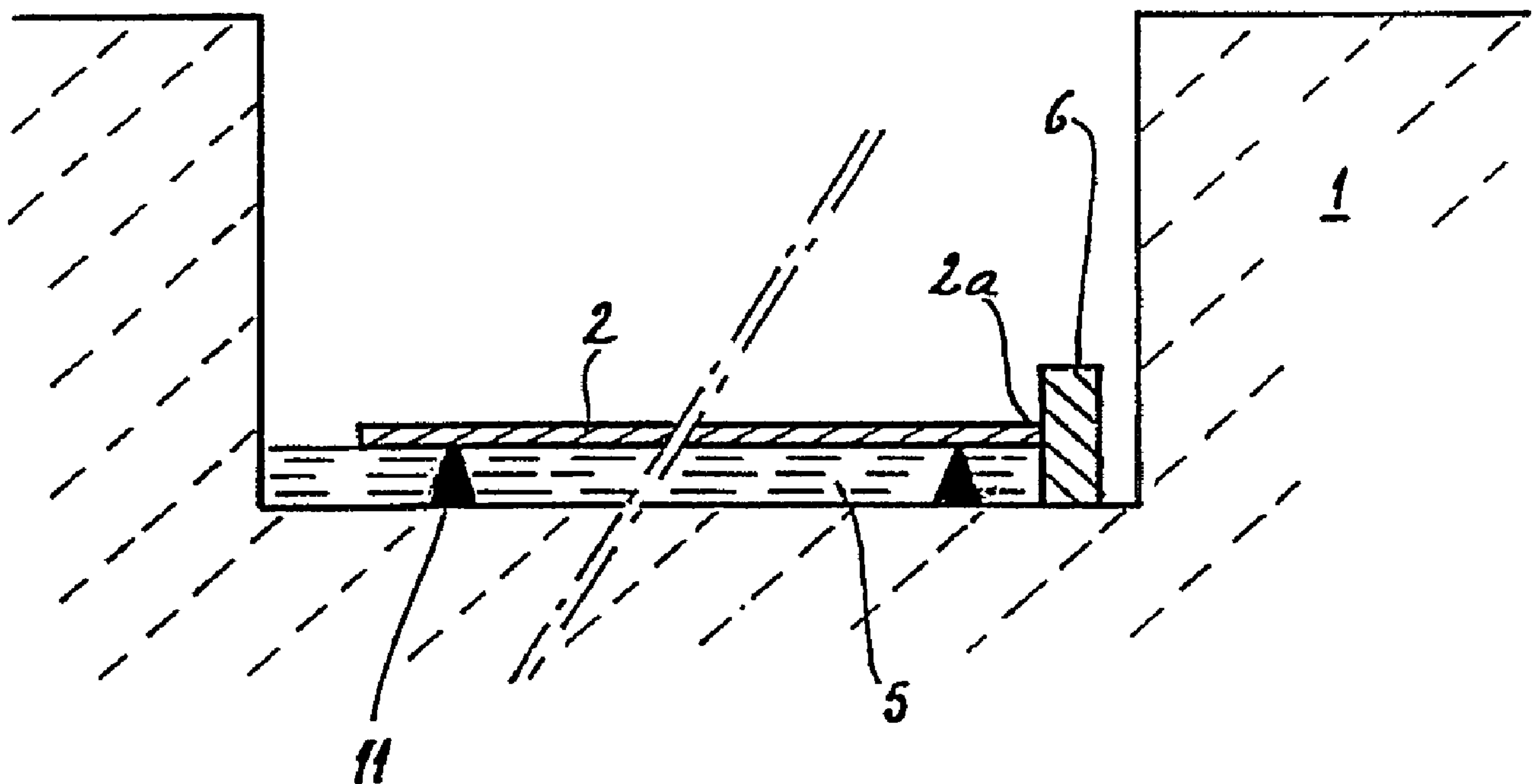




(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1997/10/06
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1998/04/16
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2010/01/12
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 1998/06/03
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1997/001781
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1998/015832
(30) Priorité/Priority: 1996/10/04 (FR96/12331)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12Q 1/68* (2006.01),
G01N 33/543 (2006.01)
(72) Inventeur/Inventor:
GINOT, FREDERIC, FR
(73) Propriétaire/Owner:
BIO MERIEUX, FR
(74) Agent: OGILVY RENAULT LLP/S.E.N.C.R.L.,S.R.L.

(54) Titre : PROCEDE ET DISPOSITIF DE TRAITEMENT PAR COMPLEXATION D'UN MILIEU LIQUIDE
(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TREATMENT BY COMPLEXING OF A LIQUID MEDIUM



(57) Abrégé/Abstract:

Procédé et dispositif de traitement par complexation d'un milieu liquide comprenant un ou plusieurs composants déterminant la présence dans ledit milieu liquide d'une pluralité de ligands, selon lequel: a) on dispose d'un support de complexation plurale, sur lequel sont distribués une pluralité de sites de couplage, dans lesquels sont immobilisés une pluralité d'anti-ligands respectivement différents, b) on met en contact ledit milieu liquide avec ledit support de complexation, moyennant quoi lesdits ligands s'apparient avec lesdits anti-ligands, caractérisé en ce que la stabilité de chaque complexe ligand/anti-ligand étant dépendante, d'au moins un paramètre exogène, dit de référence, conditionnant ledit support, d'une part on différencie les sites de couplage sur le support, en fonction dudit paramètre exogène de référence, ayant des valeurs respectivement différentes dans lesdits sites, et d'autre part on



(57) **Abrégé(suite)/Abstract(continued):**

distribue les anti-ligands entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs optimum prédéterminées du paramètre exogène de référence, déterminant la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement. Application au séquençage d'acides nucléiques par hybridation.



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/543	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/15832 (43) Date de publication internationale: 16 avril 1998 (16.04.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01781 (22) Date de dépôt international: 6 octobre 1997 (06.10.97) (30) Données relatives à la priorité: 96/12331 4 octobre 1996 (04.10.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). (72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): GINOT, Frédéric [FR/FR]; 55, avenue Maréchal Leclerc, F-38340 Voreppe (FR). (74) Mandataire: CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).		(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR TREATMENT BY COMPLEXING OF A LIQUID MEDIUM (54) Titre: PROCEDE ET DISPOSITIF DE TRAITEMENT PAR COMPLEXATION D'UN MILIEU LIQUIDE (57) Abstract The invention concerns a method and device for treatment by complexing of a liquid medium containing one or several constituents determining the presence in said liquid medium of a plurality of ligands, which consists in: a) providing a support for plural complexing, on which are distributed a plurality of coupling sites, in which are immobilised a plurality of anti-ligands respectively different; b) contacting said liquid medium with said complexing support, whereby said ligands are paired with said anti-ligands. The invention is characterised in that the stability of each ligand/anti-ligand complex being dependent of at least one exogenous parameter, called reference parameter, conditioning said support, the coupling sites on the support are differentiated, depending on said exogenous reference parameter, having respectively different values in said sites, and the anti-ligands are distributed among the different coupling sites, depending on the predetermined optimum values of the exogenous reference parameter, determining the stability of the different ligand/anti-ligand complexes respectively. The invention is useful for sequencing nucleic acids by hybridisation. (57) Abrégé Procédé et dispositif de traitement par complexation d'un milieu liquide comprenant un ou plusieurs composants déterminant la présence dans ledit milieu liquide d'une pluralité de ligands, selon lequel: a) on dispose d'un support de complexation plurale, sur lequel sont distribués une pluralité de sites de couplage, dans lesquels sont immobilisés une pluralité d'anti-ligands respectivement différents, b) on met en contact ledit milieu liquide avec ledit support de complexation, moyennant quoi lesdits ligands s'apparient avec lesdits anti-ligands, caractérisé en ce que la stabilité de chaque complexe ligand/anti-ligand étant dépendante, d'au moins un paramètre exogène, dit de référence, conditionnant ledit support, d'une part on différencie les sites de couplage sur le support, en fonction dudit paramètre exogène de référence, ayant des valeurs respectivement différentes dans lesdits sites, et d'autre part on distribue les anti-ligands entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs optimum prédéterminées du paramètre exogène de référence, déterminant la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement. Application au séquençage d'acides nucléiques par hybridation.		

**Procédé et dispositif de traitement par complexation
d'un milieu liquide**

La présente invention concerne de manière générale le traitement par complexation d'un milieu liquide, comprenant un ou plusieurs composants déterminant la présence dans ledit milieu liquide d'une pluralité ou multiplicité de ligands différents à l'état libre.

Dans la présente description, et les revendications, on adopte ci-après les définitions suivantes.

Par "ligand", on entend toute entité ou molécule, de nature chimique, biochimique ou biologique, pouvant se lier de manière spécifique à une autre entité ou molécule, appelée "anti-ligand", par une ou des liaisons non covalentes.

Ressortent en particulier de cette définition différentes entités biologiques ou biochimiques, notamment biopolymères, pouvant former entre elles et de manière complémentaire un complexe :

- il s'agit par exemple d'un polypeptide, en particulier d'un anticorps (ligand) pouvant se lier spécifiquement à un épitope ou antigène (anti-ligand), ou inversement

- il s'agit aussi, comme montré à titre d'exemple dans la description ci-après, de tout acide nucléique ou matériel nucléique, susceptible sous forme monocaténaire de se lier complémentairement avec un oligonucléotide ou un polynucléotide.

La réaction ou équilibre de nature chimique, par lequel le ligand se lie, ou s'apparie, ou se complexe avec l'anti-ligand, sera désignée ci-après par le terme "complexation". Le produit de cette réaction ou équilibre sera désigné ci-après sous le terme de "complexe". S'agissant de matériel ou d'une macromolécule nucléique, le complexe pourra être désigné ci-après sous le terme de "duplex".

Par "matériel nucléique" ou "acide nucléique", on entend toute macromolécule comprenant au moins un enchaînement linéaire, non ramifié, de nucléotides, eux-mêmes modifiés ou non. Ressortent de cette définition, bien évidemment, tout acide désoxyribonucléique, modifié ou non, et tout acide ribonucléique, modifié ou non. Une telle macromolécule peut être monocaténaire, ou bicaténaire, ou encore avoir tout autre conformation secondaire ou tertiaire. En pratique, dans la description ci-après et à titre d'exemple, ce matériel nucléique sera celui soumis directement au traitement, ou encore celui à partir duquel un milieu liquide est obtenu, contenant le ou les ligands, pour être ensuite traité conformément à la présente invention.

Par "oligonucléotide", on entend tout polynucléotide, comportant au moins cinq monomères, et de préférence au moins sept, par exemple huit monomères, constitués par acide nucléique naturel, ou encore un acide nucléique modifié au niveau d'au moins l'un de ses éléments constitutifs, à savoir du sucre, de la base azotée, ou encore du groupement phosphate.

Par "support", on entend tout substrat à la surface duquel peuvent être immobilisés ou attachés, de manière définitive, directement ou indirectement, des anti-ligands, et ceci aussi bien de manière covalente que non covalente.

Le substrat est ou auto-porteur, par exemple une lame d'un matériau inerte et transparent, ou est lui-même supporté par une base rigide, par exemple une couche d'acrylamide sur une lame de verre.

Par "surface", on entend la surface du substrat accessible aux anti-ligands, qu'il s'agisse d'un substrat plein ou d'un substrat poreux, auquel cas la surface réelle développée est plus importante que la surface apparente.

Dans la description ci-après et à titre d'exemple, les oligonucléotides constitueront les anti-ligands définis précédemment.

La réaction de complexation entre un matériel ou
5 acide nucléique d'une part, et un oligonucléotide complémentaire d'autre part, pourra être désignée ci-après sous le terme d'"hybridation".

Conformément au document WO-92/10558 et WO-93/22680, et selon un format de bio-essai dit "dot blot
10 inverse", on a décrit un procédé et un dispositif de traitement par complexation, à savoir d'hybridation d'un milieu liquide, en l'occurrence d'un échantillon nucléique, comprenant un ou plusieurs composants nucléiques, déterminant la présence dans ce milieu liquide
15 d'une pluralité de fragments, segments ou séquences nucléiques (ligands), différents, à l'état libre. La principale application de ce traitement est le séquençage par hybridation de l'échantillon nucléique, selon des principes et méthode connus exposés dans les documents (6)
20 et (7).

Selon ce procédé :

a) on dispose d'un support de complexation plurale, du type biopuce, sur lequel sont distribués une pluralité de sites ou zones discrètes de couplage, séparés
25 les uns des autres, dans lesquels sont immobilisés une pluralité d'oligonucléotides (anti-ligands) respectivement différents, et susceptibles d'être complexés avec la ou les séquences nucléotidiques complémentaires du ou des fragments nucléiques, respectivement;

b) dans des conditions isothermes d'un site de couplage à l'autre, on met en contact le milieu liquide, ou échantillon nucléique, avec ce support de complexation, moyennant quoi les séquences nucléotidiques libres
30 s'apparient avec les oligonucléotides fixes respectivement, et sont de ce fait fixées au support de complexation plurale;

c) on observe aux différents sites de couplage du support de complexation plurale une grandeur représentative de la présence et/ou de la quantité des différents complexes ou hybrides obtenus, pour générer des signaux et/ou des informations représentatifs de la présence et/ou de la quantité des différentes séquences nucléotidiques dans le milieu liquide de départ ; préférentiellement ces complexes sont observés en mettant en oeuvre un marquage du ou des composants de l'échantillon nucléique, ou un marquage des différents hybrides obtenus et fixés sur le support.

Comme dit précédemment, ce procédé travaille dans des conditions complètement isothermes, c'est-à-dire en disposant de la même température d'hybridation d'un site de couplage à l'autre, au moment de la mise en contact du milieu liquide avec le support de complexation plurale, et/ou au moment du lavage de ce support après hybridation.

