



**HAL**  
open science

**Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN :  
applications à la séparation chirale en  
micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire  
(EC).**

Joséphine Ruta

► **To cite this version:**

Joséphine Ruta. Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire (EC).. Médicaments. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT : . tel-00333622

**HAL Id: tel-00333622**

**<https://theses.hal.science/tel-00333622>**

Submitted on 23 Oct 2008

**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.

**Université Joseph Fourier - GRENOBLE 1**  
**Faculté de Pharmacie**

## **THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**en Sciences du Médicament**

Présentée et soutenue publiquement par

**Joséphine RUTA**

Le 13 octobre 2008

**Aptamères énanti sélectifs en série ADN et ARN :  
applications à la séparation chirale en micro-  
chromatographie et en électrophorèse capillaire**

### **Membres du Jury**

<b>Mme M.- C. HENNION</b>	Rapporteur
<b>Mr J.-P. DUBOST</b>	Rapporteur
<b>Mr P. BROSSIER</b>	Examineur
<b>Mr E. DEFRANCQ</b>	Examineur
<b>Mr J.-L. DECOU</b>	Invité
<b>Melle C. RAVELET</b>	Co-Directrice de thèse
<b>Mr E. PEYRIN</b>	Directeur de thèse

Thèse préparée au sein du  
Laboratoire de chimie analytique – Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM)  
UMR 5063 CNRS

Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant



**Université Joseph Fourier - GRENOBLE 1**  
**Faculté de Pharmacie**

## **THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER**  
**en Sciences du Médicament**

Présentée et soutenue publiquement par

**Joséphine RUTA**

Le 13 octobre 2008

**Aptamères énantiométriques en série ADN et ARN :  
applications à la séparation chirale en micro-  
chromatographie et en électrophorèse capillaire**

### **Membres du Jury**

<b>Mme M.- C. HENNION</b>	Rapporteur
<b>Mr J.-P. DUBOST</b>	Rapporteur
<b>Mr P. BROSSIER</b>	Examineur
<b>Mr E. DEFRANCQ</b>	Examineur
<b>Mr J.-L. DECOUT</b>	Invité
<b>Melle C. RAVELET</b>	Co-Directrice de thèse
<b>Mr E. PEYRIN</b>	Directeur de thèse

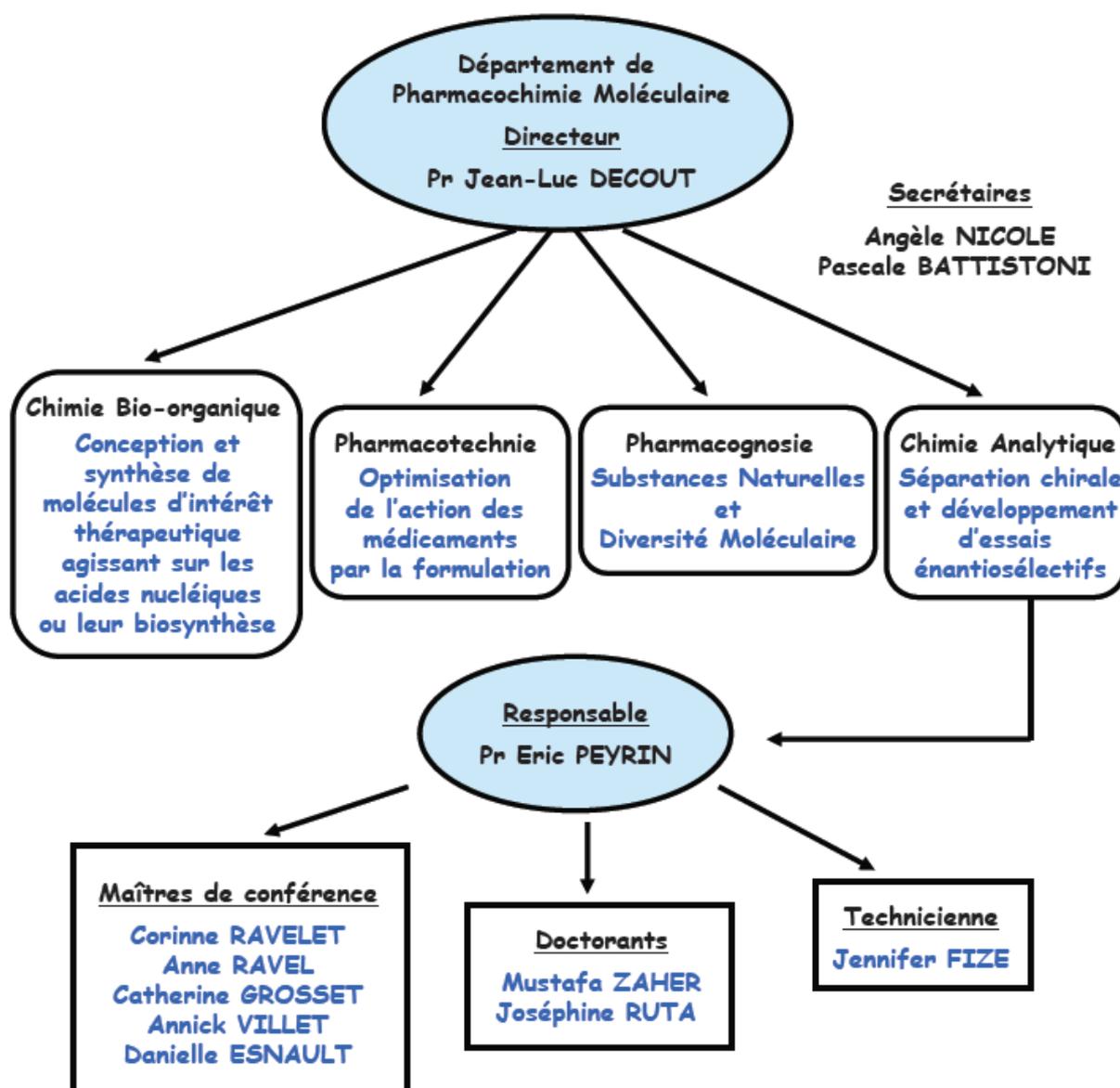
Thèse préparée au sein du  
Laboratoire de chimie analytique – Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM)  
UMR 5063 CNRS

Ecole doctorale Chimie et Sciences du Vivant



# AVANT PROPOS

Cette thèse est effectuée au sein du laboratoire de chimie analytique du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble (ICMG) FR 2607, UFR de Pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier (UJF) de Grenoble. L'organisation des équipes au sein du DPM et la composition de l'équipe de chimie analytique sont présentées dans l'organigramme suivant :



Le laboratoire se trouve depuis mars 2007 sur le campus à Saint Martin d'Hères dans le but de favoriser le rapprochement entre les équipes de recherche composant l'ICMG (Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble).

L'équipe de chimie analytique travaille sur le développement de nouveaux sélecteurs chiraux (aptamères en série ADN et ARN, dérivés de la néamine) permettant la séparation des énantiomères de molécules bioactives (acides aminés, médicaments...) par des méthodes chromatographiques et électrophorétiques et le développement d'essais énantiosélectifs.

Mes travaux de thèse ont commencé en octobre 2005 sous la direction du Pr Eric Peyrin et la co-direction du Dr Corinne Ravelet. Ces travaux ont donné lieu à 5 publications internationales (cf partie Résultats et Discussion). Ma thèse a été financée par une bourse ministérielle.

## REMERCIEMENTS

Je souhaiterais, tout d'abord, exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury de cette thèse et notamment envers les professeurs **Marie-Claire Hennion** et **Jean-Pierre Dubost** qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à la lecture de ce travail et qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également les professeurs **Pierre Brossier** et **Eric Defrancq** pour avoir accepté d'examiner mon rapport.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à **Mr le PROFESSEUR Eric Peyrin**, mon directeur de thèse, pour m'avoir encadrée brillamment pendant ces trois années de thèse. Je tiens à lui faire part de toute mon admiration face à son énorme talent de chercheur. Ces connaissances multiples et diverses, ses idées ingénieuses, ses solutions apportées face à tous types de problèmes et sa rapidité dans la rédaction des publications m'ont beaucoup impressionnée durant ma thèse. Enfin, je terminerai en le remerciant pour sa gentillesse, sa simplicité, sa bonne humeur quotidienne et son humour (« *Forza Italia* »).

Je tiens également à remercier chaleureusement ma « co-directrice » de thèse : le **Dr Corinne Ravelet** qui fut durant ces trois années de thèse bien plus qu'une « co-directrice ». Je tiens à souligner ses qualités tant sur le plan professionnel qu'humain. Je voudrais également la remercier pour sa gentillesse, sa simplicité et son soutien face aux périodes de « chat noir » que j'ai pu rencontrer. J'ai également beaucoup apprécié les moments de complicité rencontrés durant les expériences que l'on a pu réaliser ensemble.

Je souhaite, ensuite, remercier notre technicienne **Jennifer Fize** pour son implication dans mon sujet de thèse et pour son amitié. Je voudrais ensuite la remercier pour son soutien et pour toutes ses petites anecdotes qui m'ont souvent permis de faire une pause. Enfin, je n'oublierai pas nos vacances à Majorque et tous les bons moments passés ensemble.

Je continuerai par remercier tous les autres membres de l'équipe de chimie analytique : **Anne Ravel** (ma compagne de roller), **Annick Villet**, **Danièle Esnault**, **Catherine Grosset** et mon compagnon de bureau, **Mustafa Zaher**, notre « Musclor » du labo qui m'a souvent fait don de sa force pour dévisser les connexions des colonnes.

Je voudrais ensuite remercier toute l'équipe de Chimie Bio-organique du DPM pour m'avoir accueillie avec gentillesse au sein de leur laboratoire pendant plusieurs mois et notamment **Isabelle Baussanne** pour son encadrement en synthèse, sa disponibilité et sa

gentillesse, **Jean-Luc Décout** pour son encadrement en synthèse et sa participation dans le jury de cette thèse et **Jérôme Désiré** pour son implication dans une partie de mon sujet, pour son humour et sa bonne humeur (sans rancune!!!)

J'aimerais également remercier les anciennes thésardes du laboratoire (**Marine, Béa**), avec qui nous avons formé le groupe des « VAMPS » (bien sûr avec Jenny), pour tous les bons moments passés ensemble et pour leur aide lors de mon séjour en synthèse et notre retraité **François Thomasson** pour sa formation et son aide en RMN.

Je n'oublierai pas de remercier nos superbes secrétaires : **Angèle Nicole**, mon soutien italien et ma compagne de roller et **Pascale Battistoni**, notre grande gourmande du laboratoire qui nous apporte très souvent de la bonne humeur au coin café par ses gaffes.

Je souhaiterai également remercier les autres membres du DPM :

Toute l'équipe de Pharmacotechnie, **Christine, Delphine** (notre maman poule), **Annabelle** (notre fashion victim), **Luc** (p'tit Bob), et **Denis** (et son rire communicatif), que j'ai appris à connaître, depuis le déménagement, au coin café et que j'apprécie énormément.

Toute l'équipe des substances naturelles et diversité moléculaire : **Yung** (et son canapé, un grand merci pour tes nems exceptionnels), **Estelle** (notre nouvelle compagne du bureau étudiant que j'aurais aimé connaître davantage), **Chantal, Ahcène, Florence, Madeleine, Anne-Marie Mariotte**....

Je n'oublierai pas de remercier **Antoine Fortuné**, notre « docteur » de l'informatique (même si modélisateur moléculaire avant tout), pour avoir résolu tous les problèmes informatiques du bureau étudiant avec beaucoup de patience.

Enfin, je tiens à souligner tous les moments inoubliables de ces trois années de thèse : ma première soirée du foot, une grande victoire mémorable (et je ne citerai pas de noms), la soirée karaoké où l'on s'est bien marré, n'est-ce pas Jérôme ??, bien sûr la victoire de l'Italie à la coupe du monde et contre la France à l'Euro (petit dédicace à Eric).....

Je garderai donc un bon souvenir de ces trois années de thèse passées au DPM, un laboratoire petit par sa taille mais grand en valeurs humaines.

J'adresse également mes remerciements au ministère de la recherche pour l'aide financière octroyée.

Je finirai par remercier mes proches : **mes parents** pour le soutien qu'ils m'ont apporté pendant toutes ces années d'études, je leur en serai toujours reconnaissante, **mon frère** et **ma sœur** qui m'ont souvent traité de « dingue » d'aller si loin mais qui m'ont bien soutenu, ma petite **Clara** pour m'avoir fait le bonheur de venir au monde lors de ma dernière année de thèse et pour toute la joie qu'elle m'apporte au quotidien et enfin mon deuxième filleul **Jérémy**, qui je l'espère, sera fier de sa marraine.

Enfin, merci de tout cœur à ceux qui m'ont encouragé de près comme de loin durant ces quelques années...



## ABREVIATIONS

<b>ACN:</b>	<b>Acé</b> tonitrile
<b>ACPM:</b>	Additif <b>Chiral</b> de la <b>Phase Mobile</b>
<b>ADN:</b>	Acide <b>dé</b> oxyribonucléique
<b>AGP:</b>	Alpha 1 <b>Acid Glycoprotein</b> (= Alpha 1 Glycoprotéine Acide)
<b>ALP:</b>	<b>Alkaline phosphatase</b>
<b>AMV:</b>	<b>Avian Myeloblastosis Virus</b>
<b>ARN:</b>	Acide <b>Ribonucléique</b>
<b>ARNm:</b>	Acide <b>Ribonucléique messenger</b>
<b>bFGF:</b>	<b>basic Fibroblast Growth Factor</b>
<b>BrdU:</b>	5- <b>bromo-2'</b> - <b>dé</b> oxyuridine
<b>BSA:</b>	<b>Bovine Serum Albumin</b> (=Sérum Albumine Bovine: <b>SAB</b> )
<b>CBH:</b>	<b>Cellobiohydrolase</b>
<b>CC:</b>	<b>Chromatographie Capillaire</b>
<b>CDI:</b>	<b>Carbodiimidazole</b>
<b>CL:</b>	<b>Chromatographie Liquide</b>
<b>CLHP:</b>	<b>Chromatographie Liquide Haute Performance</b>
<b>DMF:</b>	<b>Diméthylformamide</b>
<b>DMLA:</b>	<b>Dégénérescence Maculaire liée à l'âge</b>
<b>DNB:</b>	<b>Dinitrobenzoyl</b>
<b>DNP:</b>	<b>Dinitrophényl</b>
<b>dT:</b>	<b>Dé</b> oxythymidine
<b>EC:</b>	<b>Electrophorèse Capillaire</b>
<b>ECA:</b>	<b>Electrophorèse Capillaire d'Affinité</b>
<b>ECC:</b>	<b>Electrochromatographie Capillaire</b>
<b>ECEEM:</b>	<b>Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures</b>
<b>EDAC:</b>	(1- <b>Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl)</b> carbodiimide)
<b>EDTA:</b>	<b>Ethylene Diamine Tetraacetic</b>
<b>ELAA:</b>	<b>Enzyme-linked aptamer assay</b>
<b>ELISA:</b>	<b>Enzyme-linked immunosorbent assay</b>
<b>ELONA:</b>	<b>Enzyme-linked oligonucleotide assay</b>
<b>FAD:</b>	<b>Flavine Adénine Dinucléotide</b>
<b>FDA:</b>	<b>Food and Drug Administration</b>
<b>FET:</b>	<b>Field-effect transistor</b>
<b>FITC:</b>	<b>Fluoresceine Iso Thio Cyanate</b>
<b>FMN:</b>	<b>Flavine Mononucléotide</b>
<b>FRET:</b>	<b>Fluorescence Resonance Energy Transfer</b>
<b>HAP:</b>	<b>Hydrocarbures aromatiques polycycliques</b>
<b>Hb:</b>	<b>Hémoglobine</b>
<b>HCV:</b>	<b>Hepatitis C Virus</b> (=Virus de l'hépatite C : <b>HCV</b> )
<b>hKGF:</b>	<b>human Keratinocyte Growth Factor</b> (= facteur de croissance des kératinocytes humains)
<b>hNE:</b>	<b>human Neutrophil Elastase</b>
<b>HRP:</b>	<b>Horseradish peroxidase</b>
<b>hTSH:</b>	<b>human Thyroid Stimulating Hormone</b>
<b>IgE:</b>	<b>Immunoglobuline E</b>
<b>IMPDH:</b>	<b>Inosine Monophosphate déshydrogenase</b>

<b>ISFET:</b>	<b>I</b> on-selective <b>f</b> ield-effect <b>t</b> ransistor
<b>IUPAC:</b>	<b>I</b> nternational <b>U</b> nion of <b>P</b> ure and <b>A</b> ppplied <b>C</b> hemistry
<b>LIF:</b>	<b>L</b> aser- <b>I</b> nduced <b>F</b> luorescence
<b>LNA:</b>	<b>L</b> ocked <b>N</b> ucleics <b>A</b> cids
<b>LOD:</b>	<b>L</b> imit of <b>d</b> etection
<b>MALDI:</b>	<b>M</b> atrix <b>A</b> ssisted <b>L</b> aser <b>D</b> esorption <b>I</b> onisation
<b>MAP Kinases:</b>	<b>M</b> itogen- <b>A</b> ctivated <b>P</b> rotein <b>K</b> inases
<b>MCP-1:</b>	<b>M</b> onocyte <b>C</b> hemoattractant <b>P</b> rotein- <b>1</b>
<b>MIP:</b>	<b>M</b> olecularly <b>I</b> mprinted <b>P</b> olymers
<b>MMLV:</b>	<b>M</b> oloney <b>M</b> urine <b>L</b> eukemia <b>V</b> irus
<b>mPMS:</b>	<b>1</b> - <b>M</b> ethoxy- <b>5</b> - <b>M</b> ethylphenazinium <b>M</b> ethylsulfate
<b>NECEEM:</b>	<b>N</b> on- <b>E</b> quilibrium <b>C</b> apillary <b>E</b> lectrophoresis of <b>E</b> quilibrium <b>M</b> ixtures
<b>NHS:</b>	<b>N</b> -hydroxysuccinimide
<b>NOESY:</b>	<b>N</b> uclear <b>O</b> verhauser <b>E</b> nhancement <b>S</b> pectroscopy
<b>OVN:</b>	<b>O</b> vomucoïde
<b>Pbf:</b>	<b>2,2,4,6,7</b> - <b>P</b> entamethyl-dihydrobenzofuran- <b>5</b> -sulfonyl
<b>PCR:</b>	<b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction
<b>PDGF:</b>	<b>P</b> latelet- <b>d</b> erived <b>g</b> rowth <b>f</b> actor
<b>PEG:</b>	<b>P</b> olyéthylène <b>G</b> lycol
<b>PFTase:</b>	<b>P</b> rotein <b>F</b> arnesyl <b>T</b> ransferase
<b>Ppm:</b>	<b>P</b> artie <b>p</b> ar <b>m</b> illion
<b>PhotoSELEX:</b>	<b>P</b> hotochemical <b>S</b> ystematic <b>E</b> volution of <b>L</b> igands by <b>E</b> xponential <b>E</b> nrichment
<b>PNA:</b>	<b>P</b> eptide <b>N</b> ucleic <b>A</b> cid
<b>PSC:</b>	<b>P</b> hase <b>S</b> tationnaire <b>C</b> hirale (=Chiral <b>S</b> tationary <b>P</b> hase:CSP)
<b>Psi:</b>	<b>P</b> ound per <b>S</b> quare <b>I</b> nch
<b>QCM:</b>	<b>Q</b> uartz <b>C</b> rystal <b>M</b> icrobalance
<b>RBP:</b>	<b>R</b> etinol <b>b</b> inding <b>p</b> rotein
<b>RCA:</b>	<b>R</b> olling <b>C</b> ircle <b>A</b> mplification
<b>RG:</b>	<b>R</b> eactive <b>G</b> reen
<b>RMN:</b>	<b>R</b> ésonance <b>M</b> agnétique <b>N</b> ucléaire
<b>RPS:</b>	<b>R</b> ésonance <b>P</b> lasmonique de <b>S</b> urface (=Surface <b>P</b> lasmon <b>R</b> esonance : SPR)
<b>RPSi:</b>	<b>R</b> ésonance <b>P</b> lasmonique de <b>S</b> urface par <b>i</b> magerie
<b>RT-HIV:</b>	<b>R</b> everse <b>T</b> ranscriptase- <b>H</b> uman <b>I</b> mmunodeficiency <b>V</b> irus
<b>SAH:</b>	<b>S</b> érum <b>A</b> lbumine <b>H</b> umaine
<b>SELEX:</b>	<b>S</b> ystematic <b>E</b> volution of <b>L</b> igands by <b>E</b> xponential <b>E</b> nrichment
<b>SWCNT-FET:</b>	<b>S</b> ingle-walled <b>c</b> arbon <b>n</b> anotube <b>f</b> ield-effect <b>t</b> ransistor
<b>Taq:</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TAR:</b>	<i>Trans</i> - <b>A</b> ctivation <b>R</b> esponse
<b>TBAI:</b>	<b>T</b> etra-butyl- <b>a</b> mmonium- <b>i</b> odide
<b>TFA:</b>	<b>T</b> rifluoroacetic acid
<b>THF:</b>	<b>T</b> étrahydrofurane
<b>Tm:</b>	<b>M</b> elting <b>t</b> emperature
<b>TMB:</b>	<b>T</b> étraméthyl- <b>b</b> enzidine
<b>TOF:</b>	<b>T</b> ime <b>O</b> f <b>F</b> light
<b>TTF1</b>	<b>T</b> hyroid <b>t</b> ranscription <b>f</b> actor <b>1</b>
<b>UV:</b>	<b>U</b> ltra- <b>V</b> iolet
<b>ValP:</b>	<b>V</b> alyl <b>p</b> hosphonate
<b>VEGF:</b>	<b>V</b> ascular <b>E</b> ndothelial <b>G</b> rowth <b>F</b> actor (= facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)
<b>VIH:</b>	<b>V</b> irus de l' <b>I</b> mmunodéficience <b>H</b> umaine

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I - LES SELECTEURS CHIRAUX.....</b>	<b>20</b>
<b>I LES SELECTEURS CONVENTIONNELS ET LEURS LIMITATIONS .....</b>	<b>21</b>
<b>II LES SELECTEURS CHIRAUX SPECIFIQUES D'UNE CIBLE PREDETERMINEE ..</b>	<b>24</b>
<b>II.1 LES SELECTEURS CHIRAUX A EMPREINTE MOLECULAIRE .....</b>	<b>25</b>
<b>II.2 LES ANTICORPS ENANTIOSELECTIFS .....</b>	<b>26</b>
<b>II.3 L'APPROCHE COMBINATOIRE .....</b>	<b>28</b>
II.3.1 LES SELECTEURS A FAIBLE MASSE MOLECULAIRE.....	28
II.3.2 LES APTAMERES, UNE NOUVELLE CLASSE DE SELECTEURS CHIRAUX AUX PROPRIETES PROMETTEUSES .....	33
<b>CHAPITRE II : LES APTAMERES, DES MOLECULES AUX PROPRIETES PROMETTEUSES.....</b>	<b>40</b>
<b>I LA SELECTION D'APTAMERES : LA METHODE SELEX .....</b>	<b>41</b>
<b>I.1 PRINCIPE GENERAL DE LA SELECTION CONVENTIONNELLE .....</b>	<b>42</b>
<b>I.2 LES TECHNIQUES DE SEPARATION UTILISEES POUR LA SELEX .....</b>	<b>44</b>
<b>I.3 LES INCONVENIENTS DE LA METHODE .....</b>	<b>45</b>
<b>I.4 LES AMELIORATIONS DE LA TECHNIQUE SELEX CONVENTIONNELLE.....</b>	<b>46</b>
I.4.1 LES AMELIORATIONS DE L'AFFINITE.....	46
I.4.2 LES AMELIORATIONS DE LA STABILITE.....	47
I.4.2.1 Les modifications chimiques des oligonucléotides .....	48
I.4.2.2 La stratégie image-miroir .....	51
I.4.3 LES AMELIORATIONS DU TEMPS NECESSAIRE A LA SELECTION .....	53
I.4.3.1 L'automatisation de la sélection .....	53
I.4.3.2 La CE-SELEX .....	55
I.4.3.3 Electrophorèse capillaire en équilibre de mélanges en équilibre (ECEEM) et Electrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM).....	58
<b>I.5 COMPARAISON DES DIFFERENTES PROCEDURES DE SELEX .....</b>	<b>62</b>



<b>II</b>	<b>LES DIFFERENTES CLASSES D'ESPECES CHIMIQUES CIBLEES</b>	<b>64</b>
<b>II.1</b>	<b>LES APTAMERES SELECTIONNES CONTRE DE PETITES ESPECES</b>	<b>64</b>
II.1.1	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'ESPECES INORGANIQUES	67
II.1.2	LES APTAMERES SPECIFIQUES DE COLORANTS ORGANIQUES	67
II.1.3	LES APTAMERES SPECIFIQUES DES NUCLEOTIDES ET DERIVES	67
II.1.4	LES APTAMERES SPECIFIQUES DES COFACTEURS	68
II.1.5	LES APTAMERES SPECIFIQUES DES ACIDES AMINES	69
II.1.6	LES APTAMERES SPECIFIQUES DES CARBOHYDRATES	72
II.1.7	LES APTAMERES SPECIFIQUES DE BASES XANTHIQUES	73
II.1.8	LES APTAMERES SPECIFIQUES DE PEPTIDES	74
II.1.9	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'ANTIBIOTIQUES	74
<b>II.2</b>	<b>LES APTAMERES SELECTIONNES CONTRE DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	<b>75</b>
<b>II.3</b>	<b>LES APTAMERES SELECTIONNES CONTRE DES PROTEINES</b>	<b>76</b>
II.3.1	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'ENZYMES	76
II.3.2	LES APTAMERES SPECIFIQUES DE PROTEASES A SERINE	77
II.3.3	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'ANTICORPS	79
II.3.4	LES APTAMERES SPECIFIQUES DE FACTEURS DE CROISSANCE	79
<b>II.4</b>	<b>LES APTAMERES SELECTIONNES CONTRE DES STRUCTURES COMPLEXES</b>	<b>81</b>
II.4.1	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'UNE ORGANELLE	81
II.4.2	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'UN VIRUS	81
II.4.3	LES APTAMERES SPECIFIQUES D'UNE CELLULE	82
<b>III</b>	<b>LES CARACTERISTIQUES DES APTAMERES</b>	<b>84</b>
<b>III.1</b>	<b>LA TAILLE</b>	<b>84</b>
<b>III.2</b>	<b>L'AFFINITE</b>	<b>85</b>
<b>III.3</b>	<b>LA SPECIFICITE</b>	<b>86</b>
<b>III.4</b>	<b>CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES APTAMERES</b>	<b>87</b>
III.4.1	LA STRUCTURE SECONDAIRE : LA DOUBLE HELICE	88
III.4.2	DE LA STRUCTURE SECONDAIRE A LA STRUCTURE TERTIAIRE : L'ARRANGEMENT SUPRAHELICOÏDAL	89
<b>III.5</b>	<b>LIAISON D'UN APTAMERE A SA CIBLE : QUELQUES EXEMPLES DE STRUCTURES RESOLUES</b>	<b>92</b>
III.5.1	EXEMPLE D'UN COMPLEXE APTAMERE-NUCLEOTIDE	93
III.5.2	EXEMPLE D'UN COMPLEXE APTAMERE-PROTEINE FORMANT UNE STRUCTURE PARTICULIERE	98

