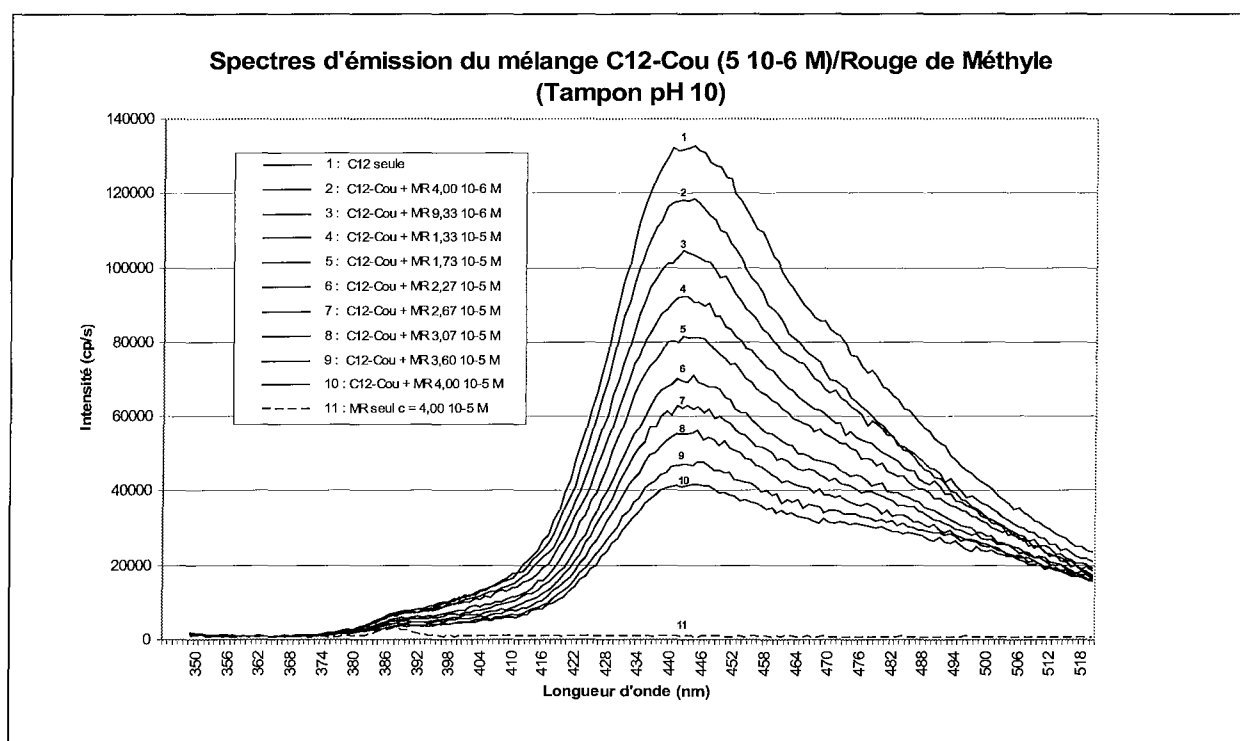


Figure 49 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / MR

($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10)

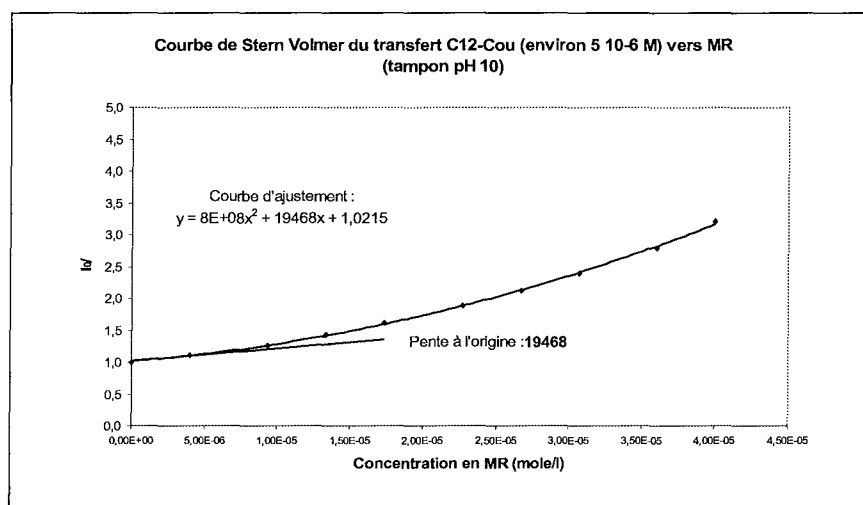


Figure 50 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers MR) et pente à l'origine
(solvant : tampon pH 10)

L'analyse de Stern Volmer donne une constante $k_{SV} = 19\ 468\ \text{L.Mole}^{-1}$. Ceci confirme bien que le rouge de méthyle est un très bon inhibiteur de fluorescence, à l'instar de son homologue, le DABCYCLE déjà très utilisé dans la technologie des balises moléculaires (seule la position du groupement carboxyle change et passe de la position ortho à la position para).

III.3.3.3. Etude de l'influence du Rouge de Méthyle sur le CDOH

Une deuxième expérience vise à rechercher une inhibition du CDOH par le rouge de méthyle. Pour des raisons de stabilité, l'étude s'est faite dans l'éthanol absolu (un passage par un milieu aqueux provoque (comme pour la CN-Coumarine) une perte de fluorescence au cours du temps). Cependant, il a été remarqué des modifications du spectre d'absorption du MR en milieu éthanolique par rapport à un milieu aqueux.

Deux solutions sont préparées :

Solution 16 : Solution de CDOH à $5\ 10^{-6}$ Mole/L, solvant : éthanol.

Solution 17 : Solution de CDOH à $5\ 10^{-6}$ Mole/L et MR à $5\ 10^{-5}$ Mole/L, solvant : éthanol.

La réalisation d'une gamme a été faite selon le tableau 9, les résultats étant représentés sur la figure 51. En raison de la faible émission du CDOH et d'un signal assez bruité, il a été décidé

d'augmenter la largeur des fentes du spectrofluorimètre à 3 mm (bande passante : 11,3 nm), contre 1,5 mm (bande passante : 5,7 nm) dans les autres expériences.

Tube	Solution 16 (mL)	Solution 17 (mL)	MR (Mole/l)	CDOH (Mole/l)	I (cps)	I/I	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	10798197	9,26E-08	1,00
2	2,7	0,3	5,00E-06	5,00E-06	10923231	9,15E-08	0,99
3	2,3	0,7	1,17E-05	5,00E-06	10589865	9,44E-08	1,02
4	2	1	1,67E-05	5,00E-06	9576671	1,04E-07	1,13
5	1,7	1,3	2,17E-05	5,00E-06	9264243	1,08E-07	1,17
6	1,3	1,7	2,83E-05	5,00E-06	8733854	1,14E-07	1,24
7	1	2	3,33E-05	5,00E-06	8064663	1,24E-07	1,34
8	0,7	2,3	3,83E-05	5,00E-06	7113641,5	1,41E-07	1,52
9	0,3	2,7	4,50E-05	5,00E-06	6372431	1,57E-07	1,69
10	0	3	5,00E-05	5,00E-06	5086258	1,97E-07	2,12

Tableau 9 : Influence du MR sur le CDOH

(λ_{exc} = 468 nm ; solvant : éthanol)

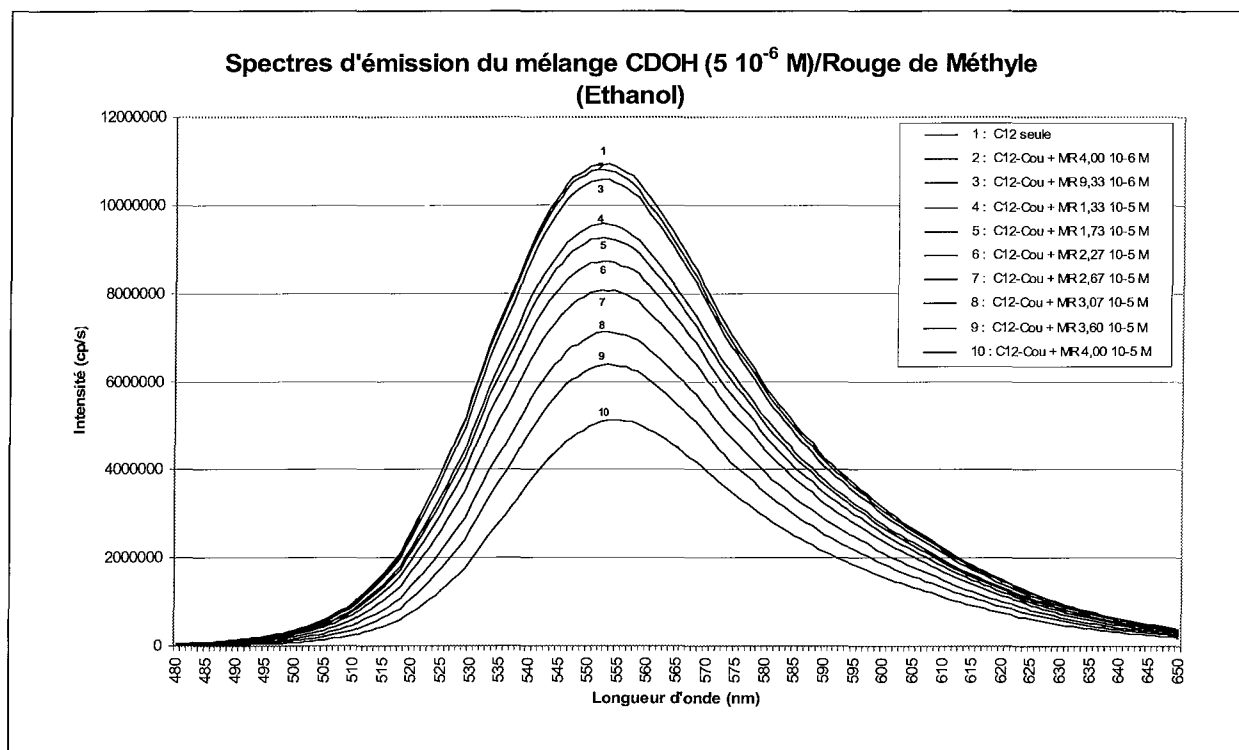


Figure 51 : Spectres d'émission du mélange CDOH / MR

(λ_{exc} = 468 nm ; solvant : éthanol)

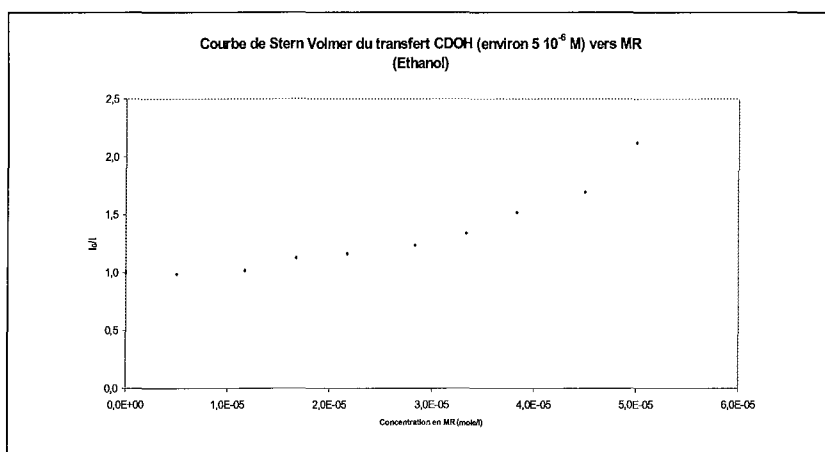


Figure 52 : Courbe de Stern-Volmer (CDOH vers MR ; solvant : éthanol)

L'analyse de Stern Volmer est délicate ici en raison de la trop forte absorption du MR dans le domaine d'excitation du CDOH se traduisant par une diminution artificielle (artefact) de la fluorescence (effet de peau). On remarque tout de même que la pente à l'origine semble très faible, voire nulle. Ceci traduit une absence d'inhibition dans ce cas.

Les exemples étudiés ne sont pas nombreux, néanmoins nous pouvons constater la difficulté de trouver un seul inhibiteur capable d'inhiber plusieurs fluorophores.

III.4. Transferts de fluorescence

III.4.1. Objectifs

Avec l'objectif de préparer des composés fluorescents de type cassette « FRET », nous avons abordé l'étude des interactions qui pouvaient exister entre les différents fluorophores présentés plus haut. Le principe est le même que pour l'inhibition de fluorescence : le fluorophore donneur est maintenu à la même concentration et les concentrations du fluorophore accepteur sont augmentées progressivement.

III.4.2. Interactions entre N-Cou, O-Cou et fluorescéine

III.4.2.1. Objectifs

Après avoir étudié les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de ces trois fluorophores, nous avons testé les interactions existantes entre la N-Ethyl Coumarine (N-Cou) et la fluorescéine, puis entre l'Hydroxy-Coumarine (O-Cou) et la fluorescéine, et enfin nous avons recherché l'existence d'un transfert énergétique entre ces deux coumarines.

Dans les expériences qui suivent, le fluorophore est excité à son $\lambda_{\text{exc max}}$ et une gamme est préparée en faisant varier la concentration du constituant jouant le rôle d'inhibiteur. Les spectres d'émission de fluorescence qui en résultent sont enregistrés sur une même figure.

Une solution mère de fluorescéine à 10^{-3} Mole/L est préparée pour l'étude et sera utilisée directement pour préparer les gammes de mesures des interactions. Des dilutions ont été effectuées par la suite pour tracer des spectres de référence.

III.4.2.2. Etude des interactions entre la N-Ethyl Coumarine et la fluorescéine

Dans cette expérience, la N-Cou jouant le rôle du fluorophore donneur est excitée à 430 nm (Figure 53). La fluorescéine constitue l'accepteur de fluorescence. Nous nous sommes attachés à observer l'existence d'un transfert énergétique entre ces deux molécules et à déterminer si possible un coefficient de Stern-Volmer correspondant à cette expérience.

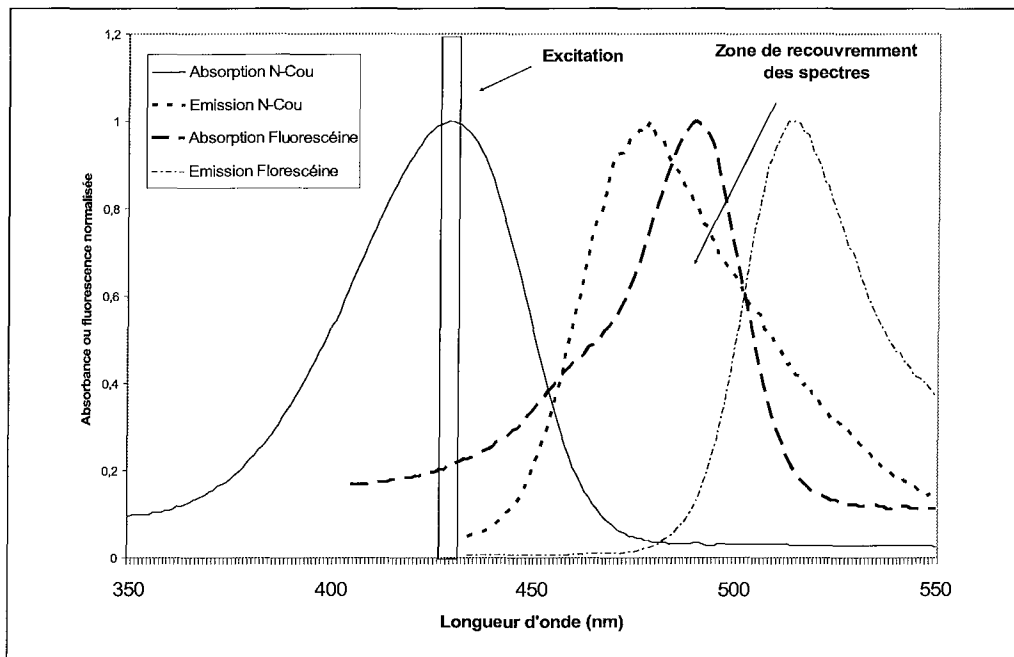


Figure 53 : Principe du transfert d'énergie entre la N-Cou et la fluorescéine

Le calcul de la probabilité de transfert d'énergie (§ II.2.3, page 50) donne une valeur de **0,28** pour une concentration en accepteur de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L. Ainsi, on peut estimer que 28 % de l'énergie émise par le donneur est captée par l'accepteur. Celui-ci devrait ensuite réémettre de la fluorescence en perdant une certaine quantité d'énergie (rendement quantique).