Conformément au document EP-0535242, on a décrit et proposé un procédé similaire, travaillant également dans des conditions isothermes, et selon lequel en chaque site de couplage la concentration en oligonucléotide correspondant et spécifique audit site est choisie en fonction de la température de travail, pour favoriser la stabilité du complexe correspondant obtenu avec la séquence nucléotidique complémentaire.

Selon ce document, on choisit cette concentration en observant les pourcentages de séquence nucléotidique complémentaire éluee en chaque site de couplage, pendant une phase de lavage, effectuée avec un liquide de lavage dont on fait varier la température, et improprement qualifiée de lavage avec gradient thermique.

Les solutions décrites précédemment se heurtent à une difficulté technique, identifiée dans le document WO-92/10588 mais non résolue. En effet, à une température prédéterminée d'hybridation, et pour une longueur de séquence donnée de l'oligonucléotide (anti-ligand), la

stabilité du complexe obtenu par hybridation d'un acide nucléique sonde avec sa séquence complémentaire cible varie selon cette séquence. Ainsi deux oligonucléotides ne différant l'un de l'autre que par l'un des nucléotides, à savoir T dans un cas et G et dans l'autre cas, bien que de même longueur et de séquence proche, n'hybrident pas leurs acides nucléiques complémentaires respectifs avec la même stabilité. En d'autres termes, puisque la stabilité des complexes obtenus dépend de la température, il faut hybrider l'acide nucléique échantillon avec les oligonucléotides sondes, portés sur le support de complexation plurale, à une température suffisamment froide pour que le moins stable des complexes possibles puisse se former, sous peine d'obtenir des faux négatifs après hybridation, c'est-à-dire des oligonucléotides sondes ne générant pas de signal d'hybridation, alors que leur séquence complémentaire est présente dans l'échantillon. Cependant, en procédant ainsi, il arrive que des oligonucléotides sondes forment des complexes suffisamment stables avec des séquences non parfaitement complémentaires ; en pareil cas, on obtient alors des faux positifs, c'est-à-dire des oligonucléotides sondes générant un signal d'hybridation, alors que leurs séquences complémentaires ne sont pas présentes dans l'échantillon nucléique.

Comme ces faux négatifs et ces faux positifs introduisent en conséquence des erreurs dans l'analyse de l'échantillon nucléique, notamment pour un séquençage par hybridation, ils rendent la solution technique décrite précédemment souvent inexploitable.

La présente invention a donc pour objet d'augmenter la fiabilité d'un traitement par complexation, notamment hybridation, tel que décrit précédemment.

La présente invention part de la constatation selon laquelle la stabilité ou fidélité de chaque complexe ligand/anti-ligand dépend, directement ou indirectement,

d'au moins un paramètre exogène, dit ci-après de référence, et qui conditionne le support de complexation plurale.

Par "paramètre exogène", on entend un paramètre ou
5 une condition extrinsèque par rapport au ligand et/ou à l'anti-ligand, c'est-à-dire indépendant d'eux-mêmes.

Un tel paramètre exogène de référence, conditionnant ou susceptible de conditionner le support de complexation plurale, est par exemple :

10 - un paramètre ou condition physique, applicable au support, par exemple la température,

- ou un paramètre ou condition chimique, biochimique ou biologique, existant ou disponible à la surface dudit support, par exemple la concentration
15 surfacique d'un anti-anti-ligand, susceptible de s'apparier avec pratiquement tous les anti-ligands,

- ou encore un paramètre physico-chimique, établi sur la surface du support, par exemple sa mouillabilité ou sa tension superficielle par rapport au milieu liquide.

20 A titre d'exemple encore, par paramètre exogène, s'agissant d'un ligand du type acide nucléique, et d'un anti-ligand du type oligonucléotide, on entend tout paramètre ou caractéristique, n'appartenant pas aux séquences de nucléotides de l'acide nucléique et/ou de
25 l'oligonucléotide, et par exemple différant de leurs richesses respectives en l'une quelconque des bases élémentaires azotées nucléiques.

La présente invention se distingue ensuite par la conjonction des deux caractéristiques suivantes :

30 - d'une part, dans tout le support, par exemple sur toute sa surface, on différencie les sites de couplage, en fonction du paramètre exogène de référence, lequel a des valeurs respectivement différentes dans les différents sites de couplage

35 - et on distribue les anti-ligands, entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs

optimum prédéterminées du paramètre exogène de référence, déterminant notamment la stabilité des différents complexes ligands/anti-ligands respectivement.

Par conséquent selon la présente invention, chaque
5 site de couplage, sur le support de complexation plurale, auquel est immobilisé un anti-ligand correspondant, travaille à une valeur optimale du paramètre exogène de référence, vis-à-vis de la stabilité du complexe ligand/anti-ligand correspondant, cette valeur optimale
10 pouvant être différente de la valeur optimale d'au moins un site de couplage immédiatement voisin.

Grâce à l'invention, on obtient un mode de complexation plurale particulièrement fiable, précis et sensible, ayant aussi un bon pouvoir de résolution.

15 Par "couplage", on entend toute liaison, covalente ou non, permettant d'immobiliser de manière permanente un anti-ligand à la surface du support.

La présente invention est mise en oeuvre selon différents formats de bio-essais, par exemple par
20 complexation directe ou complexation par compétition.

L'invention est éventuellement mise en oeuvre selon un format "sandwich", selon lequel le ligand est susceptible de s'apparier avec l'anti-ligand fixe, et avec un échantillon à l'état libre dans le milieu liquide.

25 A titre d'exemples préférentiels, trois modalités pratiques différentes sont retenues :

- selon une première modalité, on effectue la mise en contact du milieu liquide avec le support de complexation, en appliquant une même valeur minimale du
30 paramètre exogène de référence, cette valeur minimale étant suffisante pour complexer pratiquement tous les ligands avec les anti-ligands; puis on lave le support en appliquant aux différents sites de couplage des valeurs respectivement différentes et prédéterminées, du paramètre
35 exogène de référence, et ce pendant la seule étape de lavage,

- selon une deuxième modalité, on effectue cette même mise en contact du support avec le milieu liquide, en appliquant aux différents sites de couplage, des premières valeurs respectivement différentes et prédéterminées du paramètre exogène de référence; puis on lave le support en maintenant les différents sites de couplage, à des secondes valeurs prédéterminées, respectivement différentes, du paramètre exogène de référence; les premières valeurs sont identiques ou différentes des secondes valeurs respectivement du paramètre exogène de référence,

- selon une troisième modalité, on effectue la mise en contact du support avec le milieu liquide, en appliquant aux différents sites de couplage des valeurs respectivement différentes et prédéterminées du paramètre exogène de référence, et ce pendant la seule étape de complexation ou hybridation, puis on lave le support hybridé avec un liquide de lavage à température relativement froide et constante.

Bien entendu dans un mode de détection dit de type homogène, une étape de lavage n'est pas indispensable.

La première modalité définie précédemment suppose qu'en chaque site de couplage, la quantité ou concentration d'anti-ligand est suffisante pour se complexer, d'une part avec tous les ligands réellement complémentaires du ligand considéré, et d'autre part avec tous les ligands susceptibles de s'apparier de manière concurrente ou parasitaire avec ce même anti-ligand.

Préférentiellement, on établit sur le support de complexation plurale une gradation spatiale, notamment à plat, par exemple un gradient du paramètre exogène de référence, selon au moins une direction de référence du support, par exemple sa largeur dans le cas d'un support rectangulaire. Et alors, cette gradation spatiale fixe la position ou l'ordonnancement des différents sites de

couplage, avec la distribution des anti-ligands entre les différents sites de couplage respectivement.

A titre de variante ou complément à la présente invention, on différencie les sites de couplage sur les supports de complexation plurale, en fonction d'un autre paramètre exogène de référence, ayant lui aussi des valeurs différentes dans lesdits sites de couplage, et d'autre part on distribue les anti-ligands entre les différents sites de couplage, également en fonction de valeurs optimum prédéterminées de l'autre paramètre exogène de référence, qui détermine aussi la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

Préférentiellement, un autre paramètre exogène duquel dépend la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand, est fixé à une valeur moyenne entre celles dudit autre paramètre, requises pour la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement. A titre d'exemple, cet autre paramètre exogène est le pH ou la force ionique du milieu liquide mis au contact du support de complexation plurale un paramètre dépendant de la composition du tampon d'hybridation.

Le support de complexation plurale, agencé et conditionné selon l'invention en ce qui concerne ses différents sites de couplage, est mis en oeuvre de manière préférée pour la détection et/ou quantification des ligands.

A cette fin, plusieurs modalités sont considérées:

- on observe, notamment par balayage, aux différents sites de couplage du support une grandeur représentative de la présence et/ou de la quantité des différents complexes ligand/anti-ligand, pour obtenir des signaux et/ou des informations représentatifs de la présence et/ou de la quantité des différents ligands dans le milieu liquide de départ

- préférentiellement, on observe les différents complexes ligand/anti-ligand, en mettant en oeuvre au moins une quelconque des opérations suivantes, bien connues en elles-mêmes, à savoir marquage du ou des
5 composants du milieu liquide, et marquage des différents complexes ligand/anti-ligand fixés sur le support.

Classiquement, le milieu liquide mis au contact du support est obtenu à partir d'un échantillon, par exemple un échantillon ou un matériel biologique, soumis à analyse
10 et contenant une ou plusieurs entités différentes; et ceci selon deux modalités:

- ou l'échantillon est traité directement selon le procédé défini précédemment, notamment directement par mise en contact directe avec le support de complexation
15 plurale

- ou l'échantillon est soumis à au moins une opération préalable, choisie pour obtenir un ou plusieurs composants dans le milieu liquide traité, identiques à ou dérivés directement des différentes entités
20 respectivement, et représentatives de ces dernières.

Classiquement encore, le support de complexation sur lequel sont fixés les différents ligands est éventuellement soumis à au moins une opération postérieure, telle qu'un lavage, choisie pour séparer
25 dudit support le ou les composants n'ayant pas été complexés, ou ceux complexés avec les anti-ligands de manière instable, et/ou éluér ou relarguer les différents ligands, de manière différenciée ou non.

Un domaine privilégié, mais non exclusif, d'application de la présente invention, concerne le traitement et l'analyse de produits ou composés
30 nucléiques. Dans ce cas, le ligand est un acide nucléique qui comprend une séquence nucléotidique cible, libre, notamment sous forme monocaténaire, accessible à une
35 hybridation avec une autre séquence nucléotidique sonde,

complémentaire, fixe ou fixée, comprise par un anti-ligand correspondant.

Toujours pour un matériel nucléique, à titre préférentiel, le milieu liquide comprend un seul
5 composant, à savoir un acide nucléique, comprenant ou
exhibant plusieurs ligands respectivement différents, à
savoir plusieurs régions ou segments d'hybridation,
moyennant quoi le même composant est apparié aux
différents anti-ligands, à savoir oligonucléotides
10 respectivement. Par conséquent, dans ce cas, la suite de
nucléotides d'au moins un brin de l'acide nucléique
détermine une pluralité de régions d'hybridation, et donc
de ligands, selon les séquences nucléotidiques cible,
respectivement complémentaires aux séquences
15 nucléotidiques sonde des anti-ligands.

Les traitements selon l'invention appliqués à des
produits ou composés nucléotidiques ou nucléiques, sont
mis en oeuvre par exemple dans au moins une quelconque des
applications suivantes, à savoir séquençage par
20 hybridation du composant nucléique du milieu liquide,
reséquençage de ce même composant nucléique, cartographie
d'un matériel nucléique, analyse et identification d'un
matériel ou échantillon nucléique, typage d'un matériel
nucléique, criblage d'un matériel nucléique, analyse
25 génétique (cf par exemple référence bibliographique 8),
détection d'un agent pathogène bactérien ou viral.

Une application de l'invention est le séquençage
d'un matériel nucléique par hybridation, en particulier en
déterminant les séquences chevauchantes de ce matériel.
30 Les principes de ce séquençage et ses modalités ont été
décrites dans les publications (6) et (7), en cas de
besoin. L'analyse et le traitement des informations ainsi
obtenues pour reconstruire la séquence nucléotidique d'un
matériel nucléique ont été décrits dans les publications
35 (9) et (10).

Une autre application de l'invention est l'identification de microorganismes ou de gènes associés à un microorganisme, par détermination d'un profil d'hybridation, sans reconstitution obligatoire de
5 séquences.

Pour toutes ces applications, le milieu liquide est obtenu à partir d'un échantillon nucléique, comprenant un seul et même fragment nucléique, ou plusieurs fragments nucléiques différents. Et l'échantillon nucléique est
10 éventuellement soumis à au moins une opération préalable, choisie parmi les opérations suivantes, à savoir dénaturation, lyse, fragmentation, clonage, et amplification.

Deux cas différents de traitement selon
15 l'invention doivent être considérés:

- dans un premier cas, le milieu liquide comprend plusieurs composants différents, comprenant des ligands respectivement différents, moyennant quoi lesdits composants différents sont fixés et séparés les uns des
20 autres, et en quelque sorte résolus sur le support de complexation plurale; cette modalité est mise en oeuvre dans au moins une quelconque des applications suivantes, à savoir identification, quantification, séparation et fractionnement des composants différents,

25 - dans un autre cas, le milieu liquide comprend un seul composant, comprenant ou exhibant lui-même plusieurs ligands respectivement différents, moyennant quoi le même composant est apparié aux différents ligands respectivement.

30 Un dispositif de traitement conforme à l'invention comprend :

- un support de complexation plurale, sur lequel sont rangés ou distribués, par exemple sous forme matricielle, une pluralité de sites de couplage, séparés
35 les uns des autres, dans lesquels sont immobilisés une pluralité d'anti-ligands respectivement différents, et

susceptibles d'être complexés avec lesdits ligands respectivement,

- un moyen de mise en contact du milieu liquide avec le support, agencé pour apparier lesdits ligands avec lesdits anti-ligands respectivement, et les fixer audit support.