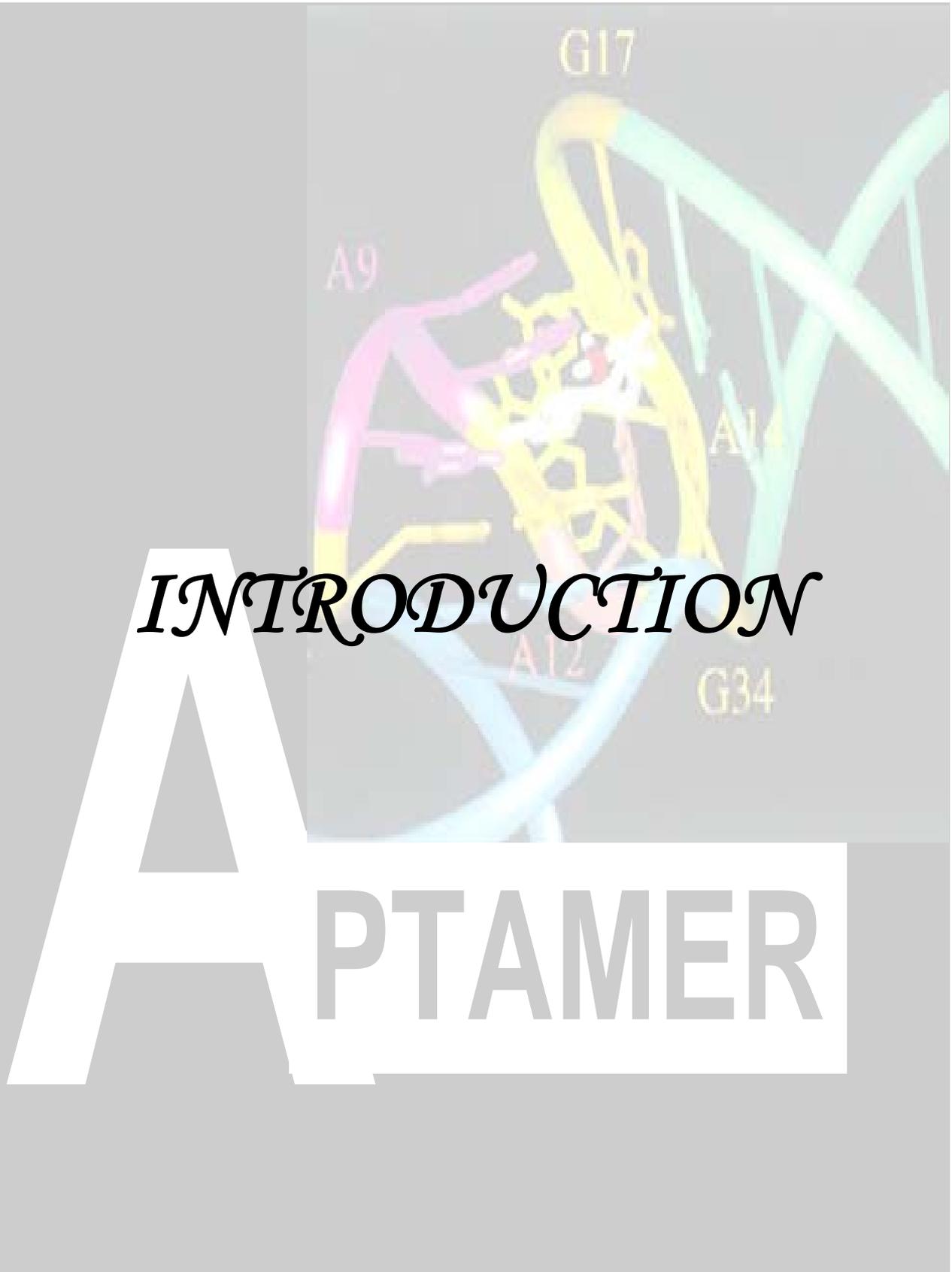


III.5.3	STRUCTURE DE COMPLEXES IMPLIQUANT UN APTAMERE HAUTEMENT SELECTIF .....	100
III.5.3.1	Exemple du complexe aptamère-arginine/citrulline .....	100
III.5.3.2	Exemple du complexe aptamère-théophylline .....	103
<b>IV</b>	<b>LES APPLICATIONS ANALYTIQUES DES APTAMERES .....</b>	<b>106</b>
<b>IV.1</b>	<b>LES BIOCAPTEURS A BASE D'APTAMERES : « APTASENSORS ».....</b>	<b>107</b>
IV.1.1	QUELQUES GENERALITES SUR LES BIOCAPTEURS.....	107
IV.1.2	LES « APTASENSORS » ELECTRONIQUES .....	109
IV.1.2.1	Les « aptasensors » électrochimiques.....	109
IV.1.2.2	Des transistors à effet de champs utilisés comme « aptasensors » .....	117
IV.1.2.3	Des « aptasensors » acoustiques.....	119
IV.1.3	LES « APTASENSORS » OPTIQUES.....	121
IV.1.3.1	Les biocapteurs fluorescents.....	121
IV.1.3.2	Les biocapteurs colorimétriques.....	127
IV.1.3.3	Les biocapteurs à résonance plasmonique de surface (RPS).....	132
IV.1.4	LES « APTASENSORS » DE TYPE « CANTILEVERS » .....	134
<b>IV.2</b>	<b>L'UTILISATION DES APTAMERES DANS DES TECHNIQUES BIOANALYTIQUES.....</b>	<b>136</b>
IV.2.1	LES APPLICATIONS DES APTAMERES EN CYTOMETRIE DE FLUX .....	136
IV.2.2	LES APPLICATIONS DES APTAMERES EN TECHNOLOGIE DE TYPE ELISA : LA TECHNIQUE ELONA OU ELAA .....	137
<b>IV.3</b>	<b>L'UTILISATION DES APTAMERES COMME LIGANDS D'AFFINITE EN CHROMATOGRAPHIE, EN ELECTROCHROMATOGRAPHIE ET EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE.....</b>	<b>140</b>
IV.3.1	LES APPLICATIONS DES APTAMERES EN CHROMATOGRAPHIE ET EN ELECTROCHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE .....	140
IV.3.1.1	Principe général de la chromatographie d'affinité.....	140
IV.3.1.2	Utilisation d'aptamères pour la séparation de petites molécules.....	143
IV.3.1.3	Utilisation d'aptamères comme agents de capture, de purification ou de séparation de protéines.....	147
IV.3.2	LES APPLICATIONS DES APTAMERES EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE D'AFFINITE .....	151
IV.3.2.1	Principe général de l'électrophorèse capillaire d'affinité.....	151
IV.3.2.2	Utilisation d'aptamères pour la séparation de protéines.....	152
IV.3.3	LES APPLICATIONS DES APTAMERES COMME SELECTEURS CHIRAUX EN MICRO- CLHP .....	157



IV.3.3.1	Méthode générale de fabrication des colonnes aptamères.....	158
IV.3.3.2	Les PSCs à base d'aptamères en série ADN .....	159
IV.3.3.3	Les PSCs à base d'aptamères en série ARN.....	161
<b>V</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>164</b>
<b><u>RESULTATS ET DISCUSSION .....</u></b>		<b><u>190</u></b>
<b><i>CHAPITRE I- ETUDES DES APTAMERES PAR MICRO-CLHP .....</i></b>		<b><i>192</i></b>
<b>PUBLICATION N°1 .....</b>		<b>193</b>
	ETUDE DES PROPRIETES ENANTIOSELECTIVES D'UN NOUVEL APTAMERE, EN SERIE ARN, RECEMMENT SELECTIONNE POUR SON AFFINITE POUR L'HISTIDINE	
<b>PUBLICATION N°2 .....</b>		<b>201</b>
	DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE D'IMMOBILISATION COVALENTE POUR CREER DES PSCS APTAMERES PLUS ROBUSTES	
<b>COMPARAISON DES DEUX MODES D'IMMOBILISATION .....</b>		<b>211</b>
<b><i>CHAPITRE II- ETUDES DES APTAMERES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE .....</i></b>		<b><i>215</i></b>
<b>PUBLICATION N°3 .....</b>		<b>216</b>
	UTILISATION D'UN APTAMERE COMME ADDITIF CHIRAL POUR LA SEPARATION D'ENANTIOMERES PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE	
<b>PUBLICATIONS N°4 ET 5 .....</b>		<b>234</b>
	UTILISATION D'UN APTAMERE POUR LE DEVELOPPEMENT D'UN ESSAI ENANTIOSELECTIF PAR COMPETITION PERMETTANT LA DETECTION RAPIDE D'UNE IMPURETE ENANTIOMERIQUE	
<b>PARTIE EXPERIMENTALE ADDITIVE .....</b>		<b>247</b>
	SYNTHESE DU DERIVE D-ARGININE DANSYLE	
<b><u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</u></b>		<b><u>258</u></b>





# *INTRODUCTION*

# A PTAMER



La chiralité est une propriété inhérente de tous systèmes biologiques qui est évidente dans la nature car de nombreuses formes asymétriques dites « chirales » y sont présentes (coquilles d'escargots, mains, pieds d'un être humain...) et les molécules indispensables à la vie (acides aminés, glucides, lipides, protéines...) sont généralement également chirales. Cependant, il faudra attendre 1848 et les travaux de Pasteur démontrant pour la première fois que deux molécules peuvent être l'image l'une de l'autre dans un miroir et posséder des propriétés différentes pour voir se développer une forte activité de recherche dans ce domaine.

Plus tard, la tragédie du thalidomide, un médicament commercialisé sous forme de mélange racémique dans les années 50-60 comme hypnotique et chez les femmes enceintes pour combattre les nausées matinales, a soulevé le problème de la chiralité. En effet, les épidémiologistes ont noté un effet tératogène comme cause d'amélie ou de phocomélie induite par la capacité de la forme S du thalidomide à interférer avec le développement des vaisseaux sanguins du fœtus alors que l'énantiomère R possède l'effet thérapeutique. L'observation que deux énantiomères peuvent posséder des comportements différents a conduit le monde pharmaceutique à distinguer très clairement un énantiomère de son mélange racémique et à réglementer la commercialisation des molécules chirales. La FDA (Food and Drug Administration) n'impose pas l'usage systématique d'un énantiomère pur, mais exige des études biologiques, pharmacologiques et toxicologiques très poussées pour les deux énantiomères avant la commercialisation d'un médicament sous la forme d'un mélange racémique. Ainsi, des méthodes très performantes ont été développées pour résoudre un des problèmes les plus ardues d'un analyste, à savoir la résolution de molécules chirales.

Parmi les substances chirales présentes chez les organismes vivants, les acides aminés sont d'un grand intérêt. Bien que l'on ait cru pendant longtemps que le monde vivant était homochiral, c'est-à-dire que seuls les acides aminés en série L étaient présents chez l'homme, il est à l'heure actuelle bien établi que les acides aminés en série D sont présents, à faibles concentrations, dans l'organisme et jouent un rôle prépondérant en biochimie et en physiopathologie humaine [1]. Parmi ces molécules nous pouvons citer l'exemple de la D-sérine, un acide aminé synthétisé et libéré par les cellules gliales, fonctionnant comme un puissant neuromodulateur [2] et impliqué dans l'évolution de maladies telles que la schizophrénie et l'épilepsie. L'aspartate en série D est impliqué dans le développement et dans les fonctions endocriniennes [3] et sa présence a été détectée dans le cas de certaines maladies (Alzheimer, cataracte). L'arginine en série D joue, quant à elle, un rôle dans le cycle de l'urée [4]. Plus récemment, l'alanine en série D a été détectée dans le pancréas au niveau des îlots de Langerhans et plus particulièrement au niveau des cellules  $\beta$  produisant l'insuline.

Cette observation suggère que la L-alanine est impliquée dans la régulation du taux de glucose dans le sang [5].

De plus, en sciences médico-légales, le taux de racémisation des acides aminés (en particulier l'acide aspartique) est utilisé pour estimer l'âge des individus au moment du décès puisqu'à la mort d'un individu, les acides aminés en série L ont tendance à être transformés en acides aminés en série D par une transformation non enzymatique [6,7]. Il en est de même en archéologie où la mesure de la racémisation des acides aminés est utilisée pour la datation des fossiles et pour l'analyse de météorites [8,9]. Enfin, dans le domaine de l'agroalimentaire, le rapport énantiomérique des acides aminés est un paramètre fiable pour tester la qualité des produits alimentaires et pour vérifier leur conformité [10].

Actuellement, parmi les nombreuses méthodes de discrimination chirale, les techniques chromatographiques et électrophorétiques constituent des méthodes de choix pour la séparation et la quantification d'énantiomères. Deux approches distinctes sont utilisées pour résoudre des racémates en chromatographie liquide et en électrophorèse capillaire :

- La première approche de séparation, dite « indirecte », consiste à faire réagir la molécule à analyser, présente sous la forme d'un mélange racémique, avec un réactif énantiomériquement pur (agent de dérivation) de façon à former deux diastéréoisomères, possédant des propriétés physico-chimiques différentes, qui sont donc séparables dans un environnement achiral « classique ». Cette méthode est cependant limitée aux molécules possédant des groupements permettant la dérivation (amines, alcools, acides, etc), elle nécessite des agents chiraux de bonne pureté énantiomérique et, pour une application préparative, une étape de synthèse additionnelle est nécessaire pour éliminer l'agent de dérivation chirale.

- La deuxième approche de séparation dite « directe » implique l'utilisation de sélecteurs chiraux soit dans la phase mobile (en chromatographie, additif chirale de la phase mobile : ACPM) ou dans le tampon de migration (méthode électrophorétique), soit immobilisés à la surface de la phase stationnaire (phases stationnaires chirales : PSCs).

Aujourd'hui, l'utilisation des approches analytiques « indirectes » est en déclin face au développement de nombreux sélecteurs chiraux capable de séparer « directement » différents énantiomères sans la nécessité d'un agent de dérivation. Ces sélecteurs peuvent être classés en deux grandes familles : les sélecteurs dits « conventionnels » pour lesquels la sélectivité n'est pas prédéterminée et les sélecteurs dits « sur mesure », comprenant les anticorps et les polymères à empreinte moléculaire, pour lesquels l'énantiosélectivité et l'ordre d'élution sont prédéterminés.

Au sein de l'équipe de chimie analytique du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM), dirigé par le professeur Eric Peyrin, un nouveau type de sélecteur chiral (aptamères en série ADN et ARN), appartenant à la famille des sélecteurs dits « sur mesure » est utilisé depuis 2002 [11], pour la séparation d'un énantiomère cible prédésigné. A mon arrivée au laboratoire, des études sur l'application d'aptamères en série ADN et ARN par micro-CLHP, avaient déjà été réalisées.

Cette thèse a eu pour objectifs d'étudier la séparation chirale de divers composés (acides aminés, nucléoside) par micro-CLHP et par électrophorèse capillaire en utilisant d'autres aptamères sélectionnés en série ADN et ARN. Un nouveau type d'immobilisation de l'aptamère a été développé et utilisé en micro-CLHP et un essai énantiosélectif permettant la détermination d'une impureté énantiomérique a été réalisé par électrophorèse capillaire.

La première partie de la thèse sera consacrée à une étude bibliographique. Nous introduirons tout d'abord, l'intérêt de l'utilisation de sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible prédéterminée. Puis, une présentation concernant les aptamères sera illustrée, mettant l'accent sur les principales méthodes de sélection développées, les différentes cibles utilisées pour la sélection et leurs caractéristiques principales. Des structures tridimensionnelles d'aptamères résolues seront également présentées afin de comprendre les propriétés de discrimination de ceux-ci. Puis, leurs applications analytiques seront décrites. Enfin, les travaux concernant l'utilisation des aptamères pour la discrimination chirale seront exposés à la fin de cette partie bibliographique.

La deuxième partie de la thèse sera consacrée aux résultats du travail expérimental, présentés sous la forme d'articles parus dans des revues scientifiques et sera articulée autour de deux chapitres :

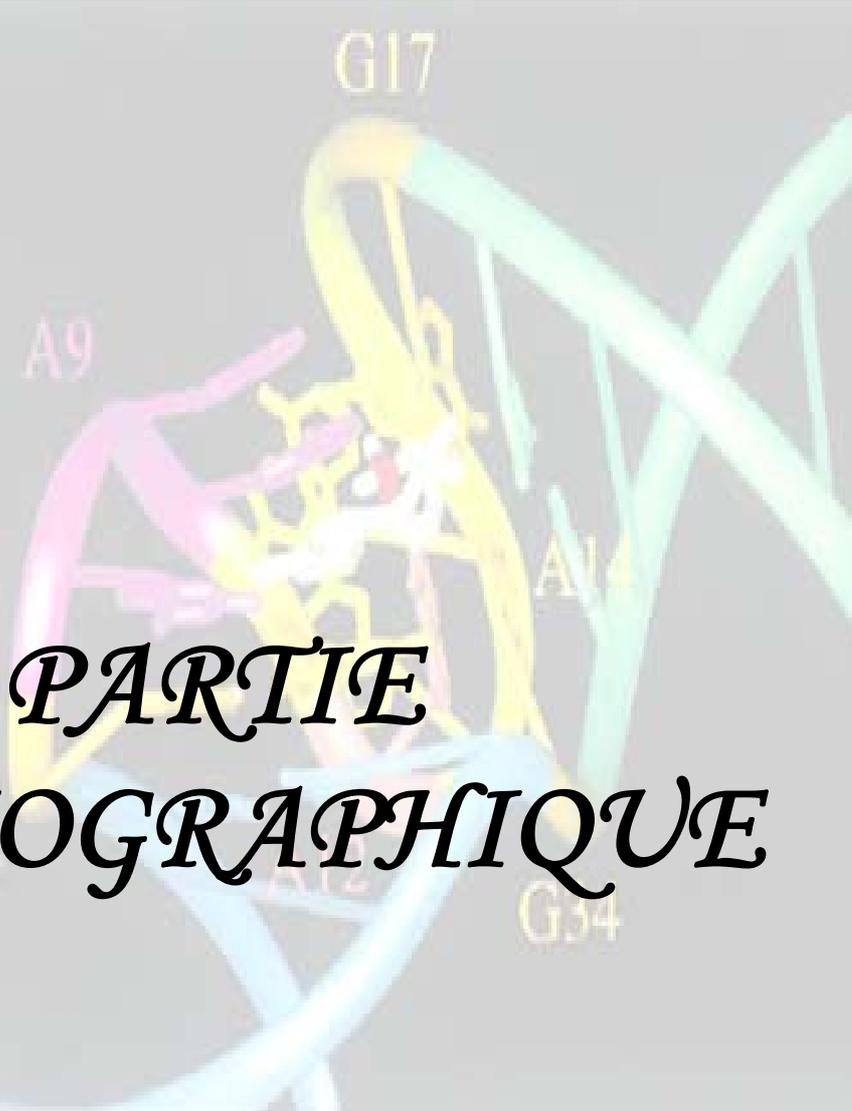
- Le premier chapitre présentera une comparaison des modes d'immobilisation des aptamères sur des supports chromatographiques.
- Dans le deuxième chapitre, seront illustrés les études menées par électrophorèse capillaire sur les aptamères en tant que sélecteurs chiraux.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Fuchs S. A., Berger R., Klomp L. W. J. and De Koning T. J., "*D-Amino acids in the central nervous system in health and disease*", Molecular Genetics and Metabolism, **2005**, 85, (3), 168-180.
2. Schell M. J., Molliver M. E. and Snyder S. H., "*D-Serine, an Endogenous Synaptic Modulator: Localization to Astrocytes and Glutamate-Stimulated Release*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1995**, 92, (9), 3948-3952.
3. Hashimoto A. and Oka T., "*Free -aspartate and -serine in the mammalian brain and periphery*", Progress in Neurobiology, **1997**, 52, (4), 325-353.
4. Saavedra-Molina A. and Piña E., "*Stimulation of L-ornithine uptake and L-citrulline and urea biosynthesis by D-arginine*", biochemistry international, **1991**, 24, (2), 349-357.
5. Morikawa A., Hamase K., Ohgusu T., Etoh S., Tanaka H., Koshiishi I., Shoyama Y. and Zaitzu K., "*Immunohistochemical localization of D-alanine to beta-cells in rat pancreas*", Biochemical and Biophysical Research Communications, **2007**, 355, (4), 872-876.
6. Lubec G. and Lubec B., Amino Acids, **1993**, 4, 1-3.
7. Yekkala R., Meers C., Van Schepdael A., Hoogmartens J., Lambrechts I. and Willems G., "*Racemization of aspartic acid from human dentin in the estimation of chronological age*", Forensic Science International, **2006**, 159, (Supplement 1), S89-S94.
8. Cronin J. R. and Pizzarello S., "*Enantiomeric Excesses in Meteoritic Amino Acids*", Science, **1997**, 275, (5302), 951-955.
9. Pizzarello S. and Cronin J. R., "*Non racemic amino acid in the Murchison and Murray meteorites*", Geochimica Cosmochimica Acta, **2000**, 64, 329-338.
10. Marchelli R., Dossena A. and Palla G., "*The potential of enantioselective analysis as a quality control tool*", Trends in Food Science & Technology, **1996**, 7, (4), 113-119.
11. Peyrin E., Grosset C., Ravel A., Villet A. and Jourdan E., "*Acides nucléiques en tant que nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques*", **2003**, FR 2855822, Brevet.





*PARTIE  
BIBLIOGRAPHIQUE*

**A  
PTAMER**





*Chapitre I - Les sélecteurs  
chiraux*

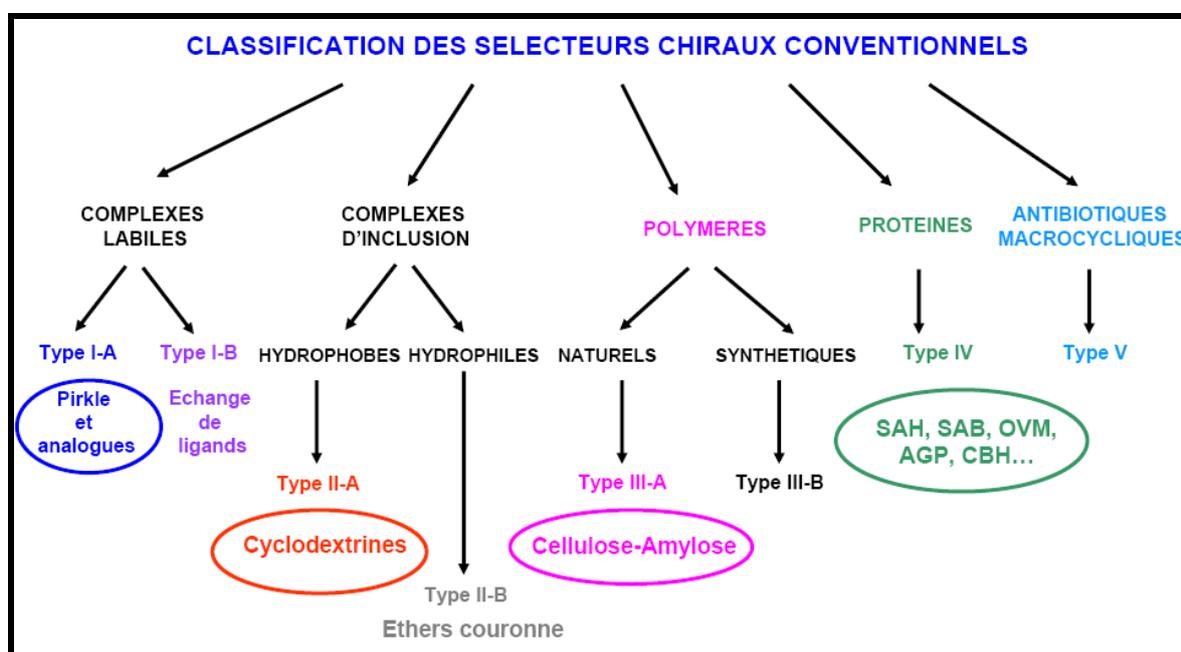
# A PTAMER



La classification des sélecteurs chiraux est basée sur leur structure et sur les interactions mises en jeu lors du processus de la reconnaissance chirale. On peut ainsi distinguer deux grandes familles de sélecteurs chiraux : les sélecteurs dits « conventionnels » et les sélecteurs dits « sur mesure », spécifiques d'un énantiomère prédéterminé.

## I Les sélecteurs conventionnels et leurs limitations

Les sélecteurs chiraux conventionnels peuvent être classés en cinq grandes familles selon leur structure chimique et le mécanisme de reconnaissance chirale mis en jeu (*figure 1*).



**Figure 1 :** Classification des sélecteurs chiraux conventionnels. (SAH : Sérum Albumine Humaine ; SAB : Sérum Albumine de Bœuf, OVM : Ovomucoïde ; AGP :  $\alpha$ 1-glycoprotéine acide ; CBH : Cellobiohydrolase).

La première famille regroupe les sélecteurs chiraux permettant la séparation d'énantiomères par formation de complexes diastéréoisomériques labiles.

Les phases stationnaires de **type Pirkle [1]** sont constituées d'une petite molécule, très souvent un acide aminé possédant un noyau aromatique, immobilisé de façon covalente sur un gel de silice. Le mécanisme de reconnaissance chirale proposé par Pirkle est basé sur la formation de diastéréoisomères entre soluté et sélecteur, mettant en jeu des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  (transfert de charge), des interactions par formation de liaisons hydrogène, d'empilement de dipôle et/ou des encombrements stériques [1,2].

Les phases stationnaires faisant intervenir le phénomène d'**échange de ligands**, développées par Davankov et Rogozhin en 1971 [3], sont obtenues par greffage chimique d'un ligand chiral, le plus souvent un acide aminé, sur une matrice organique de type polyacrylamide ou polystyrène-divinylbenzène [4,5] ou sur une silice de fine granulométrie [6]. Le principe de la séparation repose sur la formation de complexes diastéréoisomériques ternaires entre un ligand sélecteur, un cation métallique (le Cu(II) est le plus couramment utilisé) et le soluté (énantiomères R ou S) possédant des stabilités et/ou des affinités différentes pour la colonne. De nombreuses revues sur l'application de l'échange de ligands en chromatographie et en électrophorèse capillaire sont présentes dans la littérature [7].

Les sélecteurs chiraux appartenant à la deuxième famille impliquent la formation de complexes d'inclusion hydrophobes (**cyclodextrines**) ou hydrophiles (**éthers couronne**).

Les **cyclodextrines** [8] sont des oligosaccharides cycliques constitués d'unités glucopyranosiques liées entre elles par des liaisons glucosidiques  $\alpha(1-4)$ . Elles forment une cavité hydrophobe de forme toroïdale. Les groupements alcool secondaire bordent l'entrée de la cavité alors que les groupements alcool primaire plus rapprochés, et par ailleurs plus flexibles, obstruent partiellement l'accès opposé, plus étroit, de la cavité. Du fait de l'absence de groupements hydroxyle et de part la densité électronique élevée due aux atomes d'oxygène glucosidique à l'intérieur de la cavité, celle-ci est à la fois hydrophobe et apolaire, ce qui favorise la formation de complexe d'inclusion avec les solutés apolaires ou polaires comportant un motif hydrophobe.

Les **éthers couronne** [9] sont des polyéthers macrocycliques construits sur la base d'unités 1,2-éthanediol (-O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-O). Les éthers couronne possèdent une cavité hydrophile et un extérieur hydrophobe. La formation de liaisons hydrogène et d'interactions électrostatiques entre la fonction amine d'un composé chiral et les hétéroatomes de l'éther couronne joue un rôle important dans le phénomène d'inclusion. Le domaine d'application de ces sélecteurs chiraux est, cependant, limité aux solutés possédant une fonction amine primaire.

Les polymères peuvent constituer une troisième famille de sélecteurs chiraux conventionnels. En effet, les **polymères naturels** [10] et **synthétiques** [11] possèdent une structure hélicoïdale asymétrique, impliquant une combinaison d'interactions de type  $\pi$ - $\pi$ , des liaisons hydrogène et/ou des empilements de dipôles et la formation de complexe d'inclusion pour induire une séparation.

Les **protéines** sont des polymères de poids moléculaire élevé composés de sous-unités chirales (les acides aminés naturels en série L en général). Diverses protéines telles que l'avidine [12], l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide (AGP) [13,14], l'ovomucoïde (OVM) [15], la cellulase nommée cellobiohydrolase (CBH) [16], la sérum albumine humaine (SAH) [17] ou de bœuf (SAB) [18,19]...ont la capacité de fixer certaines molécules de façon stéréosélective. Les mécanismes de reconnaissance chirale semblent être dus à la structure particulière de la protéine et/ou à la formation de cavités hydrophobes capables de reconnaître des molécules chirales. D'autres interactions (effet hydrophobe, électrostatiques, transfert de charges, liaisons hydrogène, échange d'ions, etc) sont probablement également impliquées dans la reconnaissance énantiosélective du ligand [20]. Ces sélecteurs chiraux permettent la résolution d'une large gamme de composés chiraux. Ainsi, des molécules médicamenteuses chirales acides, neutres ou basiques ont été séparées à l'aide des différents sélecteurs chiraux protéiques existants par CLHP ou par électrophorèse capillaire [21].

Enfin, la dernière famille est un type de sélecteurs plus récemment introduit [22], qui regroupent les **antibiotiques macrocycliques**. Les antibiotiques macrocycliques les plus utilisés et donnant de meilleurs résultats en tant que sélecteurs chiraux sont les glycopeptides (ristocétine, vancomycine, teicoplanine et avopracine) [23,24]. Bien que le mécanisme de reconnaissance de ces sélecteurs chiraux ne soit pas clairement élucidé, il semblerait que des mécanismes d'inclusion dans la cavité hydrophobe, des interactions dipôles-dipôles, des liaisons hydrogène, des interactions de type  $\pi$ - $\pi$  (transfert de charge), électrostatiques, ou des répulsions stériques, jouent un rôle dans la reconnaissance chirale [23,25,26]. Donc, les propriétés énantiosélectives des antibiotiques macrocycliques semblent se rapprocher de celles des protéines, des cyclodextrines et des sélecteurs chiraux polymériques. Cependant, les antibiotiques macrocycliques présentent des avantages majeurs par rapport aux autres sélecteurs chiraux à savoir, leur stabilité plus élevée et leur capacité plus importantes [27]. Ils ont été utilisés pour la résolution énantiomérique d'une grande variété de composés. Nous pouvons citer sans être exhaustif, les acides aminés et dérivés, les peptides, des composés acides, alcools, aminés, esters, sulfamides, aromatiques ou aliphatiques.