Deux solutions sont utilisées, l'une contenant la N-Cou (solution 18) et l'autre contenant l'accepteur (Fluorescéine) à une concentration voisine de 10^{-3} Mole/L (solution 19), ces deux solutions étant préparées dans l'eau distillée :

Solution 18 : Solution de N-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 19 : Solution de fluorescéine à 10^{-3} Mole/L

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 10. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 430 nm.

Les spectres obtenus sont représentés sur la figure 54 :

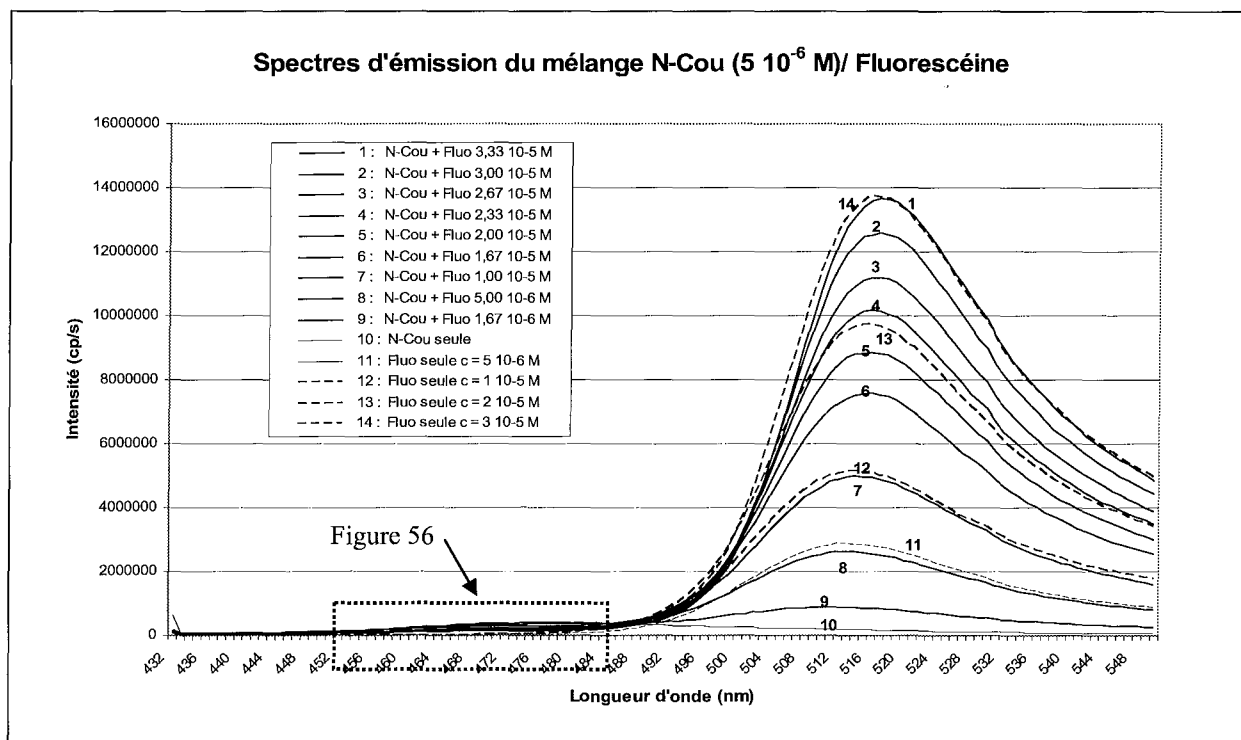


Figure 54 : Spectres d'émission du mélange N-Cou / Fluorescéine

($\lambda_{exc} = 430$ nm ; solvant : eau distillée)

On notera la faible émission de fluorescence de la N-Cou par rapport à celle de la fluorescéine qui absorbe encore beaucoup de lumière incidente à 430 nm (Figure 53). Ainsi, on pouvait s'attendre à observer peu de différence sur l'intensité d'émission de la fluorescéine en présence du donneur. Au contraire, nous avons remarqué que c'était l'inverse qui se produisait, la fluorescéine semblant émettre moins de fluorescence en présence de la N-Cou que lorsqu'elle est seule. Il est cependant difficile de conclure à ce niveau sur la cause de cette différence ; peut-être une compétition au niveau de l'absorption de la lumière incidente (léger effet de peau).

Par contre, on peut mettre aisément en évidence le phénomène de filtre interne en comparant la forme du spectre de la fluorescéine aux deux concentrations extrêmes que nous avons utilisées. Il est assez visible que le spectre de la fluorescéine semble être écrasé du côté des faibles longueurs d'ondes (Figure 54) ; aussi, une analyse plus poussée des spectres obtenus a été menée afin de mettre en évidence les phénomènes entrant en jeu (Figure 55).

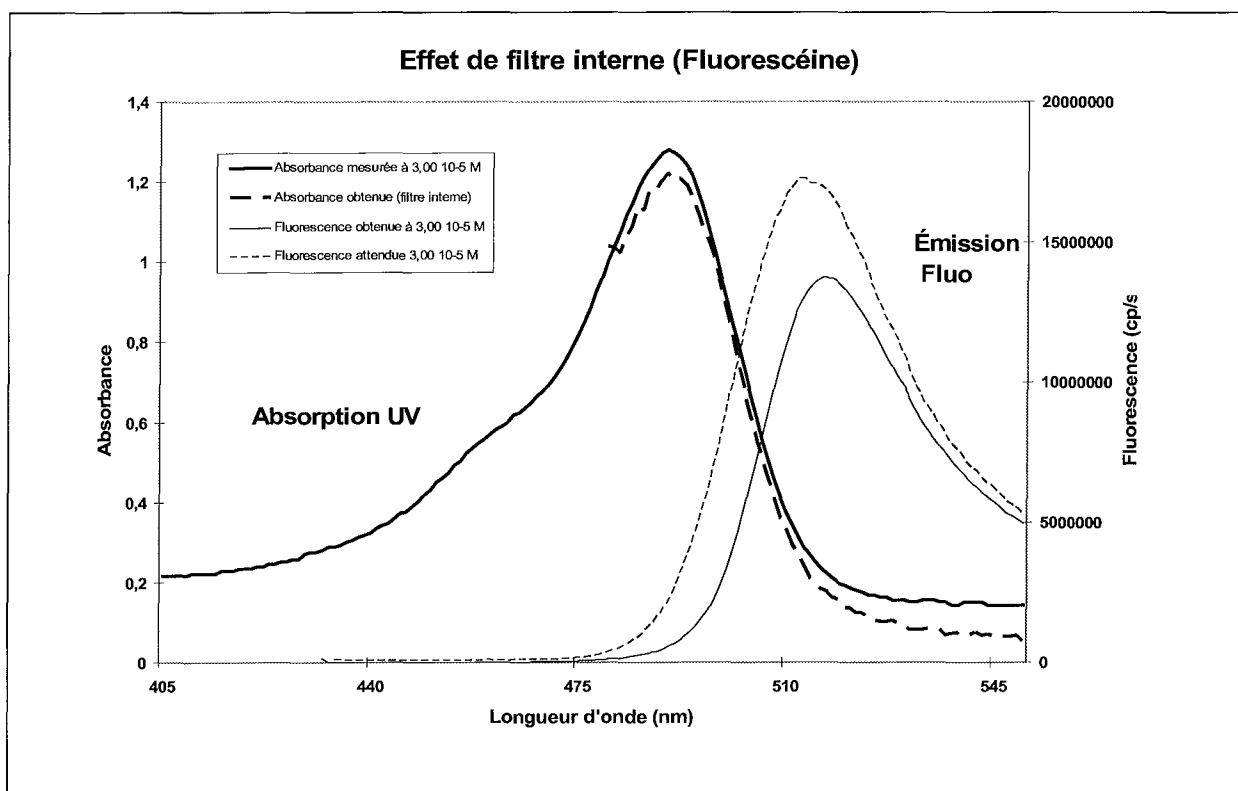


Figure 55 : Mise en évidence de l'effet de filtre interne

Ce graphique part de l'hypothèse que l'effet de filtre interne est négligeable pour de faibles concentrations en fluorescéine, ce qui permet d'extrapoler un spectre de fluorescence attendu à forte concentration à partir d'un spectre à faible concentration en fluorescéine. Puis, il suffit de calculer une densité optique (DO) dans la zone de recouvrement en prenant le logarithme décimal du rapport de l'intensité de fluorescence attendue sur celle obtenue réellement. A noter que cette valeur a été multipliée par deux pour effectuer une comparaison avec l'absorbance mesurée, car le trajet optique du faisceau de fluorescence est globalement deux fois moindre que la largeur de la cuve étant donné que l'excitation est effectuée en milieu de cuve.

On constate qu'il existe bien un effet de filtre interne dans notre cas, expliquant la déformation du spectre de la fluorescéine. Cette étude permet d'apprécier la difficulté qu'il peut y avoir dans l'interprétation des spectres d'émission de fluorescence de mélanges de fluorophores.

La partie intéressante du graphique de la figure 54 se situe en fait autour de 477 nm, là où on s'attend à observer le maximum d'émission de fluorescence de la N-Cou. C'est donc à

cette longueur d'onde que nous allons rechercher une inhibition de fluorescence due à la présence de fluorescéine dans la solution.

La figure 56 montre bien cette inhibition de fluorescence à cette longueur d'onde.

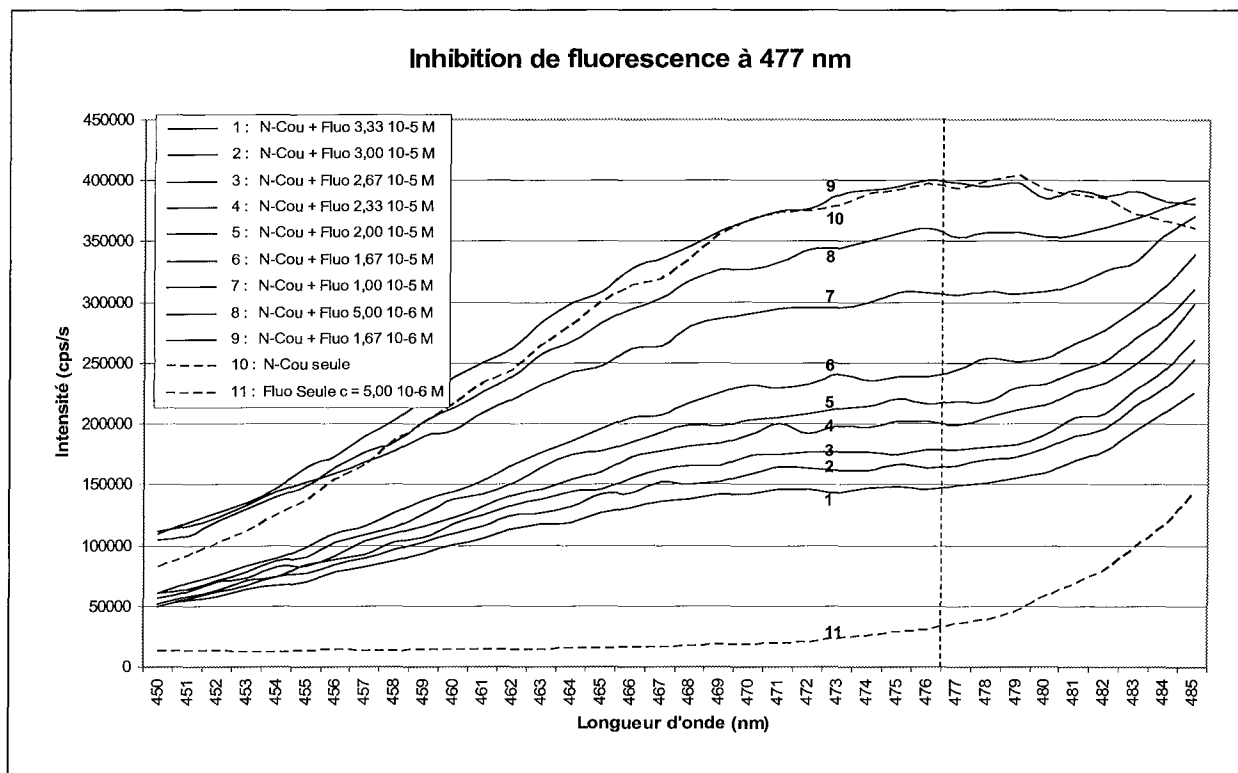


Figure 56 : Inhibition de fluorescence de la N-Cou par la fluorescéine

($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$; solvant : eau distillée)

Les données correspondantes à ce point et les calculs effectués ont été regroupés dans le tableau 10.

Tube	Solution 18 (mL)	Solution 19 (µL)	Fluorescéine (Mole/L)	N-Coumarine (Mole/L)	I (cps)	I/I ₀	I ₀ /I
10	3	0	0,00E+00	5,00E-06	393338	2,54E-06	1,00
9	2,995	5	1,67E-06	4,99E-06	397805	2,51E-06	0,99
8	2,985	15	5,00E-06	4,98E-06	353200	2,83E-06	1,11
7	2,97	30	1,00E-05	4,95E-06	305404	3,27E-06	1,29
6	2,95	50	1,67E-05	4,92E-06	245020	4,08E-06	1,61
5	2,94	60	2,00E-05	4,90E-06	218899	4,57E-06	1,80
4	2,93	70	2,33E-05	4,88E-06	198868	5,03E-06	1,98
3	2,92	80	2,67E-05	4,87E-06	179105	5,58E-06	2,20
2	2,91	90	3,00E-05	4,85E-06	165467	6,04E-06	2,38
1	2,9	100	3,33E-05	4,83E-06	148973	6,71E-06	2,64

Tableau 10 : Influence de la fluorescéine sur la N-Coumarine

($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 477 \text{ nm}$; solvant : eau distillée)

La figure 57 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience.

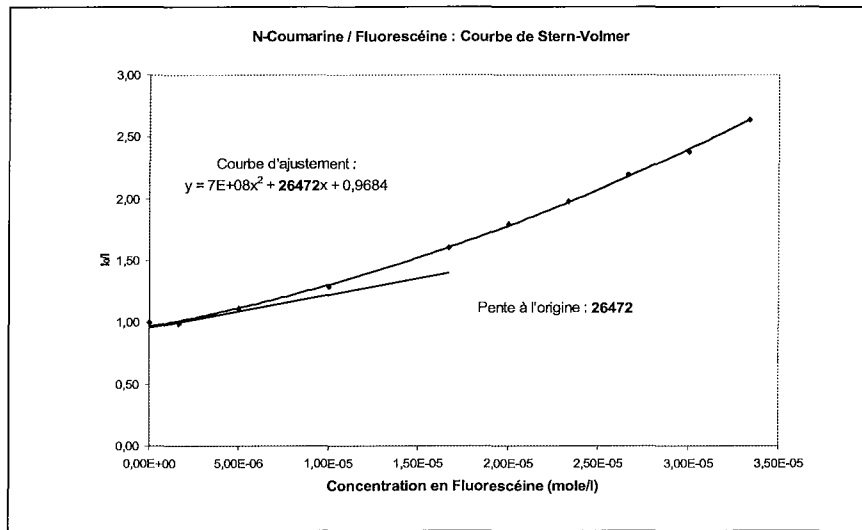


Figure 57 : Courbe de Stern-Volmer (fluorescéine sur N-Cou) et pente à l'origine
(solvant : eau distillée)

La constante de Stern-Volmer a été calculée : $k_{SV} = 26\ 472\ \text{L.Mole}^{-1}$. La fluorescence du donneur diminue de façon progressive. En contrepartie il est difficile de mettre en évidence le transfert car dans ces conditions la fluorescence émise par excitation directe de la fluorescéine est aussi importante.

III.4.2.3. Etude des interactions entre la O-Coumarine et la fluorescéine

Cette série d'expériences doit permettre de rechercher une éventuelle interaction entre la fluorescéine et la O-Cou. Comme dans le paragraphe III.4.2.2, la fluorescéine joue le rôle d'accepteur, donc d'inhibiteur de fluorescence de la coumarine.