Ce dispositif se caractérise en ce que, d'une part il comprend en outre des moyens de différenciation des sites de couplage sur le support, en fonction du paramètre exogène de référence, avec des valeurs respectivement différentes dudit paramètre dans lesdits sites, et d'autre part les anti-ligands sont distribués sur le support, entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs optimum prédéterminées du paramètre exogène de référence, déterminant la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

Préférentiellement, mais non exclusivement, le paramètre exogène de référence retenu étant la température, les moyens de différenciation sont agencés pour graduer la température selon au moins une direction de référence, par exemple selon un gradient de température. Dans ce cas, préférentiellement, le dispositif comprend une source froide et une source chaude, entre lesquelles s'étend ledit support selon la direction de référence.

A titre d'exemple, un tel dispositif comprend un seul ou des capteurs, associés aux différents sites de couplage du support respectivement, détectant au moins une grandeur observée, représentative de la présence et/ou de la quantité du complexe ligand/anti-ligand, en chaque site de couplage, et délivrant un ou des signaux de mesure ou informations correspondantes.

A titre d'exemple, le dispositif comprend un capteur unique, composé lui-même de multiples capteurs élémentaires, par exemple une caméra CDD, ou un capteur

unique balayant la surface du support de complexation plurale.

Par exemple, pour l'analyse ou le séquençage d'un matériel nucléique, ce même dispositif comprend ou est
5 associé à une unité de traitement des signaux délivrés par les différents capteurs, selon des opérations mathématiques et/ou logiques prédéterminées, pour obtenir une ou des informations caractérisant le ou les composants du milieu liquide.

10 A titre d'exemple, la grandeur observée, et représentative de la présence et/ou de la quantité du complexe ligand/anti-ligand, est l'absorbance lumineuse, ou l'intensité d'une lumière émise ou réémise (fluorescence, luminescence, par exemple), l'intensité
15 d'un rayonnement ionisant, ou toute propriété physique, optique, électrique ou diélectrique ou électrochimique des différents complexes ligand/anti-ligand, par exemple diffraction lumineuse, résonnance magnétique nucléaire, variation d'angle de contact, conductivité électrique,
20 voltamétrie, ampérométrie, mesure d'impédance.

A titre de mode de réalisation, le support de complexation plurale comprend l'un des matériaux inertes suivants, du verre, un matériau vitreux, un matériau poreux, inorganique ou amorphe, et une matière plastique.

25 Lorsqu'il s'agit d'une biopuce, ce support et les sites de couplage sont obtenus selon les techniques traditionnelles de photolithographie (cf publication N°11).

La présente invention est maintenant décrite à
30 titre d'exemple, par référence au traitement d'un acide ou matériel nucléique, selon le protocole expérimental détaillé ci-après, et se référant au dessin annexé dans lequel:

- les Figures 1a à 1d représentent le résultat
35 d'hybridations isothermes respectivement à 4°C, 10°C, 20°C et 25°C, pour des oligonucléotides et fragments nucléiques

identifiées de manière abrégée en abscisses ; en ordonnées sont portées les valeurs relatives de la grandeur observée, à savoir de la lumière réémise par fluorescence des différents complexes obtenus; les traits pleins 5 représentent des appariements parfaits, et les traits non pleins représentent des mésappariements externes;

- la Figure 2 représente de manière schématique une vue en coupe d'un dispositif de traitement conforme à l'invention;

10 - la Figure 3 représente de manière schématique une vue du dessus du dispositif représenté à la Figure 2;

- la Figure 4 représente une vue à échelle agrandie de la cavité de traitement du dispositif représenté aux Figures 2 et 3;

15 - la Figure 5 représente une vue de dessus du dispositif représenté aux Figures 2 et 3, limitée à la cavité de traitement et de mesure, instrumentée;

- la Figure 6 représente la variation de la grandeur observée (fluorescence) en fonction de la 20 température, pour différents complexes fragment nucléique/oligonucléotide, identifiées dans la légende disposée à droite de cette figure;

- la Figure 7 représente pour une plaque de support de complexation plurale, adaptée à la cavité du 25 dispositif selon Figures 2 et 3, et plus particulièrement représentée à la Figure 4, la disposition selon la largeur ou hauteur de cette plaque, mais aussi selon sa longueur, des sites de couplage, en fonction des oligonucléotides choisis;

30 - de manière analogue aux Figures 1a à 1d, la Figure 8 représente, avec les mêmes conventions que dans les Figures précitées, l'hybridation obtenue avec les fragments nucléiques et oligonucléotides identifiés en abscisses, et ceci avec un support de complexation plurale 35 selon l'invention.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Selon le plan suivant:

I - Mise en évidence du problème à la base de la présente invention

- 5 1.1 Choix des oligonucléotides (anti-ligands)
- 1.2 Synthèse des oligonucléotides
- 1.3 Méthode de greffage des oligonucléotides
- 1.4 Hybridations et visualisation de la
fluorescence des complexes
- 10 1.5 Résultats d'hybridation à températures
isothermes

**II - Résolution du problème à l'aide d'un support de complexation plurale, dont les sites de couplage sont
15 différenciés selon un gradient thermique**

- 2.1 Description du dispositif selon l'invention
permettant l'application d'un gradient thermique
- 2.2 Positionnement des oligonucléotides à leur
température optimum prédéterminée d'hybridation
- 20 2.3 Résultats d'hybridation en gradient
thermique, selon l'invention
- 2.4 Extrapolation au fonctionnement d'une
"biopuce" à oligonucléotides universelle

25 I - Mise en évidence du problème à la base de la présente invention**1.1 - Choix des oligonucléotides (anti-ligands)**

30 Pour montrer les difficultés rencontrées pour une hybridation traditionnelle d'acides nucléiques (ligands) avec des oligonucléotides immobilisés à la surface d'un support solide, des oligonucléotides modèles représentatifs dans ce type d'analyse ont été choisis.

La longueur des oligonucléotides choisis est de 8
35 bases: c'est une longueur communément admise pour une

application de type séquençage par hybridation.
(références bibliographiques 1 et 2).

3 séquences de base , notées B, D, et J, ont été
choisies. Elles se caractérisent par les différences de
5 stabilité des ADNs double brin correspondant. La séquence
B, riche en nucléotides A et T, formera un duplex
relativement instable avec sa séquence complémentaire. En
revanche, la séquence J, riche en nucléotides C et G,
formerá un duplex relativement stable avec sa séquence
10 complémentaire. La séquence D, contenant autant de
nucléotides A et T que de nucléotides C et G formerá un
duplex de stabilité intermédiaire avec sa séquence
complémentaire. Il est possible de prédire
approximativement les stabilités relatives
15 d'oligodeoxyribonucléotides double-brins en utilisant le
modèle du voisin le plus proche de Breslauer et col. (cf
référence bibliographique 3). Ce modèle permet de calculer
pour chaque duplex et à toute température l'énergie libre
de liaison en fonction de sa séquence.

20 A partir de ces trois séquences de base (notées B,
D, et J, voir ci-après), sept autres séquences ont été
déterminées, qui correspondent à des variations simples
des séquences B, D ou J.

Ce sont ces 10 oligonucléotides qui ont été
25 immobilisés sur un support solide de complexation plurale.
Ils contiennent un groupe biotine à leur extrémité 5',
nécessaire à leur immobilisation (voir §1.3 ci-après).
Dans le tableau ci-dessous les trois séquences de base
sont écrites en gras. Dans la rubrique "remarque", le
30 suffixe "c" désigne la séquence complémentaire.

<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>	<u>Remarque</u>
bA	5'b- ACTGATGA 3'	Mésappariement simple externe avec Dc
bB	5'b- AATCATTA 3'	riche en AT
35 bC	5'b- GAGCATTA 3'	Mésappariement double interne avec Bc
bD	5'b- ACTGATGC 3'	50% AT. 50% GC.

bE	5'b-ACTCATGC3'	Mésappariement simple interne avec Dc
bF	5'b-AAGCATTA3'	Mésappariement simple interne avec Bc
bG	5'b-GCTGATGC3'	Mésappariement simple externe avec Dc ou mésappariement double externe avec Ac
5 bH	5'b-GCACCGTC3'	Mésappariement simple interne avec Jc
bI	5'b-ACGCCGTC3'	Mésappariement simple externe avec Jc
bJ	5'b-GCGCCGTC3'	riche en GC

6 oligonucléotides fluorescents (ligands marqués)
 10 ont été hybridés avec ces oligonucléotides immobilisés. Il s'agit des oligonucléotides complémentaires des 3 séquences de base, et de leurs variants différant par un nucléotide terminal. Ils contiennent une fluorescéine à leur extrémité 5'.

15

	<u>Nom</u>	<u>Séquence</u>	<u>Remarque</u>
	fAc	5'F-TCATCAGT.3'	Complémentaire de bA
	fBc	5'F-TAATGATT3'	Complémentaire de bB
	fDc	5'F-GCATCAGT3'	Complémentaire de bD
20	fGc	5'F-GCATCAGC3'	Complémentaire de bG
	fIc	5'F-GACGGCGT3'	Complémentaire de bI
	fJc	5'F-GACGGCGC3'	Complémentaire de bJ

1.2 - Synthèse des oligonucléotides

25 Les oligonucléotides marqués par la biotine et la fluoresceine ont été obtenus après couplage des dérivés activés de biotine et de fluoresceine avec les séquences oligonucléotidiques fonctionnalisées par un bras aminé $-(CH_2)_6-NH_2-$ en position 5'.

30

1.2.1 - Synthèse des oligonucléotides

Les oligonucléotides aminés ont été synthétisés sur un appareil ABI 394 (Applied Biosystems*, Forster City, CA) selon la méthode au phosphoramidite en utilisant le
 35 protocole donné par le constructeur. Tous les réactifs, y

* Marque de commerce

compris le précurseur phosphoramidite du bras aminé, sont fournis par Applied Biosystems. Après clivage du support et déprotection, les séquences oligonucléotidiques sont précitées par addition d'une solution d'acétate de sodium (3M) et de l'éthanol froid (-20°C).

1.2.2 - Synthèse du conjugué oligonucléotide-biotine en 5'

L'oligonucléotide aminé est séché puis solubilisé dans une solution tampon de carbonate de sodium 0,2M, NaCl 0,15M (pH 8,8). Une solution de biotine (biotinoyl-amidocaproic acid N-hydroxysuccinimide ester, BOEHRINGER*) dans la DMF (5mg/l) est ensuite ajoutée. Après 2 heures d'incubation à 37°C, la réaction est bloquée par addition de 10 microlitres d'une solution de chlorure d'ammonium (1M). L'oligonucléotide biotinylé est ensuite précipité à -80°C dans de l'éthanol et de l'acétate de sodium (3M), solubilisé dans de l'eau pure puis purifié par HPLC en phase inverse. Sa concentration a été déterminée par mesure UV à 260 nm.

1.2.3 - Synthèse du conjugué oligonucléotide-fluoresceine en 5'

L'oligonucléotide aminé est séché puis solubilisé dans une solution tampon de carbonate de sodium 0,2M, NaCl 0,15M (pH8,8). Une solution de l'isothiocyanate de fluoresceine (ALDRICH*) dans la DMF (12,5mg/l) est ensuite ajoutée. Après 2 heures d'incubation à 55°C, la réaction est bloquée par addition de 25 microlitres d'une solution de chlorure d'ammonium (1M). L'oligonucléotide fluorescent est ensuite précipité et purifié comme indiqué ci-dessus. Sa concentration a été déterminée par mesure UV à 260nm.

La pureté des différents conjugués est contrôlée par HPLC en phase inverse.

* Marque de commerce

1.3 - Méthode de greffage (immobilisation) des oligonucléotides (anti-ligands)

Le support solide sélectionné pour les expériences est une lame de microscope en verre. C'est un support
5 courant pour ce genre d'analyse. Les lames utilisées sont de dimension 75 x 25 x 1 mm. Le procédé d'immobilisation des oligonucléotides mis en oeuvre est composé de techniques couramment utilisées en dérivation de surface de verre et en biologie moléculaire.

10 La première étape consiste à greffer des groupes amines à la surface du verre, au moyen d'une silanisation. Dans la seconde étape, la surface est activée au moyen d'un agent de couplage réagissant fortement avec les amines. Dans une troisième étape, de l'avidine est greffée
15 de façon covalente sur la surface activée, par la réaction des amines primaires de ses acides aminés sur l'agent de couplage. Enfin, dans une dernière étape, les oligonucléotides biotinilés sont immobilisés à la surface, grâce à la fixation forte de la biotine par l'avidine.

20 Ce procédé assure une fixation des oligonucléotides sur la surface de verre par leur extrémité 5'.

Protocole détaillé :

25 1. Laver les lames de verre à l'acide sulfochromique (Prolabo^{*}) dilué au dixième, les rincer à l'eau, et les faire sécher à 80°C pendant 15 minutes.

2. Plonger les lames dans une solution de toluène contenant 1 % (vol/vol) de 3-
30 aminopropyldiméthylethoxysilane (société ABCR^{*}). Laisser incubé 20 minutes à température ambiante.

3. Rincer deux fois les lames à l'éthanol, et les faire sécher 15 min à 80°C.

4. Plonger les lames dans du diméthylformamide
35 contenant 10% (vol/vol) de pyridine, et 0,2% (w/vol) de 1,4 phénylène diisothiocyanate (Aldrich).

* Marque de commerce

Laisser incuber 1 h à température ambiante.

5. Rincer les lames dans du méthanol, puis de l'acétone, et les faire sécher 15 min. à 80°C.

6. Déposer des gouttes de 2 μ l d'avidine en solution, aux endroits voulus. La solution d'avidine est composée de Tris-HCl 10 mM pH8; EDTA 1 mM; Avidine 1 mg/ml (Sigma*). Laisser incuber 20 à 30 minutes à température ambiante.

7. Reprendre les gouttes d'avidine à la pipette.

8. Rincer les dépôts d'avidine avec une solution de NaCl 1 M, toujours en déposant des gouttes de 2 μ l et en les reprenant à la pipette.