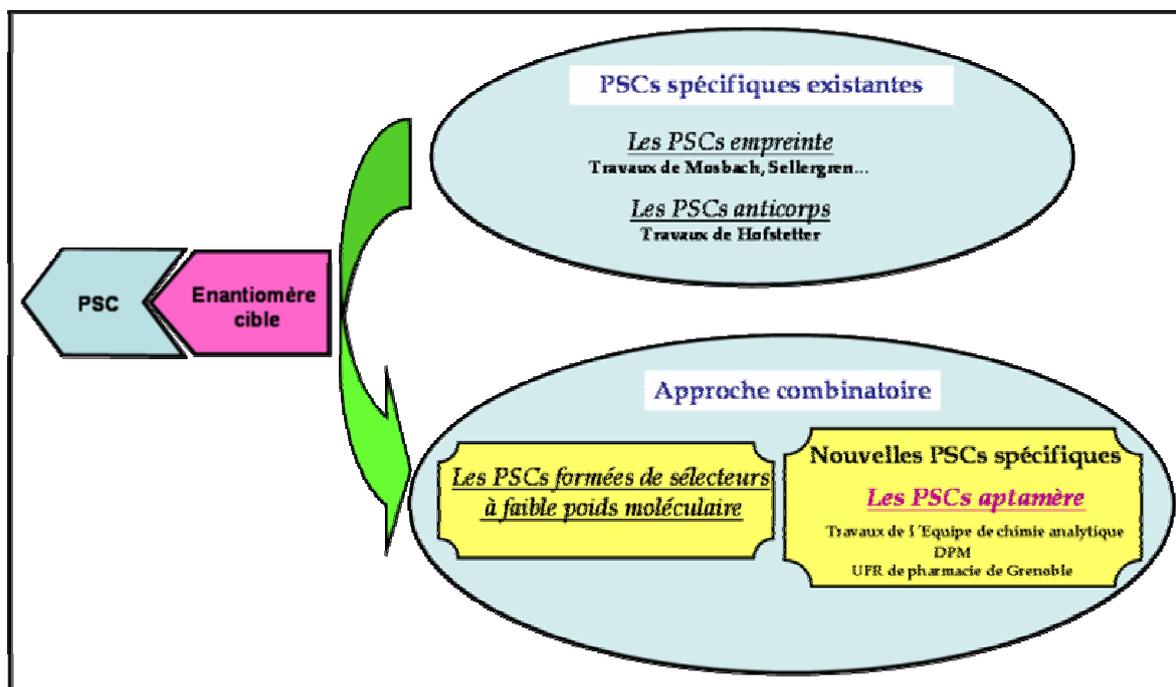
Ces sélecteurs conventionnels, décrits rapidement ici, sont très largement utilisés (plus de 200 PSCs commerciales sont actuellement disponibles) et, de nombreuses applications sont réalisées grâce à eux. Cependant, ils ne sont pas dirigés spécifiquement contre une molécule cible prédéterminée. Donc, un « screening » des sélecteurs disponibles doit être réalisé afin de

développer une méthode de séparation appropriée aux énantiomères. De plus, la présence de sites non spécifiques, dans la plupart des cas, entraîne une diminution de l'énantiosélectivité apparente, une efficacité limitée et une déformation des pics. Enfin, l'ordre d'élution des énantiomères séparés par ces sélecteurs conventionnels n'est pas prédéfini.

Ainsi, des recherches ont été menées dans le but de développer des sélecteurs chiraux, spécifiques d'un énantiomère cible prédéterminé.

## II Les sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible prédéterminée

Actuellement, trois stratégies générales ont été décrites pour créer un sélecteur chiral spécifiquement désigné contre un racémique à résoudre : la formation de polymères à empreinte moléculaire, la production d'anticorps et l'approche combinatoire. Cette dernière méthode implique deux procédures différentes : une approche à partir d'une petite bibliothèque de sélecteurs à faible poids moléculaire et une approche impliquant une large banque d'oligonucléotides simples brins (aptamères ADN et ARNs) (*figure 2*).



**Figure 2 :** Phases stationnaires chirales spécifiques d'une cible prédéterminée.

## **II.1 Les sélecteurs chiraux à empreinte moléculaire**

Les polymères à empreintes moléculaires (*Molecularly Imprinted Polymers*, MIPs) constituent une classe d'éléments de reconnaissance moléculaire à base de polymères fortement réticulés, fabriqués pour créer des PSCs polymériques synthétiques douées d'une forte capacité de reconnaissance pour une molécule cible donnée [28-30].

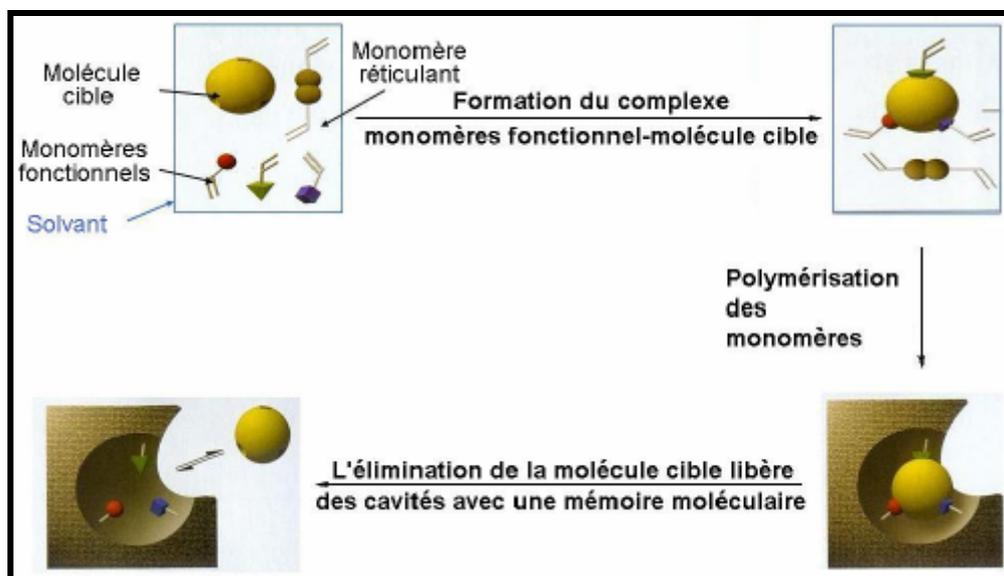
Le premier exemple de polymère à empreinte moléculaire, introduit par Wulff en 1972, était basé sur une stratégie d'attachement covalent [29]. Actuellement, la technique utilisée pour générer des empreintes moléculaires repose sur la méthode non covalente développée par Mosbach et ses collaborateurs [31].

L'impression moléculaire consiste à créer des images complémentaires, des "empreintes moléculaires", d'une molécule dans un polymère synthétique. La molécule « modèle » contre laquelle des empreintes doivent être générées est mise en contact avec un mélange de monomères (dérivés méthacryliques, vinyliques, acryliques) portant des groupements fonctionnels capables de la complexer, par exemple par liaisons hydrogène, liaisons ioniques ou effet hydrophobe. La polymérisation, conduite en présence d'un monomère réticulant, permet d'obtenir un réseau polymère rigide qui, après élimination de la molécule « modèle », porte des sites complémentaires de cette dernière, capables de la reconnaître de manière spécifique. La molécule « modèle » est le plus souvent identique, mais au moins de structure très proche, à la molécule cible qui doit être reconnue lors de l'utilisation du polymère. La présence d'un solvant porogène dans le mélange de polymérisation permet de créer une structure poreuse qui facilite l'élimination de la molécule « modèle » et l'accès aux sites lors de l'utilisation ultérieure du polymère (*figure 3*).

Un nombre important de PSCs de type MIP a été reporté dans la littérature. Ces PSCs ont permis la séparation des énantiomères d'acides aminés et dérivés [32], de peptides [33], d'hormones [34], d'antibiotiques [35]... Le mécanisme de reconnaissance est basé sur une complémentarité fonctionnelle et une complémentarité de forme entre le substrat et le site de fixation du polymère.

Ces PSCs de type MIP présentent des caractéristiques attractives : les polymères sont facile à préparer, peu coûteux, exposent des stabilités remarquables face à des stress mécaniques (température élevée, pression importante) et sont résistants à la présence d'acides, de bases, d'ions métalliques et à une large gamme de solvants [36]. De plus, l'ordre d'élution des énantiomères sur ces PSCs est prédéterminé, et dépend de la forme de la cible utilisée comme empreinte moléculaire. Ainsi, l'énantiomère testé comme modèle sera mieux retenu

que son image dans le miroir [37]. Enfin, les polymères à empreintes moléculaires (MIPs) ont en général une très haute sélectivité pour leur molécule cible, comparable à celle des anticorps pour leur antigène.



**Figure 3 :** Principe de préparation d'un polymère à empreinte moléculaire [38].

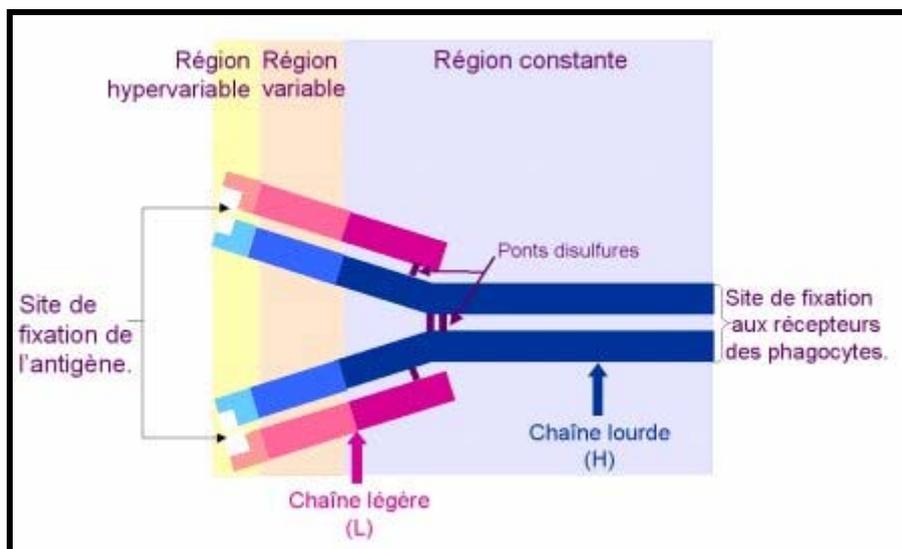
Les PSCs de type MIP sont aujourd'hui préférentiellement préparées sous forme de particules sphériques [39-41] et de monolithes [42]. Cependant, l'utilisation de ce type de sélecteurs comme PSCs est limitée par une faible énantiosélectivité, des pics asymétriques et larges et une faible capacité de saturation. Une distribution hétérogène des sites de fixation, de faibles cinétiques de transfert de masse et l'irrégularité des particules de la phase stationnaire sont responsables de ces faibles performances chromatographiques [28,43]. De meilleurs résultats peuvent être observés en utilisant les sélecteurs à empreinte moléculaire comme additif dans le tampon de migration en électrophorèse capillaire [44].

## **II.2 Les anticorps énantiosélectifs**

Les anticorps sont des molécules produites par le système immunitaire des animaux supérieurs pour reconnaître différentes sortes de molécules avec une spécificité importante. Cette spécificité est conférée par la présence de domaines extrêmement variables aux extrémités des anticorps (*figure 4*). L'immunisation par de petites molécules organiques couplées à des protéines de transport est régulièrement utilisée pour produire des anticorps.

En 1928, Landsteiner montrait que les anticorps étaient capables de séparer des énantiomères [45]. Plus récemment, les anticorps ont été utilisés pour la séparation

d'énantiomères en chromatographie [46-53] et pour la détection d'impureté énantiomérique par immunoessais [54] et par biocapteurs [55].



**Figure 4 :** Représentation de la structure générale d'un anticorps [56].

Hofstetter et ses collaborateurs ont montré que les anticorps ont la capacité de fixer un des énantiomères (les acides aminés dans leur cas) avec une bonne spécificité, c'est-à-dire, celui pour lequel il a été sélectionné. Les propriétés stéréosélectives des anticorps semblent liées à la présence d'interactions spécifiques, au niveau du site de fixation, entre l'anticorps et l'énantiomère, et à une complémentarité fonctionnelle et de forme. Les interactions spécifiques entre anticorps et molécule cible sont de nature non covalentes et impliquent des interactions électrostatiques, des effets hydrophobes, des liaisons hydrogène et des interactions de type Van der Waals [50].

Les anticorps énantiosélectifs ont permis la résolution de diverses molécules chirales. Nous pouvons citer sans être exhaustif, les médicaments [46,51], les acides aminés et dérivés [47-50], les acides- $\alpha$ -hydroxylés [52].

Hofstetter et ses collaborateurs ont également montré que ces PSCs pourraient être intéressantes au niveau académique et industriel puisqu'elles combinent à la fois une bonne sélectivité et spécificité pour l'analyte, une utilisation aisée, une séparation rapide (quelques minutes) et une stabilité à long terme de la colonne (plusieurs mois à une année) [49].

Cependant, l'utilisation d'anticorps énantiosélectifs implique un certain nombre de limitations. Tout d'abord, les anticorps spécifiques d'un énantiomère donné sont obtenus par production *in vivo*. Ceci implique des étapes longues de production, des problèmes de reproductibilité et des difficultés d'obtention d'anticorps contre des molécules non tolérées par les animaux (exemple : toxines). De plus, les capacités d'immobilisation sur support

chromatographique sont limitées par des problèmes d'encombrement stérique à cause de la taille importante de ces sélecteurs. D'autre part, et en règle générale, les petites molécules sont faiblement immunogéniques. Enfin, les anticorps sont sensibles à la température et peuvent subir des dénaturations irréversibles [57]. Il est, cependant, important de noter que différentes approches ont été développées pour surmonter ces limitations. Ainsi, ces approches sont l'immunisation *in vitro* [58], l'humanisation des anticorps [59], la présentation de peptides à la surface de phages [60] et de ribosomes [61].

### **II.3 L'approche combinatoire**

La chimie combinatoire est un outil puissant permettant la découverte de ligands sélectifs d'une molécule cible. Cette stratégie combinatoire s'est montrée très prometteuse, elle utilise des méthodes rapides selon différentes approches. La première méthode combinatoire décrite impliquait une petite bibliothèque contenant des sélecteurs chiraux à faible masse moléculaire. Plus récemment, une approche combinatoire très efficace, à partir d'une très grande bibliothèque contenant des oligonucléotides simples brins, a permis la création d'une nouvelle classe de sélecteurs chiraux à base d'aptamères en série ADN et ARN [62].

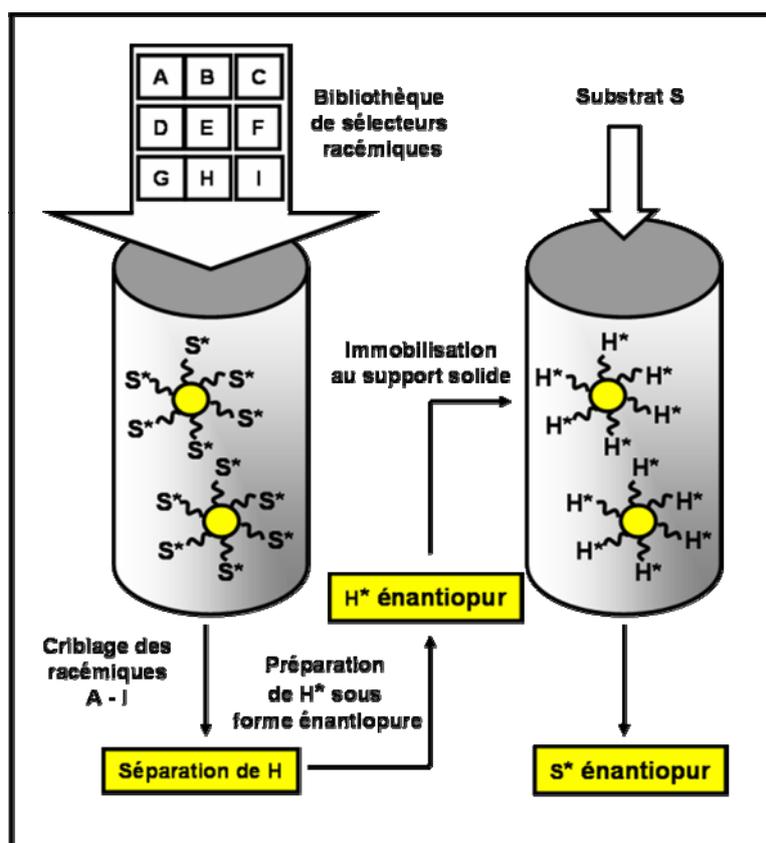
#### **II.3.1 Les sélecteurs à faible masse moléculaire**

La découverte de sélecteurs chiraux à faible masse moléculaire par la stratégie combinatoire implique plusieurs approches faisant intervenir un « screening » par chromatographie liquide (ou électrophorèse capillaire) ou un « screening » séquentiel.

La première approche applique le principe de réciprocité introduit par Pirkle et ses collaborateurs pour séparer différentes classes de composés pharmaceutiques [2,63]. Ce principe est le suivant : si un sélecteur chiral, présent énantiomériquement pur, possède différentes affinités pour les énantiomères d'une molécule cible, alors les énantiomères de la molécule cible, pris séparément, devraient posséder une affinité différente pour les énantiomères du sélecteur chiral.

La première étape de cette approche consiste à immobiliser un énantiomère du racémique cible sur un support chromatographique. Puis, un criblage est réalisé, par CLHP, en faisant passer au niveau de cette phase stationnaire chirale une banque de composés

racémiques à faible masse moléculaire, synthétisée par une approche combinatoire, susceptibles d'être séparés sur cette PSC. Le racémique le mieux résolu est ensuite préparé sous forme énantiomériquement pure puis fixé sur un support chromatographique. Cette PSC est ensuite utilisée pour séparer le racémique cible immobilisé à la première étape (*figure 5*). Cette technique a l'avantage de faire intervenir seulement deux colonnes, qui ont pour but de développer et optimiser une PSC pour la séparation énantiomérique d'un seul composé. En réalité, il a été montré que ces colonnes ont la capacité de séparer d'autres racémiques avec des énantiosélectivités plus faibles.



**Figure 5 :** Concept de criblage réciproque pour l'identification d'un sélecteur spécifique pour la préparation d'une phase stationnaire chirale (d'après [64]).

Par cette approche, Lewandowski et ses collaborateurs ont sélectionné un sélecteur chiral à partir d'une bibliothèque combinatoire de dihydropyrimidines contenant plus de 140 membres. Ce sélecteur chiral, ainsi identifié, est capable de séparer des dérivés d'acides aminés, des anti-inflammatoires non-stéroïdiens et des dihydropyrimidines avec des facteurs de séparation apparents supérieurs à 8 [65,66].

De la même façon, Brahmachary et ses collaborateurs ont identifié le sélecteur optimal permettant la résolution des énantiomères des dérivés de la leucine et de l'alanine [64], par

criblage d'une banque de dérivés d'acétylphénylamide-2-oxo-azétidine sur une phase stationnaire contenant la *N*-(3,5-dinitrobenzoyl)- $\alpha$ -L-leucine.

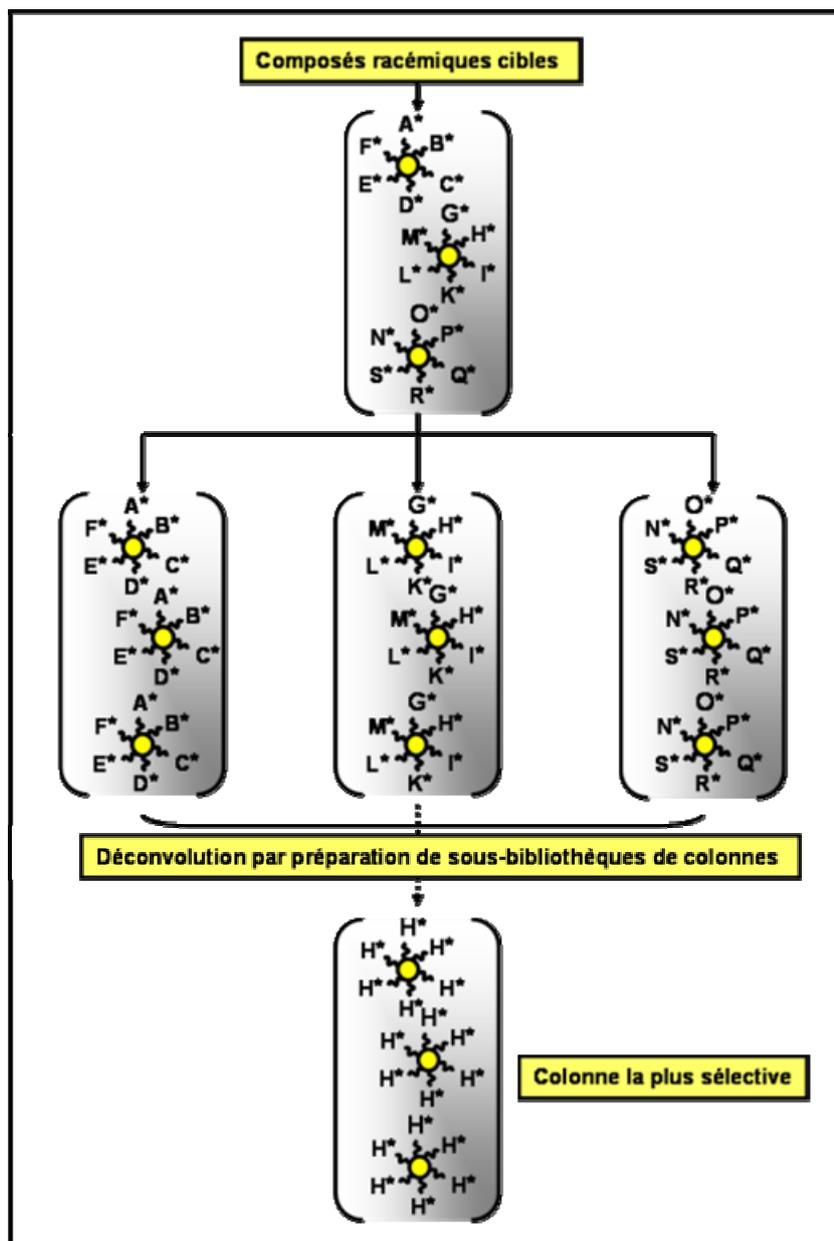
Une deuxième approche consiste à immobiliser, au niveau d'un support chromatographique approprié, une bibliothèque contenant un mélange de sélecteurs chiraux potentiels énantiomériquement purs. Puis, les propriétés énantiosélectives de cette colonne sont testées par injection de différents composés racémiques. Si une séparation est observée, des sous-banques de cette colonne, contenant une densité plus faible en sélecteurs chiraux sont ensuite préparées afin d'identifier le sélecteur optimal (*figure 6*) [62]. Cette approche présente l'« avantage du parallélisme » c'est-à-dire que le nombre de colonnes nécessaire lors de l'étape de criblage du sélecteur optimal, par déconvolution, est très inférieur au nombre de sélecteurs chiraux présents dans la bibliothèque initiale [67].

De la même façon, Chiari et ses collaborateurs ont utilisé une banque contenant plus de 8000 cyclohexapeptides afin d'évaluer leurs propriétés énantiosélectives pour les dérivés d'acides aminés dinitrophénylés (DNP) par électrophorèse capillaire [68].

Li et son équipe ont développé une PSC permettant la séparation de dérivés d'acides aminés par une approche un peu différente [69]. Les auteurs ont préparé une PSC naphthylleucine par immobilisation de l'énantiomère L sur une colonne de silice. Puis, deux petites bibliothèques différentes ont été préparées, à partir d'un même mélange de 16 peptides énantiomériquement purs mais de configurations opposées, pour étudier la capacité de résolution chirale des énantiomères de la leucine-(1-naphthyl)-ester par une approche chromatographique réciproque. La comparaison des chromatogrammes obtenus indique la présence de sélecteurs chiraux potentiels dans la bibliothèque selon le principe de réciprocité évoqué précédemment. Après déconvolution, les deux sélecteurs chiraux (DNB-Ala-Gly-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> et DNB-Leu-Gly-NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) identifiés, sont immobilisés au niveau d'un gel de silice puis remplis dans des colonnes pour former deux PSCs distinctes. Les facteurs de séparation de la leucine-(1-naphthyl)-ester varie de 6.9 à 8.0 pour les colonnes contenant respectivement l'alanine et la leucine.

A partir d'une banque contenant un mélange de 36 acides aminés substitués, riche en électrons, formé par combinaison de 3 acides aminés en série L (valine, phénylalanine et proline) et 12 amines aromatiques, Frechet et ses collaborateurs ont sélectionné, par cette méthode, une PSC optimale pour la séparation de dérivés d'acides aminés contenant un groupement déficient en électrons (le 3,5-dinitrobenzoyl (DNB)). Cette PSC, formée du

sélecteur chiral : la L-proline-1-indananilide greffé sur des billes, montre une énantiosélectivité apparente supérieure à 23 pour la DNB-leucine [67,70].



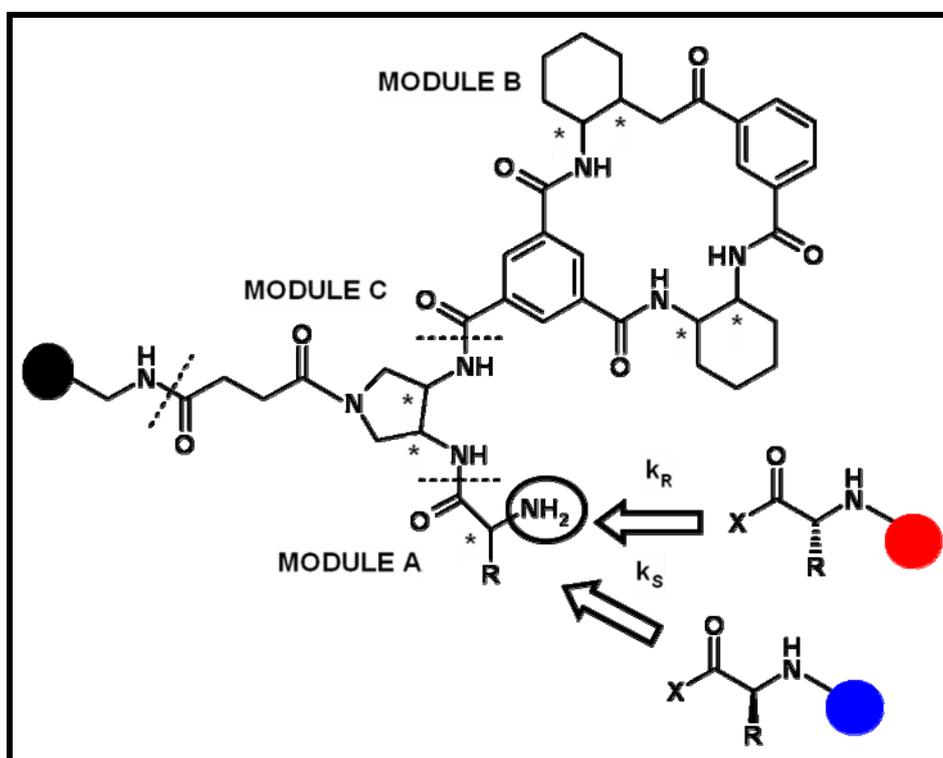
**Figure 6** : Concept de criblage par greffage d'une large bibliothèque de sélecteurs potentiels sur des billes (d'après [67]).

Cette méthode, décrite précédemment, et utilisée par Li et ses collaborateurs présente quelques limitations. En effet, elle nécessite la synthèse des deux banques et des sous banques énantiomériquement pures pour l'identification du meilleur sélecteur chiral, ce qui peut être laborieux. De plus, la taille de la bibliothèque criblée est limitée par la faible efficacité de la colonne. Ainsi, ces auteurs ont développé une approche par criblage séquentiel [62] pour la

préparation de sélecteurs chiraux par la méthode combinatoire [71]. Par cette approche, chaque énantiomère du mélange racémique est immobilisé sur deux phases stationnaires distinctes. Puis, une seule banque contenant un mélange de sélecteurs chiraux potentiels, énantiomériquement purs, est également préparée et injectée en quantités égales et dans les mêmes conditions au niveau des deux phases stationnaires. L'observation de différences d'intensités des pics pour une même rétention entre les deux chromatogrammes, obtenus en polarité de phases inversée pour chaque colonne, indique que le composé correspondant au pic est un bon sélecteur chiral.

Par criblage séquentiel, Welch et ses collaborateurs ont décrit la séparation d'analytes à caractère  $\pi$ -basique par immobilisation de dérivés dipeptides (DNB-oligopeptide) sur support chromatographique [72].

Enfin, Weingarten et ses collaborateurs ont développé une nouvelle approche combinatoire élégante permettant la sélection du sélecteur chiral le plus énantiosélectif, à partir d'une bibliothèque de sélecteurs chiraux potentiels, par inspection visuelle à l'aide d'un microscope à basse résolution [73]. Cette approche est basée sur la préparation d'un support solide contenant 60 membres d'une banque d'amines chiraux, formée principalement de macrocycles, de diamines, et de différents acides aminés (*figure 7*).



**Figure 7 :** Approche combinatoire permettant le criblage de sélecteurs chiraux par inspection visuelle (d'après [73]).

Le protocole de criblage pour évaluer les propriétés énantiosélectives des sélecteurs chiraux s'effectue en incubant ce support en présence de l'analyte cible, dont les deux énantiomères ont été marqués par des chromophores absorbant dans le visible à des longueurs d'onde différentes (l'énantiomère S et l'énantiomère R sont marqués respectivement en bleu et en rouge). Ainsi, l'association énantiosélective entre l'analyte et les sélecteurs peut être observée visuellement pour chaque énantiomère (l'association sélecteur chiral-énantiomère S donnera des billes colorées en bleu alors que l'association avec l'énantiomère R entraînera une coloration des billes en rouge et, la présence de billes non colorées (marron) indique la non-affinité de la molécule immobilisée sur le support pour les énantiomères cibles). D'autre part, les molécules les plus intensivement colorées sont identifiées en tant que sélecteurs chiraux les plus énantiosélectifs du composé cible [74]. Par cette approche, Weingarten et ses collaborateurs ont identifié des sélecteurs chiraux spécifiques de dérivés d'acides aminés [73].

Donc, la chimie combinatoire est un outil puissant dans le domaine de la reconnaissance moléculaire pour découvrir de nouveaux sélecteurs chiraux par CLHP ou électrophorèse capillaire. Ainsi, il a été montré que différentes approches sont disponibles pour développer des phases stationnaires chirales à base de sélecteurs à faible masse moléculaire possédant de bonnes propriétés énantiosélectives.

### **II.3.2 Les aptamères, une nouvelle classe de sélecteurs chiraux aux propriétés prometteuses**

Plus récemment, la stratégie combinatoire a été appliquée pour sélectionner des oligonucléotides possédant une affinité et une spécificité importantes, à partir d'une très large bibliothèque contenant des séquences aléatoires d'oligonucléotides. Ces molécules nommées « aptamères », possédant un grand potentiel pour des applications diverses, sont utilisées depuis 2002 comme sélecteur chiral, et ont fait l'objet de cette thèse.