Les manipulations seront donc les mêmes que précédemment.

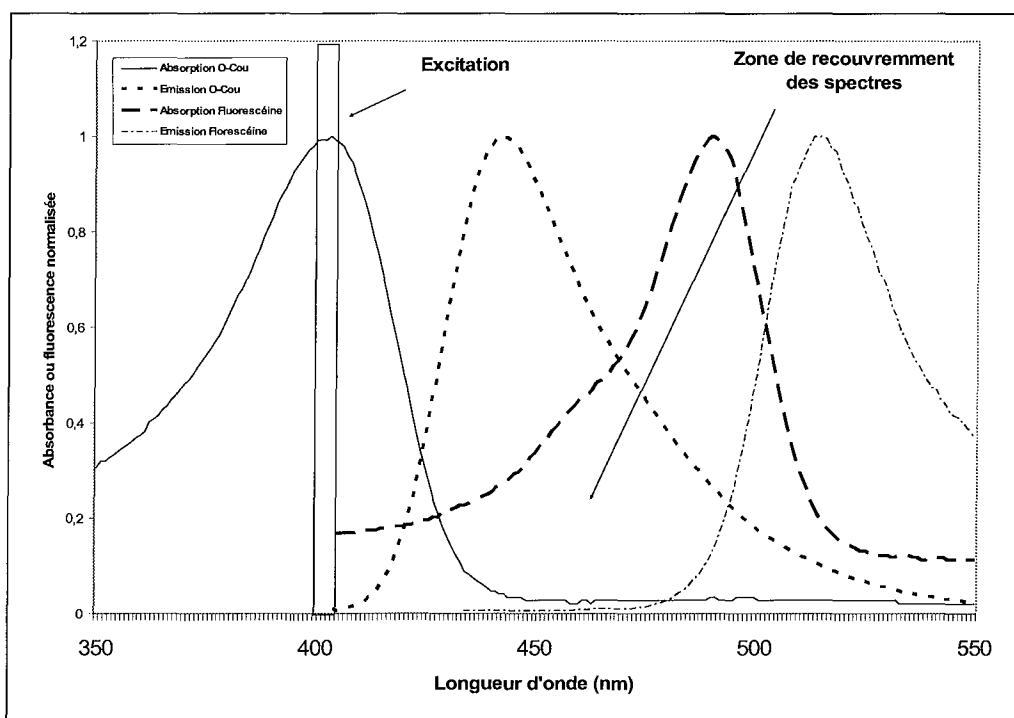


Figure 58 : Principe du transfert d'énergie entre la O-Cou et la fluorescéine

Le calcul de la probabilité de transfert d'énergie (§ II.2.3, page 50) donne une valeur de **0,21** pour une concentration en accepteur de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L.

Deux solutions sont utilisées, l'une contenant la O-Cou (solution 20) et l'autre contenant l'accepteur (Fluorescéine) à une concentration voisine de 10^{-3} Mole/L (solution 21), ces deux solutions étant préparées dans l'eau distillée :

Solution 20 : Solution de O-Coumarine à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 21 : Solution de fluorescéine à 10^{-3} Mole/L

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 11. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 402 nm. Les spectres obtenus sont présentés figure 59 :

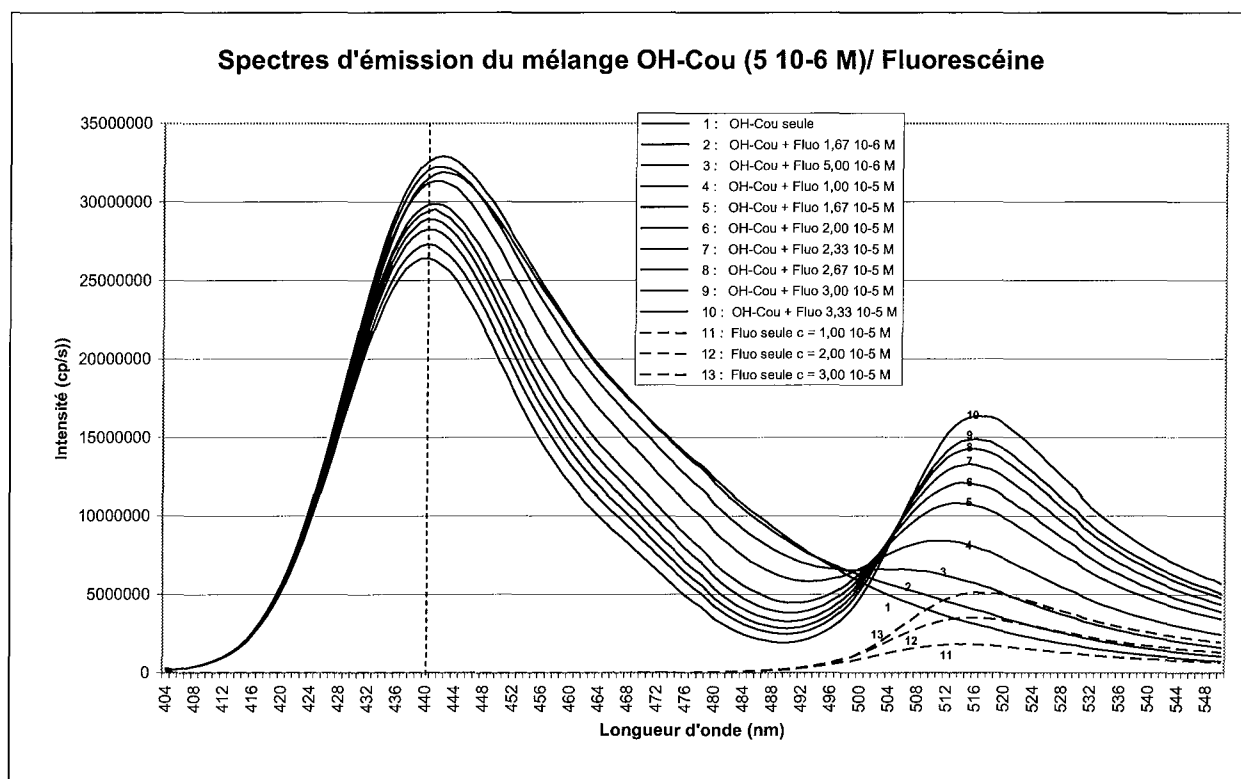


Figure 59 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / Fluorescéine
 ($\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$; solvant : eau distillée)

Il est ici intéressant d'observer que le spectre d'émission de la O-Cou est plus affecté par une baisse d'intensité vers les grandes longueurs d'onde, ceci s'expliquant simplement par une plus forte absorption de la fluorescéine dans ce domaine comme le montre la figure 58.

De plus, on notera cette fois-ci que le transfert est bien visible puisque les intensités de fluorescence sont bien plus élevées pour la fluorescéine en présence du donneur, la O-Cou, qui émet beaucoup plus que la N-Cou.

Ainsi, en excitant la molécule à 402 nm, on obtient une émission accrue à 515 nm, ce qui représente tout de même un décalage de plus de 100 nm. Ceci est intéressant dans l'optique d'une application pour les cassettes FRET par exemple.

Afin de mesurer la constante de Stern-Volmer, nous avons regroupé dans le tableau 11 les données correspondantes au maximum d'émission de la O-Coumarine :

Tube	Solution 20 (mL)	Solution 21 (μL)	Fluorescéine (Mole/L)	O-Cou (Mole/L)	I (cps)	I/I ₀	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	31767828	3,15E-08	1,00
2	2,995	5	1,67E-06	4,99E-06	32833824	3,05E-08	0,97
3	2,985	15	5,00E-06	4,98E-06	32236742	3,10E-08	0,99
4	2,97	30	1,00E-05	4,95E-06	31339454	3,19E-08	1,01
5	2,95	50	1,67E-05	4,92E-06	29882450	3,35E-08	1,06
6	2,94	60	2,00E-05	4,90E-06	29531344	3,39E-08	1,08
7	2,93	70	2,33E-05	4,88E-06	28858886	3,47E-08	1,10
8	2,92	80	2,67E-05	4,87E-06	28212414	3,54E-08	1,13
9	2,91	90	3,00E-05	4,85E-06	27231636	3,67E-08	1,17
10	2,9	100	3,33E-05	4,83E-06	26282972	3,80E-08	1,21

Tableau 11 : Influence de la fluorescéine sur la O-Coumarine

($\lambda_{exc} = 402 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 441 \text{ nm}$; solvant : eau distillée)

Ces données nous permettent de tracer la courbe de Stern-Volmer (Figure 60).

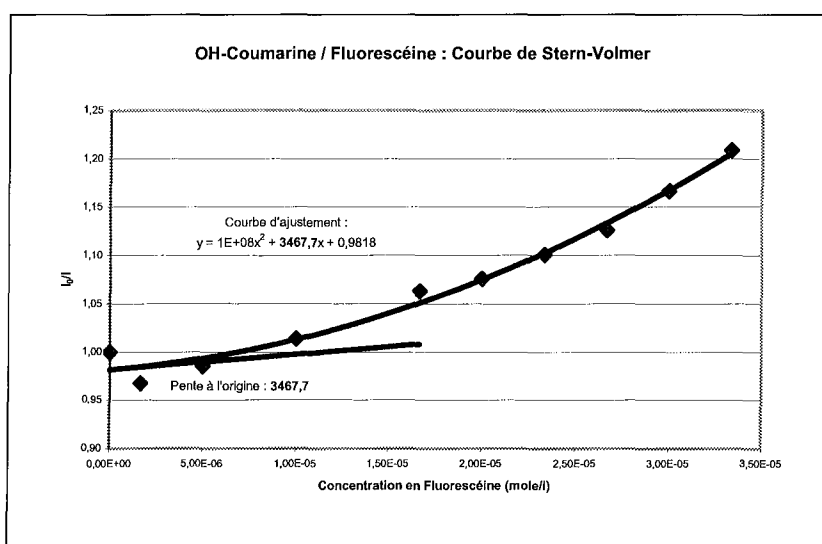


Figure 60 : Courbe de Stern-Volmer (fluorescéine sur O-Cou)

Une interpolation graphique est ici assez délicate, le premier point étant en décalage par rapport aux autres. Cependant, un polynôme d'ordre 2 a été tout de même calculé ce qui permet de calculer une constante de Stern-Volmer pour cette expérience ; ainsi, cette constante vaut ici **3 467,7 L.Mole⁻¹**. On remarque que le premier point à concentration nulle semble aberrant ; sans ce point, la constante vaut **7122,5 L.Mole⁻¹**. L'explication peut venir d'une différence ponctuelle de concentration de O-Cou entre les solutions 20 et 21 due à une imprécision dans une étape de leur préparation.

III.4.2.4. Etude des interactions entre la N-Ethyl Coumarine et la O-Coumarine

Ces deux composés à structure coumarine ont des données d'absorption et d'émission assez proches (cf. Tableau 3, p.62) ; néanmoins, une interaction entre les deux coumarines a été recherchée. En effet, nous avons remarqué que l'O-Cou, excitée à 380 nm (afin de s'affranchir d'une trop forte absorption de la N-Cou à cette longueur d'onde), émettait dans une gamme de longueurs d'onde proche du $\lambda_{\text{exc max}}$ de la N-Cou.

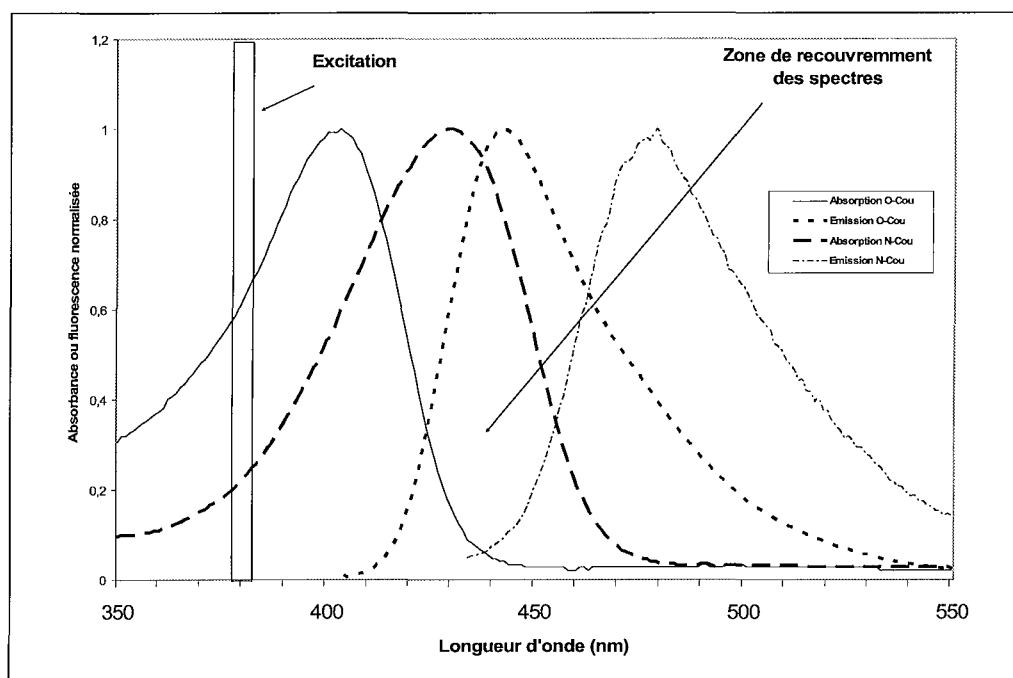


Figure 61 : Principe du transfert d'énergie entre la O-Cou et la N-Cou

Le calcul de la probabilité de transfert d'énergie (§ II.2.3, page 50) donne une valeur de **0,24** pour une concentration en accepteur de $5 \cdot 10^{-6}$ M. On remarquera que les spectres d'émission des deux composés sont assez proches l'un de l'autre ce qui pourra poser des problèmes de résolution des deux spectres lors de l'analyse du mélange.

Dans les expériences qui suivent, la O-Cou est excitée (à 380 nm) en présence de quantités croissantes de N-Cou, et les spectres d'émissions de ces mélanges sont regroupés sur la figure 62.