9. Déposer des gouttes de 2 μ l d'oligonucléotides biotinilés (5 μ M) aux mêmes endroits. Laisser incuber 30 minutes à température ambiante. Retirer les gouttes à la pipette. Les oligonucléotides sont dilués en Tris-HCl 10 mM, pH8; EDTA 1 mM; NaCl. 1.M.

10. Plonger les lames dans une solution ammoniacale 1% (vol/vol), NaCl 1 M. Les laisser 10 minutes à température ambiante.

11. Rincer les lames à l'eau, et les faire sécher à l'air ambiant.

Les lames sont alors prêtes pour l'hybridation ou complexation.

Pour déterminer les sites de couplage et positionner les oligonucléotides de façon précise sur les lames de verre, les étapes 6 à 9 ont été automatisées au moyen d'un robot Gilson*, modèle 222. Ce robot est composé d'un bras robot cartésien muni d'une aiguille reliée à un diluteur. Ce montage permet le dépôt et la reprise de gouttes de façon précise et reproductible.

1.4 - Hybridations et visualisation de la fluorescence (grandeur caractérisant la présence et/ou la quantité de complexe)

* Marque de commerce

Les oligonucléotides fluorescents ont été hybridés sur la surface portant les oligonucléotides immobilisés à une concentration de 10^{-7} M dans le tampon suivant: 50 mM Tris-Cl pH 8; 4,5 M TMACl; 2 mM EDTA; 0,01% sarcosine. Ce
5 tampon provient de la référence bibliographique 4.

Le volume d'hybridation est de 150 μ l. Ce volume correspond à un film liquide d'environ 0,1 mm d'épaisseur quand des lamelles 24x50 mm sont utilisées.

La durée de l'hybridation est de 1 h.

10 Les hybridations isothermes ont été faites entre lame et Lamelle, dans une étuve ou un bain-marie assurant la température désirée.

Pour les hybridations selon l'invention avec gradient thermique (voir ci-après), la solution
15 d'hybridation (milieu liquide) est déposée directement sur le bloc de métal supportant le gradient, et la lame portant les oligonucléotides a été appliquée dessus, en prenant soin d'éviter la formation de bulles.

La visualisation ou observation des hybridations
20 (complexations) a été faite par fluorescence, au moyen d'un appareil FluorImager de la société Molecular Dynamics* (Sunnyvale, Californie, USA). Cet appareil balaie la surface à observer en l'illuminant point par point, et site de couplage par site de couplage, au moyen d'un
25 faisceau laser argon (excitation à 488 nm), et collecte la lumière réémise, observée et détectée au moyen d'un faisceau de fibres optiques. Un filtre passe-baut à 515 nm est inclus de façon inamovible dans l'appareil. Il est possible d'ajouter des filtres supplémentaires pour mieux
30 sélectionner en longueur d'onde la lumière collectée et observée.

Pour les observations, un filtre d'interférence 530 $\pm$ 30 nm a été ajouté, et le photomultiplicateur de l'appareil a été réglé sur 920 Volts. La taille du pixel
35 de l'image résultat est un carré de 200 x 200 μ m. Et un site de couplage consiste en un disque d'environ 2 mm de

* Marque de commerce

diamètre, ce qui représente une image finale de chaque site de l'ordre d'une dizaine de pixels.

Les oligonucléotides (anti-ligands) sont de courte taille, et une dissociation rapide des duplex d'ADN a lieu à température ambiante pour les séquences ayant les plus faibles stabilités (séquences A et B). Aussi le procédé suivant a-t-il été mis au point pour observer de façon fidèle les hybridations:

1. Plonger rapidement les lames dans du tampon d'hybridation refroidi à -20°C. Agiter.

2. Plonger rapidement les lames dans du SSC 20X (référence commerciale de la Société AMBESCO*, Solon, Ohio, USA) refroidi à -9°C. Agiter.

Ces deux étapes doivent prendre 10 à 15 secondes maximum.

3. Plonger les lames rapidement dans du tampon d'hybridation refroidi à -20°C. Il n'y a pas de dissociation du duplex (complexe) à cette température et dans ce tampon. Ce tampon doit être dégazé.

4. Sortir les lames de la solution comprenant les oligonucléotides des cibles (ligands). Déposer une lamelle préalablement refroidie dessus. Essuyer rapidement le dessous de la lame.

5. Visualiser et observer aussitôt avec l'appareil FluorImager.

La quantification des hybridations a été réalisée au moyen du logiciel ImageQuant® fourni par la Société Molecular Dynamics avec l'appareil FluorImager*.

Les protocoles décrits ci-dessus assurent un coefficient de variation des signaux d'hybridation de 25% pour des duplicata portés sur la même lame.

1.5 - Résultats d'hybridation à température isotherme

Des lames portant les 10 oligonucléotides (anti-ligands) bA, bB, bC, bD, bE, bF, bG, bH, bI, bJ ont été

* Marque de commerce

produites, et ont été hybridées à 4°C avec un mélange des trois oligonucléotides (ligands) fluorescents fBc, fDc, et fJc, chacun à la concentration initiale de 10^{-7} M.

Les résultats quantitatifs de ces hybridations
5 sont résumés dans le tableau 1.

Il s'agit de la moyenne d'une expérience, en duplicat, et les signaux d'hybridation ont été exprimés en fonction du signal du duplex bJ:FJc.

A partir des valeurs du tableau 1, la différence
10 d'intensité des signaux d'hybridations fortes et très faibles est d'environ 15 fois. Une hybridation non délectable est au moins 20 fois plus faible qu'une hybridation forte.

Comme attendu, les hybridations obtenues avec les
15 oligonucléotides bB, bD, et bJ sont fortes, puisque les oligonucléotides libres en solutions étaient leurs complémentaires respectifs.

Les hybridations obtenues avec bC, bE, bF, et bH
20 sont très faibles ou non détectables, ce qui signifie que les mésappariements internes sont facilement distingués des appariements parfaits.

En revanche, il n'en est pas de même pour les mésappariements externes. En effet, si bA génère un signal d'hybridation relativement faible, il n'en est pas de même
25 pour bG et bI qui génèrent des signaux d'hybridation aussi forts que ceux des appariements parfaits. Le mésappariement externe formé par le duplex bA:fDc est donc correctement discriminé, mais les mésappariements externes que forment les duplex bG:fDc et bI:fJc ne le sont pas.

30 Dans ces conditions expérimentales, on voit donc qu'il n'est pas possible d'analyser finement un échantillon (milieu liquide) inconnu. Si l'hybridation ci-dessus avait été menée avec un échantillon inconnu, les oligonucléotides bB, bD, bG, bI, et bJ auraient été
35 déterminés comme hybridant avec l'échantillon, ce qui représente un taux de faux positif de 40%.

Pour améliorer la discrimination des mésappariements externes, on peut penser à augmenter la température d'hybridation. Pour explorer cette solution, les six oligonucléotides bA, bB, bD, bG, bI et bJ ont été immobilisés sur une lame, et hybridés avec les oligonucléotides fBc, fDc, et fJc à différentes températures (4, 10, 20, 25, 30, et 37°C). La figure 1 représente les résultats d'hybridation obtenus pour les températures de 4 à 25°C. Il s'agit des moyennes obtenues sur 16 à 42 déterminations. Les résultats sont exprimés en intensité lumineuse relative de l'hybridation bJ:fJc, car ce duplex apparaît être le plus stable. Bien entendu, l'intensité absolue du signal d'hybridation de ce duplex diminue quand la température augmente.

La figure 1 montre qu'à 10°C le profil des hybridations est semblable à celui obtenu avec des hybridations à 4°C. En revanche, certains changements ont lieu à 20 et 25°C. Le mésappariement externe bG-fDc devient nettement plus faible que l'appariement parfait bI:fJc. De même, le mésappariement externe bI:fJc devient significativement plus faible que l'appariement parfait bJ:fJc, bien que la différence soit un peu faible pour une discrimination parfaite lors d'une hybridation unique. Cependant, l'appariement parfait bB:fBc diminue lui aussi d'intensité, et génère un signal plus faible que celui du duplex mésapparié bI:fJc. En conséquence, il n'est pas possible de choisir un seuil d'intensité d'hybridation qui départage sans erreur les duplex parfaitement appariés des duplex mésappariés. Par exemple, si l'on choisit d'hybrider à 25°C avec un seuil de 0,5, l'oligonucléotide bB sera déclaré négatif, et l'oligonucléotide bI sera déclaré positif. Le résultat final comprendra donc un faux positif et un faux négatif. Si l'on choisit alors une hybridation à 20°C avec un seuil de 0,4, l'oligonucléotide bB sera bien déclaré positif, mais l'oligonucléotide bI

également, ainsi que, parfois. l'oligonucléotide bG, selon les variations expérimentales.

II - Solution selon l'invention avec un gradient thermique

5

2.1 - Description du montage permettant l'application d'un gradient thermique

Pour résoudre le problème de discrimination des mésappariements externes exposé ci-dessus, on a conçu et développé un dispositif de traitement, capable d'établir un gradient thermique à la surface de la lame de verre portant les oligonucléotides immobilisés, et constituant un support de complexation plurale.

Ce dispositif répond aux spécifications suivantes:

- gradient de température de 10°C dans la zone utile ou de travail longue de 1 cm

- connaissance de la température du subjectile de la lame en tout point à 0,1°C près

- reproductibilité des températures du subjectile de lame d'un essai à l'autre : 0,1°C, à 0,1 mm près; la température ambiante doit pouvoir varier librement de 20 à 25°C

- facilité d'installation et d'enlèvement de la lame de verre portant les oligonucléotides.

La façon la plus simple d'établir un gradient thermique à la surface d'un subjectile est de connecter les extrémités de ce subjectile à une source froide 3 et à une source chaude 4 respectivement. Il s'établit alors un gradient thermique entre les deux sources. Si le subjectile a une épaisseur constante, le gradient de température est constant, c'est-à-dire que la température varie linéairement sur le subjectile en fonction de la distance le long de ce dernier.

Du point de vue pratique, il est nécessaire que la lame de verre 2 sur laquelle sont immobilisés les oligonucléotides puisse être facilement remplaçable d'un

essai à l'autre, et qu'il n'y ait pas de différence d'échanges thermiques entre les différents essais. C'est pourquoi le gradient thermique n'a pas été établi directement dans la lame de verre, mais dans un bloc
5 métallique 1 à la surface duquel une petite cavité 1a a été creusée. La lame de verre 2 est posée dans cette cavité, la face portant les oligonucléotides immobilisés dessous. Entre le bloc métallique 1 et la lame de verre 2 supportée par des cales 11, se trouve la solution
10 d'hybridation (cf Figure 4), ou milieu liquide.

Dans la figure 4 sont indiqués des butées 6 de positionnement de la lame de verre 2. En effet, la lame est placée en contact avec ces butées. Lors de l'immobilisation des oligonucléotides sur la lame, la
15 position des oligonucléotides dans le gradient thermique est déterminée à partir du bord 2a de la lame venant ainsi en butée. Le bloc métallique 1 est en acier inox 3041, ayant par exemple une conductivité thermique entre 10 et 50 W/m.K; il est isolé par une enveloppe 7 ayant une
20 conductivité intrinsèque par exemple inférieure à 0,06 W/m.K, par exemple en polyuréthane.

Les extrémités du dispositif ont été connectées à des bain-maries à circulation des sources froide et chaude, dont la régulation thermique est stable à $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$
25 selon les indications du constructeur (cryothermostat ministat Huber, $-25/+120^{\circ}\text{C}$).

Les températures du dispositif ont été contrôlées au moyen des thermocouples chromel-alumel (type K) décrits dans la figure 5. Les thermocouples TCI et TC4 sont situés
30 de part et d'autre de la lame 2, alors que les thermocouples TC2 et TC3, dont les fils ont un diamètre total de 0,08 mm, sont situés sous la lame de verre, dans la solution d'hybridation. Ces thermocouples ont été soudés par décharge électrique directement sur l'acier.
35 Leurs positions (médianes entre les deux fils des thermocouples) ont été déterminées à 0,02 mm près, au

moyen d'une loupe binoculaire surplombant une table x,y micrométrique. Ils sont montés en différentiel avec une soudure froide plongeant dans un bain d'eau pure glacée. Les tensions différentielles sont mesurées au moyen d'un
5 multimètre de haute précision (Keithley, modèle 2000. Précision : $0,1 \mu\text{V}$), et traduites en températures au moyen de la table standard pour ces thermocouples.

Le dimensionnement du dispositif de traitement précédemment décrit est montré par les repères lettrés de
10 la Figure 2 et est : AA:40mm, BB:40mm, CC:20mm, DD:15mm, JJ:120mm, EE:10mm, FF:10mm, GG:20mm, HH:40mm, II:12mm.

La linéarité du gradient thermique, prédite par les simulations numériques, a été vérifiée expérimentalement au moyen des thermocouples placés dans
15 le montage. Le gradient étant linéaire, les températures en tout point de la zone utile de la lame 2 peuvent être calculées simplement à partir des températures données par les thermocouples TC2 et TC3.

Les mesures de température qui ont été faites pour
20 plusieurs températures des sources chaude et froide, et à différentes reprises, montrent que la répartition des températures est reproductible d'un essai à l'autre, à $0,1^\circ\text{C}$ près.

Dans la plupart des expériences reportées ici, le
25 bain-marie froid était réglé à -9°C , et le bain-marie chaud à $+61^\circ\text{C}$. Le liquide de la source froide 3 était de l'eau glycolée (25% glycol), et celui de la source chaude 2 de l'eau pure. Le gradient établi était de $1,085^\circ\text{C}/\text{mm}$. Les deux bords de la lame de verre, distants de 25 mm, se
30 trouvaient respectivement à $13,2$ et à $40,3^\circ\text{C}$.

