



Invitation à la soutenance de thèse

## Un nouveau concept d'analyse biologique : La PCR électrochimique en temps réel

Présentée par Thibaut Defever

le vendredi 19 décembre 2008 à 14h30 en salle R47 de la faculté de médecine et pharmacie de Dijon, 7 boulevard Jeanne D'arc, 21000 Dijon.

### Jury :

- |                       |                                                 |
|-----------------------|-------------------------------------------------|
| ➤ C. Marquette        | Chargé de Recherche au CNRS, Lyon               |
| ➤ E. Peyrin           | Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble |
| ➤ C. Chamard-Neuwirth | Professeur, Université de Bourgogne             |
| ➤ M. Joannes          | PDG Société Argene Biosoft                      |
| ➤ P. Brossier         | Professeur, Université de Bourgogne             |
| ➤ B. Limoges          | Directeur de Recherche au CNRS, Paris           |
| ➤ D. Marchal          | Maître de Conférence, Université Paris Diderot  |

### Résumé :

Le développement d'un nouveau concept d'analyse biologique permettant de suivre en temps réel la réplication de séquences cibles d'ADN lors d'une PCR constitue l'objectif de ce travail de thèse. Contrairement aux méthodes commercialisées – basées sur des mesures de signaux de fluorescence – nous avons envisagé le suivi de la PCR par des mesures électriques, lesquelles présentent un certain nombre d'avantages (robustesse, faible coût, miniaturisation aisée, ...) que ne présentent pas les méthodes optiques. Tout d'abord un état de l'art sur l'amplification et la détection de fragments d'ADN sera décrit, en particulier la PCR en temps réel. Celle-ci fait actuellement appel exclusivement à des mesures de fluorescence, alors que diverses méthodes non optiques – notamment électrochimiques – sont proposées pour détecter des acides nucléiques. Ainsi, la première approche présentée reposera sur l'oxydation catalytique d'un nucléoside triphosphate (dGTP) par l'intermédiaire d'un médiateur redox : le  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Les mesures obtenues à partir de ce couple,  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}/\text{dGTP}$ , bien que peu reproductibles, font cependant la preuve de la faisabilité du concept envisagé. L'utilisation d'un nouveau couple :  $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}/7\text{-deaza-dGTP}$ , dont le pic d'oxydation se situe à un potentiel plus bas que le précédent, a permis d'améliorer les performances de la méthode et ainsi d'atteindre une limite de détection de 1 000 copies d'ADN viral dans 50  $\mu\text{L}$  de solution. Toutefois celle-ci est environ 200 fois plus faible comparée au résultat obtenu par une technique commerciale utilisant des sondes fluorescentes de type TaqMan<sup>TM</sup>. Une nouvelle approche basée sur l'utilisation d'un complexe d'osmium redox – dont un des ligands permet son intercalation dans le double brin de l'ADN – a permis d'améliorer grandement les performances de notre PCR pour atteindre des résultats proches de la technique commerciale utilisant des sondes TaqMan<sup>TM</sup> tant en termes de limite de détection que de sensibilité. Par ailleurs, cette approche a permis d'observer la phase exponentielle caractéristique de la PCR. Ces résultats démontrent ainsi l'intérêt de l'électrochimie comme nouvel outil de mesure au cours des réactions d'amplification de l'ADN.