Deux solutions sont préparées, l'une contenant la O-Cou (solution 22) et l'autre contenant l'accepteur (N-Coumarine) à une concentration voisine de 10^{-3} Mole/L (solution 23), ces deux solutions étant préparées dans l'eau distillée :

Solution 22 : Solution de O-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L

Solution 23 : Solution de N-Cou à 10^{-3} Mole/L

Une solution de référence en N-Cou est préparée en diluant 600 μ L de **solution 23** dans 20 mL d'eau distillée. Cette solution à $3 \cdot 10^{-5}$ Mole/L ainsi préparée sera analysée en spectrofluorimétrie ainsi que ses dilutions aux 2/3 et au 1/3 (respectivement $2 \cdot 10^{-5}$ Mole/L et $1 \cdot 10^{-5}$ Mole/L). Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 12. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 380 nm. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 62 :

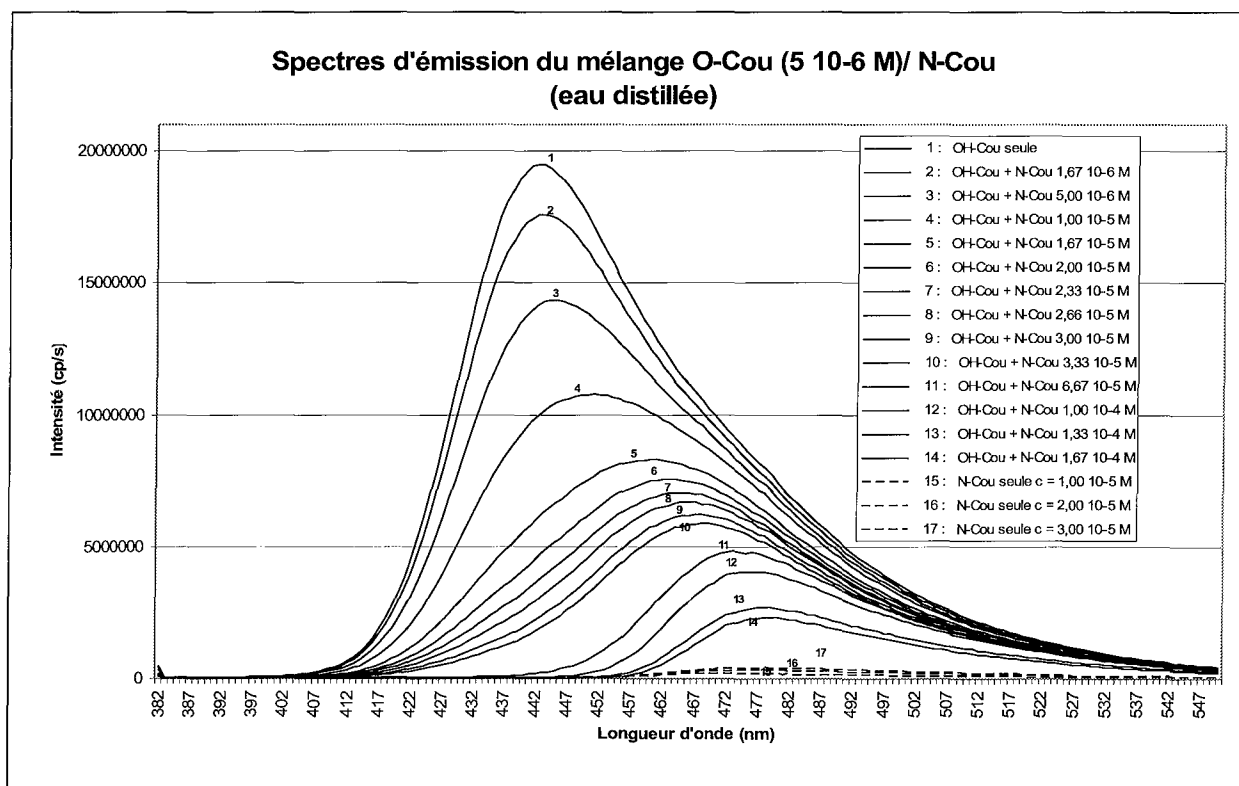


Figure 62 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / N-Cou

($\lambda_{exc} = 380$ nm ; solvant : eau distillée)

Tube	Solution 22 (mL)	Solution 23 (mL)	N-Cou (Mole/L)	O-Cou (Mole/L)	I (cps)	I/I ₀	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	19463618	5,14E-08	1,00
2	2,995	5	1,67E-06	4,99E-06	17593314	5,68E-08	1,11
3	2,985	15	5,00E-06	4,98E-06	14149297	7,07E-08	1,38
4	2,97	30	1,00E-05	4,95E-06	9911464	1,01E-07	1,96
5	2,95	50	1,67E-05	4,92E-06	6044518	1,65E-07	3,22
6	2,94	60	2,00E-05	4,90E-06	4546511	2,20E-07	4,28
7	2,93	70	2,33E-05	4,88E-06	3649820	2,74E-07	5,33
8	2,92	80	2,67E-05	4,87E-06	2955156	3,38E-07	6,59
9	2,91	90	3,00E-05	4,85E-06	2224161	4,50E-07	8,75
10	2,9	100	3,33E-05	4,83E-06	1811118	5,52E-07	10,75
11	2,8	200	6,67E-05	4,67E-06	190672	5,24E-06	102,08
12	2,7	300	1,00E-04	4,50E-06	39901	2,51E-05	487,79
13	2,6	400	1,33E-04	4,33E-06	13938	7,17E-05	1396,45
14	2,5	500	1,67E-04	4,17E-06	18154	5,51E-05	1072,11

Tableau 12 : Influence de la N-Coumarine sur la O-Coumarine

($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$; solvant : eau distillée)

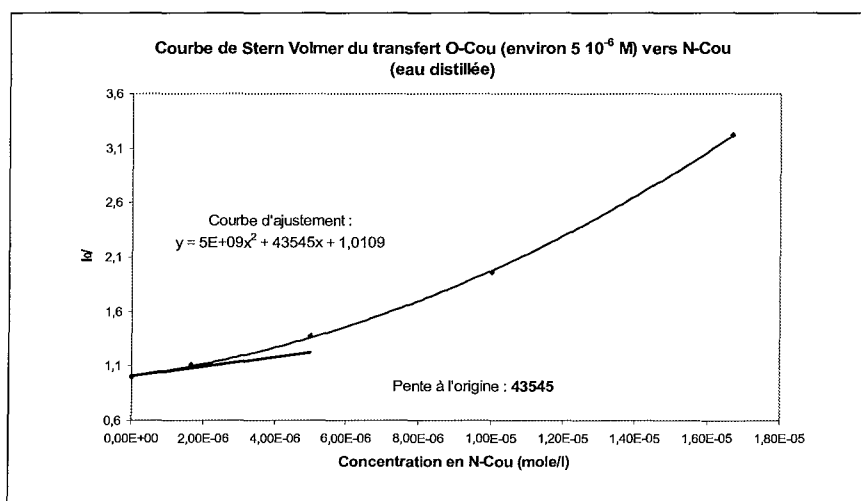


Figure 63 : Courbe de Stern-Volmer (O-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine

On remarque un très net déplacement du spectre de la O-Cou vers celui de la N-Cou (Figure 62) ce qui prouve bien qu'un transfert de fluorescence s'effectue entre les deux molécules. On remarquera également que le protocole expérimental fait décroître la concentration en O-Cou (Tableau 12) : ainsi, seuls les 5 premiers points ont été retenus pour estimer un coefficient de Stern-Volmer, la concentration en O-Cou restant très voisine de $5 \cdot 10^{-6} \text{ Mole/L}$. Dans cette expérience, ce coefficient vaut donc $43\ 545 \text{ L.Mole}^{-1}$ (Figure 63).

L'expérience a été renouvelée en modifiant le protocole afin d'obtenir des concentrations en O-Cou constantes ($5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L).

Deux solutions sont ainsi préparées, l'une contenant la O-Cou à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L (solution 24) et l'autre contenant la O-Cou à la même concentration et l'accepteur (N-Cou) à une concentration de $2 \cdot 10^{-4}$ Mole/L (solution 25), ces deux solutions étant préparées dans l'eau distillée :

Solution 24 : Solution de O-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L, solvant : eau distillée, éthanol 20 %.

Solution 25 : Solution de O-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et de N-Cou à $2 \cdot 10^{-4}$ Mole/L, solvant : eau distillée, éthanol 20 %.

Remarque : la présence d'éthanol est due au mode de préparation des solutions mères de fluorophores, celles-ci étant préparées dans un faible volume de solvant, puis re-diluées dans le solvant de travail. Dans notre cas, la dilution de la N-Cou nécessitait l'emploi de beaucoup de solution mère. Afin d'obtenir une gamme homogène en teneur d'éthanol (celui-ci pouvant avoir une grande incidence sur la fluorescence, tant en intensité qu'en longueur d'onde d'émission), les concentrations d'éthanol absolu ont été égalisées dans les solutions 24 et 25.

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 12. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 380 nm. Les spectres obtenus sont présentés sur la figure 64 :

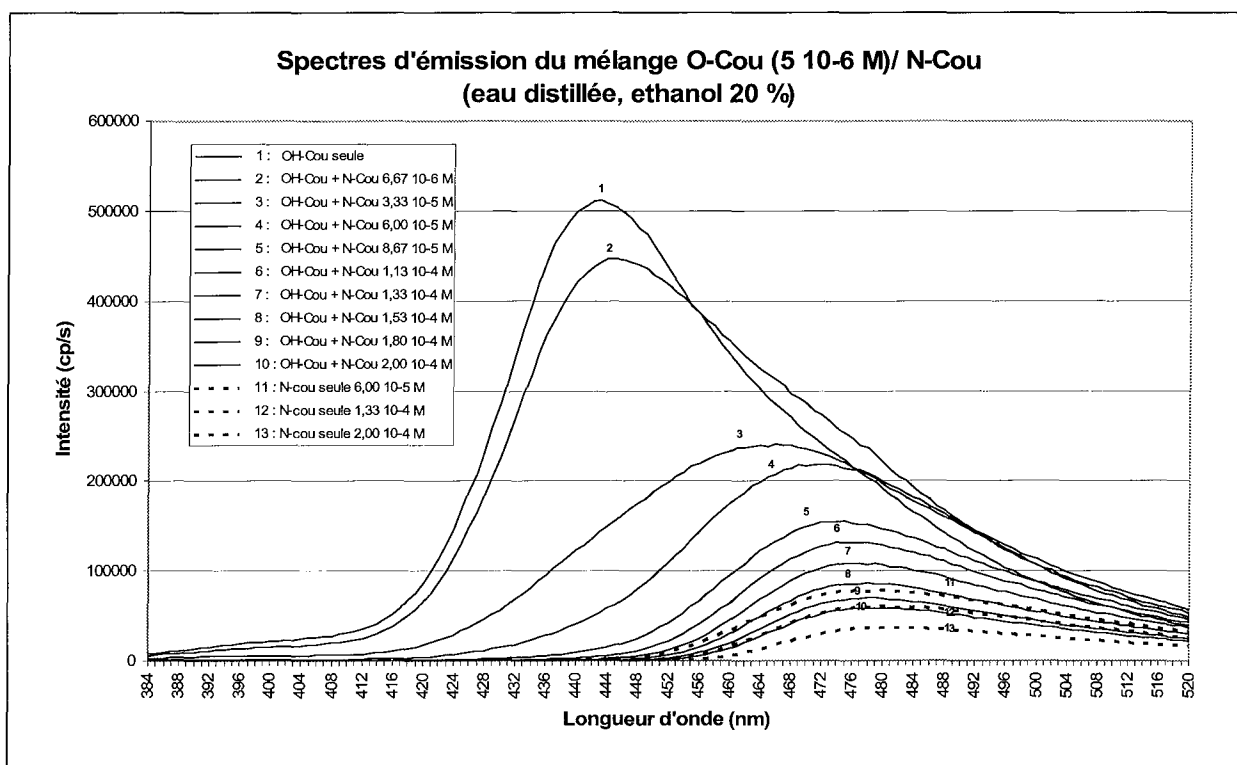


Figure 64 : Spectres d'émission du mélange O-Cou / N-Cou

($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$; solvants : eau distillée, éthanol 20 %)

Tube	Solution 24 (mL)	Solution 25 (mL)	N-Cou (Mole/L)	O-Cou (Mole/L)	I (cps)	1/I	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	510399	1,96E-06	1,00
2	2,9	0,1	6,67E-06	5,00E-06	438104	2,28E-06	1,17
3	2,5	0,5	3,33E-05	5,00E-06	134786	7,42E-06	3,79
4	2,1	0,9	6,00E-05	5,00E-06	49024	2,04E-05	10,41
5	1,7	1,3	8,67E-05	5,00E-06	11603	8,62E-05	43,99
6	1,3	1,7	1,13E-04	5,00E-06	4460	2,24E-04	114,45
7	1	2	1,33E-04	5,00E-06	1695	5,90E-04	301,10
8	0,7	2,3	1,53E-04	5,00E-06	760	1,32E-03	671,97
9	0,3	2,7	1,80E-04	5,00E-06	417	2,40E-03	1223,60
10	0	3	2,00E-04	5,00E-06	213	4,69E-03	2391,43

Tableau 13 : Influence de la N-Coumarine sur la O-Coumarine

($\lambda_{exc} = 380 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$; solvant : eau distillée, éthanol 20 %)

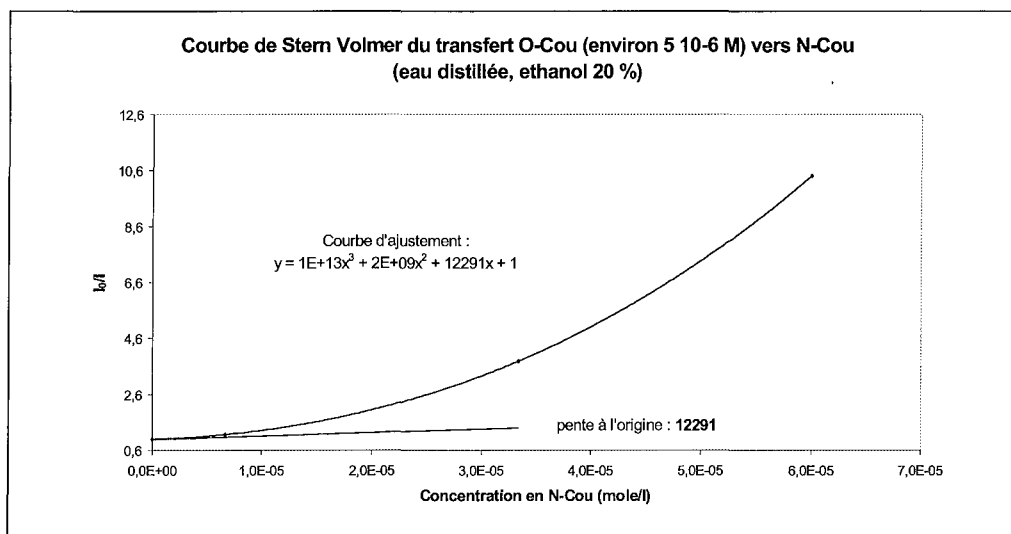


Figure 65 : Courbe de Stern-Volmer (O-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine

Là encore, le transfert d'énergie est bien visible sur la figure 64 et l'analyse de Stern-Volmer donne une constante de **12 291 L.Mole⁻¹** ce qui est sensiblement différent de la valeur trouvée précédemment, ceci pouvant s'expliquer par des différences de concentrations des solutions d'un jour à l'autre (reproductibilité) et surtout par la présence d'éthanol en concentration non négligeable.

Enfin, on remarquera que les courbes 11 à 13 de la figure 64 décroissent alors que la concentration en N-Coumarine augmente : ceci est vraisemblablement la traduction d'un effet de peau car les concentrations sont assez élevées, ce qui explique les valeurs très élevées de I_0/I rencontrées à la fin du tableau 13 (ceci est également visible pour l'expérience précédente, tableau 12. Les expériences correspondantes aux fortes concentrations en N-Cou seule n'avaient alors pas encore été réalisées).

III.4.3. Etude de l'influence de la N-Coumarine sur la C12 Coumarine

Nous avons remarqué précédemment (§ III.2.2.2) que la coumarine en C12 émettait à 442 nm lorsqu'elle était excitée à 342 nm. Or, la N-Cou a son maximum d'absorption à 430 nm ; d'où l'idée de rechercher un transfert entre ces deux molécules, la C12-Cou jouant le rôle du donneur et la N-Cou étant l'accepteur de fluorescence. La première longueur d'onde d'excitation de la C12-Cou (342 nm) a été privilégiée à la seconde (407 nm) afin de s'affranchir au maximum d'une trop forte absorption de la N-Cou.

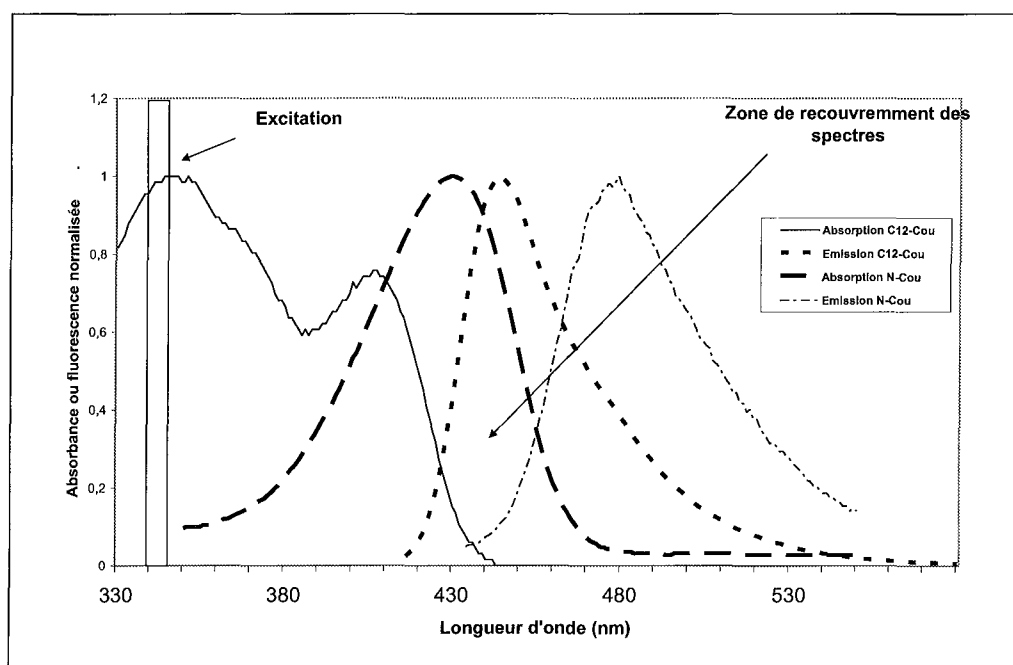


Figure 66 : Principe du transfert d'énergie entre la C12-Cou et la N-Cou

Deux solutions sont préparées, l'une contenant la C12-Cou (solution 26) à environ $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et l'autre contenant la C12-Cou à la même concentration et la N-Cou à une concentration voisine de $5 \cdot 10^{-5}$ Mole/L (solution 27), ces deux solutions étant préparées dans un tampon pH 10 :

Solution 26 : Solution de C12-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L, solvant : tampon pH 10, éthanol 5%.