2.2 - Positionnement des oligonucléotides à leur température optimum prédéterminée d'hybridation

Les résultats des hybridations isothermes montrent
35 que la température d'hybridation de chaque oligonucléotide doit être suffisamment chaude pour qu'il y ait une

discrimination correcte des mésappariements externes. Mais cette température doit rester en même temps suffisamment basse pour que le signal d'hybridation soit détectable. Avec le dispositif précédemment décrit, on a fixé la
5 température d'hybridation, de telle façon que le signal d'hybridation soit égal à 25% du signal d'hybridation obtenu à 4°C, qui correspond à la saturation des oligonucléotides immobilisés. On détermine ainsi approximativement le positionnement et la distribution des
10 oligonucléotides dans le gradient thermique, à la surface de la lame de verre 2 (support plan).

Pour affiner les positions respectives des oligonucléotides dans le gradient, des lames ont été produites qui portaient les oligonucléotides en
15 quintuplets dans la direction du gradient. Les 5 sites de couplage d'un quintuplet se trouvent respectivement à 5, 8,8, 12,6, 16,4, et 20,2 mm du bord froid 2a de la lame 2. Ces lames ont ensuite été hybridées avec diverses combinaisons des oligonucléotides fluorescents
20 complémentaires. La figure 6 est le résultat d'une telle hybridation avec les oligonucléotides fBc, fDc, et fJc. Dans cette expérience, les bains-maries du gradient thermique étaient réglés à -9 et +71°C.

A l'issue de quelques expériences de ce type, les
25 localisations des sites de couplage des différents oligonucléotides respectivement ont été définies :

bA : 23,5°C; bB : 23°C; bD : 26,5°C; bG : 27,5°C;
bI : 27,5°C; bJ : 29°C

30 2.3 - Résultats d'hybridation en gradient thermique, selon l'invention

Pour ces expériences, les oligonucléotides bA, bB, bD, bG, bI, et bJ ont été immobilisés sur des lames de verre respectivement à 9,5 , 9 , 12,2 , 13,2 , 13,2 , et
35 14,6 mm du bord froid 2a de la lame 2. Quand les bains-maries des sources froide et chaude sont réglés sur -9 et

+61°C, ces positions correspondent aux températures définies ci-dessus. Les oligonucléotides ont été déposés en duplicat, selon le schéma de la figure 7. Les lames 2 ont ensuite été hybridées en gradient thermique, avec le même mélange des oligonucléotides fBc, fDc, et fJc utilisés précédemment dans les hybridations isothermes.

Les résultats d'hybridation obtenus sont résumés dans la figure 8. Il s'agit des moyennes obtenues sur 5 déterminations. Les résultats sont exprimés en intensité relative de l'hybridation bJ:fJc, comme pour les résultats exposés aux figures 1a à 1d.

On remarque que les trois appariements parfaits génèrent un signal d'hybridation d'intensité comparable (de 0,84 à 1), alors que les mésappariements externes donnent des signaux significativement plus faibles. Contrairement aux résultats obtenus en hybridation isotherme, il est possible ici de définir un seuil d'intensité qui départage les appariements parfaits des mésappariements, par exemple un seuil de 0,7.

Afin de vérifier le bon fonctionnement du dispositif précédemment décrit, des lames identiques ont été hybridées avec d'autres combinaisons des oligonucléotides fluorescents fAc, fBc, fDc, fGc, fIc, et fJc. Ces combinaisons comprenaient systématiquement l'oligonucléotide fBc. Elles comprenaient en outre fIc ou fJc, et fAc, ou fDc, ou fGc. De cette façon, les trois oligonucléotides fluorescents de chaque combinaison n'interféraient pas dans leurs hybridations car ils ne s'appariaient jamais sur un même oligonucléotide fixe. Une combinaison contenant fAc, fGc, et fIc a aussi été utilisée. En effet, les hybridations croisées entre les séquences A et G sont très faibles (voir résultats ci-dessous).

Les résultats de ces hybridations sont rapportés dans le tableau 2. Il ont été exprimés relativement à l'intensité du signal d'hybridation du duplex bB:fBc. De

plus, pour les mésappariements, les résultats ont aussi été exprimés relativement à l'intensité du signal d'hybridation de l'appariement parfait correspondant.

Ces résultats montrent clairement que tous les appariements parfaits génèrent des signaux d'intensité semblable. Cependant, l'appariement bG:fGc génère un signal légèrement trop faible. puisqu'il est de 0,79 avec un écart-type sur 6 déterminations de 0,22. La probabilité que le signal réel, en dehors des variations expérimentales, soit effectivement plus petit que 1 est donc forte, d'environ 97%. Ceci signifie donc que le positionnement de G dans le gradient thermique est un peu chaud dans ces expériences, et que G peut être repositionné vers la source froide.

Par ailleurs, ces résultats montrent également que les mésappariements externes génèrent des signaux nettement plus faibles que le duplex parfait bB:fBc, ou encore que leurs homologues parfaits respectifs. Comme pour le cas particulier des hybridations avec la combinaison fBc+fDc+fJc, un seuil de 0,7 par rapport à un duplex parfait de référence permet de distinguer les appariements parfaits des mésappariements externes.

De nouvelles expériences ont alors été faites, avec des lames sur lesquelles l'oligonucléotide bG était positionné à 26,8°C (12,5 mm du bord froid 2a de la lame 2), la position des autres oligonucléotides restant inchangée. Ces lames ont été hybridées avec les combinaisons d'oligonucléotides fluorescents fBc+fGc+fIc et fBc+fGc+fJc. La moyenne du signal d'hybridation du duplex bG:fGc par rapport au duplex bB:fBc alors été de 1,08 sur 7 déterminations, avec un écart-type de 0,32. On a alors extrapolé les signaux des mésappariements bG:fDc et bG:fAc à cette nouvelle température de bG en prenant les anciennes valeurs, et en les multipliant par le rapport $1,08 : 0,79 = 1,367$. De même, les signaux des mésappariements bD:fGc et bA:fGc par rapport à leur

homologue parfait correspondant bG:fGc ont été déduits des valeurs précédentes en divisant celles-ci par 1,367. L'ensemble des résultats et de ces calculs est donné dans le tableau 3.

5 Comme attendu, ces nouveaux résultats confirment et améliorent les précédents. Tous les appariements parfaits génèrent un signal d'hybridation proche de 1, alors que les mésappariements terminaux génèrent des signaux inférieurs à 0,5, sauf bI:fJc qui est légèrement
10 supérieur. Un seuil de 0,7 permet de distinguer indiscutablement les appariements parfaits des mésappariements externes.

15 2.4 - Application au fonctionnement d'une biopuce à oligonucléotides universelle

Lors de l'utilisation d'une biopuce à oligonucléotides portant par exemple l'ensemble des 65 536 octamers possibles, il n'est pas très efficace d'appliquer simplement un seuil d'intensité pour déterminer si un
20 signal est positif ou négatif. En effet, les signaux des mésappariements les plus stables étant seulement deux fois plus faibles que les signaux des appariements parfaits, il est probable que des variations expérimentales feront qu'un certain nombre d'appariements parfaits seront
25 détectés comme négatifs, et que de même, un certain nombre de mésappariements externes seront déterminés comme positifs. Par exemple, sur l'ensemble des données résumées dans le tableau 3, il y a 2 signaux d'appariements parfaits sur les 39 reportés, qui sont en dessous du seuil
30 de 0,7 (5.1%), et il y a 2 des 56 (3,6%) déterminations de mésappariements externes qui sont au dessus de ce seuil de 0,7. Il s'agit d'une valeur pour le duplex bJ:fIc, et d'une valeur pour le duplex bJ:fIc. Ces deux duplex font partie des trois duplex mésappariés les plus stables des
35 expériences conduites.

Une façon plus efficace de procéder est d'associer tous les oligonucléotides ne différant que par leurs nucléotides terminaux dans un même groupe (16 octamers pour une biopuce portant tous les octamers possibles), et de déterminer pour chaque groupe le signal le plus intense. Il est alors facile de distinguer les groupes positifs des groupes négatifs, car cela reviendra à distinguer des appariements parfaits et des mésappariements internes. Par exemple, on applique un seuil de 0,4 par rapport aux signaux les plus intenses.

Ensuite, pour chaque groupe d'oligonucléotides, on peut appliquer le seuil de 0,7 par rapport au signal le plus intense.

Si l'on procède de cette façon sur l'ensemble des expériences rapportées dans le tableau 3, aucun appariement parfait n'est déterminé comme négatif car tous sont largement au dessus du seuil de 0,4 par rapport au signal le plus intense de l'expérience. En revanche, les deux valeurs qui étaient faussement déterminées comme positives restent faussement positives.

Par application de ces données, une biopuce à oligonucléotides universelle fonctionnant de cette façon aurait donc un taux de faux négatif de 0%, un taux de faux positifs des mésappariements internes de 0%, et un taux de faux positifs des mésappariements externes de 3 à 4%, qui correspond en fait à un taux de faux positifs d'environ 10% pour 30 et 40% des mésappariements externes. De tels taux de faux positifs et de faux négatifs représentent une amélioration considérable de l'état de l'art procédant par hybridation isotherme. De tels taux sont suffisamment faibles pour permettre la reconstruction de la séquence d'un échantillon nucléique par séquençage par hybridation. En effet, les erreurs d'hybridation restantes peuvent être corrigées par un logiciel d'analyse de données adéquat grâce à la redondance des hybridations (5).

Pour améliorer encore la qualité des résultats, on pourra procéder à deux expériences d'hybridation par échantillon au lieu d'une seule. Le taux de faux positif devrait alors être de l'ordre de 1% pour 30 à 40% des
5 mésappariements externes.

TABLEAU 1

Oligonucléotides	Hybridation
bA:fDc	0,31
bB:fBc	0,86
bC:fBc	0,06
bD:fDc	0,73
bE:fDc	0,02
bF:fBc	0,14
bG:fDc	1,03
bH:fJc	0,14
bI:fJc	0,79
bJ:fJc	1,00

TABLEAU 2
Résultats des hybridations en gradient thermique

Intensités relatives des appariements parfaits par rapport à bB:fBc				
Duplex	Température (1)	Moyenne (2)	n (3)	Ecart-type
bA:fAc	23,5	0,99	6	0,13
bD:fDc	26,5	1,01	7	0,28
bG:fGc	27,5	0,79	6	0,22
bl:flc	27,5	1,08	10	0,36
bJ:fJc	29	1,06	9	0,31
Total			38	

Discrimination des mésappariements externes.

Discrimination des mésappariements externes.				
Par rapport au duplex bB:fBc				
Duplex	Température (1)	n (3)	Moyenne (2)	Ecart-type
bl:fJc	27,5	9	0,56	0,14
bJ:flc	29	10	0,44	0,18
bG:fDc	27,5	6	0,27	0,07
bD:fAc	26,5	6	0,46	0,22
bD:fGc	26,5	6	0,25	0,19
bA:fDc	23,5	7	0,25	0,18
bA:fGc	23,5	6	0,00	0,10
bG:fAc	27,5	4	0,15	0,06
Total		54		
				56
Par rapport au duplex parfait (4)				
		n (3)	Moyenne (4)	Ecart-type
		9	0,54	0,12
		12	0,42	0,16
		6	0,28	0,12
		6	0,46	0,18
		6	0,29	0,19
		7	0,30	0,23
		6	-0,01	0,10
		4	0,15	0,06

(1) bB:fBc se trouve à 23°C.
(2) Moyenne des rapports (duplex / bB:fBc).
(3) Nombre de déterminations.
(4) Moyenne des rapports (duplex / duplex parfait pour l'oligonucléotide fluorescent).

TABLEAU 3
Résultats des hybridations en gradient thermique
bG positionné à 26,8°C

Intensités relatives des appariements parfaits par rapport à bB:fBc				
Duplex	Température (1)	Moyenne (2)	n (3)	Ecart-type
bA:fAc	23,5	0,99	6	0,13
bD:fDc	26,5	1,01	7	0,28
bG:fGc	26,8	1,08	7	0,32
bI:fIc	27,5	1,08	10	0,36
bJ:fJc	29	1,06	9	0,31
Total			39	

Discrimination des mésappariements externes.

Par rapport au duplex bB:fBc				
Duplex	Température (1)	n (3)	Moyenne (2)	Ecart-type
bI:fJc	27,5	9	0,56	0,14
bJ:fIc	29	10	0,44	0,18
bG:fDc (5)	26,8	6	0,37	0,07
bD:fAc	26,5	6	0,46	0,22
bD:fGc (6)	26,5	6	0,25	0,19
bA:fDc	23,5	7	0,25	0,18
bA:fGc (6)	23,5	6	0,00	0,10
bG:fAc (5)	26,8	4	0,21	0,06
Total		54		

Par rapport au duplex parfait (4)			
n (3)	Moyenne (4)	Ecart-type	
9	0,54	0,12	
12	0,42	0,16	
6	0,38	0,12	
6	0,46	0,18	
6	0,21	0,19	
7	0,30	0,23	
6	0,00	0,10	
4	0,21	0,06	
56			

(1) bB:fBc se trouve à 23°C.
(2) Moyenne des rapports (duplex / duplex / bB:fBc).
(3) Nombre de déterminations.
(4) Moyenne des rapports (duplex / duplex parfait pour l'oligonucléotide fluorescent).
(5) Valeurs moyennes calculées en multipliant les valeurs du tableau 2 par 1,367, n et écart-type laissés inchangés.
(6) Pour le rapport au duplex parfait, valeur moyenne calculée en divisant la valeur du tableau 2 par 0,367, n et écart-type laissés inchangés.