Dans le chapitre suivant, ces molécules d'oligonucléotides en série ADN et ARN aux propriétés très prometteuses seront très largement décrites.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Pirkle W. H. and Sikkenga D. L., "*Resolution of optical isomers by liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1976**, 123, (2), 400-404.
2. Pirkle W. H., Welch C. J. and Lamm B., "*Design, synthesis, and evaluation of an improved enantioselective naproxen selector*", Journal of Organic Chemistry, **1992**, 57, (14), 3854-3860.
3. Davankov V. A. and Rogozhin S. V., "*Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in alpha-amino acid copper(II) complexes*", Journal of Chromatography A, **1971**, 60, 284-312.
4. Kurganov A. A., Tevlin A. B. and Davankov V. A., "*High-performance ligand-exchange chromatography of enantiomers : Studies on polystyrene-type chiral phases bonded to microparticulate silicas*", Journal of Chromatography A, **1983**, 261, 223-233.
5. Charmot D., Audebert R. and Quivoron C., "*High Efficiency Ligand Exchange Chromatography of Amino Acid Enantiomers*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **1985**, 8, (10), 1769 - 1781.
6. Gubitz G. and Juffmann F., "*Resolution of the enantiomers of thyroid hormones by high-performance ligand-exchange chromatography using a chemically bonded chiral stationary phase*", Journal of Chromatography A, **1987**, 404, 391-393.
7. Davankov V. A., "*Enantioselective ligand exchange in modern separation techniques*", Journal of Chromatography A, **2003**, 1000, (1-2), 891-915.
8. Armstrong D.W. and Demond W., "*Cyclodextrin bonded phases for the liquid chromatographic separation of optical, geometrical, and structural isomers*", Journal of Chromatographic Science, **1984**, 22, 411-415.
9. Shinbo T., Yamaguchi T., Nishimura K. and Sugiura M., "*Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings*", Journal of Chromatography A, **1987**, 405, 145-153.
10. Lindner K. R. and Mannschreck A., "*Separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography on triacetylcellulose*", Journal of Chromatography A, **1980**, 193, (2), 308-310.
11. Blaschke G. and Maibaum J., "*Chromatographic resolutions : XIV. Optical resolution of the racemic anticancer drug ifosfamide and other chiral oxazaphosphorines*", Journal of Chromatography A, **1986**, 366, 329-334.
12. Haginaka J., "*Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, (1-2), 253-273.

13. Hermansson J., "Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using alpha-1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase", Journal of Chromatography A, **1983**, 269, 71-80.
14. Hermansson J., "Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with alpha-1-acid glycoprotein", Trends in Analytical Chemistry, **1989**, 8, (7), 251-259.
15. Miwa T., Miyakawa T., Kayano M. and Miyake Y., "Application of an ovomucoid-conjugated column for the optical resolution of some pharmaceutically important compounds", Journal of Chromatography A, **1987**, 408, 316-322.
16. Marle I., Erlandsson P., Hansson L., Isaksson R., Pettersson C. and Pettersson G., "Separation of enantiomers using cellulase (CBH I) silica as a chiral stationary phase", Journal of Chromatography A, **1991**, 586, (2), 233-248.
17. Ahmed A. and Lloyd D. K., "Effect of organic modifiers on retention and enantiomeric separations by capillary electrophoresis with human serum albumin as a chiral selector in solution", Journal of Chromatography A, **1997**, 766, (1-2), 237-244.
18. Zhang X., Davidian E. W., Nguyen T. H., Evans R. W., Im Sung J. and Barker G. E., "Investigation of chiral resolution using displacement interactions with polymer networks in capillary affinity zone electrophoresis", Journal of Chromatography A, **1996**, 745, (1-2), 1-8.
19. Eberle D., Hummel R. P. and Kuhn R., "Chiral resolution of pantoprazole sodium and related sulfoxides by complex formation with bovine serum albumin in capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, **1997**, 759, (1-2), 185-192.
20. Francotte E. and Lindner W., "Chirality in drug research", **2006**, 33, 1-341.
21. Ceccato A., Hubert Ph and Crommen J., "Analyse de médicaments énantiomériques en chromatographie liquide", STP Pharma Pratiques, **1999**, 9, (4), 295-309.
22. Armstrong D. W., Rundlett K. L. and Chen J.-R., "Evaluation of the macrocyclic antibiotic vancomycin as a chiral selector for capillary electrophoresis", Chirality, **1994**, 6, (6), 496-509.
23. Armstrong D. W. and Nair U. B., "Capillary electrophoretic enantioseparations using macrocyclic antibiotics as chiral selectors", Electrophoresis, **1997**, 18, (12-13), 2331-2342.
24. Ward T., "Macrocyclic antibiotics - the newest class of chiral selectors", LC-GC, **1996**, 14, 886-894.
25. Ward T., Dann III C. and Blaylock A., "Enantiomeric resolution using the macrocyclic antibiotics rifamycin B and rifamycin SV as chiral selectors for capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A, **1995**, 715, 337-344.

26. Ward T. J. and Oswald T. M., "*Enantioselectivity in capillary electrophoresis using the macrocyclic antibiotics*", Journal of Chromatography A, **1997**, 792, (1-2), 309-325.
27. Armstrong D. W., Tang Y., Chen S., Zhou Y., Bagwill C. and Chen J.-R., "*Macrocyclic Antibiotics as a New Class of Chiral Selectors for Liquid Chromatography*", Analytical Chemistry, **1994**, 66, (9), 1473-1484.
28. Sellergren B., "*Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, (1-2), 227-252.
29. Wulff G., "*Molecular Imprinting in Cross-Linked Materials with the Aid of Molecular Templates - A Way towards Artificial Antibodies*", Angewandte Chemie International Edition in English, **1995**, 34, (17), 1812-1832.
30. Wulff G. and Knorr K., "*Stoichiometric noncovalent interaction in molecular imprinting*", Bioseparation, **2001**, 10, (6), 257-276.
31. Mosbach K., "*Molecular imprinting*", Trends in Biochemical Sciences, **1994**, 19, (1), 9-14.
32. Andersson L. I. and Mosbach K., "*Enantiomeric resolution on molecularly imprinted polymers prepared with only non-covalent and non-ionic interactions*", Journal of Chromatography A, **1990**, 516, (2), 313-322.
33. Ramstrom O., Nicholls I. A. and Mosbach K., "*Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers*", Tetrahedron: Asymmetry, **1994**, 5, (4), 649-656.
34. Ramstrom O., Ye L. and Mosbach K., "*Artificial antibodies to corticosteroids prepared by molecular imprinting*", Chemistry & Biology, **1996**, 3, (6), 471-477.
35. Siemann M., Andersson L. I. and Mosbach K., "*Separation and Detection of Macrolide Antibiotics by HPLC Using Macrolide-imprinted Synthetic Polymers as Stationary Phases*", The Journal of Antibiotics, **1997**, 50, (1), 89-95.
36. Kriz D. and Mosbach K., "*Competitive amperometric morphine sensor based on an agarose immobilised molecularly imprinted polymer*", Analytica Chimica Acta, **1995**, 300, (1-3), 71-75.
37. Ramström O. and Ansell R. J., "*Molecular imprinting technology: challenges and prospects for the future*", Chirality, **1998**, 10, (3), 195-209.
38. Breton F., Delépée R., Jégourel D., Vidal R. and Agrofoglio L. A., "*Des polymères intelligents pour des produits cosmétiques innovants*", Institut de Chimie Organique et Analytique, UMR 6005, Université d'Orléans, **2007**, Poster.
39. Haginaka J., Takehira H., Hosoya K. and Tanaka N., "*Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen selectively modified with hydrophilic external layer*", Journal of Chromatography A, **1999**, 849, (2), 331-339.

40. Haginaka J., Sanbe H. and Takehira H., "*Uniform-sized molecularly imprinted polymer for (S)-ibuprofen: Retention properties in aqueous mobile phases*", Journal of Chromatography A, **1999**, 857, (1-2), 117-125.
41. Haginaka J. and Sanbe H., "*Uniformly sized molecularly imprinted polymer for (S)-naproxen: Retention and molecular recognition properties in aqueous mobile phase*", Journal of Chromatography A, **2001**, 913, (1-2), 141-146.
42. Yin J., Yang G. and Chen Y., "*Rapid and efficient chiral separation of nateglinide and its l-enantiomer on monolithic molecularly imprinted polymers*", Journal of Chromatography A, **2005**, 1090, (1-2), 68-75.
43. Sellergren B. and Shea K. J., "*Origin of peak asymmetry and the effect of temperature on solute retention in enantiomer separations on imprinted chiral stationary phases*", Journal of Chromatography A, **1995**, 690, (1), 29-39.
44. Walshe M., Garcia E., Howarth J., Smyth M. R. and Kelly M. T., "*Separation of the Enantiomers of Propranolol by Incorporation of Molecularly Imprinted Polymer Particles as Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis*", Analytical Communications, **1997**, 34, 119-122.
45. Landsteiner K. and van der Scheer J., "*Serological Differentiation of steric isomers*", Journal of Experimental Medicine, **1928**, 48, (3), 315-320.
46. Lua A. C. and Chou T.-Y., "*Preparation of immunoaffinity columns for direct enantiomeric separation of amphetamine and/or methamphetamine*", Journal of Chromatography A, **2002**, 967, (2), 191-199.
47. Hofstetter O., Hofstetter H., Schurig V., Wilchek M. and Green B. S., "*Antibodies Can Recognize the Chiral Center of Free alpha-Amino Acids*", Journal of the American Chemical Society, **1998**, 120, (13), 3251-3252.
48. Hofstetter O., Hofstetter H., Wilchek M., Schurig V. and Green B. S., "*Production and Applications of Antibodies Directed Against the Chiral Center of alpha-Amino Acids*", International Journal of Bio-Chromatography, **2000**, 5, 165-174.
49. Hofstetter O., Lindstrom H. and Hofstetter H., "*Direct Resolution of Enantiomers in High-Performance Immunoaffinity Chromatography under Isocratic Conditions*", Analytical Chemistry, **2002**, 74, (9), 2119-2125.
50. Hofstetter O., Lindstrom H. and Hofstetter H., "*Effect of the mobile phase on antibody-based enantiomer separations of amino acids in high-performance liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **2004**, 1049, (1-2), 85-95.
51. Nevanen T. K., Soderholm L., Kukkonen K., Suortti T., Teerinen T., Linder M., Soderlund H. and Teeri T. T., "*Efficient enantioselective separation of drug enantiomers by immobilised antibody fragments*", Journal of Chromatography A, **2001**, 925, (1-2), 89-97.

52. Zeleke T. K., Zeleke J. M., Hofstetter H. and Hofstetter O., "*Stereoselective antibodies to free alpha-hydroxy acids*", Journal of Molecular Recognition, **2005**, 18, (4), 334-340.
53. Hofstetter H. and Hofstetter O., "*Antibodies as tailor-made chiral selectors for detection and separation of stereoisomers*", Trends in Analytical Chemistry, **2005**, 24, (10), 869-879.
54. Hofstetter O., Hofstetter H., Wilchek M., Schurig V. and Green B. S., "*An Immunochemical Approach for the Determination of Trace Amounts of Enantiomeric Impurities*", Chemical Communications, **2000**, (17), 1581-1582.
55. Hofstetter O., Hofstetter H., Wilchek M., Schurig V. and Green B. S., "*Chiral discrimination using an immunosensor*", Nature Biotechnology, **1999**, 17, (4), 371-374.
56. [www.ac-corse.fr/svt/ress\\_ped/antic/diapo.jpg](http://www.ac-corse.fr/svt/ress_ped/antic/diapo.jpg), **2007**.
57. Jayasena S. D., "*Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics*", Clinical Chemistry, **1999**, 45, (9), 1628-1650.
58. Ness J. V., Laemmli U. K. and Pettijohn D. E., "*Immunization in vitro and Production of Monoclonal Antibodies Specific to Insoluble and Weakly Immunogenic Proteins*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1984**, 81, (24), 7897-7901.
59. Vaughan T. J., Osbourn J. K. and Tempest P. R., "*Human antibodies by design*", Nature Biotechnology, **1998**, 16, (6), 535-539.
60. Cwirla S. E., Peters E. A., Barrett R. W. and Dower W. J., "*Peptides on Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1990**, 87, (16), 6378-6382.
61. Hanes J., Jermutus L., Weber-Bornhauser S., Bosshard H. R. and Pluckthun A., "*Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1998**, 95, (24), 14130-14135.
62. Ravelet C. and Peyrin E., "*Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy*", Journal of Separation Science, **2006**, 29, (10), 1322-1331.
63. Pirkle W. H., House D. W. and Finn J. M., "*Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases*", Journal of Chromatography A, **1980**, 192, (1), 143-158.
64. Brahmachary E., Ling F. H., Svec F. and Frechet J. M. J., "*Chiral Recognition: Design and Preparation of Chiral Stationary Phases Using Selectors Derived from Ugi Multicomponent Condensation Reactions and a Combinatorial Approach*", Journal of Combinatorial Chemistry, **2003**, 5, (4), 441-450.

65. Lewandowski K., Murer P., Svec F. and Fréchet J. M. J., "Highly selective chiral recognition on polymer supports: preparation of a combinatorial library of dihydropyrimidines and its screening for novel chiral HPLC ligands", Chemical Communications, **1998**, (20), 2237-2238.
66. Lewandowski K., Murer P., Svec F. and Frechet J. M. J., "A Combinatorial Approach to Recognition of Chirality: Preparation of Highly Enantioselective Aryl-Dihydropyrimidine Selectors for Chiral HPLC", Journal of Combinatorial Chemistry, **1999**, 1, (1), 105-112.
67. Murer P., Lewandowski K., Svec F. and Frechet J. M. J., "On-Bead Combinatorial Approach to the Design of Chiral Stationary Phases for HPLC", Analytical Chemistry, **1999**, 71, (7), 1278-1284.
68. Chiari M., Desperati V., Manera E. and Longhi R., "Combinatorial Synthesis of Highly Selective Cyclohexapeptides for Separation of Amino Acid Enantiomers by Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **1998**, 70, (23), 4967-4973.
69. Wu Y., Wang Y., Yang A. and Li T., "Screening of Mixture Combinatorial Libraries for Chiral Selectors: A Reciprocal Chromatographic Approach Using Enantiomeric Libraries", Analytical Chemistry, **1999**, 71, (9), 1688-1691.
70. Murer P., Lewandowski K., Svec F. and Frechet J. M. J., "Combinatorial library on bead approach to polymeric materials with vastly enhanced chiral recognition", Chemical Communications, **1998**, (23), 2559-2560.
71. Bluhm L. H., Wang Y. and Li T., "An Alternative Procedure To Screen Mixture Combinatorial Libraries for Selectors for Chiral Chromatography", Analytical Chemistry, **2000**, 72, (21), 5201-5205.
72. Welch C. J., Bhat G. and Protopopova M. N., "Selection of an Optimized Adsorbent for Preparative Chromatographic Enantioseparation by Microscale Screening of a Second-Generation Chiral Stationary Phase Library", Journal of Combinatorial Chemistry, **1999**, 1, (5), 364-367.
73. Weingarten M. D., Sekanina K. and Still W. C., "Enantioselective Resolving Resins from a Combinatorial Library. Kinetic Resolution of Cyclic Amino Acid Derivatives", Journal of the American Chemical Society, **1998**, 120, (35), 9112-9113.
74. Maier N. M., Franco P. and Lindner W., "Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives", Journal of Chromatography A, **2001**, 906, (1-2), 3-33.



*Chapitre 2 : Les  
aptamères, des molécules  
aux propriétés  
prometteuses*

APTAMER



On peut s'interroger sur l'intérêt présenté par des séquences d'oligonucléotides en tant que ligands de cibles variées. En fait, l'enchaînement des nucléotides les uns aux autres (la séquence primaire) dicte les repliements de la chaîne dans l'espace (les structures secondaire et tertiaire). Ainsi, une bibliothèque d'oligonucléotides se présentera comme une population de formes, offrant une multitude de groupements susceptibles de s'associer à un partenaire via des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogène ou un effet hydrophobe. On peut penser que dans une population suffisamment riche se trouvera une séquence, une forme, adaptée à la reconnaissance de la cible choisie. La coexistence, dans la même entité moléculaire, de la forme et de la séquence permet, par alternance d'une étape de sélection (liée à la forme) et d'amplification (liée à la séquence), d'extraire de la famille, à l'issue d'un processus d'évolution moléculaire, le(s) candidat(s) doué(s) des propriétés attendues. Depuis quelques années, ces techniques connues sous des noms divers (SELEX pour *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*, génétique *in vitro*, évolution moléculaire dirigée) [1-3], ont conduit à l'isolement de motifs d'ADNs ou d'ARNs possédant des propriétés prédéfinies. Des méthodologies analogues (phage display [4] et synthèse combinatoire de peptides), s'appliquent au monde des peptides ou des protéines [5] mais ne seront pas évoquées ici.

Dans ce chapitre seront décrits les méthodes de sélection, ainsi que les caractéristiques des oligonucléotides sélectionnés pour différentes molécules cibles, le mécanisme de reconnaissance moléculaire et les applications analytiques d'aptamères en série ARN et ADN.

## **I La sélection d'aptamères : la méthode SELEX**

La technique SELEX [1] également nommée "*in vitro selection*" [2] ou "*in vitro evolution*" [3] est une technique combinatoire en biologie moléculaire pour produire des oligonucléotides simples brins, en série ADN ou ARN, liant spécifiquement une cible [1,2]. Les séquences ainsi sélectionnées ont été baptisées « aptamères », par Ellington et Szostak [2], un néologisme du mot latin « *aptus* » (apte, approprié à, ou se lie à, qui joint) et du suffixe Grec « *meros* » (mer : l'unité de base composant un polymère) désignant un polymère adapté à une fonction.

L'association de la synthèse aléatoire d'oligonucléotides, d'une sélection et d'une amplification fut développée en même temps par plusieurs laboratoires en 1990 [1,2,6]. Ainsi, Tuerk et Gold ont étudié les interactions entre l'ADN polymérase du bactériophage T4 (gp43)

et le site de fixation du ribosome au niveau de l'ARNm, codant pour une enzyme. Ils ont sélectionné des séquences fixant la gp43 à partir d'une bibliothèque aléatoire d'ARNs et ont nommé cette sélection : SELEX [1]. La même année, Ellington et Szostak ont utilisé indépendamment la même procédure pour isoler, à partir d'une bibliothèque aléatoire d'ARNs, des molécules d'ARNs ayant la capacité de se replier en une structure stable en 3 dimensions, créant ainsi un site de fixation spécifique pour de petites molécules organiques fluorescentes : le Bleu Cibacron et le Réactif Bleu 4. Ils ont ainsi nommé ces séquences d'ARNs : « aptamères » [2]. Deux années plus tard, le succès de la sélection de séquences d'ADNs à partir d'une bibliothèque de séquences chimiquement synthétisées a été démontré [7]. Ces séquences d'ADNs ainsi sélectionnées sont capable de reconnaître et de lier les ligands (Bleu Cibacron et Réactif vert 19) de la même façon que les séquences d'ARNs.

Par la suite, la technologie SELEX est devenu un outil important et largement utilisé en biologie moléculaire, dans le domaine pharmaceutique et en recherche médicale. De plus, cette technique a souvent été modifiée pour sélectionner des aptamères pour différentes applications.

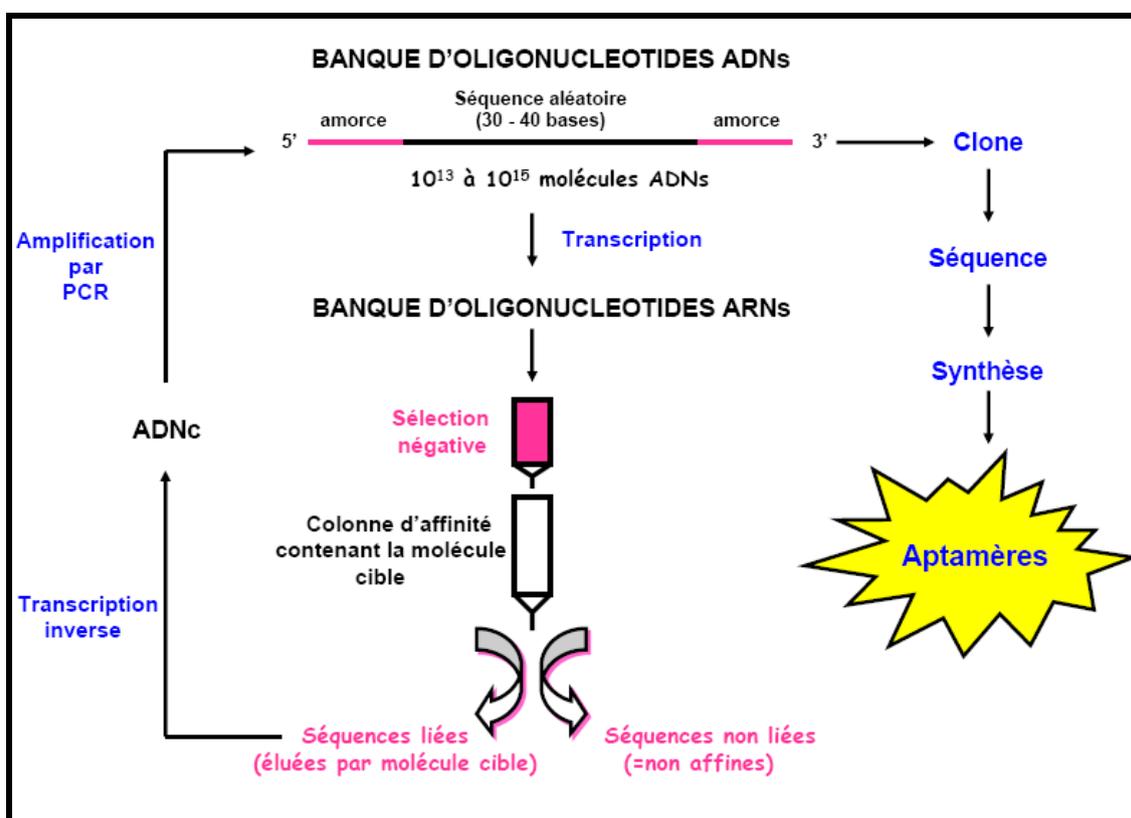
### **I.1 Principe général de la sélection conventionnelle**

Un nombre important de revues a été publié pour décrire le principe de la méthodologie SELEX [8-13]. En pratique, un protocole d'identification d'aptamères en série ARN comporte cinq étapes pour sélectionner des acides nucléiques se fixant spécifiquement et avec une forte affinité à une molécule cible choisie (aptamères) (*figure 1*).

La première étape consiste à fabriquer par synthèse chimique une banque d'ADNs simples brins servant de matériel de départ à la sélection. Les molécules de la banque comportent une séquence aléatoire de  $n$  nucléotides (soit  $4^n$  possibilités pour une séquence de  $n$  nucléotides) encadrée par deux séquences constantes correspondantes aux zones d'hybridation de deux amorces d'amplification. Pour des raisons expérimentales (synthèse et volume des échantillons à analyser), la limite supérieure de complexité analysable est de l'ordre de  $10^{15}$  molécules, ce qui correspond à des bibliothèques de séquences comportant 25 positions totalement aléatoires ( $4^{25} = 10^{15}$ ). Ainsi si davantage de positions sont entièrement dégénérées, l'échantillon ne contiendra pas un exemplaire de chaque molécule possible. Les molécules d'ADNs sont ensuite transcrites en bibliothèque d'ARNs simples brins par une

ARN polymérase (étape 2) puis mises en contact avec la molécule cible par l'utilisation de différentes techniques de séparation qui seront abordées par la suite (étape 3). Les molécules affines sont séparées des molécules non fixées puis converties en ADN à simple brin par transcription inverse (étape 4). Les séquences sélectionnées sont enfin amplifiées par la méthode PCR (« Polymérase Chain Reaction ») (étape 5).

Au terme de cette cinquième étape, une bibliothèque enrichie en candidats intéressants est obtenue. Le taux d'enrichissement sera fonction des conditions de sélection qui sont déterminantes pour l'évolution de la population. Ce cycle est renouvelé jusqu'à ce que le rapport séquences actives / séquences inactives n'évolue plus. On obtient ainsi au fur et à mesure des cycles une nouvelle banque d'ADNs enrichie en molécules, complexant spécifiquement la cible d'intérêt, dont les représentants sont clonés, séquencés puis synthétisés.



**Figure 1 :** Principe général de la sélection *in vitro* d'acides nucléiques par colonne d'affinité (SELEX).

A noter, la sélection d'aptamères en série ADN est beaucoup plus simple puisqu'elle ne nécessite pas les conversions ADN → ARN et ARN → ADN et dispense donc des étapes de transcription et de transcription inverse.

Généralement, une analyse comparée des séquences sélectionnées révèle fréquemment des motifs consensus importants pour la fixation de la molécule cible. Des expériences

introduisant des mutations ou des délétions peuvent être réalisées afin de localiser la séquence minimale de l'oligonucléotide permettant la fixation.

En général, 3 à 15 cycles de sélection sont nécessaires, cependant le nombre de cycles à réaliser dépend de la nature et de la concentration du ligand, de la longueur de la séquence aléatoire, de l'efficacité des méthodes de séparation, de la quantité de la cible par rapport à la quantité d'oligonucléotides présents dans la bibliothèque ainsi que de la pression de sélection. La procédure de sélection peut prendre quelques jours à quelques mois, mais il faut compter en moyenne 2 à 4 semaines.

## **I.2 Les techniques de séparation utilisées pour la SELEX**

Lors de l'étape de sélection proprement dite, différentes méthodes sont employées pour séparer les séquences affines des séquences non affines. La revue de Bose Gopinath [14] résume les différentes méthodes de séparation utilisées pour la méthode SELEX.

Lorsque la molécule cible n'est pas immobilisée, la technique de séparation la plus couramment employée est une filtration sur membrane de cellulose ou sur filtres [1]. La centrifugation est également utilisée comme méthode de séparation en solution [15] mais plus récemment, l'électrophorèse capillaire a été développée avec succès pour une séparation efficace des séquences d'ADNs/ARNs liées de celles non affines [16,17].

Dans le cas où la molécule cible est immobilisée, la séparation est dépendante des conditions d'immobilisation et une élution par affinité est utilisée pour libérer les molécules d'ADNs/ARNs liées. Les techniques les plus souvent utilisées sont la chromatographie d'affinité [2], l'utilisation de billes magnétiques [18], ou la séparation par résonance plasmonique de surface [19].

Afin d'améliorer la spécificité de l'aptamère, des étapes de sélections négatives (rejet des séquences fixant le support) ainsi que des contre-sélections (rejet des séquences fixant des structures similaires à la molécule cible [20]) sont couramment utilisées antérieurement à la sélection positive.

### **I.3 Les inconvénients de la méthode**

La procédure de sélection par la méthode SELEX conventionnelle présente quelques points négatifs. En effet, lorsque la sélection est réalisée sur un support, la molécule cible est généralement immobilisée par l'intermédiaire d'un bras espaceur sur celui-ci. La molécule d'intérêt n'est pas entièrement disponible pour interagir avec les oligonucléotides de la bibliothèque puisqu'une partie de la molécule est liée au bras espaceur. De ce fait, les aptamères pouvant se lier à la molécule cible par l'intermédiaire de la partie de la molécule non disponible seront exclus et considérés comme des séquences non affines.

Dans le cas de la sélection par chromatographie d'affinité (*figure 1*), il est nécessaire d'éliminer les séquences se liant de façon non spécifique au support en testant au préalable les oligonucléotides de la banque sur le support chromatographique (sélection négative). Ce qui engendre une contrainte de temps nécessaire à la préparation de cette colonne.

D'autre part, il est important de noter que les séquences fortement liées à la molécule d'intérêt pourront être difficiles à éluer (cinétique de désorption lente).

En utilisant la technique SELEX conventionnelle, des aptamères ayant des constantes de dissociation de l'ordre du nanomolaire peuvent être sélectionnés. Cependant, des constantes de dissociation de l'ordre du picomolaire ont déjà été obtenues par des essais d'affinité en utilisant des anticorps. Ainsi, la technique de sélection des aptamères doit être améliorée pour permettre la sélection d'oligonucléotides bien plus affins afin d'obtenir des constantes d'affinité comparables voire supérieures à celles obtenues pour les anticorps.

De plus, les acides nucléiques, et particulièrement les acides ribonucléiques (ARNs), sont rapidement dégradés *in vitro* et *in vivo* par des ribonucléases. La manipulation de ces molécules est difficile et on voit d'emblée que l'utilisation *in vivo* des aptamères en série ARN en tant que médicament n'est pas envisageable sachant que leur durée de vie moyenne dans l'organisme est de l'ordre de la minute.