Solution 27 : Solution de C12-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et N-Cou à $5 \cdot 10^{-5}$ Mole/L, solvant : tampon pH 10, éthanol 5%.

La même remarque qu'au paragraphe III.4.2.4 s'applique ici, la concentration en N-Coumarine étant moins élevée, moins d'éthanol a été introduit pour effectuer la solution 26.

La réalisation d'une gamme a été faite selon le tableau 14, les résultats étant représentés sur la figure 67.

Tube	Solution 26 (mL)	Solution 27 (mL)	N-Cou (Mole/L)	C12-Cou (Mole/L)	I (cps)	1/I	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	34389,332	2,91E-05	1,00
2	2,7	0,3	5,00E-06	5,00E-06	34154,2109	2,93E-05	1,01
3	2,3	0,7	1,17E-05	5,00E-06	27279,1641	3,67E-05	1,26
4	2	1	1,67E-05	5,00E-06	21974,7051	4,55E-05	1,56
5	1,7	1,3	2,17E-05	5,00E-06	17351,002	5,76E-05	1,98
6	1,3	1,7	2,83E-05	5,00E-06	12880,4844	7,76E-05	2,67
7	1	2	3,33E-05	5,00E-06	10637,8115	9,40E-05	3,23
8	0,7	2,3	3,83E-05	5,00E-06	8909,16602	1,12E-04	3,86
9	0,3	2,7	4,50E-05	5,00E-06	6860,95703	1,46E-04	5,01
10	0	3	5,00E-05	5,00E-06	5897,70703	1,70E-04	5,83

Tableau 14 : Influence de la N-Coumarine sur la C12-Coumarine

($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10, éthanol 5%)

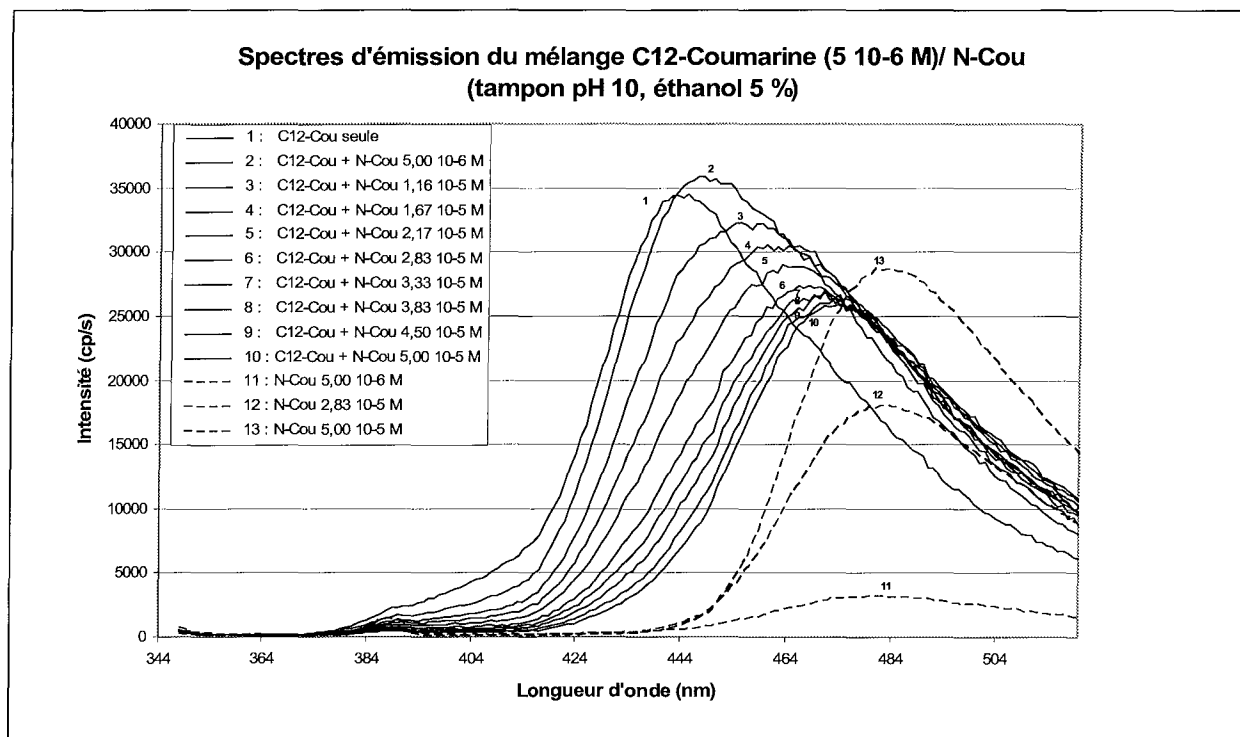


Figure 67 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / N-Cou

($\lambda_{exc} = 342 \text{ nm}$; solvant : tampon pH 10, éthanol 5%)

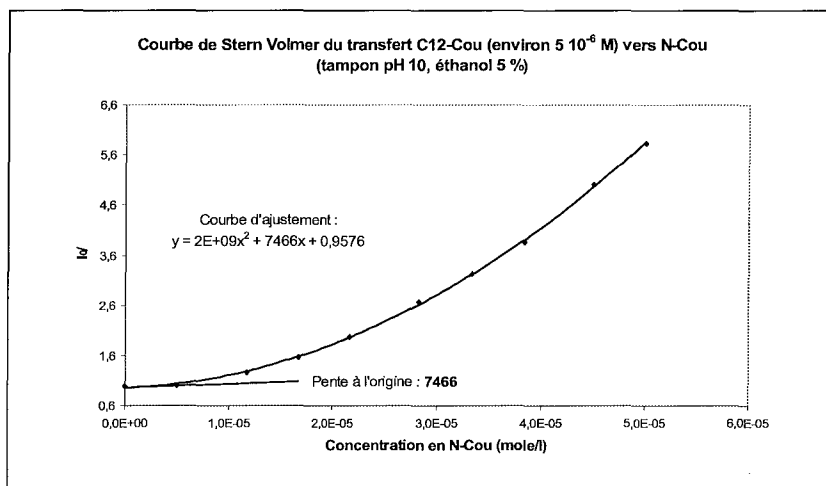


Figure 68 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers N-Cou) et pente à l'origine
($\lambda_{exc} = 342$ nm ; solvant : tampon pH 10, éthanol 5%)

Le transfert d'énergie est bien visible sur la figure 67 et l'analyse de Stern-Volmer donne une constante de $7\,466 \text{ L.Mole}^{-1}$. Cependant, la proximité des deux spectres d'émission des deux constituants est assez gênante pour une application dans une cassette FRET.

III.4.4. Etude de l'influence de CN-Cou sur C12-Cou

Dans cette expérience, la C12-Cou est maintenue à la concentration de $5 \cdot 10^{-6}$ M et est excitée à 410 nm, afin de se rapprocher des domaines d'excitation disponibles avec l'appareil ICYCLER[®] de Bio-rad. On cherche à savoir si la CN-Cou peut absorber l'émission de fluorescence de la C12-Cou. A priori, les recouvrements de spectres sont propices à un bon transfert et on remarquera que la CN-Cou n'absorbe que très peu à 410 nm, ce qui limitera les perturbations liées aux variations de concentration de cette molécule au cours de l'expérience.

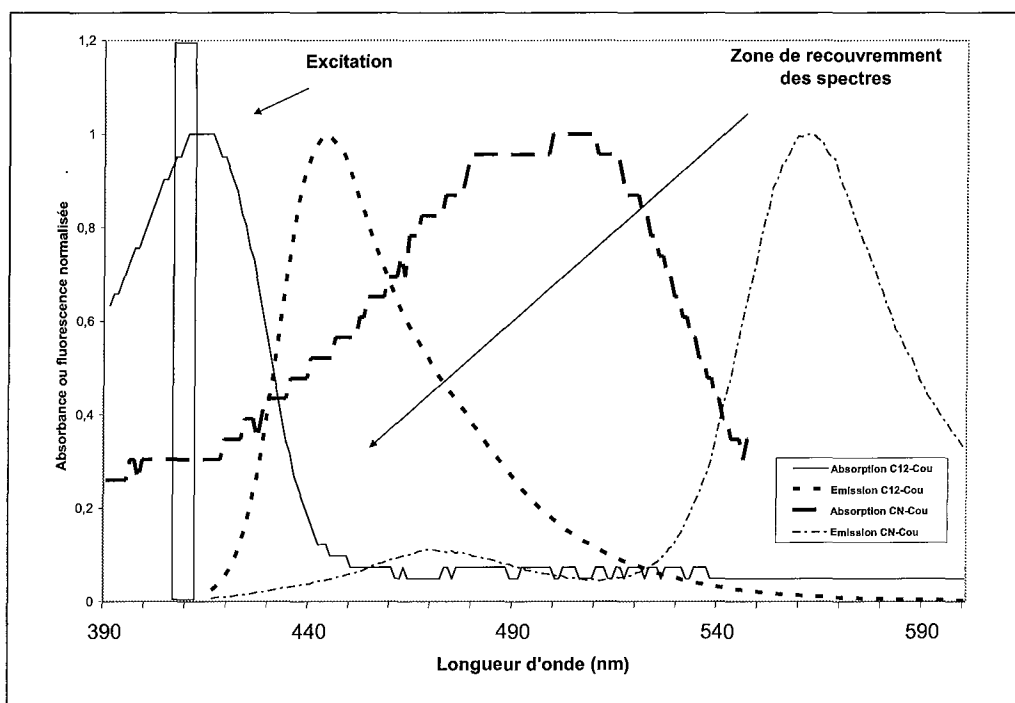


Figure 69 : Principe du transfert d'énergie entre la C12-Cou et la CN-Cou

Le calcul de la probabilité de transfert d'énergie (§ II.2.3, page 50) donne une valeur de **0,18** pour une concentration en accepteur de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L.

Deux solutions sont préparées, l'une contenant la C12-Cou (solution 28) à environ $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et l'autre contenant la C12-Cou à la même concentration et la CN-Cou à une concentration voisine de $5 \cdot 10^{-5}$ Mole/L (solution 29), ces deux solutions étant préparées dans l'éthanol absolu :

Solution 28 : Solution de C12-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L, solvant : éthanol.

Solution 29 : Solution de C12-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L et CN-Cou à $5 \cdot 10^{-5}$ Mole/L, solvant : éthanol.

La réalisation d'une gamme a été faite selon le tableau 15, les résultats étant représentés sur la figure 70.

Tube	Solution 28 (mL)	Solution 29 (mL)	CN-Cou (Mole/L)	C12-Cou (Mole/L)	I (cps)	I/I ₀	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	189538	5,28E-06	1,00
2	2,7	0,3	5,00E-06	5,00E-06	170769	5,86E-06	1,11
3	2,3	0,7	1,17E-05	5,00E-06	157710	6,34E-06	1,20
4	2	1	1,67E-05	5,00E-06	134722	7,42E-06	1,41
5	1,7	1,3	2,17E-05	5,00E-06	120081	8,33E-06	1,58
6	1,3	1,7	2,83E-05	5,00E-06	104187	9,60E-06	1,82
7	1	2	3,33E-05	5,00E-06	91584	1,09E-05	2,07
8	0,7	2,3	3,83E-05	5,00E-06	72917	1,37E-05	2,60
9	0,3	2,7	4,50E-05	5,00E-06	62666	1,60E-05	3,02
10	0	3	5,00E-05	5,00E-06	54898	1,82E-05	3,45

Tableau 15 : Influence de la CN-Coumarine sur la C12-Coumarine

($\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 442 \text{ nm}$; solvant : éthanol)

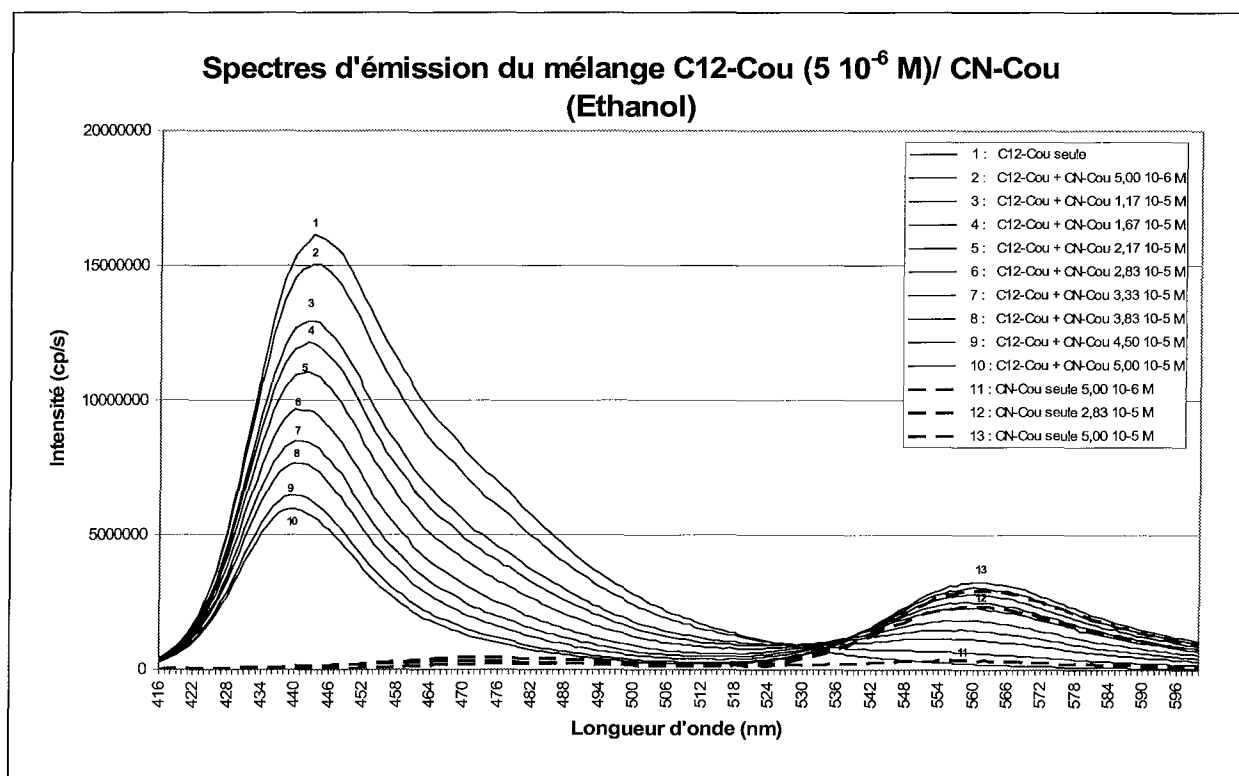


Figure 70 : Spectres d'émission du mélange C12-Cou / CN-Cou

($\lambda_{exc} = 410 \text{ nm}$; solvant : éthanol)

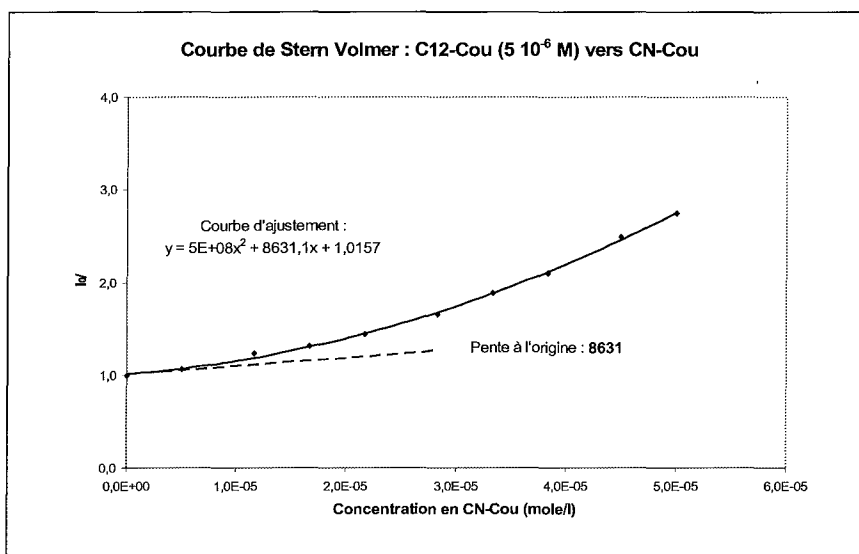


Figure 71 : Courbe de Stern-Volmer (C12-Cou vers CN-Cou) et pente à l'origine (solvant : éthanol)

L'analyse de Stern-Volmer donne une constante de **8 631 L.Mole⁻¹**. On remarque une bonne inhibition de fluorescence de la C12-Cou ; l'émission qui en résulte n'est pas importante mais il existe un grand décalage entre les deux maxima d'émission ce qui pourrait être utile dans l'optique d'une application future en PCR.