- (1) K. R. Khrapko, Y. P. Lysov, A. A. Khorlyn. V. V. Shick, V. L. Florentiev and A. D. Mirzabekov; An
5 oligonucleotide hybridization approach to DNA sequencing;
FEBS Letters; 1989; 256; 118-122.
- (2) M. J. Doktycz, M. D. Morris, S. J. Dormady, K,
L. Beattie and K. B. Jacobson; Optical melting of 128
octamer DNA duplexes; J. Biol. Chem.; 1995; 270; 8439-
10 8445.
- (3) K. J. Breslauer, R. Frank, H. Blöcker and L.
A. Mary; Predicting DNA duplex stability from the base
sequence; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1986; 83; 3746-3750.
- (4) U. Maskos and E. M. Southern; A study of
15 oligonucleotide reassociation using large arrays of
oligonucleotides synthesised on a glass support; Nucleic
Acids Research; 1993; 21; 4663-4669.
- (5) Z. Strezoska, T. Paunesku, D. Radosavljevic,
1. Labat, R. Drmanac and R. Crkvenjak-ov; DNA sequencing
20 by hybridization: 100 bases read by a non-gel-based
method; Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 1991; 88; 10089-
10093.
- (6) EM Southern et al (1992); Analysing and
comparing nucleic acid sequences by hybridization to
25 arrays of oligonucleotides; evaluation using experimental
models. Genomics 13, 1008-1017.
- (7) R. Drmanac et al (1993); DNA sequence
determination by hybridization : a strategy for efficient
large-scale sequencing Science 260; 1649-1652.
- 30 (8) Carrano et al (1989); A high resolution,
fluorescence based, semi-automated method, for DNA
fingerprinting, Genomic 4, 129-136.
- (9) Lysov, Yu et al (1988); Doklady akademi. Nauk.
SSR 303: 1508-1511.
- 35 (10) Drmanac, R et al (1989) Genomics 4: 114-128.
(11) Sze VLSI Technology, Mc Graw Hill 1983.

REVENDICATIONS

1. Procédé de traitement par complexation d'un milieu liquide comprenant un ou plusieurs composants déterminant la présence dans ledit milieu liquide d'une pluralité de ligands différents à l'état libre, selon lequel :

a) on dispose d'un support de complexation plurale, sur lequel sont distribués une pluralité de sites de couplage, séparés les uns des autres, dans lesquels sont immobilisés une pluralité d'anti-ligands respectivement différents, et susceptibles d'être complexés avec lesdits ligands respectivement,

b) on met en contact ledit milieu liquide avec ledit support de complexation, moyennant quoi lesdits ligands s'apparient avec lesdits anti-ligands respectivement, et sont fixés audit support,

caractérisé en ce que la stabilité de chaque complexe ligand/anti-ligand étant dépendante, directement ou indirectement, d'au moins un paramètre exogène, dit de référence, conditionnant ledit support, d'une part on différencie les sites de couplage sur le support, en fonction dudit paramètre exogène de référence, ayant des valeurs respectivement différentes dans lesdits sites, et d'autre part on distribue les anti-ligands entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs optimum prédéterminées du paramètre exogène de référence, déterminant la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue la mise en contact selon (b) en appliquant une même valeur minimum du paramètre exogène de référence à tous les sites de couplage, suffisante pour complexer

pratiquement tous les ligands avec les anti-ligands, puis on lave le support en appliquant aux différents sites de couplage des valeurs respectivement différentes, et prédéterminées, du paramètre exogène de référence.

3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue la mise en contact selon (b) en appliquant aux différents sites de couplage des premières valeurs respectivement différentes et prédéterminées, du paramètre exogène de référence, puis on lave le support en maintenant les différents sites de couplage à des secondes valeurs prédéterminées du paramètre exogène de référence, respectivement différentes; les premières valeurs étant identiques ou différentes des secondes valeurs respectivement du paramètre exogène de référence.

4. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on effectue la mise en contact du support avec le milieu liquide, en appliquant aux différents sites de couplage des valeurs respectivement différentes et prédéterminées du paramètre exogène de référence, on lave le support hybridé avec un liquide de lavage à température froide et constante.

5. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on établit sur le support une gradation spatiale du paramètre exogène de référence, selon au moins une direction de référence dudit support, ladite gradation spatiale fixe la position des différents sites de couplage, et la distribution des anti-ligands entre lesdits sites de couplage respectivement.

6. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le paramètre exogène de référence est :

- ou un paramètre ou condition physique,

- ou un paramètre ou condition chimique, biochimique, ou biologique à la surface du support de complexation,

- ou un paramètre physico-chimique de la surface du support.

7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la condition physique est la température.

8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la condition biologique à la surface du support de complexation est la concentration surfacique d'un anti-anti-ligand susceptible de s'apparier avec pratiquement tous les anti-ligands.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que le paramètre physico-chimique de la surface du support est sa mouillabilité ou tension superficielle par rapport au milieu liquide.

10. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'au moins un autre paramètre exogène duquel dépend la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand, est fixé à une valeur moyenne entre celles dudit autre paramètre, requises pour la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

11. Procédé selon les revendications 1, 2, 3 ou 4, caractérisé en ce que, d'une part on différencie les sites de couplage sur le support, en fonction d'un autre paramètre exogène de référence, ayant des valeurs différentes dans lesdits sites, et d'autre part on distribue les anti-ligands entre les différents sites de couplage, également en fonction des valeurs optimum prédéterminées de l'autre paramètre exogène de référence, déterminant aussi la

stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on observe aux différents sites de couplage du support une grandeur représentative de la présence ou de la quantité des différents complexes ligand/anti-ligand, pour obtenir des signaux ou des informations représentatifs de la présence ou de la quantité des différents ligands dans le milieu liquide de départ.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'on observe les différents complexes ligand/anti-ligand, en mettant en oeuvre au moins l'une quelconque des opérations suivantes, à savoir marquage du ou des composants du milieu liquide et marquage des différents complexes ligand/anti-ligand fixés sur le support.

14. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu liquide est obtenu à partir d'un échantillon, contenant une ou plusieurs entités différentes, à analyser.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'échantillon est un échantillon ou un matériel biologique.

16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'échantillon est soumis à au moins une opération préalable, choisie pour obtenir un ou plusieurs composants dans le milieu liquide traité, identiques à ou dérivés directement des différentes entités respectivement, et représentatives de ces dernières.

17. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le support de complexation sur lequel sont fixés les différents ligands est soumis à au moins une opération postérieure, choisie pour séparer dudit support le ou les composants n'ayant pas été couplés, ou éluer ou relarguer les différents ligands, de manière différenciée ou non.

18. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'un ligand est un acide nucléique, qui comprend une séquence nucléotidique cible, accessible à une hybridation avec une autre séquence nucléotidique sonde, complémentaire, comprise par un anti-ligand correspondant.

19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que la séquence nucléotidique cible est sous forme monocaténaire.

20. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu liquide comprend plusieurs composants différents, comprenant des ligands respectivement différents, moyennant quoi lesdits composants différents sont fixés et séparés les uns des autres sur ledit support de complexation.

21. Procédé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre dans au moins l'une quelconque des applications suivantes, à savoir identification, quantification, séparation et fractionnement desdites molécules différentes.

22. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le milieu liquide comprend un seul composant, comprenant ou exhibant plusieurs ligands respectivement différents, moyennant quoi le même composant est apparié aux différents anti-ligands respectivement.

23. Procédé selon les revendications 18 et 22, caractérisé en ce que le seul composant est un acide nucléique, dont la suite de nucléotides d'au moins un brin détermine une pluralité de régions d'hybridation, et donc de ligands, selon les séquences nucléotidiques cible respectivement complémentaires aux séquences nucléotidiques sonde des anti-ligands.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est mis en oeuvre dans au moins l'une quelconque des applications suivantes, à savoir séquençage par hybridation du composant nucléique du milieu liquide, reséquençage du composant nucléique, analyse et identification d'un matériel ou échantillon nucléique, et typage d'un matériel nucléique.

25. Procédé selon les revendications 14 et 18, caractérisé en ce que le milieu liquide est obtenu à partir d'un échantillon nucléique, comprenant un seul et même fragment, ou plusieurs fragments nucléiques différents.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce que l'échantillon nucléique est soumis à au moins une opération préalable, choisie parmi les opérations suivantes : dénaturation, clonage et amplification.

27. Dispositif de traitement par complexation d'un milieu liquide comprenant un ou plusieurs composants déterminant la présence dans ledit milieu liquide d'une pluralité de ligands différents à l'état libre, ledit dispositif comprenant :

- un support de complexation plurale, sur lequel sont distribués une pluralité de sites de couplage, séparés les uns des autres, dans lesquels sont immobilisés une pluralité

d'anti-ligands respectivement différents, et susceptibles d'être complexés avec lesdits ligands respectivement,

- un moyen de mise en contact dudit milieu liquide avec ledit support, agencé pour apparier lesdits ligands avec lesdits anti-ligands respectivement, et les fixer audit support,

caractérisé en ce que, la stabilité de chaque complexe ligand/anti-ligand étant dépendante directement ou indirectement d'au moins un paramètre exogène, dit de référence, conditionnant ledit support, d'une part ledit dispositif comprend en outre des moyens de différenciation des sites de couplage sur le support, en fonction dudit paramètre exogène de référence, avec des valeurs respectivement différentes dudit paramètre dans lesdits sites, et d'autre part les anti-ligands sont distribués sur ledit support, entre les différents sites de couplage, en fonction de valeurs optimum prédéterminées dudit paramètre exogène de référence, déterminant la stabilité des différents complexes ligand/anti-ligand respectivement.

28. Dispositif selon la revendication 27, caractérisé en ce que, le paramètre exogène de référence retenu pour la complexation, étant la température, lesdits moyens de différenciation sont agencés pour grader la température selon au moins une direction de référence.

29. Dispositif selon la revendication 28, caractérisé en ce que lesdits moyens de différenciation sont agencés selon un gradient de températures.

30. Dispositif selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il comprend une source froide et une source chaude, entre lesquelles s'étend un subjectile (2) selon ladite direction de référence.

31. Dispositif selon la revendication 27, caractérisé en ce qu'il comprend un ou des capteurs, associés aux différents sites de couplage du support respectivement, détectant chacun au moins une grandeur observée, représentative de la présence ou de la quantité du complexe ligand/anti-ligand, en chaque site de couplage, et délivrant un ou des signaux de mesure ou informations correspondantes.