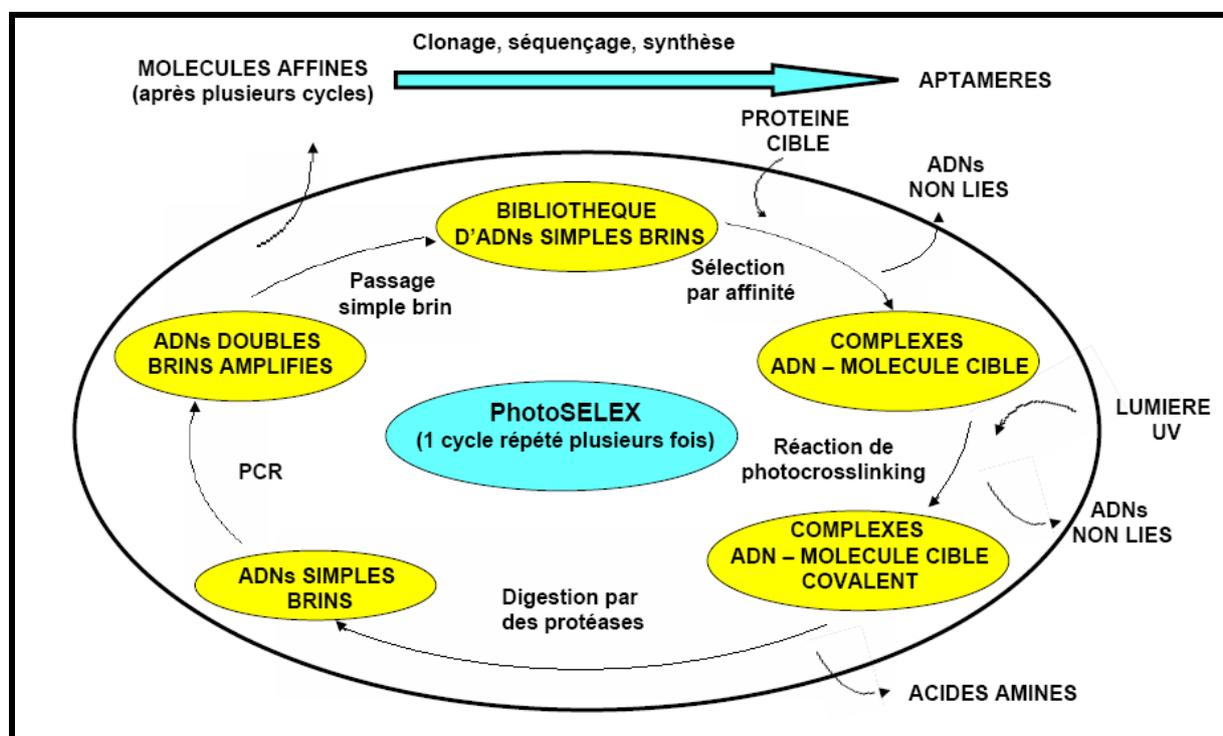
Enfin, la SELEX conventionnelle est une technique relativement longue et laborieuse qui nécessite plusieurs semaines de manipulation pour permettre l'obtention d'un aptamère. Une procédure plus rapide et plus simple est donc nécessaire pour accroître son utilisation.

## I.4 Les améliorations de la technique SELEX conventionnelle

### I.4.1 Les améliorations de l'affinité

Afin d'améliorer la capacité de fixation des aptamères, une nouvelle technique de sélection a été décrite par Jensen et ses collaborateurs [21] sur des aptamères en série ARN contre la protéine *Rev* du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).

Le principe de base de la PhotoSELEX (*Photochemical Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (**figure 2**) consiste à substituer une des bases au sein de la bibliothèque aléatoire d'oligonucléotides par un nucléotide photoactivable [22]. Le choix du nucléotide est critique : il doit subir une réaction efficace en présence de lumière mais doit être non réactif et stable en absence de photoactivation. D'autre part, la substitution ne doit pas interférer avec l'activité de la polymérase lors de la PCR. Ainsi, la 5-bromo-2'-désoxyuridine (BrdU) substitue couramment la thymidine. La 5-bromouracile est normalement relativement non réactive mais subit une réaction en présence de groupements aromatiques ou de thiols lorsqu'elle est irradiée en lumière UV (environ 310 nm). Elle est reconnue par des polymérases nécessitant, cependant, un nombre plus important de cycles de PCR.



**Figure 2 :** Principe général de la PhotoSELEX.

Comme la SELEX conventionnelle, la photoSELEX consiste à incuber une bibliothèque aléatoire en présence de protéines cibles immobilisées par exemple sur des billes magnétiques [21]. Le mélange est ensuite exposé à la lumière UV par l'intermédiaire d'un laser. Les séquences contenant une 5-bromouracile en interaction avec un groupement aromatique ou un thiol subiront une réaction photochimique conduisant à la formation d'une liaison covalente avec la molécule cible. Le mélange est ensuite lavé pour éliminer les séquences non liées. Après lavage, des protéases sont utilisées pour libérer les séquences liées aux molécules cibles et permettre l'amplification par PCR. Ensuite, le cycle est renouvelé.

La photoSELEX permet typiquement la sélection d'aptamères avec des constantes de dissociation de l'ordre du picomolaire pour des protéines cibles en 6-8 cycles de sélection [23]. Cette méthode permet une amélioration de l'affinité d'un facteur 2 ou 3 par rapport à la SELEX conventionnelle. La photoSELEX possède deux caractéristiques principales qui expliquent l'obtention de cette forte affinité. Premièrement, l'orientation et la proximité de la 5-bromouracile avec un groupement aromatique ou un thiol de la cible est importante pour permettre une réaction. Seules les séquences possédant une interaction très spécifique avec la molécule d'intérêt pourront réagir en présence de lumière UV. Les séquences interagissant seulement superficiellement seront éliminées. Deuxièmement, la formation d'une liaison covalente avec la molécule cible permet la réalisation d'étapes de lavages drastiques ce qui permettra l'élimination des ligands peu spécifiques.

Une limitation à cette technique est la nécessité de posséder un des groupements réactifs cité précédemment. Cette méthode est peu applicable aux petites molécules.

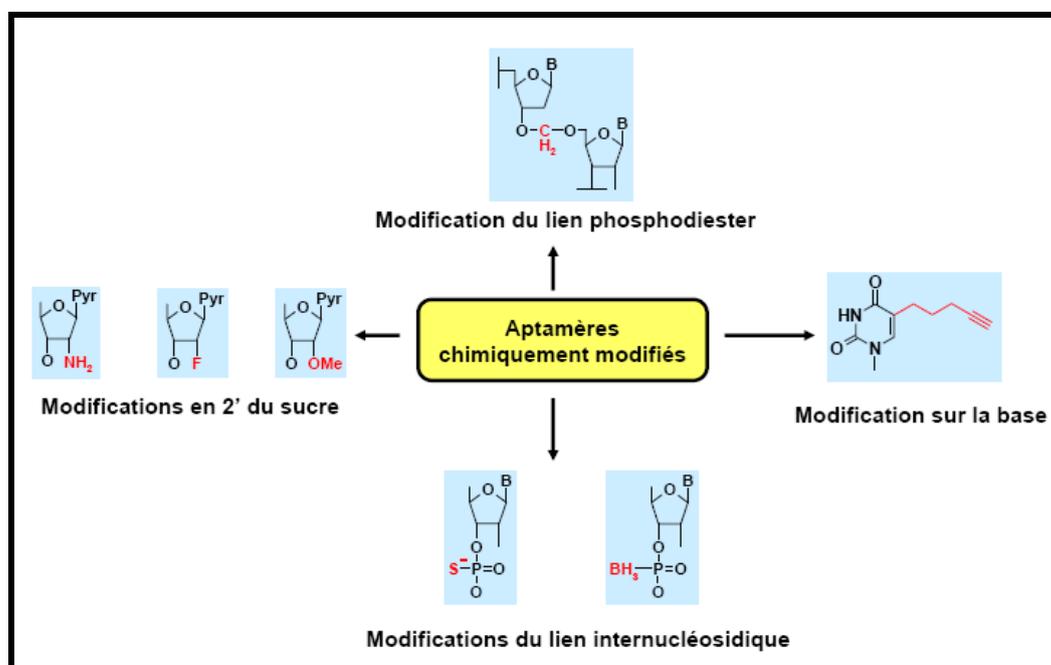
#### ***1.4.2 Les améliorations de la stabilité***

L'utilisation des aptamères dans un organisme vivant impose des contraintes bien connues de ceux qui développent des oligonucléotides antisens. Les ADNs et ARNs naturels sont rapidement dégradés par des nucléases. En particulier, les nucléases dégradent les oligonucléotides présents dans le plasma en quelques secondes voire quelques minutes [24]. Plusieurs approches ont été développées pour améliorer la stabilité *in vivo* des aptamères.

### 1.4.2.1 Les modifications chimiques des oligonucléotides

#### ❖ Les modifications pré-SELEX :

Une première approche fut l'introduction d'oligonucléotides non naturels dans la SELEX ce qui résulte en l'obtention d'aptamères modifiés insensibles aux nucléases (*figure 3*). Dans tous les cas, ces modifications doivent être compatibles avec les enzymes utilisées pendant les étapes d'amplification (polymérase), ce qui restreint considérablement leur choix. En pratique, seules certaines modifications chimiques en 2' du ribose augmentent la stabilité des oligonucléotides tout en restant compatibles avec l'utilisation des polymérase. Les nucléotides 2'-Amino, 2'-Fluoro et 2'-OMéthyle peuvent être ainsi employés dès le début de la sélection.



**Figure 3 :** Les modifications chimiques des aptamères.

En 1994, un aptamère contenant des 2'-NH<sub>2</sub>-2'-désoxypyrimidines à la place des 2'-OH-pyrimidines a été le premier aptamère modifié sélectionné [25]. Des bibliothèques aléatoires d'ARNs contenant des nucléotides modifiés ont pu être utilisées avec succès pour la sélection d'aptamères contre différentes molécules cibles incluant le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF) [26], la L-sélectine [27], le facteur de croissance des kératinocytes humains (hKGF) [28] et l'hormone stimulant la thyroïde humaine (hTSH) [29]. Les aptamères obtenus en série ARN, modifiés au niveau de la position 2' de la pyrimidine par un NH<sub>2</sub>, présentent une nette amélioration de la stabilité en comparaison des aptamères

ARN 2'-OH modifiés. Par exemple, la modification chimique de l'aptamère sélectionné contre le facteur de croissance des kératinocytes humains (hKGF) [28] a permis d'augmenter sa demi-vie dans le sérum humain de 8 secondes à 174 heures soit une augmentation d'environ 80000 fois. De la même façon, la stabilité de l'aptamère contre le bFGF a été amélioré d'environ 1000 fois [26]. Cependant, cette amélioration de la stabilité se fait au dépend de fixations plus faibles aux températures physiologiques et de séquences de fixation plus longues. Ce phénomène peut s'expliquer par une baisse de la stabilité des duplexes ADN/ADNs, ARNs/ARNs, et ADN/ARNs [30,31].

En revanche, les nucléotides modifiés en 2' par un fluor, également reconnus par les polymérase, montrent une haute stabilité thermique. Ainsi, un aptamère sélectionné à partir d'une bibliothèque aléatoire contenant des oligonucléotides modifiés par un 2'-F-2'-désoxypyrimidine [32] contre le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) possède une affinité supérieure pour le VEGF par rapport aux aptamères 2'-NH<sub>2</sub>-2'-désoxypyrimidines [33]. Un des aptamères fluoré le plus affin sélectionné est un aptamère contre le hKGF avec une constante de dissociation de l'ordre du picomolaire [28].

Plus récemment, les nucléotides 2'-O-Méthyle ont également été employés dès le début de la sélection [34] grâce à l'utilisation de polymérase mutantes permettant d'incorporer ces précurseurs [35].

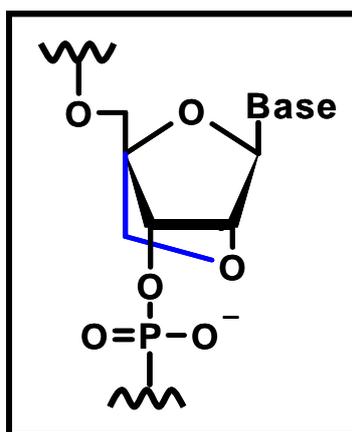
Une approche alternative au remplacement de l'hydroxyle en 2' du ribose consiste à modifier le squelette des nucléotides [36]. Cependant, les groupements chimiques utilisés sont rarement intégrés par les enzymes nécessaires à la SELEX, à l'exception notable des nucléotides phosphorothioates [37] et des nucléotides boranophosphates, où un oxygène non pontant du groupement phosphodiester est substitué par un soufre ou un groupement borane (BH<sub>3</sub>). Enfin, des modifications plus drastiques du lien phosphodiester (lien formacétal) ont parfois été employées pour l'optimisation d'un aptamère sélectionné [38]

Les modifications affectant les bases restent rares, même si une sélection réussie employant des 5-(1-pentynyl)-2'-désoxyuridines a été décrite dans la littérature [39].

#### ❖ **Les modifications post-SELEX :**

Les aptamères peuvent également être modifiés chimiquement après la sélection (modifications post-SELEX) et / ou conjugués à une chaîne de polyéthylène glycol (PEG), à un lipide, à une lipoprotéine ou à un liposome afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques [32,33].

La formation d'acides nucléiques verrouillés ou *Locked Nucleic Acids* (LNAs) [40] permet également de stabiliser les aptamères. Les nucléotides LNAs (**figure 4**), introduits en post-SELEX, sont formés d'un sucre bicyclique par liaison de l'oxygène en 2' avec le carbone en 4' par l'intermédiaire d'un groupement méthylène. Ces nucléotides modifiés permettent la stabilisation des aptamères puisqu'ils engendrent une meilleure stabilité thermique, et une résistance à la dégradation par les nucléases [41,42].



**Figure 4** : Structure des acides nucléiques verrouillés (LNAs) [40].

Tous ces nucléotides modifiés induisent des variations stériques et électroniques par rapport au motif naturel et ne sont donc pas sans conséquence sur la structure des oligonucléotides résultants. D'autre part, l'introduction de nucléotides non naturels implique le risque d'avoir des effets secondaires causés par l'administration de ces aptamères modifiés. Ainsi le potentiel toxicologique des 2'-F-pyrimidines a été évalué par des expériences réalisées sur des rats et des marmottes d'Amérique [43,44]. Ces études suggèrent que l'administration de ces composés comme agents thérapeutiques peut mener à l'incorporation de pyrimidine fluorée en 2' du ribose dans l'ADN cellulaire. Cependant, ces études montrent également que ceci implique des conséquences toxicologiques marginales.

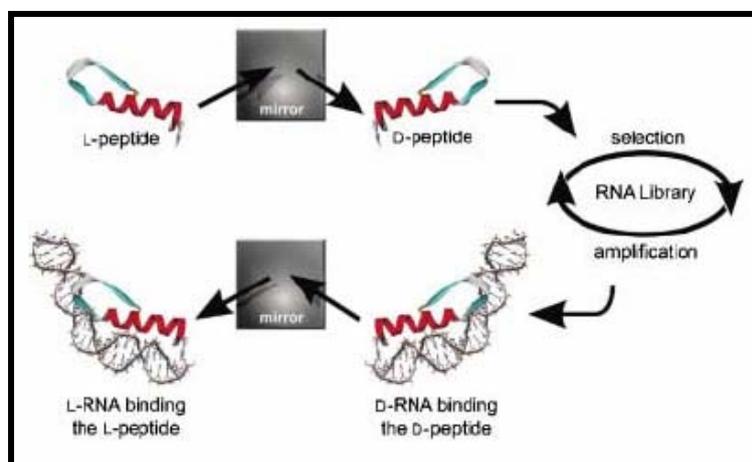
Deux aptamères 2'-F-pyrimidines en série ARN, possédant un potentiel thérapeutique, ont été développés, par le groupe de Sullenger, contre le facteur de coagulation IXa et l'angiopoïétine 2 [45,46]. Actuellement, un aptamère pegaptanib sodium 2'-F-pyrimidine en série ARN a été autorisé pour la mise sur le marché (Macugen, Pfizer) [32] en 2005 pour son effet inhibiteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. Cet aptamère est ainsi indiqué pour le traitement de la néovascularisation choroïdienne sous-fovéale secondaire à la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (cf § II-3-4).

L'expérience acquise jusqu'à présent montre que les conséquences des modifications chimiques d'un aptamère introduites, après la sélection, sont difficilement prédictibles. Une solution élégante qui tire parti des propriétés d'isomérisation optique des macromolécules biologiques a été proposée pour améliorer la stabilité des aptamères sélectionnés.

#### 1.4.2.2 La stratégie image-miroir

Furste et ses collaborateurs ont découvert une nouvelle solution au problème d'instabilité des aptamères lorsqu'ils ont réalisé que les nucléases, qui limitent la stabilité des aptamères *in vivo*, reconnaissent seulement l'isomère D (naturel) des acides nucléiques [24,47-49]. En effet, les nucléases sont constituées d'acides aminés en série L. Par conséquent, la structure des nucléases étant chirale, ceci résulte en une reconnaissance stéréosélective du substrat. Comme les acides nucléiques sont composés de nucléotides en série D, un oligonucléotide en série L devrait échapper à la reconnaissance enzymatique et donc à la dégradation. Malheureusement, de la même façon, cet oligonucléotide en série L, image dans un miroir de l'aptamère naturel, ne peut être amplifié par les polymérases qui sont également énantiométriques du substrat naturel. Ainsi, les aptamères en série L ne peuvent être obtenus par la technique SELEX.

Pour surmonter cet obstacle, Furste et ses collaborateurs ont réalisé la SELEX en utilisant l'image dans un miroir de la molécule cible, afin d'obtenir un aptamère naturel reconnaissant cette cible non naturelle. Ils ont montré que l'image de cet aptamère dans un miroir (l'aptamère en série L), reconnaît par réciprocité la cible naturelle. Cet aptamère est donc synthétisé en utilisant des nucléotides en série L non naturels (*figure 5*). Ce processus de sélection en image-miroir permet la génération d'oligonucléotides biostables.

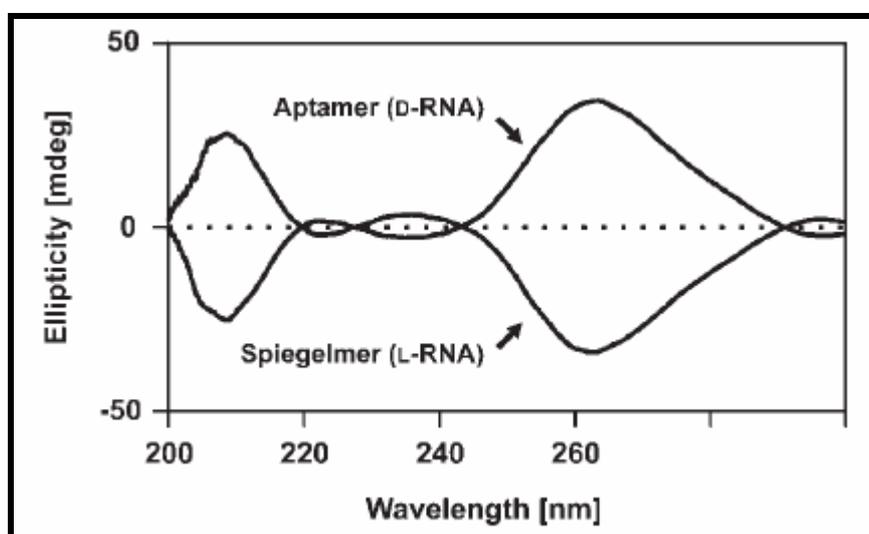


**Figure 5 :** La technique spiegelmer : la sélection *in vitro* en image-miroir [24].

Cette approche regroupe plusieurs principes chiraux au sein de la technique SELEX. Ceci résulte en l'obtention d'oligonucléotides ligands non naturels qui reconnaissent une molécule cible naturelle non seulement avec une haute affinité et spécificité mais également avec une bonne stabilité biologique *in vivo* et *in vitro*. De tels oligonucléotides en série L sont nommés « spiegelmers » (du mot allemand « Spiegel » qui signifie miroir).

Les premiers spiegelmers ont été utilisés pour fixer de petites molécules telles que l'arginine et l'adénosine [47,49]. Ces aptamères montrent la biostabilité attendue ; en ce qui concerne le spiegelmer L-ARN contre l'adénosine, aucune dégradation n'est observée après 60 heures d'incubation à 37°C [47]. De plus, le spectre de dichroïsme circulaire de l'aptamère fixant l'adénosine (D-ARN) et du spiegelmer (L-ARN) indique que les structures tertiaires des deux oligonucléotides ont également été inversées à la manière de deux images dans un miroir (*figure 6*). Par conséquent, l'inversion chirale est responsable d'une inversion de la spécificité chirale de l'oligonucléotide. L'image dans un miroir de l'oligonucléotide naturel reconnaît avec la même affinité et spécificité l'image dans un miroir de la cible.

Il faut cependant noter que cette approche est limitée aux molécules cibles dont l'énantiomère non naturel peut être synthétisé. Ceci est possible pour de courts peptides mais la sélection contre des protéines de grande taille devient problématique.



**Figure 6 :** Spectre de dichroïsme circulaire de l'aptamère fixant l'adénosine (D-ARN) et du spiegelmer (L-ARN) [50].

### **I.4.3 Les améliorations du temps nécessaire à la sélection**

#### **I.4.3.1 L'automatisation de la sélection**

Comme précédemment cité, la technique SELEX conventionnelle est une méthode de sélection longue, répétitive, et non applicable à des sélections à haut débit. Pour surmonter cette limitation, ces dernières années, de nombreuses tentatives pour automatiser la sélection *in vitro* ont été réalisées.

Ellington et ses collaborateurs ont reconnu cette limitation et ont donc automatisé le processus de sélection pour éliminer toute intervention humaine durant les trois étapes de la SELEX, à savoir la sélection, la purification et l'amplification [18,51-53]. Le premier protocole automatisé de la SELEX, constitué d'un robot Beckmann Biomek 2000, a été publié en 1998 [52]. Ce robot a été utilisé avec succès pour améliorer la sélection de molécules d'ARNs fixant un oligonucléotide riche en désoxythymidine (dT). Cet appareil est constitué d'un module thermostaté effectuant la PCR, d'un séparateur par billes magnétiques, d'un plateau contenant les échantillons, et d'un module permettant de les pipeter. Cette automatisation permet la réalisation de 9 cycles de sélection en seulement un jour au lieu de plusieurs semaines avec la SELEX conventionnelle.

Cette sélection automatisée a été améliorée par la suite en substituant la séparation par billes magnétiques par une technique de filtration sur filtres, plus efficace. Ce nouveau protocole a été appliqué pour sélectionner des aptamères en série ADN contre le lysozyme du blanc d'œuf des poules. L'aptamère ainsi obtenu possède une constante d'affinité  $K_d = 31$  nM pour la molécule ciblée et permet une inhibition de la lyse cellulaire [18]. Les auteurs ont déclaré que cette plateforme automatisée a la capacité de réaliser 8 sélections en parallèle, exécutant 12 cycles en 2 jours.

De la même façon, la SELEX automatisée a été développée avec succès pour la sélection d'aptamères contre des protéines telles que la CYT-18 (une ARN synthétase transférant la tyrosine au niveau de la mitochondrie de *Neurospora crassa*), MEK-1 (une MAP kinase humaine) et Rho (une protéine de terminaison de la transcription chez *Thermotoga maritima*) avec des constantes de dissociation variant du nanomolaire au picomolaire [53]. Pour améliorer davantage la méthode, ils ont développé une procédure automatisée avec un système de transcription et de traduction de protéines *in vitro* dans le robot et, pour permettre une immobilisation spécifique, ils ont également utilisé une biotinylation *in vitro* [51]. Pour montrer l'applicabilité de cette méthode, les auteurs ont

sélectionné des aptamères contre la ribonucléoprotéine humaine U1A, une des composantes du spliceosome présente dans le noyau des cellules eucaryotes. Les séquences sélectionnées miment les séquences et les motifs de fixation naturels.

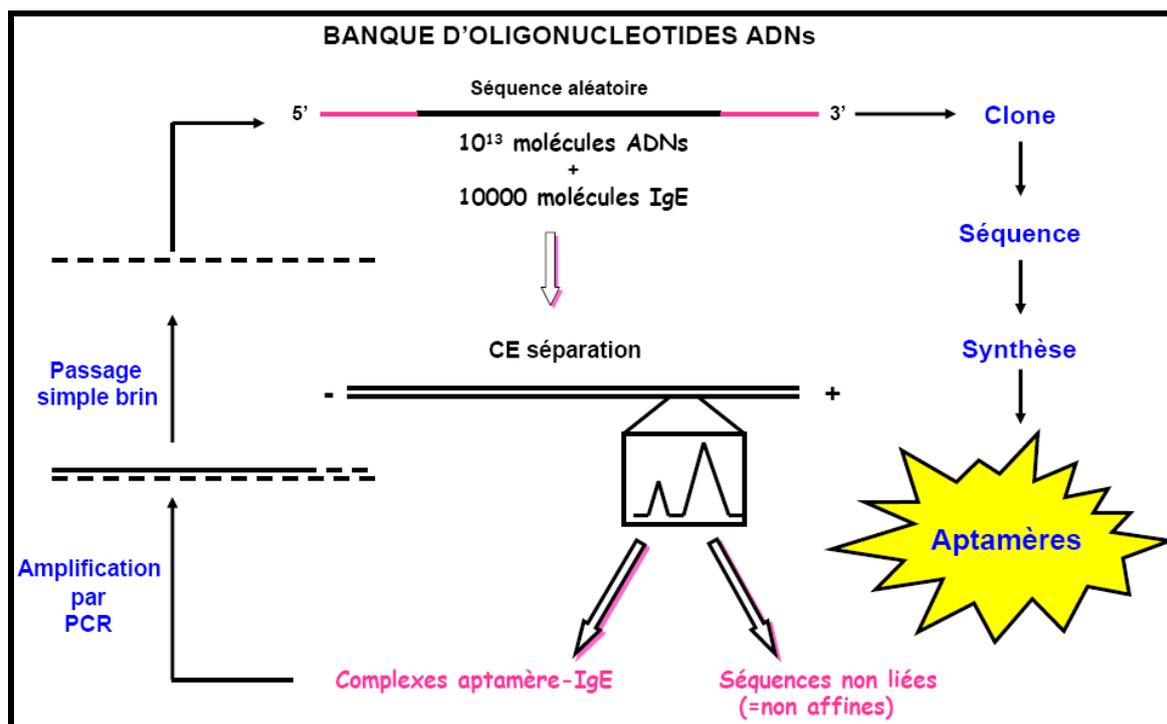
En 2005, Eulberg et ses collaborateurs [54] ont développé un système d'automatisation de la SELEX permettant une grande flexibilité et adaptabilité en terme du choix de tampon et des conditions de sélection. Le robot utilisé est un RoboAmp 4200 E (MWG Biotech, Allemagne) ayant la capacité de réaliser 2 cycles de sélection par jour ce qui est donc moins rapide que le système développé par Cox et Ellington [18]. Ce système est cependant beaucoup plus flexible et les échantillons sont traités de la même façon que manuellement, ce qui permet d'augmenter les chances de succès de la sélection. Ils ont ainsi sélectionné un aptamère en série ARN spécifique de l'image dans un miroir de la substance P (D-peptide). Dans le but d'obtenir un oligonucléotide antagoniste de la substance P ayant un potentiel thérapeutique, donc résistant aux nucléases, les auteurs ont utilisé le spiegelmer de l'aptamère sélectionné c'est-à-dire l'ARN en série L. Cet aptamère ainsi sélectionné fixe et inhibe la substance P en série L naturelle avec un  $K_d$  de 40 nM et une  $IC_{50}$  de 45 nM.

Très récemment, en 2006, Hybarger et ses collaborateurs [55] ont introduit un prototype automatisé de la SELEX microfluidique. Celui-ci repose sur de simples gradients de pression pour charger et permettre le transport des réactifs à travers des microcanaux. Il est composé d'un dispositif d'injection par pression, de microtubes permettant le stockage des réactifs, d'une machine PCR thermostatée, et de valves permettant le cheminement des échantillons. Les modules correspondant à chaque étape de la sélection peuvent être facilement enlevés ou modifiés. Bien que l'injection des échantillons se fasse de façon manuelle, les étapes suivantes sont automatisées. Ce prototype de SELEX microfluidique est capable de réaliser la transcription, la sélection, la transcription inverse et l'amplification par PCR de façon automatisée. Un aptamère en série ARN contre le lysozyme a été sélectionné manuellement et en utilisant cette machine. Ces deux méthodes ont permis l'obtention d'aptamères identiques, ce qui a permis de valider ce prototype. Ce dernier permet la sélection mais également la synthèse de l'aptamère anti-lysozyme ce qui a été vérifié par une analyse de la séquence. Il s'agit d'un nouvel outil de miniaturisation de la SELEX qui permet une réduction de sa durée, de son coût et qui prend moins de place.

### 1.4.3.2 La CE-SELEX

Mendonsa et Bowser ont montré que l'électrophorèse capillaire (CE) peut être utilisée pour améliorer les sélections d'aptamères (CE-SELEX) [16,17]. En effet, l'électrophorèse capillaire présente de nombreux avantages, par rapport aux autres techniques précédemment évoquées utilisées pour la SELEX, telles qu'une rapidité d'analyse, une bonne capacité de résolution et une faible quantité de produit nécessaire à l'analyse. Des aptamères possédant de faibles constantes de dissociation peuvent être isolés en seulement deux cycles de sélection ce qui est largement plus rapide que la SELEX conventionnelle qui peut prendre plusieurs semaines. D'autre part, avec la SELEX conventionnelle, les interactions non spécifiques avec les supports (filtres ou supports chromatographiques) sont souvent problématiques. Avec la CE-SELEX, la sélection a lieu en solution ce qui élimine les inconvénients de la méthode, évoqués précédemment, liés à la présence du support chromatographique ainsi qu'à la présence d'un bras espaceur. Les sélections négatives couramment utilisées dans la méthode conventionnelle n'ont pas lieu d'être pour la CE-SELEX ce qui simplifie considérablement la méthode. Un autre avantage moins évident de la CE-SELEX est le nombre de séquences d'aptamères obtenu. Après 8 - 12 cycles de sélection conventionnelle, souvent des motifs de séquence prédominant (séquence consensus). Ces motifs ne sont pas observés en CE-SELEX, ce qui indique que l'hétérogénéité du pool reste élevée même après sélection [16,17,56,57]. Ceci suggère que la CE-SELEX fournit un nombre plus important de séquences indépendantes possédant une forte affinité par rapport à la sélection par la méthode conventionnelle.