III.4.5. Etude de l'influence de CDOH sur la N-Cou

Dans cette expérience, la N-Cou joue le rôle de fluorophore donneur et sera excitée à 414 nm. Le composé CDOH constituera l'accepteur de fluorescence. En raison des problèmes de stabilité du CDOH évoqués précédemment, l'étude sera menée dans l'éthanol absolu (Ceci expliquant d'ailleurs que le maximum d'absorption soit un peu plus bas que dans un milieu aqueux (430 nm)). On s'attachera donc à observer l'existence d'un transfert énergétique entre ces deux molécules et à déterminer si possible un coefficient de Stern-Volmer correspondant à cette expérience.

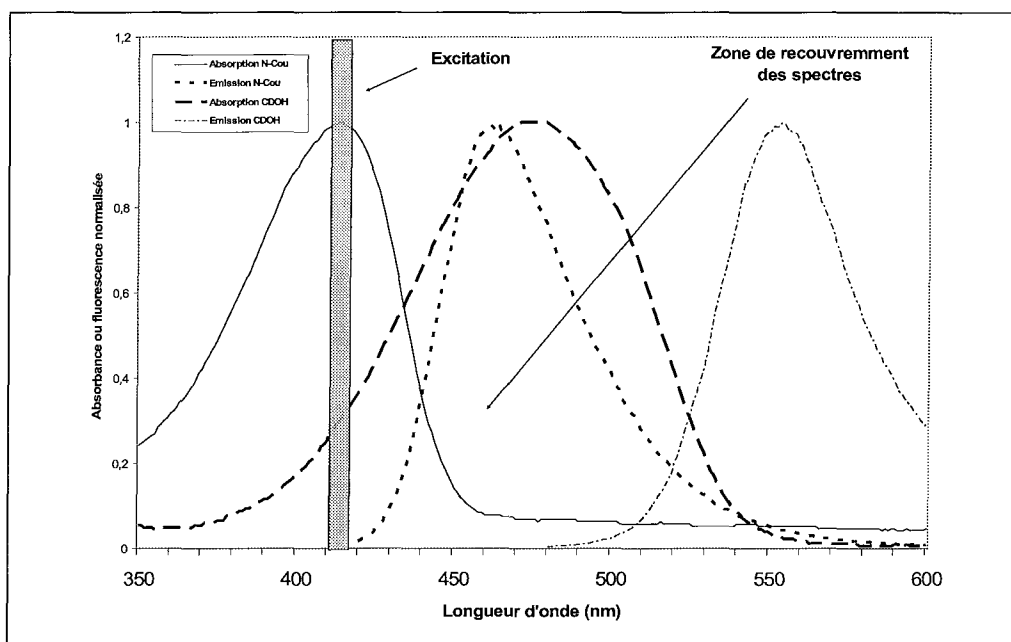


Figure 72 : Principe du transfert d'énergie entre la N-Cou et le CDOH

Le recouvrement de spectre est ici flagrant et on peut espérer un bon transfert entre ces deux molécules.

Deux solutions sont utilisées, l'une contenant la N-Cou à une concentration voisine de $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L (solution 30) et l'autre contenant également la N-Cou à la même concentration et l'accepteur (CDOH) à une concentration voisine de $4 \cdot 10^{-5}$ Mole/L (solution 31), ces deux solutions étant préparées dans l'éthanol absolu :

Solution 30 : Solution de N-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L, solvant : éthanol.

Solution 31 : Solution de N-Cou à $5 \cdot 10^{-6}$ Mole/L + CDOH à $4 \cdot 10^{-5}$ Mole/L, solvant : éthanol.

Une gamme est préparée à partir de ces deux solutions selon le tableau 16. L'analyse de la fluorescence se fait en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 414 nm, les spectres obtenus étant représentés sur la figure 73.

Tube	Solution 30 (mL)	Solution 31 (mL)	CDOH (Mole/L)	N-Cou (Mole/L)	I (cps)	1/I	I ₀ /I
1	3	0	0,00E+00	5,00E-06	4538532,5	2,20E-07	1,00
2	2,7	0,3	4,00E-06	5,00E-06	3731278,75	2,68E-07	1,22
3	2,3	0,7	9,33E-06	5,00E-06	3023304,25	3,31E-07	1,50
4	2	1	1,33E-05	5,00E-06	2431398,75	4,11E-07	1,87
5	1,7	1,3	1,73E-05	5,00E-06	1930151,38	5,18E-07	2,35
6	1,3	1,7	2,27E-05	5,00E-06	1504595,75	6,65E-07	3,02
7	1	2	2,67E-05	5,00E-06	1180899,5	8,47E-07	3,84
8	0,7	2,3	3,07E-05	5,00E-06	969771,5	1,03E-06	4,68
9	0,3	2,7	3,60E-05	5,00E-06	749058,813	1,34E-06	6,06
10	0	3	4,00E-05	5,00E-06	586808	1,70E-06	7,73

Tableau 16 : Influence du CDOH sur la N-Cou

($\lambda_{exc} = 414 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 462 \text{ nm}$)

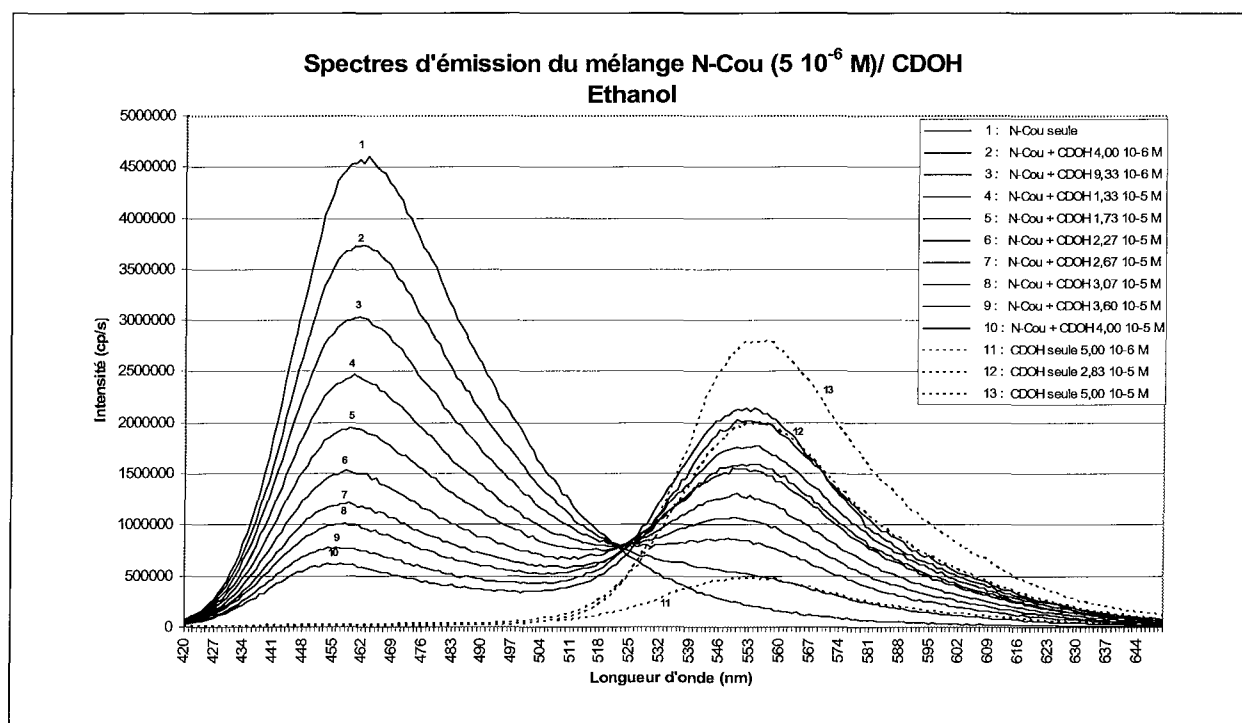


Figure 73 : Spectres d'émission du mélange N-Cou / CDOH

($\lambda_{exc} = 414 \text{ nm}$; solvant : éthanol)

La figure 74 représente la courbe de Stern-Volmer obtenue à la suite de cette expérience.

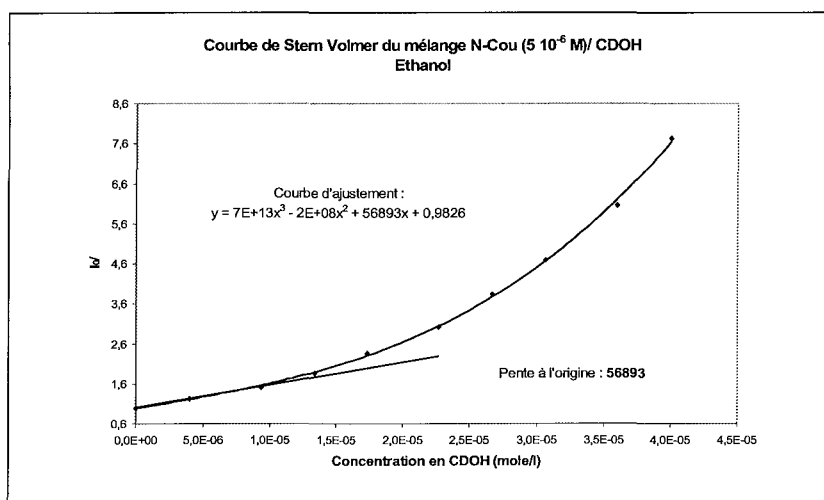


Figure 74 : Courbe de Stern-Volmer (CDOH sur N-Cou) et pente à l'origine
(solvant : éthanol)

La constante de Stern-Volmer ainsi calculée vaut **56 893 l.Mole⁻¹**. La figure 73 montre que les spectres sont bien distincts avec un point isobestique assez bien marqué avec un décalage global de plus de 140 nm, ce qui est un grand avantage dans les analyses de fluorescence.

Malheureusement il est difficile de conclure à un transfert important, car l'excitation directe de CDOH (à concentration égale) conduit à des intensités de fluorescence comparables à celles obtenues par excitation directe de N-Cou.

III.4.6. Conclusion

Ces différentes expériences nous permettent de tirer certaines conclusions sur le transfert radiatif. Comme nous avons pu le constater au cours de cette étude, ce transfert dépend de plusieurs facteurs :

- des rendements quantiques des fluorophores mis en jeu (accepteur et donneur),
- du recouvrement de leurs spectres (fluorescence du donneur/absorption de l'accepteur),
- de la séparation des spectres de fluorescence des deux composés (accepteur et donneur),
- de l'efficacité de l'inhibition de fluorescence du donneur par l'accepteur (K_{sv}).

Le tableau 17 donne un aperçu synthétique des résultats obtenus à l'issue des différentes expériences de transfert réalisées au cours de cette étude

Donneur	Accepteur	Φ donneur	Φ accepteur	K_{sv} (L.Mole ⁻¹)	Recouvrement des spectres	Séparation des spectres (Fluo)	Efficacité du transfert
O-Cou	Fluorescéine	Bon	Très bon	7 120	Bon	Très bonne	Très bonne
N-Cou	Fluorescéine	Faible	Très bon	26 470	Très bon	Bonne	Très faible
O-Cou	N-Cou	Bon	Faible	12 290	Bon	Mauvaise	Non Visible
C12-Cou	N-Cou	Bon	Faible	7 470	Bon	Mauvaise	Non Visible
C12-Cou	CN-Cou	Bon	Faible	8 630	Faible	Très bonne	Faible
N-Cou	CDOH	Faible	Faible	56 890	Très bon	Très bonne	Très faible

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des transferts de fluorescence
 Φ : rendement quantique de fluorescence ; K_{sv} : constante de Stern-Volmer

Sur les six couples étudiés, seul le couple O-Cou/fluorescéine présente les bonnes caractéristiques. Le transfert peu efficace observé avec le couple N-Cou/fluorescéine est imputable au trop faible rendement quantique du donneur. Les couples O-Cou/N-Cou et C12-Cou/N-Cou ne présentent pas la résolution spectrale nécessaire pour différencier le donneur de l'accepteur. Dans le couple C12-Cou/CN-Cou, c'est le faible recouvrement des spectres ajouté à une valeur un peu faible du rendement quantique de l'accepteur qui empêche de voir la fluorescence induite de l'accepteur. Enfin, pour le couple N-Cou/CDOH, en dépit d'un très

bon recouvrement de spectres, la trop faible valeur du rendement quantique de l'accepteur conduit à une conclusion analogue au cas précédent.

Bien entendu, ces conclusions ne s'appliquent qu'à des solutions homogènes assez diluées, loin des conditions existant au sein des cassettes FRET où donneur et accepteur sont liés et à faible distance l'un de l'autre. Ceci signifie que même un faible transfert obtenu dans ces conditions pourra peut-être se traduire par un transfert plus important si les deux molécules sont maintenues proches l'une de l'autre et cela d'autant plus que la liaison est connue pour amplifier le transfert d'énergie (Ju et *al.*, 1996).

Conclusion

Cette étude a tout d'abord permis d'aborder les notions de fluorescence et d'inhibition de fluorescence. En présence d'un inhibiteur (quencher), une molécule normalement fluorescente peut voir son émission radiative très atténuée, voire complètement éteinte par transfert d'énergie avec l'inhibiteur. Cela a surtout été vérifié pour l'inhibition de la fluorescéine par l'iodure de potassium. Le rouge de méthyle s'est révélé bon inhibiteur dans le cas de la C12-Cou, ce qui laisse supposer que ce fluorophore pourrait être opposé au dabcyle dans une structure balise moléculaire.