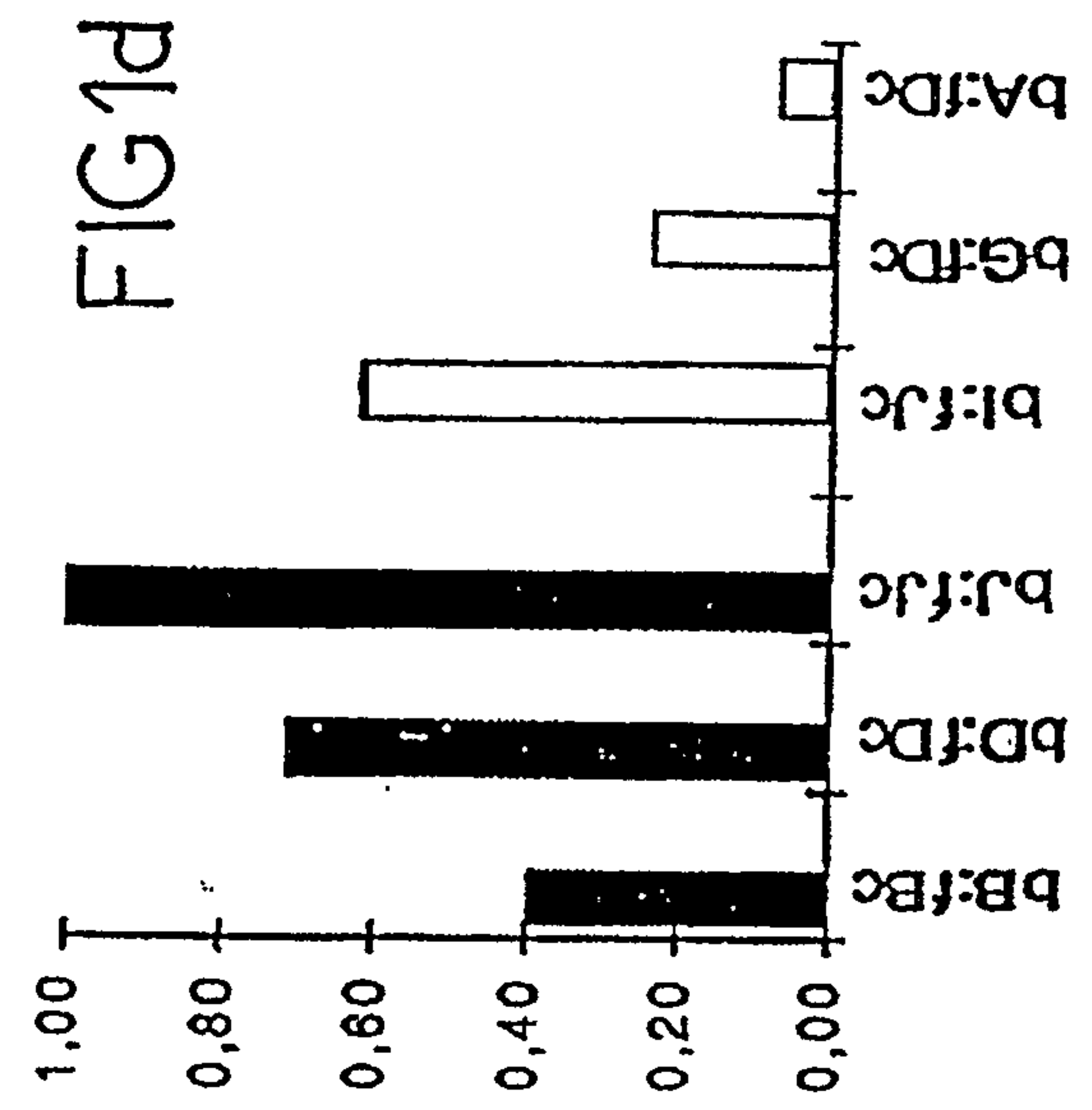
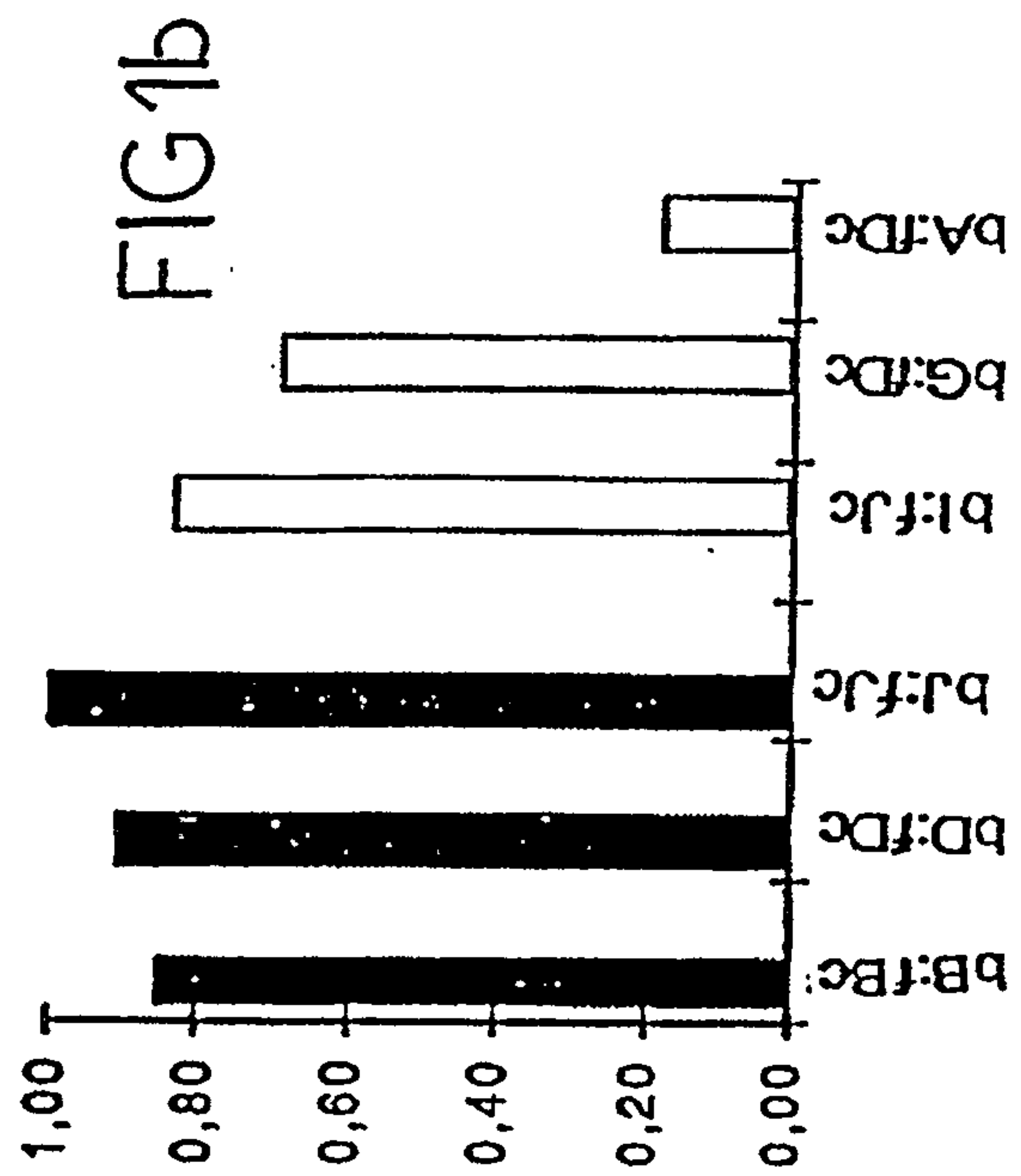
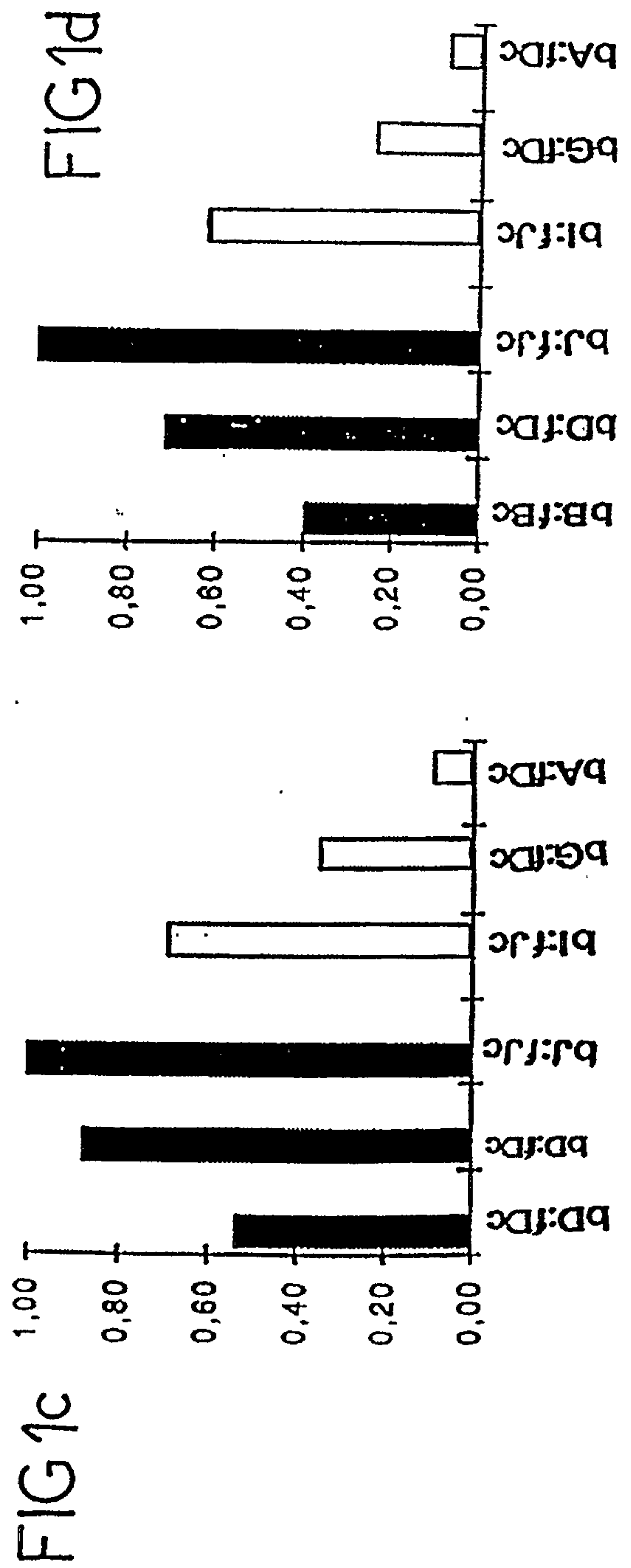
32. Dispositif selon la revendication 31, caractérisé en ce qu'il comprend une unité de traitement des signaux délivrés par les différents capteurs, selon des opérations mathématiques ou logiques prédéterminées, pour obtenir une ou des informations caractérisant le ou les composants du milieu liquide.

33. Dispositif selon la revendication 32, caractérisé en ce que la grandeur observée est choisie parmi les grandeurs suivantes, à savoir l'absorbance lumineuse, l'intensité d'une lumière émise ou réémise, et toute propriété physique, optique, électrique, diélectrique ou électrochimique des différents complexes ligand/anti-ligand.

34. Dispositif selon la revendication 27, caractérisé en ce que le support est plan.

35. Dispositif selon la revendication 27, caractérisé en ce que le support comprend au moins l'un des matériaux suivants, du verre, un matériau poreux, un matériau vitreux, inorganique, ou amorphe, et une matière plastique.

36. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la gradation spatiale du paramètre exogène de référence et un gradient du dit paramètre.