Bowser et ses collaborateurs ont sélectionné un aptamère spécifique de l'immunoglobuline E (IgE) par CE-SELEX [16,17] (*figure 7*). Cette méthode implique une séparation des espèces liées basée sur les différences de mobilité dues à la formation du complexe aptamère-molécule cible. Pour cette sélection, les auteurs ont utilisé un capillaire recouvert de poly(vinyl)alcool de 40,2 cm de longueur et avec un diamètre interne de 50  $\mu\text{m}$ . Le mélange contenant les oligonucléotides aléatoires et l'IgE sont introduits dans le capillaire par une pression de 5 psi (Pound per Square Inch) pendant 5 secondes et sont détectés à 254 nm. Sous l'application du champ électrique, en mode anodique (-20 kV), les ADNs non spécifiques seront récoltés en premier et, les ADNs liés à l'IgE migreront beaucoup moins rapidement. Ces ADNs liés sont ensuite amplifiés par PCR puis utilisés en simple brin pour un nouveau cycle.



**Figure 7 :** Schéma décrivant le principe de la CE-SELEX appliqué à l'étude de Mendonsa et Bowser [16].

Par cette méthode, différents clones ont été obtenus après le deuxième et le quatrième cycle de sélection avec des constantes de dissociation de 27 à 84 nM, légèrement supérieures à celles obtenues avec la SELEX conventionnelle. En effet, un aptamère spécifique de l'IgE a également été sélectionné par la SELEX conventionnelle et présente un  $K_d$  de 6 nM en 15 cycles de sélection [58]. De plus, après seulement 2 cycles de sélection de CE-SELEX, environ 100% des séquences sélectionnées dans la bibliothèque d'ADNs fixent l'IgE. Ce taux d'enrichissement est important si on le compare avec un taux obtenu par la SELEX (50, 93 et 100% après 6, 12 et 18 cycles, respectivement) [51].

Les  $K_d$  typiquement obtenues par CE-SELEX sont de l'ordre du nanomolaire voire du picomolaire. En effet, un aptamère spécifique de la transcriptase inverse du VIH-1 possédant un  $K_d$  de 180 pM, a été sélectionné par cette méthode [56]. Ces aptamères ainsi sélectionnés possèdent également une haute sélectivité pour leurs molécules cibles.

Le **tableau 1** permet une comparaison du nombre de cycles de sélection ainsi que des constantes de dissociation obtenues pour différentes molécules cibles par CE-SELEX et par SELEX conventionnelle [59]. Nous pouvons observer que le nombre de cycles de sélection est toujours inférieur en CE-SELEX et, selon les molécules cibles, l'affinité des aptamères sélectionnés est parfois meilleure en CE-SELEX par rapport à celle obtenue par la SELEX conventionnelle (cas de la transcriptase inverse du VIH par exemple).

**Tableau 1:** Comparaison des aptamères sélectionnés par CE-SELEX et par la SELEX conventionnelle.

Molécules cibles	CE-SELEX		SELEX	
	K <sub>d</sub> (nM)	Cycles	K <sub>d</sub> (nM)	Cycles
IgE	23 ± 12 [16]	4	6 [58]	15
RT-HIV	0,18 ± 0.07 [56]	4	1 [60]	12
Neuropeptide Y	300 ± 200 [57]	4	370 [61]	12
PFTase	0.5 [62]	1	nd	-
MutS	3,6 ± 0.5 [63]	3	nd	-
Kinase C-δ	122 [64]	9	nd	-
Ricine	58 ± 19 [65]	4	105 ± 41 [65]	9

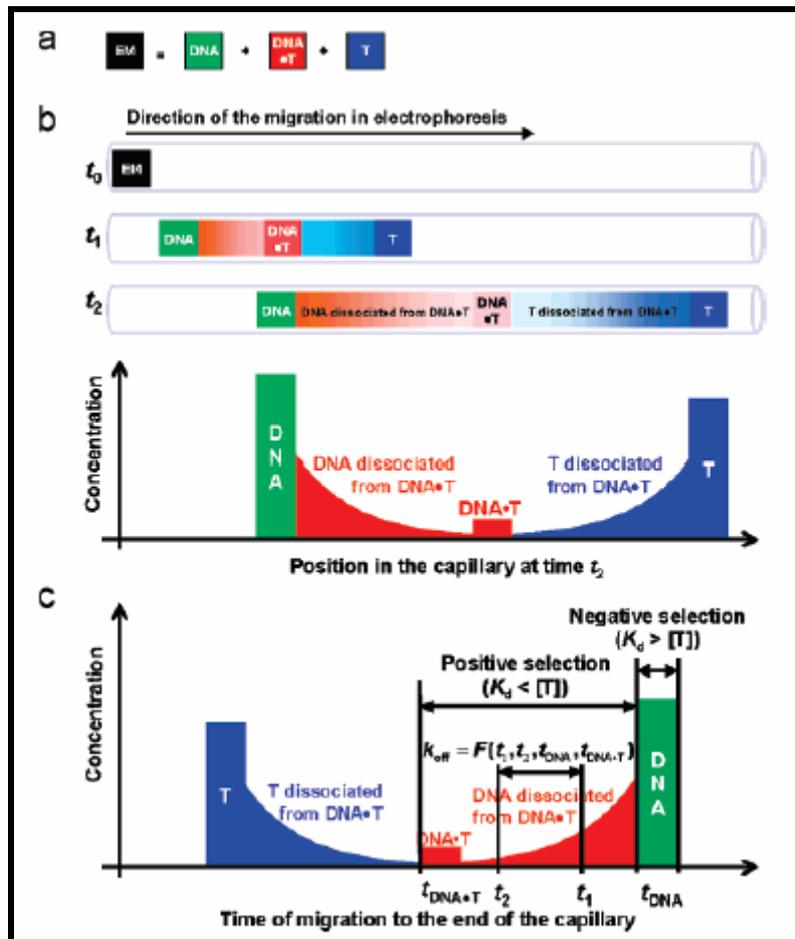
Une limitation de cette technique est la nécessité d'avoir une différence de mobilité électrophorétique suffisamment importante entre les acides nucléiques liant les molécules cibles et les oligonucléotides non affins. Lorsque la cible présente un poids moléculaire important (IgE ~ 200 kDa, RT-HIV-1 ~ 120 kDa, la protéine farnésyltransférase (FTase) ~ 45 - 48 kDa [62]), le complexe ADN (~ 25 kDa) - molécule cible est suffisamment retardé pour permettre la séparation. A noter cependant que la CE-SELEX a pu être appliquée à de petites molécules. Mendonsa et Bowser ont réussi à sélectionner un aptamère spécifique du neuropeptide Y, un peptide de 36 acides aminés (4,2 kDa) [57]. Pour améliorer la résolution entre les complexes aptamère-protéine et les acides nucléiques non liés, les auteurs ont utilisé des concentrations en ADN simple brin plus faibles que celles utilisées habituellement.

La CE-SELEX possède un autre inconvénient qui repose sur le volume injecté (de l'ordre du nanolitre). Seulement une quantité limitée de brins d'oligonucléotides ADNs peut être injectée sans surcharger la colonne, ce qui limite le nombre de séquences d'ADNs utilisées pour la sélection ( $10^{13}$  vs  $10^{15}$  séquences utilisées en SELEX conventionnelle). Pour surmonter cette limitation et permettre l'utilisation d'un nombre de séquences dans la bibliothèque plus important, les solutions proposées sont une augmentation de la concentration des bibliothèques d'ADNs simples brins, une augmentation du diamètre interne du capillaire utilisé pour la séparation ou une augmentation du nombre de cycles réalisés par électrophorèse capillaire [57].

**1.4.3.3 Electrophorèse capillaire en équilibre de mélanges en équilibre (ECEEM) et Electrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM)**

Il faut noter que très peu de sélections d'aptamères ont été réalisées par CE-SELEX car les méthodes d'électrophorèse capillaire conventionnelles telles que l'électrophorèse capillaire de zone et l'électrophorèse capillaire d'affinité ne sont pas des méthodes fournissant des paramètres cinétiques. Ainsi, la CE-SELEX ne répond pas aux 3 conditions nécessaires aux techniques de sélection des aptamères incluant : (1) une bonne efficacité de séparation entre les séquences affines et les séquences non liées, (2) la capacité à déterminer les paramètres d'interaction aptamère-molécule cible ( $K_d$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) et, (3) la capacité à sélectionner des aptamères dont les paramètres de fixation sont prédéterminés. Deux techniques : l'électrophorèse capillaire en équilibre de mélanges en équilibre (ECEEM) et l'électrophorèse capillaire en non-équilibre de mélanges en équilibre (NECEEM), développées par Krylov et ces collaborateurs, satisfont ces 3 conditions.

Le principe de la sélection des aptamères basé sur la NECEEM est illustré à la *figure 8*.



**Figure 8 :** Schéma décrivant le principe de la sélection d'aptamères par NECEEM [66].

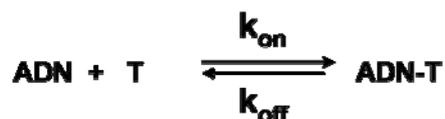
Dans la première étape, la bibliothèque d'ADNs (en vert) et la molécule cible T (en bleu) sont incubées ensemble afin de former un mélange en équilibre EM (en noir). Ainsi, les molécules d'ADNs ayant une forte affinité pour la molécule cible seront principalement liées, alors que les molécules ayant une faible affinité seront non liées. Donc, le mélange EM est constitué d'ADNs libres (en vert), de complexes ADN-molécule cible (ADN-T en rouge) et de molécules cibles non liées (en bleu) (*figure 8a*). Il faut noter que les auteurs utilisent une détection par fluorescence induite par laser (LIF) et que seul l'ADN et les complexes ADN-T sont détectables car seul l'ADN est marqué.

Dans une deuxième étape, le mélange EM est injecté dans le capillaire et un courant important est appliqué pour permettre la séparation de 2 fractions en équilibre : ADN-T et ADN libre par électrophorèse capillaire dans des conditions de non-équilibre (*figure 8b*). La principale différence entre ECEEM et NECEEM réside dans le fait que dans la première méthode, l'analyse se fait dans des conditions en équilibre c'est-à-dire que le tampon de migration contient la molécule cible à une concentration identique à celle présente dans le mélange en équilibre, alors que dans la deuxième méthode, le tampon de séparation ne contient ni ADN, ni molécule cible, l'analyse se fait donc dans des conditions de non-équilibre.

Dans l'exemple exposé, les conditions de la NECEEM sont telles que la mobilité de T est supérieure à celle de l'ADN. Ainsi la mobilité du complexe ADN-T est intermédiaire entre celles de l'ADN et de T. Donc, lorsque le champ électrique est appliqué, les zones contenant l'ADN, le complexe ADN-T et la molécule cible non liée sont séparées. Par la suite, dans le cas de la NECEEM, l'équilibre entre ADN libre et ADN complexé n'est pas maintenu, et les complexes commencent à se dissocier et ainsi libèrent ADN et T. Il peut être noté qu'étant donnée la rapidité de séparation en NECEEM, la fixation de l'ADN ou de T libérés est négligeable. Ainsi, l'ordre dans lequel les différents composants sont récoltés en sortie du capillaire est décrit à la *figure 8b* : tout d'abord la fraction T en équilibre, puis la fraction T dissociée du complexe pendant la NECEEM, ensuite les complexes ADN-T, puis l'ADN dissocié du complexe pendant la NECEEM et enfin, l'ADN libre en équilibre.

Selon le but de l'analyse, différentes fractions peuvent être récupérées (*figure 8c*). La sélection positive correspond à la collection de la fraction ADN-T liés en équilibre (en rouge) qui contient principalement les séquences d'ADNs ayant une forte affinité pour la molécule cible ( $K_d < [T]$ ). La sélection négative correspond à la récupération de la fraction contenant les ADNs libres en équilibre (en vert) qui contient principalement les séquences d'ADNs ayant une faible affinité pour la molécule cible ( $K_d > [T]$ ).

La NECEEM permet la sélection d'aptamères ADNs avec des paramètres cinétiques de fixation prédéterminés ( $K_d$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$ ) :

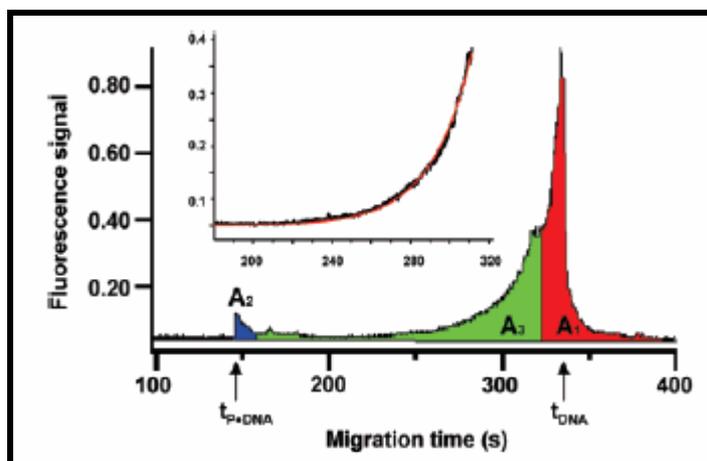


où  $k_{on}$  et  $k_{off}$  sont respectivement les vitesses de formation et de dissociation du complexe. Ces deux paramètres définissent la constante de dissociation à l'équilibre :  $K_d = k_{off} / k_{on}$ . Une caractéristique de la NECEEM est que les temps de migration délimitant la sélection positive définissent la valeur de  $k_{off}$  de l'ADN sélectionné :

$$k_{off} = \frac{t_{ADN} - t_{ADN-T}}{t_{ADN-T} (t_1 - t_2)} \ln \left[ \frac{t_{ADN} - t_2}{t_{ADN} - t_1} \right]$$

où  $t_{ADN-T}$  et  $t_{ADN}$  sont les temps de migration en NECEEM du complexe ADN-molécule cible et de l'ADN libre, respectivement.

La valeur de la constante de dissociation à l'équilibre peut être calculée grâce à la formule précédemment décrite par les auteurs [67] où  $[P]_0$  et  $[ADN]_0$  sont respectivement les concentrations totales en molécules cibles et ADNs introduites dans le mélange en équilibre (*figure 9*) et,  $A_1$ ,  $A_2$ , et  $A_3$  sont respectivement les aires des pics 1, 2, et de la partie exponentielle 3. Les surfaces  $A_1$ , et  $A_2 + A_3$  sont déterminées comme décrit par la *figure 9*.



$$K_d = \frac{[P]_0 (1 + A_1 / (A_2 + A_3)) - [DNA]_0}{1 + (A_2 + A_3) / A_1}$$

**Figure 9** : Détermination de la constante de dissociation à l'équilibre  $K_d$  à partir de la NECEEM [67].

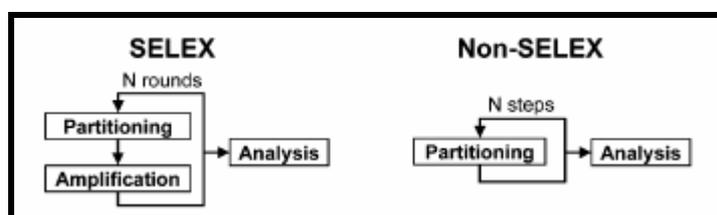
A partir des valeurs de  $K_d$  et de  $k_{off}$ , la valeur de  $k_{on}$  peut être déterminée grâce à la formule citée précédemment :  $k_{on} = k_{off} / K_d$ .

Cette technique présente de nombreux avantages : une grande efficacité de sélection, seulement quelques cycles sont nécessaires à l'obtention d'aptamères. De plus, elle permet également la détermination des paramètres cinétiques de fixation et d'obtenir des aptamères dont les paramètres  $K_d$ ,  $k_{on}$  et  $k_{off}$  sont prédéterminés. Cette caractérisation cinétique des aptamères sélectionnés avant la synthèse est un atout car elle évite de séquencer les aptamères les moins intéressants et elle limite également le coût de synthèse.

De cette façon, les auteurs ont sélectionné un aptamère contre la protéine farnésyltransférase avec une constante d'affinité du nanomolaire en seulement un cycle de sélection [66].

Drabovich et ses collaborateurs ont sélectionné un aptamère en série ADN fixant la protéine MutS [63,68] avec un  $K_d$  de 15 nM en 3 cycles de sélection en utilisant la méthode de sélection ECEEM. Cette technique permet également la sélection d'aptamères avec des paramètres cinétiques et thermodynamiques prédéterminés (=« aptamères smart ») car comme pour la NECEEM, le temps de migration des complexes dans le capillaire dépend de la valeur de  $K_d$ .

Très récemment, une nouvelle technique de sélection d'aptamères a été développée par Krylov et ses collaborateurs [69,70]. Cette stratégie nommée « non-SELEX » implique des cycles répétés de purification des complexes oligonucléotide-molécule cible sans étapes d'amplification. La **figure 10** montre une comparaison entre la technique SELEX et la non-SELEX.



**Figure 10 :** Schéma représentatif de la sélection d'aptamères par les méthodes SELEX et non-SELEX [69].

Les auteurs ont utilisé la NECEEM pour purifier les séquences affines. Toutes les étapes nécessaires à la sélection ont pris 1 heure et peuvent être facilement automatisées. Dans leur étude, ils ont utilisé la protéine h-Ras comme molécule cible pour isoler les ADNs affins à partir d'une bibliothèque d'ADNs contenant 39 séquences aléatoires marquées en 5' par une

fluorescéine carboxylée en position 6. L'affinité pour la molécule cible a été nettement améliorée (de  $10^4$   $\mu\text{M}$  à 0,3  $\mu\text{M}$ ) en seulement 3 cycles de sélection.

Les principaux avantages de cette technique sont sa rapidité et sa simplicité. En effet, la sélection est effectuée en seulement 1 heure au lieu de plusieurs jours à plusieurs semaines et peut être réalisée de façon automatisée en utilisant une simple électrophorèse capillaire commerciale. Un troisième avantage de cette méthode est sa capacité à déterminer avec précision la quantité d'aptamères présente dans chaque bibliothèque obtenue. La non-SELEX est un outil puissant pour étudier les propriétés des bibliothèques d'ADNs. Enfin un autre de ces avantages est sa capacité à sélectionner des banques non amplifiables. Cette caractéristique fait de cette technique un outil potentiellement indispensable pour la découverte de médicaments.

### ***1.5 Comparaison des différentes procédures de SELEX***

Un énorme avantage de la procédure SELEX est la possibilité d'adapter les conditions opératoires à plusieurs applications durant le processus de sélection. Un grand nombre de variations de la procédure originellement établie par Tuerk et Gold en 1990 a été décrit durant ces dernières années dans le but d'améliorer l'affinité et la spécificité des aptamères sélectionnés ou d'optimiser la méthode. Le *tableau 2* résume les techniques les plus importantes évoquées précédemment.

**Tableau 2:** Description de quelques exemples de méthodes de sélection d'aptamères.

Techniques	Avantages	Inconvénients	Molécules cibles	$K_d$
<b>Procédure conventionnelle (purification par affinité)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facile,</li> <li>• Peu coûteuse</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitée par la capacité de résolution</li> <li>• Présence d'interactions non spécifiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines</li> <li>• Peptides</li> <li>• Petites molécules</li> <li>• Cellules</li> </ul>	du pM au nM
<b>SELEX d'aptamères modifiés (PhotoSELEX)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haute spécificité,</li> <li>• Bon rendement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limitée aux molécules cibles ayant des sites réactifs (pas applicable aux petites molécules)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines</li> <li>• Peptides</li> </ul>	pM [23]
<b>CE-SELEX</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haute résolution,</li> <li>• Rapide (peu de cycle)</li> <li>• Haute affinité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faibles capacités de résolution du capillaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines</li> <li>• Peptides principalement</li> </ul>	pM [56]
<b>NECEEM, ECEEM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu de cycles</li> <li>• Haute résolution</li> <li>• Détermination de <math>K_d</math>, <math>k_{on}</math> et <math>k_{off}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu d'applications</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protéines</li> <li>• Peptides principalement</li> </ul>	nM [66]
<b>« Non – SELEX »</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rapide</li> <li>• Simple</li> <li>• Possibilité d'automatisation</li> <li>• Détermination de la quantité en aptamère présente dans chaque bibliothèque</li> <li>• Sélection d'aptamères non amplifiables</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Encore peu utilisée</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Appliquée seulement à des protéines</li> </ul>	nM [69]

Depuis 1990, la sélection d'aptamères, selon la technologie SELEX conventionnelle ou par les différentes variantes décrites précédemment, a été appliquée à différentes classes de molécules cibles.

## **II Les différentes classes d'espèces chimiques ciblées**

Les aptamères peuvent être générés contre des cibles de nature très diverse : petites espèces organiques ou inorganiques, acides nucléiques, protéines, virus, organelles, et même contre des cellules entières. Plusieurs revues décrivent les différentes molécules cibles pour lesquelles un ou plusieurs aptamères ont été sélectionnés [5,8,71-78]. Le **tableau 3** donne quelques exemples d'aptamères sélectionnés pour les différentes classes de cibles.

### **II.1 Les aptamères sélectionnés contre de petites espèces**

L'hypothèse d'un « monde d'ARNs » a amené l'idée que les aptamères seraient capables, en se repliant, de former des poches de fixation permettant de lier des petites espèces.

La plus petite molécule cible utilisée pour la sélection d'aptamères est l'éthanolamine, une molécule formée de deux atomes de carbone liant deux groupements fonctionnels (-OH, -NH<sub>2</sub>) [79]. A partir d'une méthode de sélection d'aptamères, dite FluMag-SELEX, des aptamères fixant l'éthanolamine avec une affinité importante ( $K_d$  variant de 6 à 19 nM) ont été obtenus à partir d'une bibliothèque contenant  $10^{16}$  molécules d'ADNs simples brins. Cette méthode de sélection utilise un marquage fluorescent de l'ADN permettant une quantification du taux d'enrichissement à chaque cycle de sélection, ainsi qu'une immobilisation de la molécule cible sur des billes magnétiques.

Dans la littérature, de nombreux aptamères, sélectionnés pour de petites espèces chimiques appartenant à différentes familles, sont décrits. Seulement quelques exemples de ces aptamères seront exposés par la suite.

**Tableau 3** : Exemples de cibles utilisées pour la sélection d'aptamères.

Cibles	Type d'aptamères	K <sub>d</sub>	Réf.
<b>Petites espèces</b>			
<i>Espèces inorganiques</i>			
Zn <sup>2+</sup>	ARN	1,2 mM	[80]
Ni <sup>2+</sup>	ARN	0,8 - 29 μM	[81]
<i>Espèces organiques</i>			
Ethanolamine	ADN	6 - 19 nM	[79]
Colorants organiques	ARN	100 - 600 μM	[2]
	ADN	33 - 46 μM	[7]
<i>Nucléotides et dérivés</i>			
ATP/adénosine	ARN	0,7 - 50 μM	[82]
	ADN	6 μM	[83]
ATP	ARN	4,8 - 11 μM	[84]
<i>Cofacteurs</i>			
Riboflavine	ARN	1 - 5 μM	[85]
NAD	ARN	2,5 μM	[85]
<i>Acides aminés</i>			
L-arginine	ARN	1 mM	[86]
	ARN	56 μM	[20]
	ARN	330 nM	[87]
	ADN	~ 2,5 mM	[88]
L-citrulline	ARN	62-68 μM	[20]
L-histidine	ARN	8 - 54 μM	[89]
L-isoleucine	ARN	200 - 500 μM	[90]
L-valine	ARN	12 mM	[91]
<i>Carbohydrates</i>			
Cellobiose	ADN	1 - 100 μM	[92]
<i>Bases xanthiques</i>			
Théophylline	ARN	100 nM	[93]
	ARN	60 μM	[94]
<i>Peptides</i>			
Substance P	ARN	190 nM	[95]
	ARN	40 nM	[54]
Vasopressine	ADN	1,2 μM	[48]
	ARN	~ 1 nM	[96]

Cibles	Type d'aptamères	K <sub>d</sub>	Réf.
<b>Petites espèces (suite)</b>			
<i>Antibiotiques</i>			
Tobramycine	ARN	2 - 3 nM	[97]
Lividomycine	ARN	≤ 300 nM	[98,99]
Kanamycine A	ARN	≤ 300 nM	[98]
Kanamycine B	ARN	180 nM	[100]
Néomycine B	ARN	~ 100 nM	[101]
<b>Acides Nucléiques</b>			
ARN TAR du VIH-1	ADN	50 nM	[102]
	ARN	20 - 50 nM	[103]
<b>Protéines</b>			
<i>Enzyme</i>			
Transcriptase inverse du VIH-1	ARN	~ 5 nM	[104]
	ADN	~ 1 nM	[60]
<i>Protéases à sérine</i>			
Thrombine	ADN	200 nM	[105]
	ARN	250 pM	[106]
	ARN	< 3 nM	[107]
<i>Anticorps</i>			
Immunoglobuline E	ARN	30 - 35 nM	[58]
	ADN	10 nM	[58]
	ADN	23 - 29 nM	[16]
<i>Facteurs de croissance</i>			
VEGF	ARN	0,1 - 2 nM	[108]
	ARN	0,05 - 0,13 nM	[32]
<b>Structures complexes</b>			
<i>Organelle</i>			
Ribosome	ARN	4 - 5 nM	[109]
<i>Virus</i>			
Virus sarcome de Rous	ARN	n.d. <sup>a</sup>	[110]
<i>Cellule</i>			
Cellules de leucémie (CCRF-CEM)	ADN	0,8 - 229 nM	[111]

<sup>a</sup> n. d: non déterminée.

### **II.1.1 Les aptamères spécifiques d'espèces inorganiques**

Les ions métalliques divalents ont été utilisés comme cibles pour la SELEX. Ciesiolka et ses collaborateurs et Hofmann et son équipe ont décrit la sélection d'aptamères, en série ARN, possédant une bonne affinité pour le  $Zn^{2+}$  [80,112] et pour le  $Ni^{2+}$  [81], respectivement. Dans les deux cas, une matrice sur laquelle les ions métalliques ont été immobilisés, est utilisée pour la sélection de molécules d'ARNs à partir d'une banque d'ARNs aléatoires. Des aptamères possédant des constantes de dissociation comprises entre 1  $\mu$ M et 1 mM ont été obtenus (*tableau 3*).

### **II.1.2 Les aptamères spécifiques de colorants organiques**

Ellington et Szostak ont été les premiers à démontrer que des oligonucléotides simples brins, peuvent posséder des propriétés de fixation de ligands spécifiques, et peuvent être sélectionnés par sélection « *in vitro* » à partir d'ARNs synthétisés de façon aléatoire [2] ou à partir d'un pool d'ADNs [7]. Pour montrer le principe de la SELEX, ces auteurs ont choisi des colorants organiques (Bleu Cibacron, Réactif Bleu, Réactif vert...) comme molécules cibles car ils ont la capacité de mimer les cofacteurs métaboliques.

Tout d'abord, les auteurs ont décrit la sélection d'aptamères ARNs spécifiques de 6 colorants différents et de structures très proches. Ils ont prouvé que certains des aptamères sélectionnés, montrent une forte spécificité pour le colorant utilisé pour la SELEX [2]. En renouvelant leurs expériences de sélection sur un pool d'ADNs en utilisant les mêmes molécules cibles, ils ont démontré que les ADNs simples brins possèdent également la capacité de lier les ligands sélectivement et spécifiquement [7]. Cependant, aucune similarité de séquence n'a été observée entre les aptamères ADNs et ARNs sélectionnés contre les mêmes molécules colorants. Les auteurs ont également montré que la fixation est spécifique du type de séquence puisque la version ARN de l'aptamère ADN sélectionné, ne parvient pas à fixer la molécule cible.

### **II.1.3 Les aptamères spécifiques des nucléotides et dérivés**

Des aptamères ont également été sélectionnés contre des nucléotides, nucléosides et nucléobases. Seuls les aptamères spécifiques de l'ATP seront détaillés.

Le premier aptamère spécifique de l'ATP a été sélectionné par Sassanfar et Szostak en 1993 [82]. La sélection des aptamères a été réalisée par chromatographie d'affinité sur une colonne agarose liée à l'ATP à partir d'une banque d'ARNs contenant  $10^{14}$  molécules. Les ARNs liés sont élués par passage du ligand libre. Un aptamère tronqué de 40 nucléotides fixant l'ATP avec un  $K_d$  de  $0,7 \mu\text{M}$  a ainsi été sélectionné. Afin de déterminer si un aptamère ADN est également capable de fixer l'ATP, Huizenga et Szostak ont isolé un aptamère pour l'ATP à partir d'une banque contenant  $2 \times 10^{14}$  molécules d'ADNs simples brins [83]. Ces aptamères ARNs et ADNs fixant l'ATP ont des tailles similaires (structure minimale fonctionnelle de 35 et 25 nucléotides respectivement) et une affinité et spécificité proches pour l'ATP, l'AMP et l'adénosine. En effet, des expériences d'éluion en présence d'analogues de l'ATP ont révélé, pour ces deux types d'aptamères, que la base et le sucre semblent impliqués dans la fixation. En revanche, les phosphates en 5' n'interviennent pas dans la fixation. Des aptamères de complexité similaire peuvent être isolés pour une même molécule cible à partir d'ARNs et d'ADNs. Cependant, il a été démontré, comme pour les aptamères liant des colorants organiques, que la version ADN de l'aptamère ARN et la version ARN de l'aptamère ADN ne sont pas fonctionnelles. En effet, ces aptamères se replient en des structures secondaires et tertiaires différentes (cf § III-5-1).