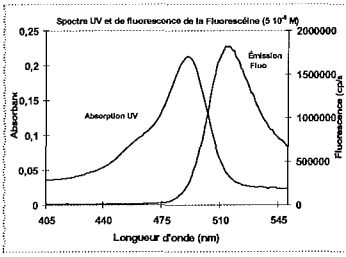
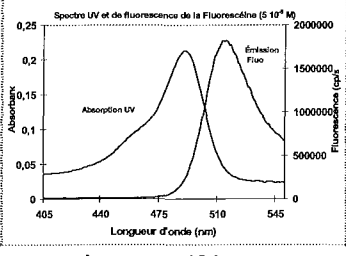
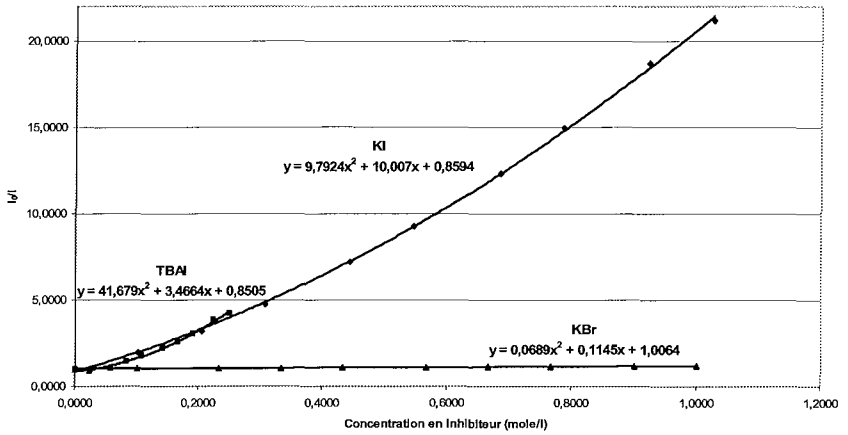
D'autres composés ont été testés cette fois-ci en effectuant des expériences de transferts de fluorescence. L'objectif de ces expériences était de démontrer qu'un donneur de fluorescence était capable de transmettre son énergie à un accepteur, lui-même capable de réémettre sa propre fluorescence. Ce principe est utilisé dans la technologie des cassettes FRET où le donneur et l'accepteur sont maintenus à proximité grâce à un bras espaceur, ce qui a pour effet d'augmenter l'émission de fluorescence de l'accepteur. Des transferts radiatifs ont ainsi été mis en évidence entre différents fluorophores étudiés en solution homogène. Même si l'efficacité de certains paraît faible, il faut rappeler que les conditions de l'étude ne reflètent pas exactement le comportement des cassettes FRET. Des études réalisées récemment au laboratoire sur un composé comprenant deux motifs coumarine reliés entre eux par un court bras alkyle, ont montré en effet un transfert total et une augmentation de l'émission de fluorescence.

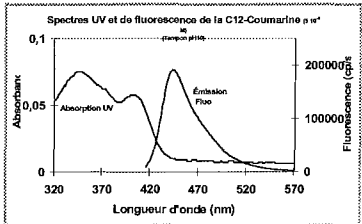
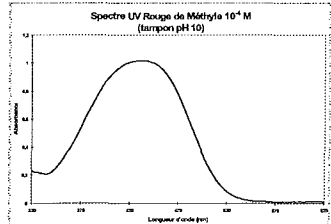
Cet exemple positif justifie la poursuite de l'étude avec en particulier, la modification des fluorophores pour leur incorporation dans les sondes oligonucléotidiques.

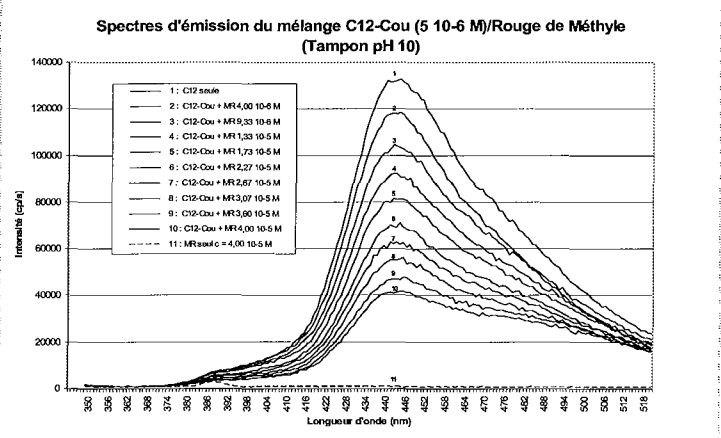
L'équipe du CRB ayant mis en évidence les altérations géniques associées au cancer bronchique, a développé la technologie de RTPCR pour le diagnostic et le pronostic de cette pathologie. Pour ce faire, elle a réalisé une importante recherche sur la conception et la validation de balises moléculaires préparées à partir de fluorophores commerciaux. Ces études permettront de valider les performances des sondes obtenues à partir de fluorophores étudiés au cours de ce projet.

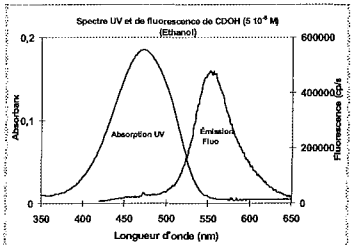
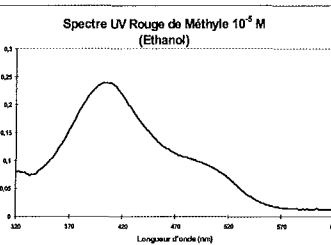
Annexe

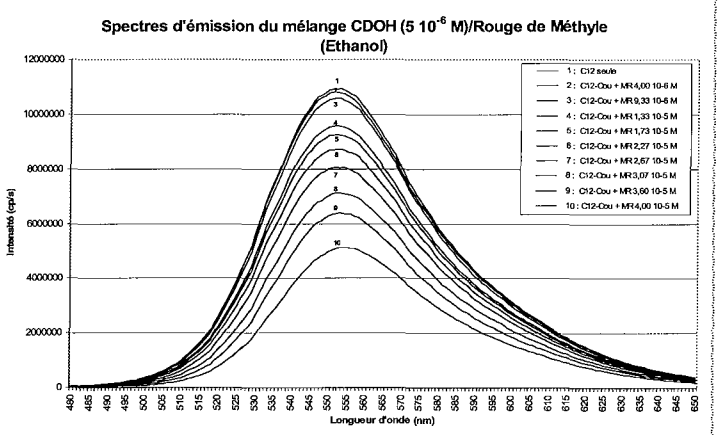
Récapitulatif des résultats obtenus

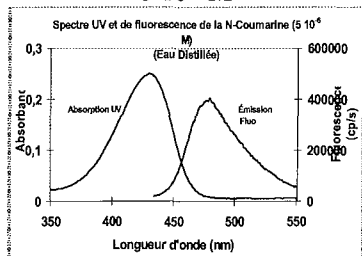
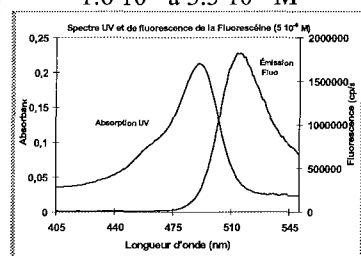
Fluorophore	Inhibiteur	Conditions opératoires	K_{sv} (L.Mole ⁻¹)	Page
Fluorescéine $5 \cdot 10^{-6}$ M  $\lambda_{exc\ max} = 491\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 513\ nm$	KI 0.1 à 1 M	Tampon pH 10 $\lambda_{exc} = 491\ nm$ $\lambda_{em} = 516\ nm$	7,269	68
Rotor $5 \cdot 10^{-6}$ M $\lambda_{exc\ max} = 492\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 590\ nm$	KI 0.2 à 2 M	Eau distillée $\lambda_{exc} = 492\ nm$ $\lambda_{em} = 590\ nm$	Non mesurable	72
Fluorescéine $5 \cdot 10^{-6}$ M  $\lambda_{exc\ max} = 491\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 513\ nm$	TBAI 0.025 à 0.25 M	Ethanol absolu $\lambda_{exc} = 492\ nm$ $\lambda_{em} = 521\ nm$	5,59	73
	KBr 0.1 à 1 M	Eau distillée $\lambda_{exc} = 490\ nm$ $\lambda_{em} = 512\ nm$	0.1145	75
	KBr 0.1 à 1 M	Tampon pH 10 $\lambda_{exc} = 490\ nm$ $\lambda_{em} = 512\ nm$	0,0453	77
Comparatif inhibition par halogénures 				

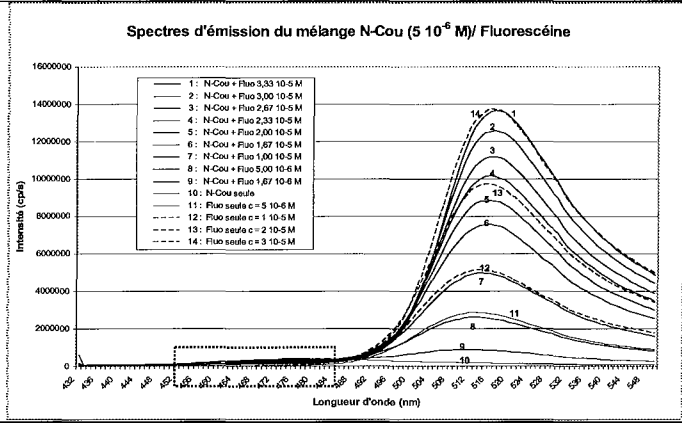
Fluorophore	Inhibiteur	Conditions opératoires	K_{sv} (L.Mole ⁻¹)	Page
<p>C12-Cou 5 10⁻⁶ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 342\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 442\ nm$</p>	<p>Rouge de Méthyle 4 10⁻⁶ à 4 10⁻⁵ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 432\ nm$ $\lambda_{em\ max} = inc$</p>	<p>Tampon pH 10 $\lambda_{exc} = 342\ nm$ $\lambda_{em} = 444\ nm$</p>	<p>19468</p>	<p>79</p>

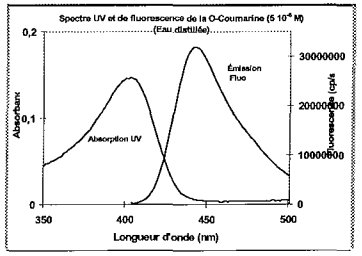
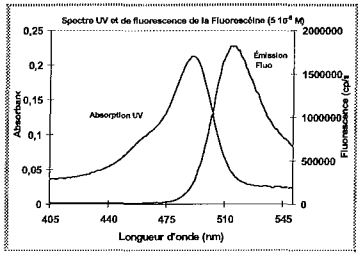


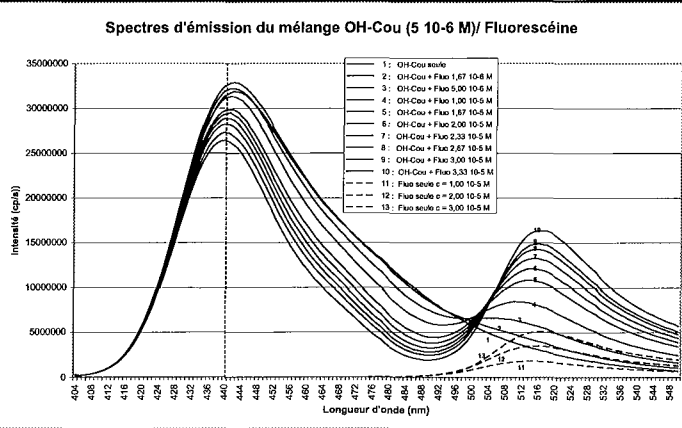
<p>CDOH 5 10⁻⁶ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 468\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 552\ nm$</p>	<p>Rouge de Méthyle 5 10⁻⁶ à 5 10⁻⁵ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 405\ nm$ $\lambda_{em\ max} = inc$</p>	<p>Ethanol $\lambda_{exc} = 468\ nm$ $\lambda_{em} = 552\ nm$</p>	<p>Non Mesurable</p>	<p>81</p>
--	--	---	-----------------------------	-----------

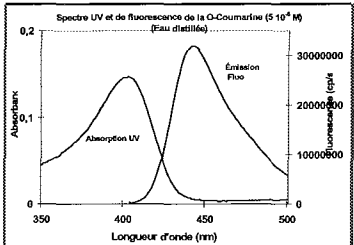
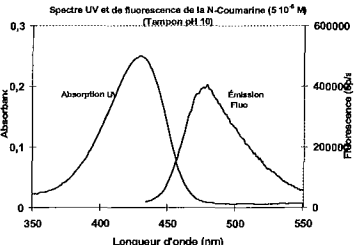
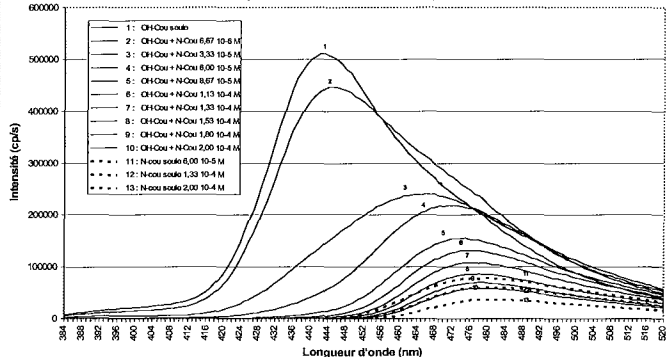
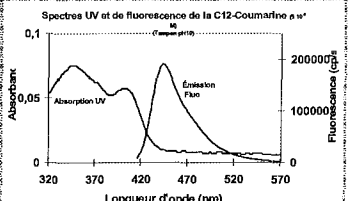
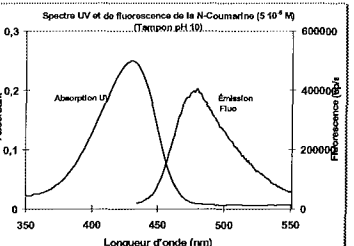
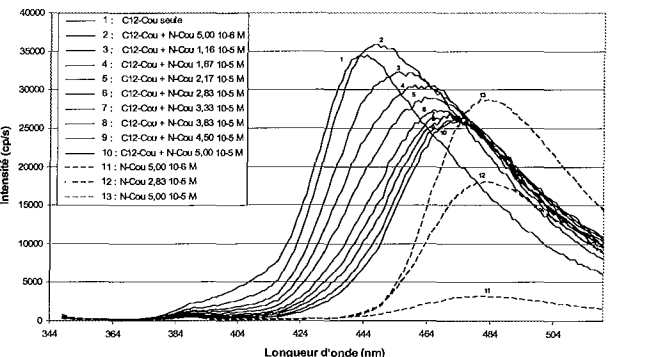


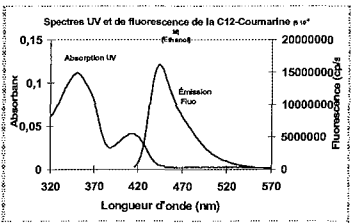
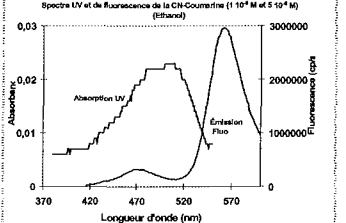
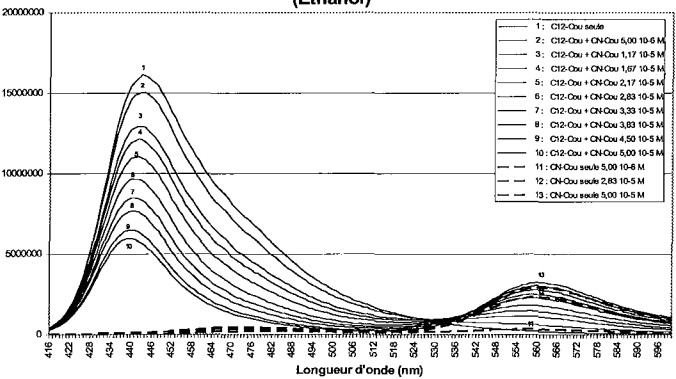
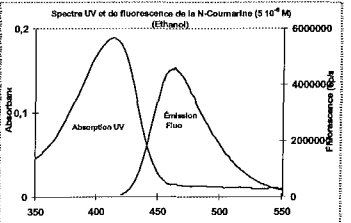
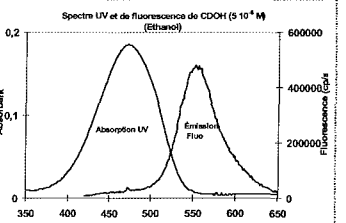
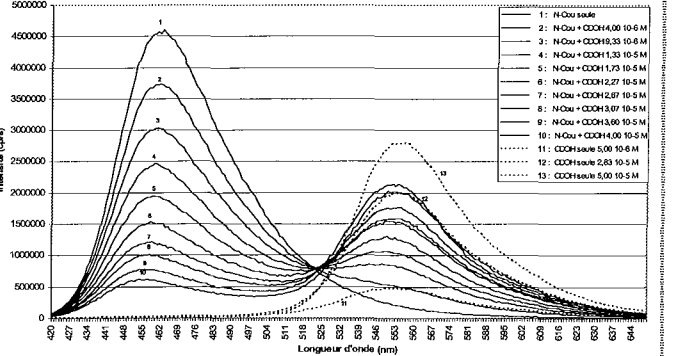
Fluorophore donneur	Fluorophore accepteur	Conditions opératoires	Constante de Stern-Volmer (L.Mole ⁻¹)	Page
<p>N-Cou 5 10⁻⁶ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 430\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 477\ nm$</p>	<p>Fluorescéine 1.6 10⁻⁶ à 3.3 10⁻⁵ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 491\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 513\ nm$</p>	Eau distillée $\lambda_{exc} = 430\ nm$ $\lambda_{em} = 477\ nm$	26472	84