2/5

FIG 2

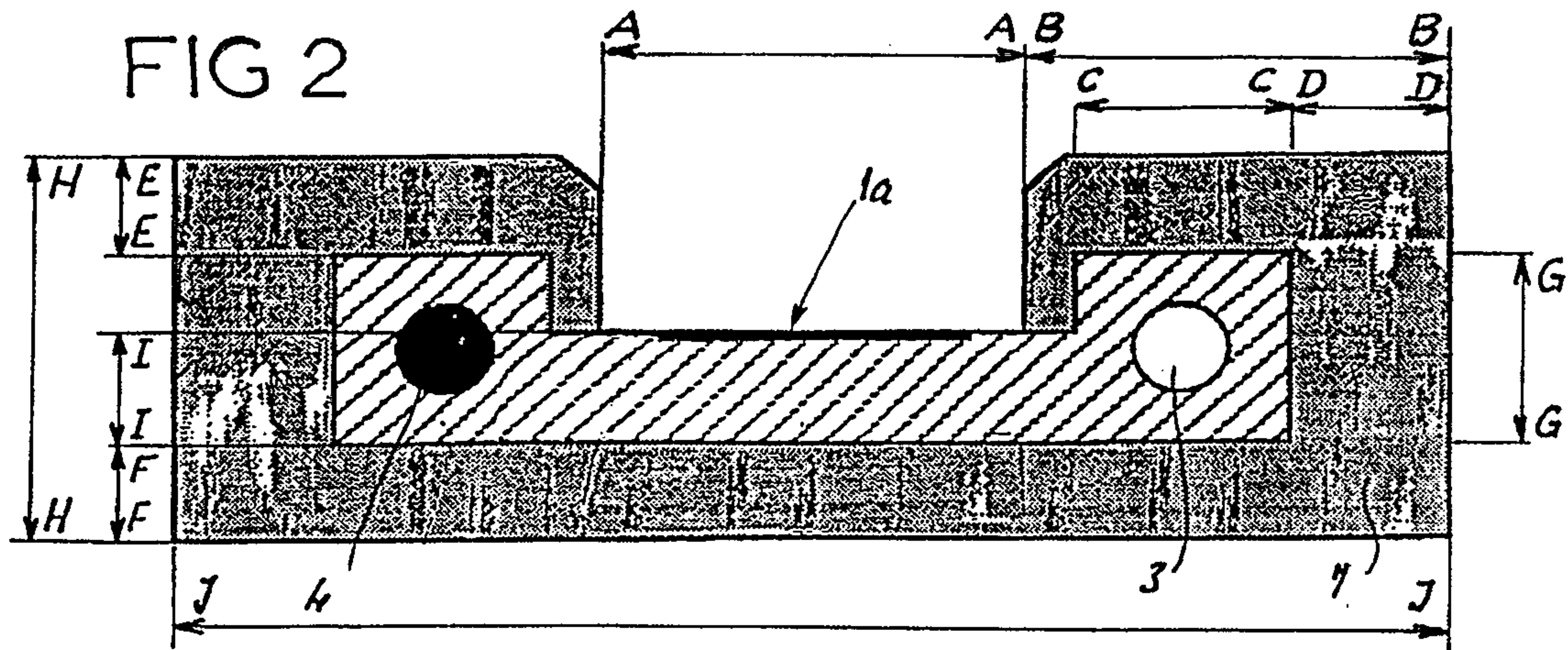


FIG 3

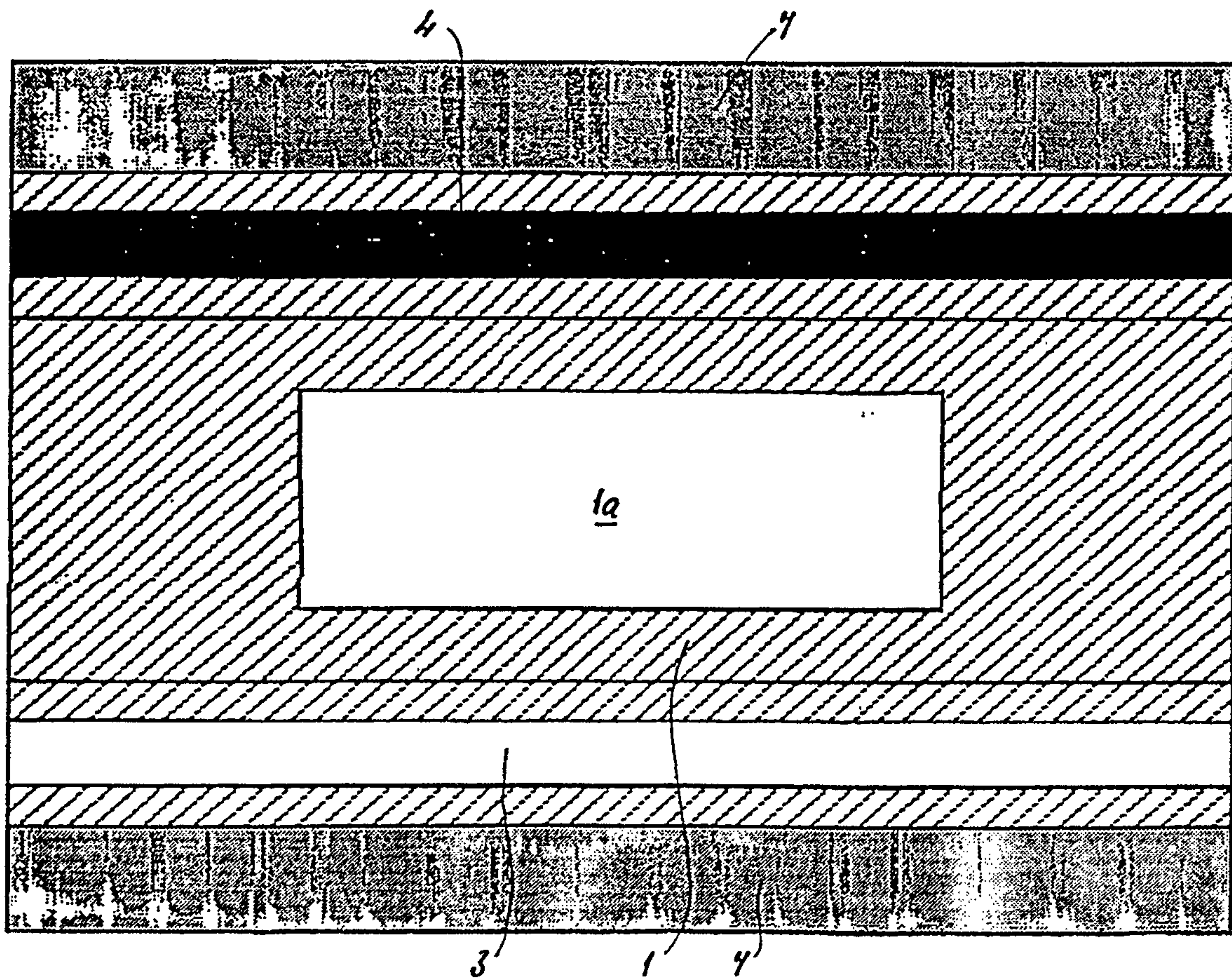


FIG 4

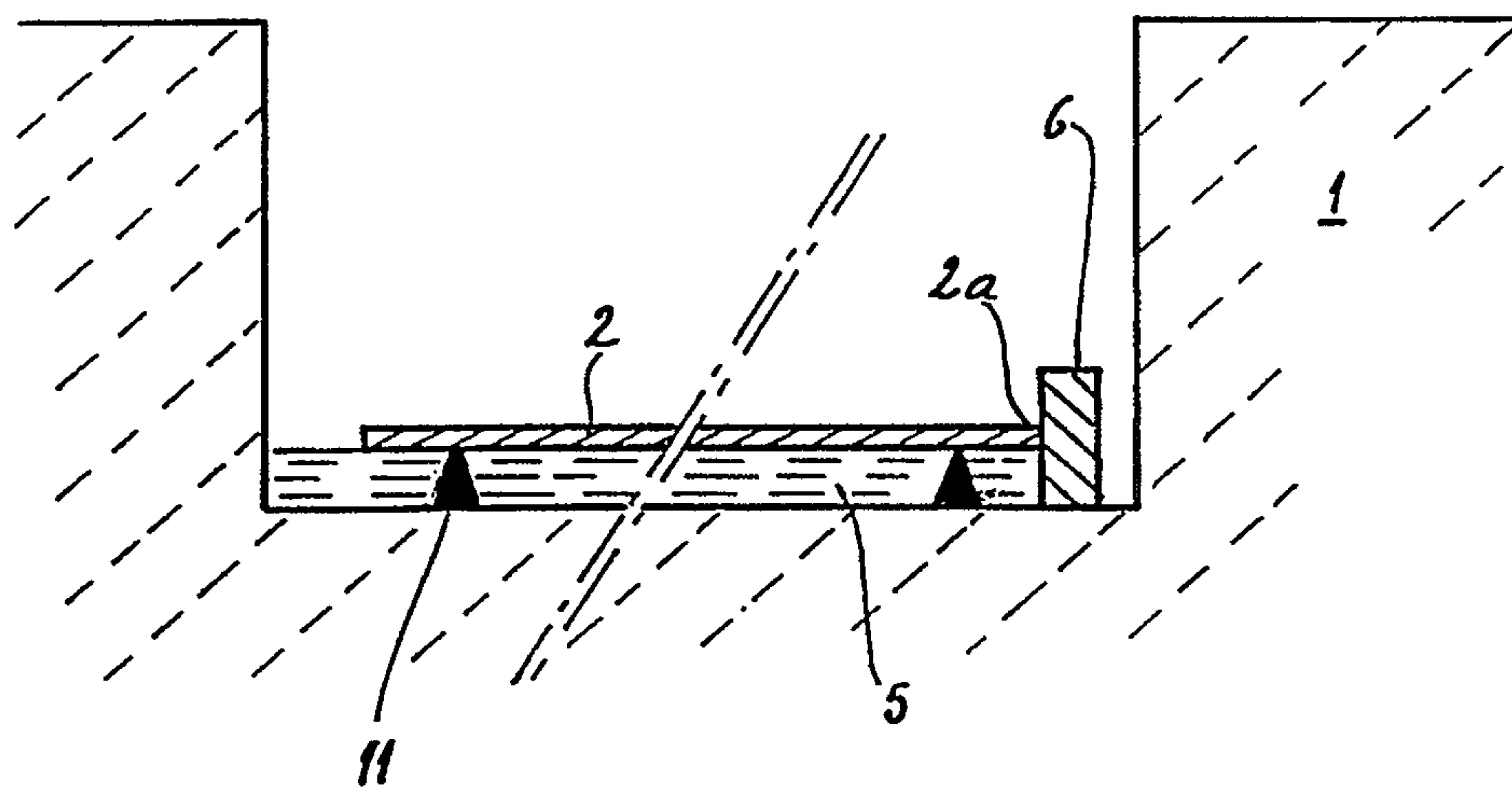


FIG 5

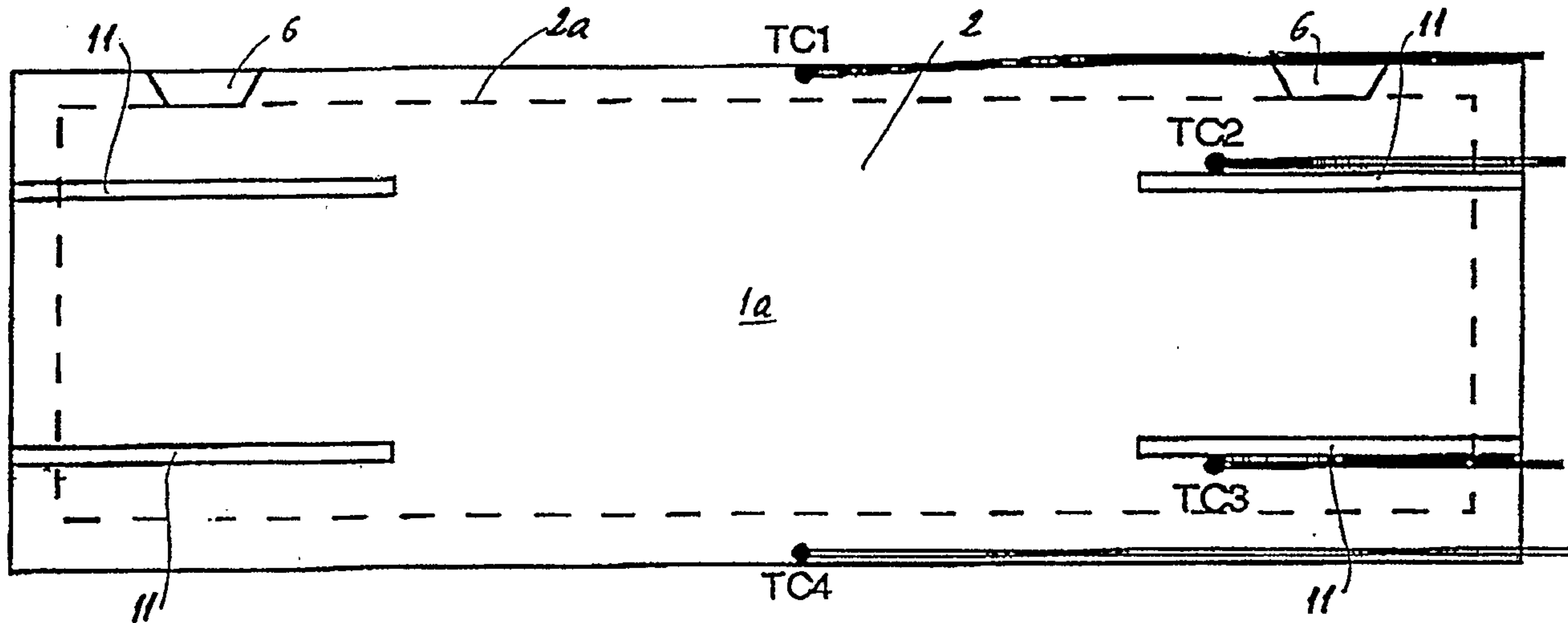


FIG 6

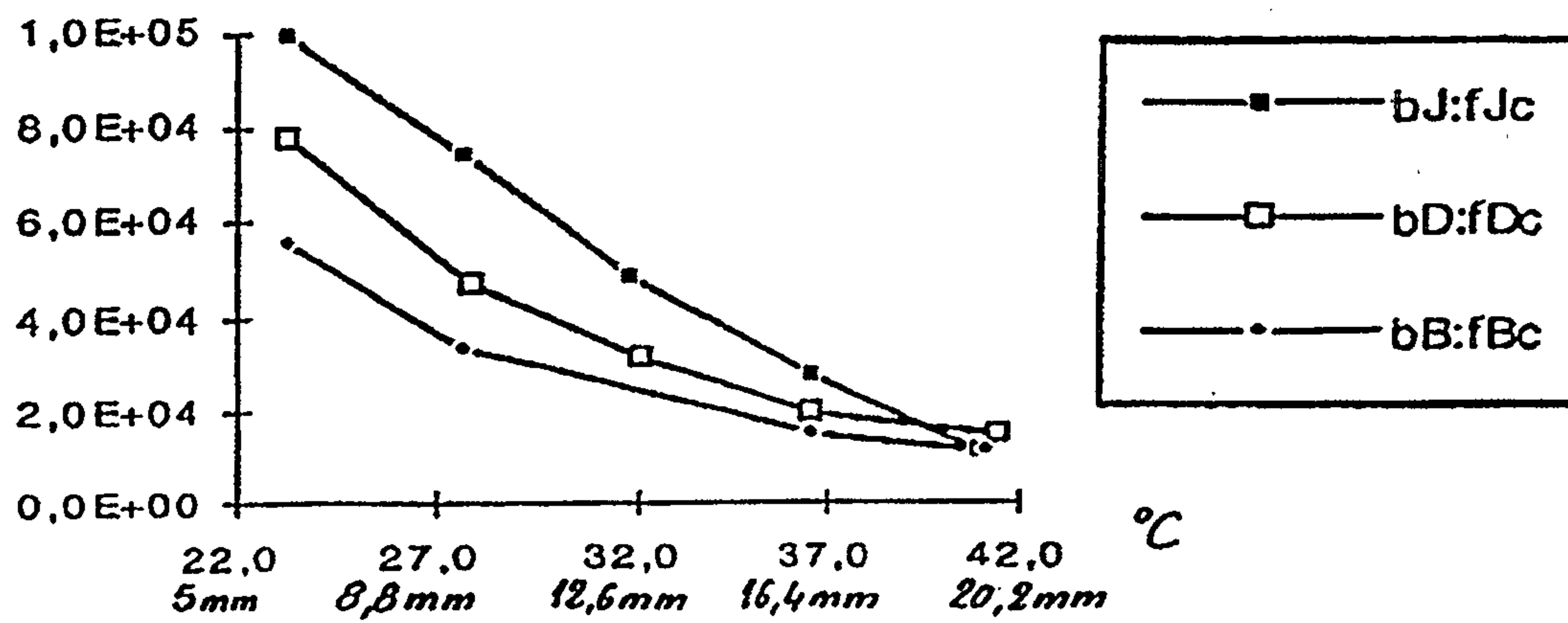


FIG 7

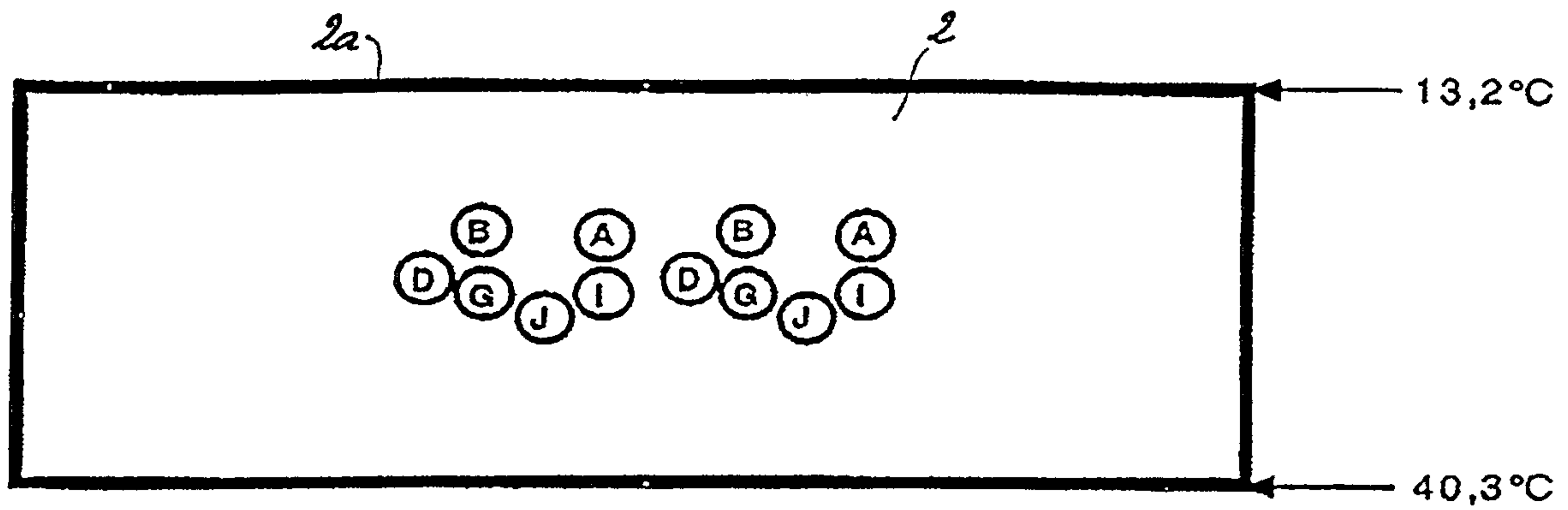


FIG 8