Un autre aptamère reconnaissant l'ATP a été sélectionné par le même laboratoire en 2004 [84]. Un protocole faisant intervenir une contre-sélection à l'aide d'une colonne agarose liée à l'AMP et des lavages en présence d'AMP ont été réalisés avant l'éluion des ARNs liants l'ATP. Un aptamère de 57 nucléotides possède un  $K_d$  de  $11 \mu\text{M}$  pour l'ATP et de  $1700 \mu\text{M}$  pour l'AMP. Les auteurs ont ainsi isolé des aptamères interagissant fortement avec les phosphates en  $\beta$  et  $\gamma$  de l'ATP. A l'inverse des aptamères précédemment isolés, cet aptamère fixe également des analogues triphosphates : GTP, UTP, et CTP.

#### ***II.1.4 Les aptamères spécifiques des cofacteurs***

Lauhon et Szostak [85], ont, par exemple, publié la sélection d'aptamères ARNs fixant les cofacteurs flavine et nicotinamide. Après 9 cycles de sélection, des aptamères en série ARN formant une structure de type « tétrade de G » (cf tableau 4) ont montré une affinité faible vis-à-vis de la riboflavine ( $K_d = 1 - 5 \mu\text{M}$ ). La version ADN de ces aptamères fixe la riboflavine avec une affinité plus faible. Il s'agit de la première publication montrant que des aptamères ADNs et ARNs de séquences identiques possèdent la capacité de fixer la même molécule cible. En ce qui concerne la sélection pour les nicotinamides, les aptamères ARNs

sélectionnés sont capables de discriminer entre les deux états de réduction du NAD. En effet, des constantes de dissociation environ 10 fois plus faibles ont été obtenues pour le NAD par rapport au NADH ( $K_d = 2,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$  pour le NAD contre  $37 \pm 3 \mu\text{M}$  pour le NADH).

### **II.1.5 Les aptamères spécifiques des acides aminés**

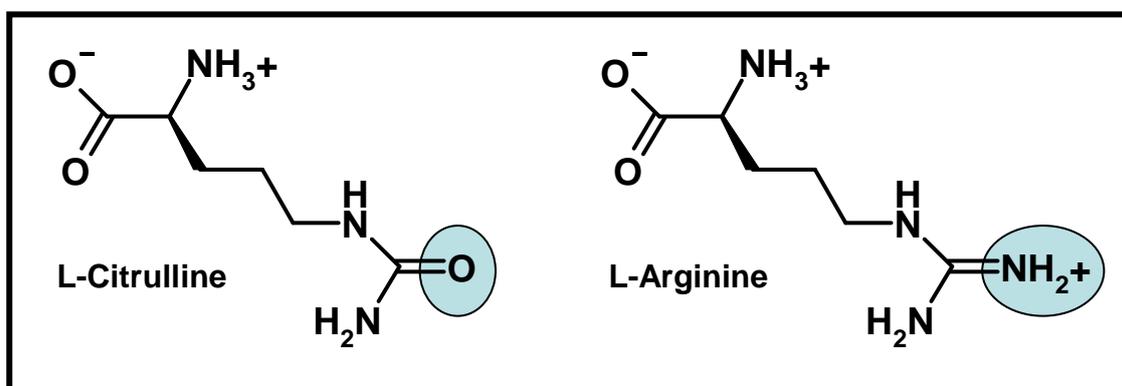
L'isolement et la caractérisation de séquences d'ARNs reconnaissant spécifiquement des acides aminés libres peut faciliter une meilleure compréhension des interactions protéine-ARN ou ARN-acide aminé. Ainsi, des aptamères spécifiques de différents acides aminés sont décrits dans la littérature.

Parmi les acides aminés fixant les ARNs, les aptamères spécifiques de l'arginine semblent particulièrement intéressants pour la reconnaissance protéine-ARN puisque la chaîne latérale de l'arginine chargée positivement à pH neutre peut créer une interaction spécifique avec les charges négatives des acides nucléiques.

Le premier aptamère liant un acide aminé libre a été sélectionné par le laboratoire de M. Yarus en 1993 [86]. Connell et ses collaborateurs ont isolé un aptamère ARN spécifique de la L-arginine par chromatographie d'affinité en utilisant un dipeptide L-arginyl-L-cystéine lié à une thiopropylsépharose comme matrice de sélection. L'éluion des ARNs liés est réalisée par passage d'une solution contenant la L-arginine libre. Des constantes de dissociation de 0,2 à 0,4 mM pour la molécule cible immobilisée et de 1 mM pour la L-arginine ont été obtenues. Ces aptamères possèdent des affinités comparables aux deux ARNs naturels fixant la L-arginine : l'intron du groupe I de *Tetrahymena* et l'ARN TAR du VIH. Comme ce fût déjà observé pour l'intron du groupe I de *Tetrahymena*, ces aptamères sélectionnés ont également la capacité de fixer la guanosine-5'-monophosphate (GMP) probablement à cause des similarités structurales entre arginine et guanine.

Famulok et ses collaborateurs ont publié la sélection d'autres aptamères ARNs fixant la L-arginine à partir d'une sélection initiale d'aptamères fixant la L-citrulline [20]. La citrulline diffère de l'arginine par deux aspects : elle contient un groupement urée à la place de la fonction guanidinium de l'arginine et de ce fait, ce groupe urée est neutre et accepteur de liaisons hydrogène. En revanche, le groupement guanidinium de l'arginine est chargé positivement et est donneur de liaisons hydrogène (*figure 11*). Les aptamères sélectionnés fixent la L-citrulline avec des  $K_d$  de 62 à 68  $\mu\text{M}$  et la D-citrulline avec un  $K_d$  de 180  $\mu\text{M}$ . Aucune affinité n'est observée pour les analogues de la citrulline. Une des séquences obtenue fixant la citrulline a été resynthétisée en ADN avec un taux de mutation de 30%. Ensuite,

l'affinité de ce nouveau pool, converti en ARN, a été testée pour différents analogues de la citrulline. Seule, la sélection pour la L-arginine a été un succès. La moitié des aptamères isolés contre la L-arginine montre des similarités de séquence par rapport au pool « parental » d'aptamères spécifiques de la L-citrulline (cf § III-5-3-1). Cependant, un aptamère ARN sélectionné possède la capacité de fixer la L-arginine ( $K_d = 56 \mu\text{M}$ ) avec une affinité 120 fois supérieure à celle de la L-citrulline (à cause de la contre-sélection avec la L-citrulline) et de discriminer les énantiomères de l'arginine ( $K_d = 410 \mu\text{M}$  pour la D-arginine). Cette étude a donc montré, pour la première fois, qu'il était possible de resélectionner un aptamère afin de changer sa spécificité de fixation.



**Figure 11 :** Structure chimique de la L-citrulline et de la L-Arginine.

En utilisant un protocole SELEX modifié, un aptamère hautement spécifique de la L-arginine a été identifié [87]. Pour cela, une sélection d'aptamères a été réalisée à partir d'un pool complètement aléatoire et à partir du pool connu pour fixer la citrulline [20]. Pour obtenir des ligands très affins pour l'arginine, les auteurs ont inclus dans le processus une contre-sélection en présence de citrulline ainsi qu'une étape de dénaturation à la chaleur en présence de cet analogue de l'arginine. Ensuite, une étape de lavage en présence de la L-arginine est réalisée afin d'éliminer les aptamères possédant une faible affinité (vitesse de dissociation importante). Enfin, pour libérer les aptamères fortement liés, une étape de dénaturation en présence de L-arginine est réalisée. Plusieurs molécules d'ARNs fixant fortement et spécifiquement la L-arginine ont été sélectionnées. Parmi ces molécules, un aptamère possédant une constante de dissociation de 330 nM, soit une affinité 200 fois plus importante que celle obtenue pour les aptamères spécifiques de l'arginine connus à cette date, a été identifié [20]. D'autre part, cet aptamère ne présente aucune affinité pour les analogues de l'arginine. Enfin, il a la capacité de discriminer très fortement les énantiomères de l'arginine (énantiosélectivité de 12000). Les caractéristiques hautement énantiosélectives de cet aptamère ont été exploitées durant cette thèse [113-115] (cf partie résultats et discussion,

**chapitre 2).** Par ces études, il a été démontré que différentes molécules d'ARNs peuvent reconnaître la même molécule avec une spécificité et une sélectivité importantes.

Frankel et ses collaborateurs ont isolé un aptamère en série ADN fixant la L-arginine par chromatographie d'affinité [88]. Une étape de sélection négative (colonne liant la L-Lysine) est réalisée pour éliminer les séquences se liant de façon non spécifiques soit au niveau du support, soit par interactions électrostatiques. Les molécules fixées, sont ensuite éluées en présence d'un gradient de NaCl. Un aptamère possédant une constante de dissociation de 2,5 mM a ainsi été sélectionné. Aucune similarité de séquence n'a été observée entre les aptamères ADNs et ARNs spécifiques de la L-arginine.

Majerfield et ses collaborateurs ont isolé des aptamères en série ARN hautement spécifiques pour la chaîne latérale de la L-histidine protonnée, possédant des constantes de dissociation variant de 8 à 54  $\mu\text{M}$  [89]. Parmi les séquences sélectionnées, un aptamère tronqué de 40 nucléotides possédant un  $K_d$  d'environ 10  $\mu\text{M}$  présente une importante énantiosélectivité ( $\alpha \sim 1000$ ) puisqu'il fixe la D-histidine avec un  $K_d$  d'environ 10000  $\mu\text{M}$ . Une étude par CLHP a été réalisée, durant cette thèse, afin d'étudier les propriétés de séparation chirale de cet aptamère pour des énantiomères de l'histidine en faisant varier plusieurs paramètres chromatographiques [116] (cf **partie résultats et discussion, chapitre 1, publication N°1**).

Le fait que le code génétique associe pour chaque acide aminé une séquence d'ARNs contenant trois bases nucléiques appelée codon, a attiré l'attention de plusieurs scientifiques pour savoir si le mécanisme de reconnaissance d'un aptamère spécifique d'un acide aminé pouvait être lié à la présence de codons liant cet acide aminé. Ainsi, Knight et Landweber [117] ont réalisé une analyse statistique sur plusieurs aptamères spécifiques de la L-arginine [20,87,118,119] sélectionnés par trois laboratoires différents sous différentes conditions, afin d'observer si ces aptamères possèdent des codons ou anticodons arginine au niveau du site de fixation. Les auteurs ont observé que ces aptamères contiennent plus de codons arginine (CGN et AGR où N est un nucléotide et R une purine) qu'il ne serait possible d'obtenir de façon aléatoire. En effet, 72% des nucléotides présents au niveau du site de fixation des aptamères spécifiques de l'arginine sont des codons arginine alors que ce pourcentage est de 29% pour des aptamères non spécifiques de l'arginine. Ainsi, Knight et Landweber ont fourni une évidence statistique, au moins pour l'arginine, supportant l'hypothèse que les acides aminés ont la capacité d'interagir de façon spécifique avec des séquences ARNs contenant

dans leur séquence des codons spécifiques de l'acide aminé. En 2005, Yarus et ses collaborateurs [120] ont montré que d'autres aptamères sélectionnés contre différents acides aminés (isoleucine [90], tryptophane [121], leucine [122], tyrosine [123] et histidine [89]) possédaient également des codons ou des anticodons spécifiques au niveau du site de fixation de l'aptamère. Par exemple, la présence de deux anticodons (GUG et AUG) spécifiques de l'histidine se sont montrés indispensables à la fixation de l'acide aminé. Ces résultats semblent confirmer la présence d'un lien entre le code génétique et la spécificité des aptamères sélectionnés pour des acides aminés. En revanche, aucun codon ou anticodon valine n'a été observé au niveau d'un aptamère sélectionné pour fixer la L-valine [91].

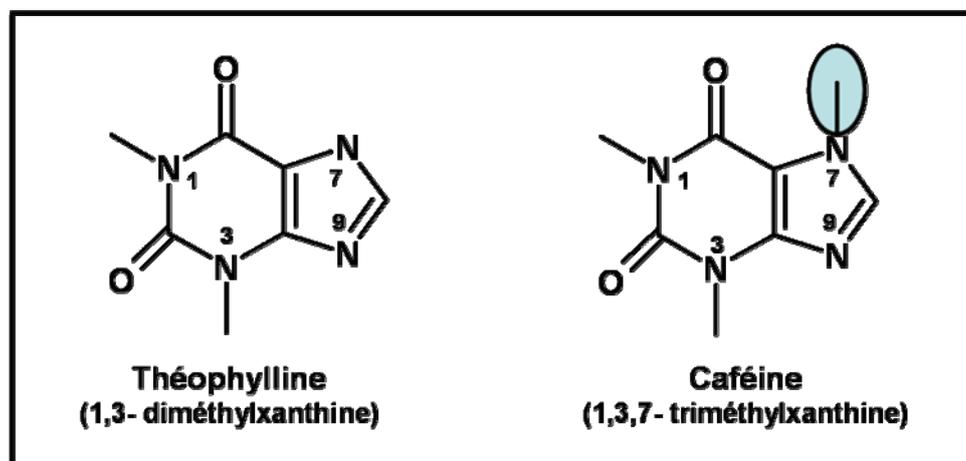
### **II.1.6 Les aptamères spécifiques des carbohydrates**

Des aptamères spécifiques de carbohydrates ont été isolés dans un but bien précis. Les carbohydrates présents à la surface des cellules jouent des rôles essentiels dans divers phénomènes biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la reconnaissance moléculaire et les réponses inflammatoires. Le développement de ligands capables de reconnaître sélectivement une variété de petits motifs dans différents oligosaccharides peut avoir un intérêt expérimental et de diagnostic.

Dans ce but, Yang et ses collaborateurs ont effectué une sélection d'aptamères contre la cellulose [92]. Une série d'aptamères a été ainsi générée, certains possèdent la capacité de reconnaître seulement le polymère cellulose alors que d'autres reconnaissent le polymère ainsi que son unité minimale répétée : la cellobiose ( $\beta$ -D-glucopyrannosyl(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-glucopyrannose). La constante de dissociation de ces aptamères varie de 1 à 100  $\mu$ M. La reconnaissance par ces aptamères se produit avec une sélectivité importante puisque des disaccharides analogues tel que le lactose ( $\beta$ -D-**galact**opyrannosyl(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-glucopyrannose, le maltose ( $\alpha$ -D-glucopyrannosyl(1 $\rightarrow$ 4) $\beta$ -D-glucopyrannose) et la gentiobiose ( $\beta$ -D-glucopyrannosyl(1 $\rightarrow$ 6) $\beta$ -D-glucopyrannose) sont, soit reconnus avec une faible affinité, soit non reconnus. Ces aptamères ont la capacité de discriminer des sucres épimères, anomères ainsi qu'une modification du lien osidique. Les auteurs ont donc démontré que les aptamères sont capables de reconnaître une glycosylation particulière et peuvent donc être utilisés comme outil de diagnostic.

### II.1.7 Les aptamères spécifiques de bases xanthiques

La théophylline (1,3-diméthylxanthine) est un alcaloïde naturel, utilisé comme bronchodilatateur dans le traitement de l'asthme, de la bronchite et de l'emphysème. A cause de son index thérapeutique limité, son taux dans le sérum doit être contrôlé pour éviter une intoxication sérieuse. La théophylline est chimiquement similaire à la théobromine (3,7-diméthylxanthine) et à la caféine (1,3,7-triméthylxanthine). Jenison et ses collaborateurs ont sélectionné un aptamère fixant la théophylline avec une importante sélectivité et spécificité [93] par une méthodologie SELEX conventionnelle faisant intervenir une contre-sélection en présence de caféine. Un aptamère fixant la théophylline avec une constante de dissociation de 100 nM a été identifié. Son affinité pour la théophylline est 10000 fois plus importante que pour la caféine, qui diffère de la théophylline seulement par la présence d'un groupement méthyle sur l'azote N7 (*figure 12*). Les anticorps monoclonaux utilisés contre la théophylline montrent un facteur de discrimination 10 fois moins important [124]. Ceci démontre que les molécules d'ARNs peuvent présenter un niveau plus important de reconnaissance et de discrimination par rapport aux anticorps.



**Figure 12 :** Structure chimique de la théophylline et de la caféine.

Plus récemment, Anderson et Mecozzi ont réduit cet aptamère spécifique de la théophylline de 33-mer à un aptamère de 13-mer en supprimant les nucléotides présents à l'extérieur de la poche de fixation [94]. Cet aptamère présente une bonne affinité de fixation et une spécificité pour la théophylline permettant également de discriminer la caféine ( $K_d \sim 60 \mu\text{M}$  pour la théophylline et  $K_d \sim 200 \mu\text{M}$  pour la caféine). Cette étude a donc suggéré la possibilité d'utilisation d'ARNs de petites tailles pour une application thérapeutique.

### **II.1.8 Les aptamères spécifiques de peptides**

Des études récentes ont suggéré que la substance P pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse et pourrait contribuer à des maladies angiogéniques telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, la rétinopathie diabétique, et le cancer [125]. En vue d'une application diagnostique ou pharmacologique, Gold et son équipe ont isolé un aptamère ARN possédant une affinité importante pour la substance P ( $K_d = 190$  nM) [95]. Cet aptamère possède également la capacité à discriminer la substance P de sa séquence en acides aminés inversée.

En 2005, Euberg et ses collaborateurs [54] ont isolé un aptamère ARN de type Spiegelmer de la substance P naturelle, par la stratégie image-miroir décrite précédemment (cf § I-4-2-2), afin d'obtenir un aptamère à potentiel thérapeutique. Cet aptamère fixe et inhibe la substance P avec un  $K_d$  de 40 nM et une  $IC_{50}$  de 45 nM.

De la même façon, un ligand de la vasopressine ou hormone antidiurétique pourrait donc être utile comme antagoniste thérapeutique ou comme réactif de diagnostic dans des maladies associées à un excès de vasopressine. Williams et ses collaborateurs ont utilisé la stratégie image-miroir, pour sélectionner des aptamères spécifiques de la vasopressine [48]. Un aptamère Spiegelmer L-ADN fixe la L-vasopressine avec une constante de dissociation de 1,2  $\mu$ M. Un avantage pratique de cet aptamère est sa résistance aux nucléases.

Plus récemment, Klusmann et ses collaborateurs ont isolé un ARN fixant la forme non naturelle de la vasopressine (D-AVP) [96]. Le Spiegelmer correspondant (L-ARN 38 mer), nommé NOX-F37, possède la capacité d'inhiber la vasopressine *in vivo* chez des rats. Cette étude met l'accent sur l'action potentielle de celui-ci dans le traitement de maladies associées à un excès de vasopressine.

### **II.1.9 Les aptamères spécifiques d'antibiotiques**

Il a été clairement établi que les antibiotiques ont la capacité d'interagir avec l'ARN. Afin de démontrer comment la reconnaissance entre ARN et antibiotique est réalisée, plusieurs scientifiques ont isolé des aptamères spécifiques de différents antibiotiques (tétracycline, streptomycine, aminoglycosides, chloramphénicol, viomycine...).

Les aminoglycosides, par exemple, sont des composés cationiques possédant une flexibilité importante, ce qui facilite leur accueil dans la poche de fixation de l'ARN chargé

négativement. Plusieurs laboratoires ont isolé des aptamères possédant une affinité importante pour différentes aminoglycosides comme la tobramycine [97], la lividomycine [98,99], la kanamycine A [98] et B [100] et la néomycine B [101]. La sélection est réalisée à partir de bibliothèques contenant entre 30 et 74 nucléotides aléatoires. Ces sélections résultent en l'isolement d'aptamères plus ou moins spécifiques. Par exemple, l'aptamère K8, isolé contre la kanamycine B reconnaît également la néomycine mais avec une affinité cinq fois plus faible [100]. De même, plusieurs aptamères fixant la lividomycine, reconnaissent également la néomycine B [98].

Ces résultats montrent que, bien que les aptamères diffèrent par leur mode de fixation, ils possèdent des motifs en commun qui peuvent être considérés comme des éléments de base de reconnaissance dans les interactions ARN-aminoglycoside.

D'après ces quelques exemples tirés de la littérature, nous avons pu observer que les aptamères ont, non seulement la capacité de fixer diverses espèces de petite taille avec une affinité et une spécificité importante, mais ont aussi la capacité de discriminer des différences mineures au sein des molécules cibles. Des aptamères fixant des espèces de taille plus importante ont également été sélectionnés.

## **II.2 Les aptamères sélectionnés contre des acides nucléiques**

La technologie SELEX a été appliquée pour la sélection d'aptamères ciblant des acides nucléiques. Ceci peut être d'un grand intérêt puisque les ARNs jouent un rôle important comme domaine régulateur de l'expression des gènes dans divers processus biologiques. Par exemple, l'ARN TAR (*trans*-activation-responsive) est un ARN de 59 nucléotides de long, formant une structure de type tige-boucle (**cf tableau 4**), présent du côté 5' terminal de l'ARN du virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1). La protéine virale Tat joue le rôle de facteur d'antiterminaison. En effet, la fixation de cette protéine au niveau de l'ARN TAR induit une progression de l'ARN polymérase, aboutissant à la synthèse du génome viral. Un oligonucléotide capable de fixer TAR avec une affinité importante pourrait empêcher la fixation de la protéine Tat sur TAR et donc inhiber la transcription du génome viral. Pour vérifier cette hypothèse, Toulmé et ses collaborateurs ont utilisé la SELEX pour identifier des ADNs fixant l'élément TAR de l'ARN [102]. Un aptamère possédant une constante de dissociation de 50 nM a été sélectionné. Cette sélection a également été menée

en présence d'une bibliothèque d'ARNs [103], ces aptamères possèdent des constantes de dissociation similaires (20 - 50 nM). Un aptamère ARN tronqué, nommé R06, ainsi sélectionné, a été testé sur des cellules HeLa (*Henrietta Lacks*) P4 [126], afin d'évaluer sa capacité à interférer avec la transcription médiée par TAR. Les auteurs ont observé une diminution de la réplication du VIH-1 dans des cellules infectées par le VIH-1. Cet effet s'est avéré spécifique et lié à la présence du complexe R06-TAR puisque un aptamère possédant une boucle mutée, n'ayant pas la capacité de fixer TAR, n'a aucun effet.

### **II.3 Les aptamères sélectionnés contre des protéines**

De nombreux aptamères ont été sélectionnés contre différents types de protéines pour diverses applications. Seuls quelques exemples d'aptamères spécifiques de protéines seront décrits.

#### **II.3.1 Les aptamères spécifiques d'enzymes**

Des ARNs ont été sélectionnés contre la transcriptase inverse du VIH-1, par exemple. Comme l'ont montré des études d'interférence par modification chimique [127], ces aptamères, qui possèdent une affinité très forte pour l'enzyme ( $K_d = 5$  nM), s'organisent en une structure en pseudo-noeud (**cf tableau 4**) [104]. Le processus de sélection mené à partir d'une bibliothèque d'ADNs a conduit à des séquences totalement différentes des séquences ARNs. Les oligonucléotides ADNs adoptent des structures en tige-boucle imparfaites (**cf tableau 4**) mais ne peuvent être repliées en pseudo-noeud [60]. Cependant, ces aptamères ADNs se fixent à la transcriptase inverse avec une affinité du même ordre de grandeur que celle des aptamères ARNs. Les deux classes d'aptamères montrent des propriétés inhibitrices de l'activité polymérase de la transcriptase inverse du VIH-1 ( $K_i = 0,5$  nM). Ces effets sont spécifiques de l'enzyme du VIH-1 car l'inhibition des activités correspondantes à des enzymes homologues des rétrovirus murin (MMLV) et aviaire (AMV) est faible. Il a, par ailleurs, été possible d'identifier des aptamères efficaces contre les transcriptases inverses d'AMV et de MMLV [128]. Tous ces oligonucléotides ne montrent aucun motif commun. Ces résultats prouvent l'extraordinaire potentiel des sélections *in vitro* puisqu'il est possible de générer des ligands qui discriminent entre des protéines homologues dont les sites actifs sont voisins.

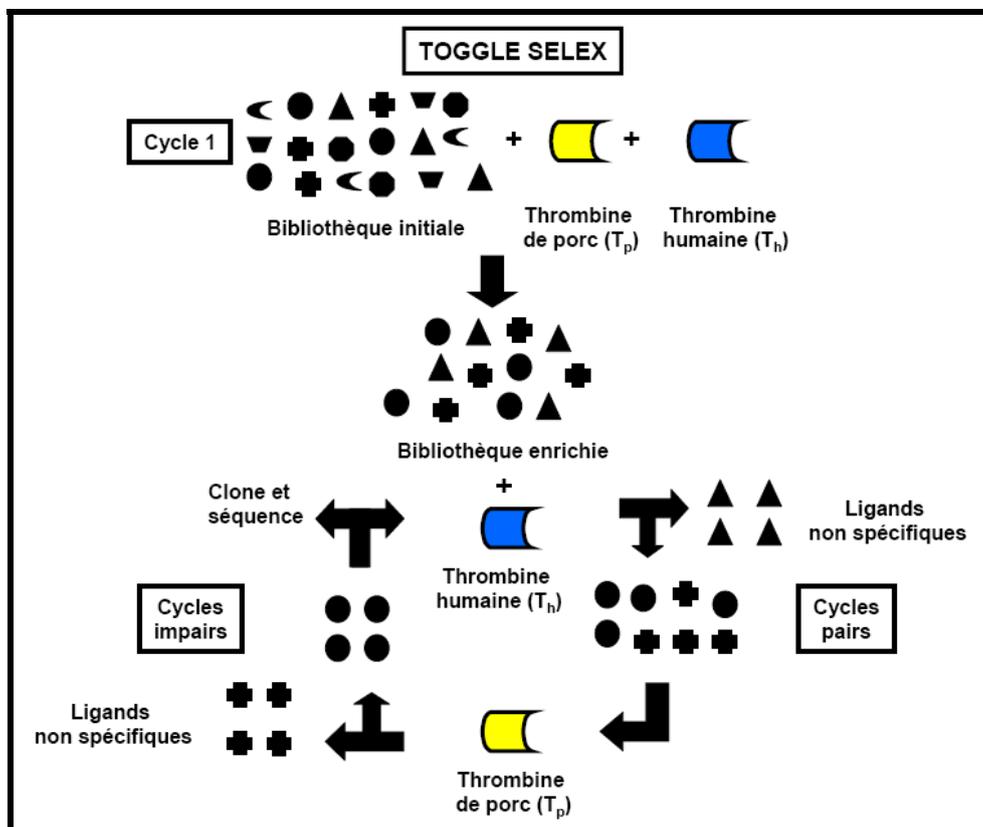
### **II.3.2 Les aptamères spécifiques de protéases à sérine**

Le meilleur exemple actuel de l'intérêt pharmacologique des aptamères est sans doute celui de la thrombine, une protéase impliquée dans le processus de coagulation sanguine. Une bibliothèque d'ADNs comportant une fenêtre aléatoire de soixante nucléotides a été criblée par affinité [105] contre une colonne de concanavaleine A (ConA) sur laquelle avait été immobilisée la thrombine. Après lavage pour éliminer les candidats ADNs non spécifiques, les complexes thrombine-ADN ont été élués par addition d' $\alpha$ -méthylmannoside, un sucre compétiteur de l'association ConA-thrombine. La population de candidats avait été préalablement chargée sur une colonne de ConA non greffée afin de minimiser la sélection de candidats qui possèdent une affinité pour la matrice. Après cinq cycles de sélection, la population montrait une fixation préférentielle pour la thrombine par rapport au fibrinogène humain et à l'ovalbumine. Après clonage et séquençage, l'analyse de 32 clones faisait apparaître un motif double, espacé de façon variable : GGTTGGNxGGNTGG. Ces aptamères se fixent à la thrombine avec une affinité de l'ordre de 200 nM.

Des études *ex vivo* démontrent l'intérêt de l'aptamère anti-thrombine. Dans un modèle d'artère de lapin lésée et perfusée avec du sang humain, cet aptamère s'est montré plus efficace que l'héparine et aussi efficace qu'un antithrombine synthétique pour inhiber l'agrégation plaquettaire [129]. Dans un essai de circulation extracorporelle sur des chiens, l'aptamère utilisé à 0,5 mg/kg/min a permis d'augmenter le temps de coagulation de 106 s à plus de 1500 s. Le temps de coagulation des animaux est revenu à la normale 5 minutes après l'arrêt de l'administration de l'aptamère et les saignements postopératoires étaient minimaux. Cet aptamère paraît donc parfaitement adapté pour des utilisations limitées dans le temps. En effet, une étude réalisée *in vivo* chez le singe a montré une durée de vie de l'aptamère de l'ordre de 100 s [130].

Une sélection d'ARNs a également été menée contre la thrombine [106,131] à partir d'une bibliothèque contenant 40 nucléotides aléatoires. Après 7 cycles de sélection effectués en présence de thrombine immobilisée sur des microplaques, un aptamère possédant une constante de dissociation de 250 pM a été isolé [106]. Cependant, aucune expérimentation fonctionnelle n'a été réalisée sur cet aptamère. En effet, les aptamères fixant leur molécule cible avec une importante spécificité sont problématiques pour des tests précliniques car ils ne reconnaissent pas les cibles non-humaines lors de tests réalisés sur animaux. Pour surmonter ce problème, une nouvelle approche de sélection nommée « Toggle SELEX » a été développée.

White et ses collaborateurs ont décrit une sélection *in vitro*, la « Toggle SELEX » permettant la sélection d'aptamères reconnaissant plusieurs molécules cibles [107]. Ils ont ainsi sélectionné des aptamères reconnaissant à la fois la thrombine humaine ( $T_h$ ) et la thrombine du porc ( $T_p$ ). Le principe de la « Toggle SELEX » est illustré à la **figure 13**.