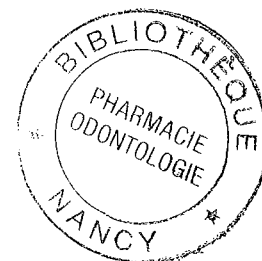


<p>O-Cou 5 10⁻⁶ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 402\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 442\ nm$</p>	<p>Fluorescéine 1.6 10⁻⁶ à 3.3 10⁻⁵ M</p>  <p>$\lambda_{exc\ max} = 491\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 513\ nm$</p>	Eau distillée $\lambda_{exc} = 402\ nm$ $\lambda_{em} = 441\ nm$	7122,5	89
---	--	--	---------------	----



Fluorophore donneur	Fluorophore accepteur	Conditions opératoires	Constante de Stern-Volmer ($L \cdot Mole^{-1}$)	Page
<p style="text-align: center;">O-Cou $5 \cdot 10^{-6} M$</p>  <p style="text-align: center;">$\lambda_{exc} \text{ max} = 402 \text{ nm}$ $\lambda_{em} \text{ max} = 442 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">N-Cou $6.6 \cdot 10^{-6} \text{ à } 2 \cdot 10^{-4} M$</p>  <p style="text-align: center;">$\lambda_{exc} \text{ max} = 430 \text{ nm}$ $\lambda_{em} \text{ max} = 477 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">Tampon pH 10, ethanol 20% $\lambda_{exc} = 380$ nm $\lambda_{em} = 442$ nm</p>	<p>12291</p>	<p>93</p>
<p>Spectres d'émission du mélange O-Cou ($5 \cdot 10^{-6} M$)/ N-Cou (eau distillée, ethanol 20 %)</p> 				
<p style="text-align: center;">C12-Cou $5 \cdot 10^{-6} M$</p>  <p style="text-align: center;">$\lambda_{exc} \text{ max} = 342 \text{ nm}$ $\lambda_{em} \text{ max} = 442 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">N-Cou $1.67 \cdot 10^{-6} \text{ à } 3.33 \cdot 10^{-5} M$</p>  <p style="text-align: center;">$\lambda_{exc} \text{ max} = 430 \text{ nm}$ $\lambda_{em} \text{ max} = 477 \text{ nm}$</p>	<p style="text-align: center;">Tampon pH 10, ethanol 5 % $\lambda_{exc} = 342$ nm $\lambda_{em} = 441$ nm</p>	<p>7466</p>	<p>99</p>
<p>Spectres d'émission du mélange C12-Coumarine ($5 \cdot 10^{-6} M$)/ N-Cou (tampon pH 10, ethanol 5 %)</p> 				

Fluorophore donneur	Fluorophore accepteur	Conditions opératoires	Constante de Stern-Volmer (L.Mole ⁻¹)	Page
<p align="center">C12-Cou 5 10⁻⁶ M</p>  <p align="center">$\lambda_{exc\ max} = 342 - 407\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 442\ nm$</p>	<p align="center">CN-Cou 5 10⁻⁶ à 5 10⁻⁵ M</p>  <p align="center">$\lambda_{exc\ max} = 504\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 566\ nm$</p>	<p align="center">Ethanol $\lambda_{exc} = 410\ nm$ $\lambda_{em} = 442\ nm$</p>	<p align="center">8631</p>	<p align="center">101</p>
<p align="center">Spectres d'émission du mélange C12-Cou (5 10⁻⁶ M) / CN-Cou (Ethanol)</p> 				
<p align="center">N-Cou 4 10⁻⁶ à 4 10⁻⁵ M</p>  <p align="center">$\lambda_{exc\ max} = 414\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 462\ nm$</p>	<p align="center">CDOH 5 10⁻⁶ M</p>  <p align="center">$\lambda_{exc\ max} = 468\ nm$ $\lambda_{em\ max} = 552\ nm$</p>	<p align="center">Ethanol $\lambda_{exc} = 414\ nm$ $\lambda_{em} = 462\ nm$</p>	<p align="center">56893</p>	<p align="center">104</p>
<p align="center">Spectres d'émission du mélange N-Cou (5 10⁻⁶ M) / CDOH (Ethanol)</p> 				



Bibliographie

Abravaya K., Huff J., Marshall R., Merchant B., Mullen C., Schneider G., Robinson J. (2003). Molecular Beacons as diagnostic Tools: Technology and Applications. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **41**, 468-474.

Baros F., Bouchy M., Brooke F., Andre J-C. (1990). Kinetics of partially Diffusion-controlled Reactions. Part 23 – The case of ionic reactions. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **86** (12), 2145-2153.

Birks J.D. (1970). Photophysics of Aromatic Molecules. *Wiley-Interscience*, Londres.

Bonnet G., Tyagi S., Libchaber A., Kramer F.R. (1999). Thermodynamic basis of the chemical specificity of structured DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6171-6176.

Bustin S.A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Molecular. Endocr.*, **25**, 169-193.

Clegg R.M. (1992). Fluorescence Resonance Energy Transfer and Nucleic Acids. *Methods Enzymol.*, **211**, 353-388.

Drake T.J., Tan W. (2004). Molecular beacon DNA probes and their bioanalytical applications. *Appl. Spectro.*, **58**, 269A-280A.

Dubertret B., Calame M., Libchaber A. (2001). Single-mismatch detection using gold quenched fluorescent oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 365-370.

Durand R., Huart V., Jafari S., and Le Bras J. (2002). Rapid detection of a Molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **46**, 2684-2686.

El-Hajj H.H., Marras S.A.E., Tyagi S., Kramer F.R., Alland D. (2001). Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with Molecular beacons. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 4131-4137.

Elsayed S., Chow B.L., Hamilton N.L., Gregson D.B., Pitout J.D., Church D.L. (2003). Development and validation of a Molecular beacon probe-based real-time polymerase chain reaction assay for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **127**, 845-849.

Even P. (2001). Elaboration de sondes fluorescentes pour des applications en Biologie et Imagerie par microscopie de fluorescence. *Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy*.

Fang X., Li J.J., Tan W. (2000). Using Molecular beacons to probe Molecular interactions between lactate dehydrogenase and single-stranded DNA. *Anal. Chem.*, **72**, 3280-3285.

Fang X., Liu X., Schuster S., Tan W. (1999). Designing a novel Molecular beacon for surface-immobilized DNA hybridization studies. *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 2921-2922.

Gibson U. E., Heid C. A., Williams P. M. (1996). A novel method for real-time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, **6**, 995-1001.

Giesendorf B. A., Vet J. A., Tyagi S., Mensink E. J., Trijbels F. J., Blom H. J. (1998). Molecular beacons, a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin. Chem.*, **44**, 482-486.

Heinlein T., Knemeyer J-P., Piestert O., Sauer M. (2003). Photoinduced Electron Transfer between Fluorescent Dyes and Guanosine Residues in DNA-Hairpins. *J. Phys. Chem.* **107**, 7957-7964.

Heyduk T., Heyduk A. (2002). Molecular beacon for detecting DNA binding protein. *Nat. Biotechnol.*, **20**, 171-175.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh P. S., Griffith R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, **10**, 413-417.

Jiao G. S., Thoresen L. H., Burgess K. (2003). Fluorescent, through-bond energy transfer cassettes for labelling multiple biological Molecules in one experiment. *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14668-14669.

Ju J., Glazer A.N., Mathies R.A. (1996). Cassette labeling for facile construction of energy transfer fluorescent primers. *Nucleic Acids Res.*, **24**, 1144-1148.

Kandimalla E. R., Agrawal S. (2000). "Cyclicons" as hybridation-based fluorescent primer-probes : synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorg. Med. Chem.*, **8**, 1911-1916.

Kostrikis L.G., Tyagi S., Mhlanga M.M., Ho D.D., Kramer F.R. (1998). Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles. *Science*, **279**, 1228-1229.

Lakowicz J.R. (1999). Principles of fluorescence spectroscopy, 2nd Ed. *Kluwer Academic, Plenum Publishing Corporation*, New York.

Leone G., van Schijndel H., van Gemen B., Kramer F.R., Schoen C.D. (1998) Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogenous real-time detection of RNA. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2150-2155.

Li J.J., Fang X., Schuster S.M., Tan W. (2000). Molecular beacons: A novel approach to detect protein - DNA interactions. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, **39**, 1049-1052.

Li Y., Glazer A. (1999). Design, synthesis and spectroscopic propertie of peptide-bridged fluorescence energy-transfer cassettes. *Bioconj. Chem.*, **10**, 241-245.

Livak K.J., Flood S.J.A., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Applic.*, **4**, 357-362.

Marras S.A.E., Kramer F.R., Tyagi S. (1999). Multiplex detection of single-nucleotide variation using Molecular beacons. *Genet. Anal. Biomol. Eng.*, **14**, 151-156.

Mhlanga M. M., Malmberg L. (2001). Using Molecular beacons to detect single nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *Methods*, **25**, 463-471.

Morrison T. M., Weiss J. J., Wittwer C. T. (1998). Quantification of low copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques*, **24**, 952-962.

Muller C. (2001). Synthèse de groupements photolabiles fluorescents avec comme cible le greffage sur support solide pour des applications en Biosciences. *Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC*, Nancy.

Myakishev M. V., Khripin Y., Hu S., Hamer D. H. (2001). High-throughput SNP Genotyping by allele-specific PCR with universal energy-transfer-labeled primers. *Genome Res.*, **11**, 163-169.

Nascimento A.M., Goldman G.H., Park S., Marras S.A.E., Delmas G., Oza U., Lolans K., Dudley M.N., Mann P.A., Perlin D.S. (2003). Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 1719-1726.

Nazarenko I. A., Bhatnagaer S. K., Hohman R. J. (1997). A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2516-2521.

Piatek A.S., Telenti A., Murray M.R., El-Hajj H., Jacobs W.R.Jr., Kramer F.R., Alland D. (2000). Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using Molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 103-110.

Piatek A.S., Tyagi S., Pol A.C., Telenti A., Miller L.P., Kramer F.R., Alland D. (1998). Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 359-363.

Poitras E. et Houde A. (2002). La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.*, **2**, 2-11.

Skene W. G., Dufresne S. (2004). Easy one-pot synthesis of energy transfer cassettes. *Org. Lett.*, **6.17**, 2949-2952.

Sokol D.L., Zhang X., Lu P., Gewirtz A.M. (1998). Real time detection of DNA:RNA hybridization in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 11538-11543.

Stojanovic M., Prada P., Landry D. W. (2001). Catalytic Molecular Beacons. *ChemBioChem.*, **2**, 411 - 415.

Takakusa H., Kikuchi K., Urano Y., Higuchi T., Nagano T. (2001). IntraMolecular fluorescence resonance energy transfer system with Coumarin donor included in β -Cyclodextrin. *Anal. Chem.*, **73**, 939-942.

Tan W., Fang X., Li J., Liu X. (2000). Molecular beacons: a novel DNA probe for nucleic acid and protein studies. *Chemistry*, **6**, 1107-1111.

Thelwell N., Millington S., Solinas A., Booth J., Brown T. (2000). Mode of action and application of scorpions primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3752-3761.

Tyagi S., Kramer F.R. (1996). Molecular Beacons : Probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303-306.

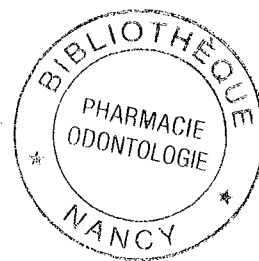
Tyagi S., Bratu D.P., Kramer F.R. (1998). Multicolor Molecular beacons for allele discrimination. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 49-53.

Vet J.A.M., Majithia A.R., Marras S.A.E., Tyagi S., Dube S., Poiesz B.J., Kramer F.R. (1999). Multiplex detection of four pathogenic retroviruses using Molecular beacons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 6394-6399.

Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P., Brown T., Little S. (1999). Detection of PCR products using self probing amplicons and fluorescence. *Nat. Biotechnol.*, **17**, 804-807.

Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**, 130-138.

Yaron A., Carmel A., Katchalski-Katzir E. (1972). IntraMolecularly quenched Fluorogenic Substrates for Hydrolytic Enzymes. *Anal. Biochem.*, **95**, 228-235.



DEMANDE D'IMPRIMATUR N° 2396
Date de soutenance le 7.12.2005.

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présenté par Rémi SIMON

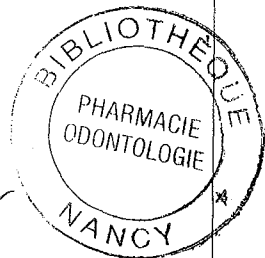
Sujet :

Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR.

Jury :

Président : M. Alain NICOLAS, Professeur

Juges : Mme. Marie-Christiane CARRE, CR INSERM
M. Francis BAROS, CR CNRS
Mme. Mireille DONNER, DR INSERM
Mme. Nadine MARTINET, DR INSERM



Vu,

Nancy, le 16/11/2005

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. Alain NICOLAS,
Professeur

Mme. Marie-Christiane
CARRE,
CR INSERM

Vu et approuvé,

Nancy, le 18/11/2005

Doyen de la Faculté de Pharmacie de
l'Université Henri Poincaré – Nancy 1,

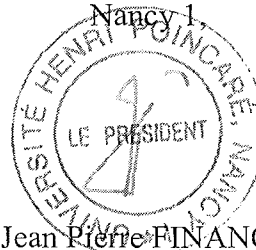


Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 23 NOV. 2005

Le Président de l'Université Henri Poincaré –
Nancy 1



Jean Pierre FINANCE

Imprim' Service



IMPRIM' SERVICE
90, rue de Mirande
21000 DIJON
Tél & Fax: 80 65 30 74

N° d'identification : PH Nancy 05 n°84

TITRE

Transferts d'énergie de différents fluorophores pour une application en PCR

Thèse soutenue le 07 décembre 2005

Par Rémi SIMON

RESUME

Des méthodes de plus en plus performantes pour la détection de séquences spécifiques d'ADN ouvrent des perspectives très encourageantes dans différents domaines de la Biologie que ce soit pour le diagnostic médical, l'étude de nouveaux médicaments, la génétique... A ce titre, les balises moléculaire ("Molecular beacons") utilisées dans la technologie de RTPCR ("Polymerase Chain Reaction" en temps réel) constituent une nouvelle famille de sondes pour la détection et l'analyse de fragments d'ADN. Ces sondes oligonucléotidiques ont la particularité de n'être détectables (par fluorescence) que lorsqu'elles sont appariées avec le fragment d'ADN recherché et ce, de manière très spécifique.

L'objet principal de cette étude a été de s'intéresser aux possibilités de créer de nouvelles sondes applicables en PCR. Cette recherche est réalisée en collaboration avec l'équipe du CRB, Nancy qui a déjà validé par cette technologie des tests pour une application dans le dépistage précoce des cancers bronchiques.

Plusieurs séries d'expériences ont ainsi été réalisées afin de trouver le meilleur couple inhibiteur-fluorochrome en vue de le greffer sur une sonde oligonucléotidique adaptée. De plus, des expériences de transfert de fluorescence ont permis de trouver des couples donneur - accepteur intéressants pour la synthèse de cassettes FRET ("Fluorescence Resonance Energy Transfer"), composés plus sensibles que les fluorophores simples correspondants.

MOTS CLES : ADN - PCR - Fluorescence - Balises Moléculaires - Fluorophores - Inhibiteurs

Directeur de Thèse	Intitulé du Laboratoire	Nature
Marie-Christiane CARRE	Département de Chimie Physique des Réactions UMR 7630 CNRS-INPL Groupe ENSIC 1, rue Grandville - BP 20451 54001 Nancy Cedex	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input checked="" type="checkbox"/>

Thèmes :

1 - Sciences fondamentales

3 - Médicament

5 - Biologie

2 - Hygiène/Environnement

4 - Alimentation - Nutrition

6 - Pratique professionnelle