**Figure 13:** Schéma représentant le principe de la « Toggle SELEX » (d'après [107]).

Le premier cycle de ce processus consiste à incuber la bibliothèque initiale en présence de thrombine appartenantes aux 2 espèces. Les séquences fixant ces deux molécules cibles sont récupérées puis amplifiées pour obtenir une bibliothèque enrichie en séquences liant les deux thrombines. Le second cycle consiste à incuber cette nouvelle bibliothèque en présence de la  $T_h$  seule. Les séquences liant cette thrombine sont récoltées puis amplifiées. Puis dans le cycle 3, cette bibliothèque enrichie en séquences fixant la  $T_h$  est incubée en présence de la  $T_p$ . Les séquences affines sont ainsi récupérées et amplifiées puis cette « Toggle » sélection est répétée pendant 4 à 13 cycles en utilisant la protéine humaine pour les cycles pairs et la protéine du porc pour les cycles impairs. Toutes les séquences ainsi sélectionnées fixent à la fois la thrombine humaine ( $T_h$ ) et la thrombine du porc ( $T_p$ ) avec une forte affinité ( $K_d = 2,8 \pm 0,7$  nM pour  $T_h$  et  $K_d = 83 \pm 3$  pM pour  $T_p$ ). De plus, cet aptamère inhibe deux des fonctions les plus importantes de cette protéine : la formation de caillot sanguin et l'activation plaquettaire.

### **II.3.3 Les aptamères spécifiques d'anticorps**

L'immunoglobuline E (IgE), par exemple, joue un rôle important dans la protection des mammifères contre les parasites [132]. Une stratégie pour combattre les maladies liées à une surexpression en IgE serait de bloquer l'interaction entre IgE et son récepteur. Dans ce but, une sélection d'ARNs modifiés en 2' par une amine et une sélection d'ADNs ont été réalisées contre l'IgE humaine. Ces sélections ont permis l'obtention d'aptamères fixant l'IgE humaine avec une forte affinité (ARN,  $K_d = 30$  nM ; ADN,  $K_d = 9$  nM) [58]. Malheureusement, ces aptamères anti-IgE humaine possèdent, une fixation plus importante pour l'IgE humaine que pour les analogues du rat et de la souris, ce qui limite leurs applications précliniques. Cependant, des études ont été réalisées afin de déterminer leurs capacités à inhiber la fixation de l'IgE sur son récepteur. Des valeurs de  $K_i = 21$  nM pour l'aptamère en série ARN et de 6 nM pour l'aptamère en série ADN ont été obtenues.

Mendonça et son équipe ont également décrit la sélection d'aptamères spécifiques des IgE par CE-SELEX [16,17]. Cette sélection a été décrite au § I-4-3-2.

### **II.3.4 Les aptamères spécifiques de facteurs de croissance**

L'angiogenèse joue un rôle critique dans plusieurs stades physiologiques et pathologiques. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), par exemple, est le facteur de croissance le mieux caractérisé, impliqué dans l'angiogenèse bénigne et néoplastique et, représente une cible intéressante pour combattre le cancer ou pour d'autres thérapies anti-angiogéniques [133]. Des taux élevés en VEGF sont associés à des néovascularisations oculaires incluant la rétinopathie diabétique, la rétinopathie du prématurité et la dégénérescence maculaire. Des études et des essais cliniques ont démontré que l'inhibition de l'angiogénèse accompagnant une tumeur permettait de stopper son développement et, l'inhibition du VEGF, en particulier, permettait d'arrêter la croissance tumorale. Ainsi, dans la lutte contre certains cancers, une voie de recherche actuelle est d'étudier l'action des anti-VEGF.

Dans cette optique, plusieurs sélections d'aptamères ont été réalisées contre un VEGF contenant 165 acides aminés (VEGF<sub>165</sub>) à partir de bibliothèques d'ARNs non modifiés [108] ou modifiés en 2' des pyrimidines par une fonction amine [33], ou par un groupement fluor [32]. L'aptamère sélectionné par Ruckman et ses collaborateurs [32] est non seulement plus

stable par rapport à l'aptamère ARN non modifié [108] (cf § I-4-2-1) mais possède également une meilleure affinité par rapport aux deux autres aptamères. En effet, le fait d'avoir un fluor en 2' des pyrimidines entraîne des conformations plus rigides de l'aptamère, ce qui devrait aboutir à une augmentation de l'affinité pour la cible (cf tableau 3). Ruckman et ses collaborateurs ont isolé, après 12 cycles de sélection, trois aptamères qui ont ensuite été modifiés par un groupement méthyle en 2' des purines afin d'augmenter la stabilité structurale et la résistance aux nucléases. Ces aptamères, ainsi modifiés, possèdent des constantes de dissociation variant de 50 à 130 pM ainsi qu'une importante spécificité pour VEGF<sub>165</sub> puisqu'aucune fixation n'est détectée pour les protéines VEGF<sub>121</sub> et le facteur de croissance du placenta PlGF<sub>129</sub>. La capacité de ces aptamères à inhiber la fixation de VEGF sur deux de ces récepteurs (Flt-1 et KDR) a été évaluée *in vitro*. Des IC<sub>50</sub> de 50 à 300 pM et de 2 à 60 pM ont été obtenues pour l'inhibition de Flt-1 et KDR respectivement.

Un des aptamères sélectionné par Ruckman et son équipe a été modifié chimiquement afin de permettre des études pharmacocinétiques. Cet aptamère, nommé NX-1838 est un aptamère de 27 nucléotides dans lequel la position 2' des riboses de toutes les bases a été modifiée, soit par un groupement fluor pour les bases pyrimidines, soit par un groupement O-méthyle s'il s'agit d'une base purine. D'autre part, cet aptamère contient un groupement polyéthylène glycol de 40 KDa en 5' afin d'augmenter sa durée de vie dans le plasma en réduisant ainsi la filtration glomérulaire (Pegaptanib). Enfin, sa biostabilité est également améliorée par le couplage d'une 2'-désoxythymidine en 3' par un lien 3'-3'. Des études pharmacocinétiques ont été conduites sur des singes rhésus (*Macaca mulatta*). Le temps de demi-vie de cet aptamère dans le plasma est de 9,3 heures par injection intraveineuse et de 12 heures par injection sous cutanée et une clairance rénale de 6,2 mL/h a été obtenue [134]. Des études pré-cliniques et cliniques sur NX-1838, alors renommé Macugen, ont été conduites par Eyetech Pharmaceutical Inc pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et de l'œdème maculaire diabétique [135-137]. L'activité anti-angiogénique de l'aptamère sélectionné contre le VEGF a été évaluée sur l'angiogenèse de la cornée de rats et la rétinopathie des souris de pré-maturité (ROP). Ces études ont révélé une inhibition significative de la néovascularisation par le VEGF et, 80% des patients traités par le Macugen, montrent une vision stable ou améliorée après 3 mois de traitement. De plus, aucun effet secondaire n'a été observé et aucun anticorps contre l'aptamère n'a été détecté. Eyetech en collaboration avec Pfizer ont reçu l'approbation par la FDA pour la mise sur le marché du Macugen pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Ces résultats ont été les premiers à montrer que les aptamères, sélectionnés *in vitro*, pouvaient être utilisés comme médicaments chez l'homme. Bien que le concept d'application d'acides nucléiques (aptamères) pour cibler des protéines est employé dans la nature par les virus et les cellules, le concept d'utilisation d'aptamères pour fixer et inhiber l'activité de protéines pathogènes date seulement de quelques années. Avec l'approbation de l'aptamère Macugen et la présence d'autres aptamères en cours d'études cliniques, il paraît évident que la recherche et l'utilisation clinique d'aptamères ciblant des protéines devraient être prometteuses.

## **II.4 Les aptamères sélectionnés contre des structures complexes**

Il a été montré qu'il était possible de générer des aptamères non seulement contre une molécule isolée mais également contre des complexes multimoléculaires [138].

### **II.4.1 Les aptamères spécifiques d'une organelle**

Gold et son équipe ont conduit une sélection d'aptamères, en série ARN, contre des ribosomes et la protéine ribosomique S1 afin d'essayer de comprendre le rôle de cette protéine dans la reconnaissance de la région d'initiation de la traduction (TIR) [109]. Les aptamères sélectionnés contre ces molécules montrent des affinités similaires ( $K_d = 4 - 5$  nM) et des structures identiques organisées en pseudo-noeud (**cf tableau 4**) ayant la capacité de reconnaître le ribosome libre ou lié à la protéine S1.

### **II.4.2 Les aptamères spécifiques d'un virus**

Dans ce domaine, un exemple frappant concerne la sélection d'aptamères ARNs contre le virus sarcome de Rous (RSV) intact [110]. Le virus sarcome de Rous est un rétrovirus appartenant à la famille Retroviridae, famille à laquelle appartient également le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Chaque membre de cette famille sont des virus possédant une enveloppe avec des glycoprotéines nécessaires à la fixation du virus à un récepteur spécifique présent à la surface d'une cellule ou pour la fusion à une membrane cellulaire. Les auteurs ont utilisé le virus de sarcome de Rous, pour montrer qu'en absence de connaissance sur la structure de protéines virales, des ARNs ou des analogues d'ARNs, fixant

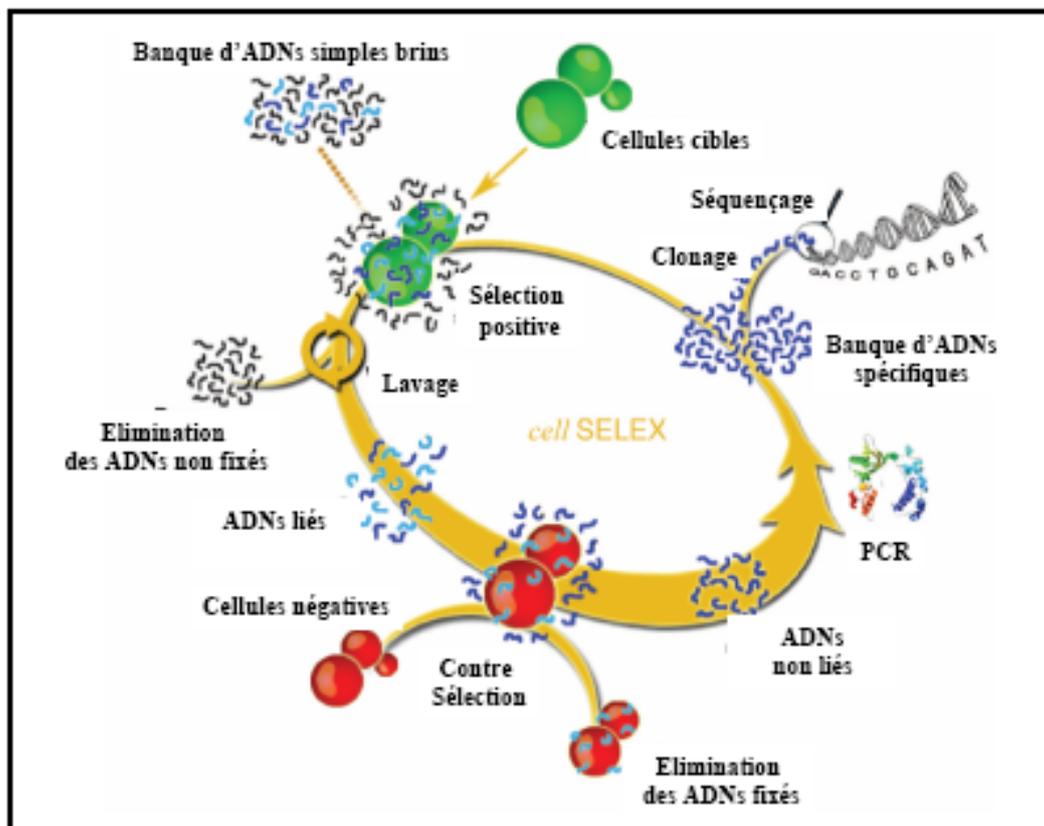
spécifiquement le virus, peuvent être isolés à partir d'une large bibliothèque. Ensuite, la capacité des séquences sélectionnées à neutraliser le virus a été estimée. En effet, les auteurs ont émis l'hypothèse suivante : en fixant le virus, les ARNs ou les analogues d'ARNs devraient changer la structure des protéines présentes à la surface de celui-ci et ainsi, celles-ci ne devraient plus être fonctionnelles dans les différentes étapes de l'infection virale. A savoir, l'attachement du virus, la fusion entre la cellule et le virus, l'internalisation du virus, et l'expression du génome viral dans la cellule infectée. Les oligonucléotides isolés après 12 cycles de sélection, convertis en analogues 2'-fluor, montrent des propriétés inhibitrices de l'invasion virale par suite de l'absorption à la surface des virions. Les auteurs ont démontré que cette activité antivirale est spécifique de l'interaction avec le virus sarcome de Rous.

Ces résultats ont suggéré la possibilité d'application de cette approche pour isoler des ARNs ou des analogues d'ARNs résistants aux nucléases pour d'autres virus tel que le VIH. De plus, la sélection d'ARNs pour des virus intacts ou des cellules entières peut fournir un outil intéressant pour étudier les interactions virus-cellule et les interactions intercellulaires.

#### **II.4.3 Les aptamères spécifiques d'une cellule**

Une stratégie pratique permettant la discrimination des cellules cancéreuses de cellules normales est hautement intéressante puisqu'elle permet, par identification des différences à un niveau moléculaire, de faciliter la découverte des caractéristiques moléculaires de cellules cancéreuses. Dans cet optique, Shangguan et son équipe [111] ont développé une sélection d'aptamères pour des cellules entières. Ils ont nommé cette sélection : *Cell SELEX (figure 14)*.

Une banque d'ADNs simples brins contenant 52 nucléotides aléatoires est incubée en présence de cellules cibles (cellules CCRF-CEM). Les cellules non liées sont ensuite éliminées et les ADNs affins sont élués par chauffage. Les séquences collectées sont ensuite mises en contact avec des cellules Ramos (cellules de lymphocytes B tumorales du lymphome de Burkitt), pour réaliser une sélection négative afin de garder les séquences liant seulement la cellule cible. Les molécules d'ADNs libres sont alors collectées et amplifiées puis le cycle est renouvelé.



**Figure 14:** Schéma représentant le principe de la « Cell SELEX » [111].

Après environ 20 tours de sélection les séquences sont clonées et synthétisées de la même façon que pour la SELEX conventionnelle. Le suivi de la sélection est réalisé par cytométrie de flux. Après chaque cycle, l'ADN isolé est marqué par le FITC et incubé en présence des deux lignées cellulaires. L'intensité de fluorescence des cellules, mesurée par cytométrie de flux, indique la capacité de fixation des séquences sélectionnées aux lignées cellulaires. Aucune fluorescence n'est observée pour la lignée Ramos, en revanche, au fur et à mesure des cycles de sélection, l'intensité de fluorescence augmente pour les cellules cibles. Ceci démontre que les sondes ADNs reconnaissent spécifiquement des cibles à la surface des cellules CCRF-CEM. Cette méthode a permis la sélection d'aptamères hautement affins pour les cellules CCRF-CEM avec des constantes de dissociation variant de 0,8 à 229 nM. Cette méthode est rapide, simple, directe et reproductible et peut être réalisée sans connaissances au préalable pour la molécule cible. Les aptamères sélectionnés ont la capacité de reconnaître les cellules leucémiques présentes dans un mélange cellulaire contenant des cellules normales de moelle osseuse humaine et ont également la capacité à identifier des cellules cancéreuses étroitement liées à la lignée cellulaire de la cellule cible. D'autre part, ces aptamères ont également été utilisés pour la récolte rapide et la détection de cellules leucémiques dans le

sang [139]. Ainsi, la capacité des aptamères sélectionnés, par *cell* SELEX, pour un diagnostic moléculaire dans des cas cliniques est clairement démontrée ici. Donc, la sélection d'aptamères contre des cellules devrait être prometteuse pour le développement de sondes moléculaires spécifiques pour le diagnostic et la découverte de marqueurs spécifiques du cancer.

En conclusion, des cibles très variées ont été visées pour générer des aptamères : des petites espèces chimiques, des acides nucléiques, des protéines, mais aussi des structures complexes telles que des virus ou des cellules. Il est important de noter que des pré-requis sont nécessaires pour permettre la sélection d'aptamères possédant une affinité et une spécificité importantes pour une cible. Tout d'abord, la cible d'intérêt doit être présente en quantité suffisante et avec une importante pureté afin de minimiser l'enrichissement d'oligonucléotides non spécifiques et donc augmenter la spécificité de la sélection. D'autre part, certaines caractéristiques des cibles facilitent la sélection d'aptamères : les groupements chargés positivement (par exemple les groupements amines primaires), la présence de groupements donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogène et la planarité (composés aromatiques) [72,74]. Par contre, la sélection d'aptamères est plus difficile pour des cibles possédant un caractère hautement hydrophobe et anionique.

Dans la partie suivante, les différentes caractéristiques des aptamères seront abordées car selon la molécule cible, l'aptamère sélectionné pourra posséder des propriétés différentes. Des modèles d'interaction aptamère-cible seront également illustrés.

### ***III Les caractéristiques des aptamères***

#### ***III.1 La taille***

Généralement, la taille des oligonucléotides utilisés pour la SELEX excède, ou est proche, de la limite pratique des molécules manipulables. Pour diverses applications, il est préférable que l'aptamère soit le plus petit possible, soit pour un problème de coût soit pour des raisons d'accessibilité de la cible. Après sélection, des expériences de mutations sont très souvent réalisées pour déterminer la séquence minimale des acides nucléiques qui permettra la fixation de la cible d'intérêt. Généralement, la taille d'un aptamère est inférieure à 100

nucléotides. Par exemple, le motif minimal des aptamères spécifiques du VEGF comprend entre 23 et 35 nucléotides [32], l'aptamère minimal fixant la guanine et la xanthine contient 32 nucléotides [140], l'aptamère fixant la streptomycine est de 46 nucléotides [141], et la région minimale de l'aptamère spécifique d'une protéase à sérine du sang (la protéine C) est de 99 nucléotides [142]. Ces résultats fournissent une masse en aptamère variant de 7,5 à 32 kDa sachant qu'une masse de 10 kDa est assez courante. La surface exposée au solvant pour un aptamère classique varie entre 50 et 60 nm<sup>2</sup> [143].

### **III.2 L'affinité**

Lors de la sélection d'un aptamère, les études de fixation sont de grande importance. La détermination de la constante de dissociation  $K_d$  comme paramètre caractéristique des aptamères, est primordiale. Une faible valeur de  $K_d$  désigne des aptamères possédant une forte affinité pour la molécule cible. Généralement, pour des molécules d'intérêts de petite taille, les aptamères identifiés sont caractérisés par des constantes de dissociation de l'ordre du micromolaire tandis que pour des cibles protéiques, des  $K_d$  de l'ordre du nanomolaire et même inférieures (picomolaire) sont parfois obtenues (**cf tableau 3**).

Il est important de noter que ni l'affinité ni la spécificité ne sont reliées à la taille, à la complexité ou à la quantité de molécule cible. Par contre, elles sont en relation avec des propriétés de la molécule d'intérêt telles que les groupements fonctionnels et les paramètres de la SELEX. En effet, des effets électrostatiques et hydrophobes gouvernent généralement les interactions entre deux molécules et, les liaisons hydrogène sont particulièrement importantes pour la reconnaissance des acides nucléiques. De plus, une complémentarité de forme est également cruciale. Une affinité importante pour une molécule cible devrait être obtenue avec des ligands possédant une adéquation parfaite de forme pour la molécule cible et une distribution de charges parfaitement complémentaire. Au contraire, une conformation flexible est un facteur majeur limitant l'affinité et la spécificité d'interaction. En effet, les ligands se liant par le principe d'ajustement de forme (« *induced fit* ») seront capables d'interagir avec une variété de molécules mais posséderont, en contre partie, une affinité plus faible à cause du coût en énergie conformationnelle.

On peut, cependant, se demander pourquoi les aptamères fixant les protéines possèdent de meilleures affinités. Il y a probablement deux raisons à cela. Tout d'abord, la plupart des petites molécules sont moins rigides par rapport aux cibles protéiques

généralement bien structurées. Ainsi, ces petites molécules devront posséder la bonne conformation pour se fixer à l'oligonucléotide ligand, sinon un coût entropique sera nécessaire pour que la molécule cible présente sa bonne conformation [95]. D'autre part, la surface d'interaction d'une petite molécule est inévitablement moins importante que celle d'une protéine. Le nombre de groupements fonctionnels disponibles pour la fixation est également plus faible. En conclusion, une affinité importante pour une petite molécule cible peut être obtenue seulement avec une complémentarité de forme et d'interactions à travers ses quelques groupements fonctionnels disponibles [144].

### **III.3 La spécificité**

La propriété la plus remarquable des aptamères est sans doute la spécificité des interactions engagées avec leur cible, ce qui en fait des agents de premier plan pour la reconnaissance. La spécificité peut être définie comme la capacité de discrimination entre des molécules en compétition pour un ligand commun. Une telle discrimination est très souvent le résultat de différence d'énergie libre d'interaction, mais dans certains systèmes, des discriminations cinétiques existent également (cas des aptamères) [144].

De nombreux exemples, montrant l'extraordinaire spécificité de certains aptamères, sont présents dans la littérature et ont pour certains déjà été évoqués précédemment. Les aptamères ont, par exemple, la capacité à distinguer différentes enzymes possédant la même activité. Ainsi, l'aptamère sélectionné contre la transcriptase inverse du VIH-1 [104] n'interagit pas avec les enzymes homologues du virus aviaire (AMV), ni avec celles du virus murin (MMLV). Il a été possible de sélectionner des aptamères contre les transcriptases inverses d'AMV ou de MMLV qui, réciproquement, ne se fixent pas à l'enzyme du rétrovirus humain [128] (cf § II-3-1). D'autre part, les aptamères dirigés contre les antibiotiques aminoglycosides sont particulièrement spécifiques ; les aptamères sélectionnés contre la tobramycine [145], par exemple, possèdent une affinité 3 à 4 fois inférieure pour d'autres aminoglycosides. Il en est de même pour d'autres aptamères dirigés contre d'autres aminoglycosides (cf § II-1-9). Les aptamères ont également la capacité à distinguer des sucres épimères, anomères et même une modification du lien osidique (cf § II-1-6) [92]. L'un des exemples le plus démonstratif de la spécificité d'un aptamère est sans doute celui de l'aptamère anti-théophylline. Cet aptamère montre une affinité  $10^4$  fois plus faible pour la caféine, un autre dérivé purique qui ne diffère de la théophylline que par un groupement

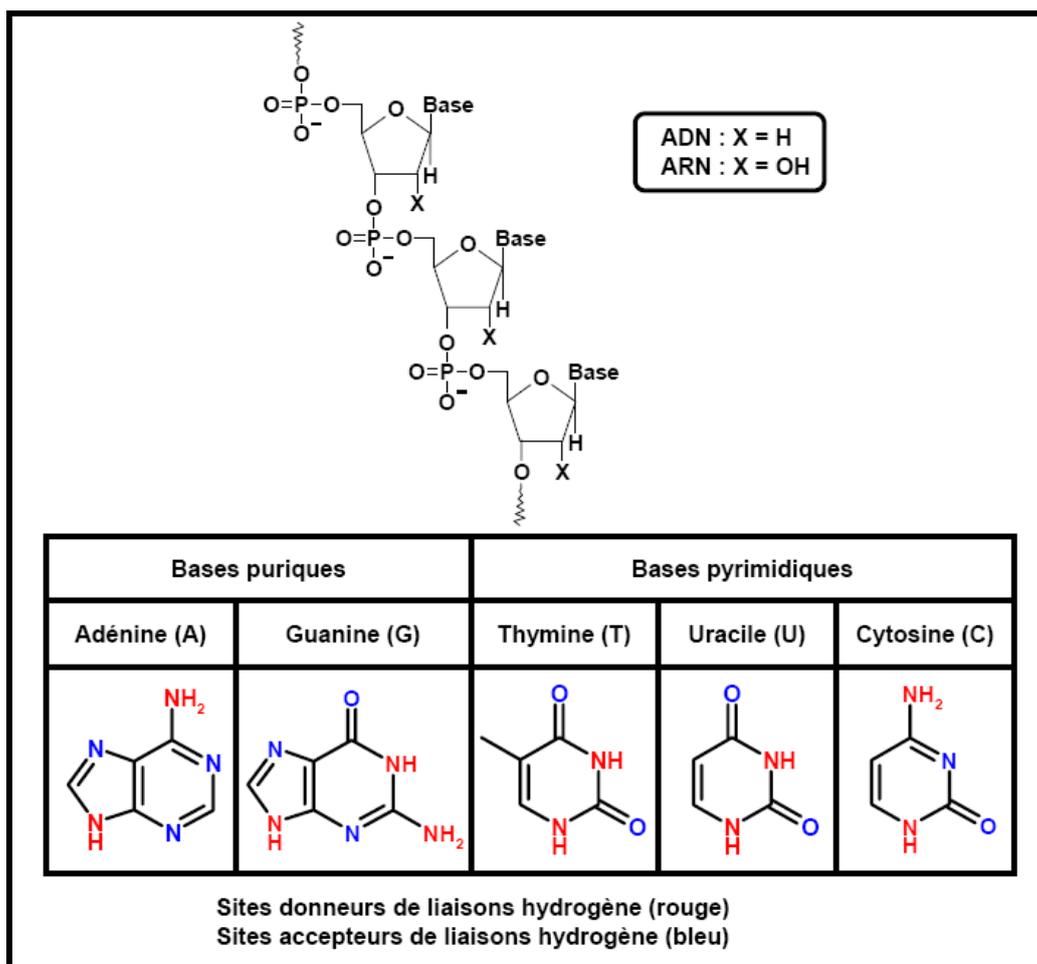
méthyle en position N7 (cf § II-1-7) [93]. Enfin, probablement plus impressionnante encore est la capacité des aptamères à discriminer des énantiomères d'une même molécule. Ainsi, une discrimination d'un facteur 3 entre la L- et D-citrulline ( $\Delta\Delta G = 2,5 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ), une différence de constante de dissociation d'un facteur 6 entre la L- et D-arginine ( $\Delta\Delta G = 4,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) sont obtenues [20], et, un rapport de  $K_d$  de 12000 entre la L- et D-arginine a été publié par Geiger et ses collaborateurs [87]. Ces capacités de discrimination chirale des aptamères sont exploitées au sein de l'équipe de chimie analytique du Département de Pharmacochimie Moléculaire dirigé par le Pr Eric Peyrin [146] et, ont fait l'objet de cette thèse. Les travaux antérieurs à ma thèse seront exposés dans la dernière partie de ce chapitre (§ IV-3-3).

Par la suite, nous nous attacherons à comprendre, à l'aide de la structure des aptamères et de la résolution moléculaire de certains complexes aptamère-molécule cible, ce qui peut expliquer de telle capacité de discrimination pour des molécules très proches. Mais, auparavant, un rappel sur la structure des acides nucléiques est nécessaire.

### **III.4 Caractéristiques structurales des aptamères**

Les oligonucléotides sont des poly-anions, chaque motif unitaire possédant une charge à pH neutre, des sites donneurs/accepteurs de liaisons hydrogène et un hétérocycle aromatique (la base nucléique) pouvant générer des interactions d'empilement (*figure 15*).

Tout comme la structure des protéines, la structure des acides nucléiques possède une classification permettant la hiérarchisation de leur architecture. La structure primaire, correspondant à la séquence en acides nucléiques, se replie suite à la formation de paires de bases, pour générer des structures secondaire et tertiaire. Par analogie avec le vocabulaire décrivant la structure des protéines, on dit donc que l'hélice est la structure secondaire de base des oligonucléotides, tandis que la structure tertiaire décrit l'arrangement suprahélicoïdal de la molécule.



**Figure 15:** Structure des acides nucléiques et des bases associées.

### III.4.1 La structure secondaire : la double hélice

Via le repliement de leur squelette (désoxy)ribose-phosphate, les acides nucléiques monobrans forment des doubles hélices de longueur variable par l'appariement de régions complémentaires au sens de Watson et Crick (c'est-à-dire pour la formation de paires G-C et A-T(U)).

Les petit et grand sillons des hélices représentent des zones d'interaction favorables, que l'évolution naturelle a largement exploitée (par exemple, les facteurs de transcription se lient à l'ADN génomique via le grand sillon). Cependant, la spécificité de ces sites est a priori limitée, l'information discriminante (c'est-à-dire les groupements fonctionnels des bases sont orientés vers l'intérieur) restant peu accessible. Seules les déformations locales au sein de l'hélice, en exposant certains groupements, permettent des interactions spécifiques avec la molécule partenaire. Les déformations des hélices sont créées par des appariements non

canoniques des bases (association selon Wobble, Hoogsteen), par empilement (« stacking ») interbrin des bases (« base zipper »), ou par l'association de deux bases consécutives d'un même brin pour former une plate-forme d'interaction. Les triplets de bases, triples hélices et « tétrades de G » (**tableau 4**) sont stabilisés par de telles interactions et constituent des structures propices à la fixation d'un ligand donné [147].

#### III.4.2 De la structure secondaire à la structure tertiaire : l'arrangement suprahélicoïdal

Les régions charnières de bases non appariées sont de toute première importance pour une interaction spécifique avec la molécule cible, et adoptent des conformations très variées : saillies, jonctions, boucles, pseudo-noeuds... [148].

La présence d'une ou plusieurs bases non appariées crée une saillie au sein de l'hélice. Ces saillies sont soit orientées vers l'intérieur de l'hélice et stabilisées par « stacking », soit rejetées vers l'extérieur, et fournissent alors par leur exposition un site d'interaction privilégié. La zone de connection entre deux hélices orientées différemment s'appelle une jonction ou « turn ». Différentes familles (C-turn, U-turn) ont été identifiées, d'après le nucléotide autour duquel s'effectue le changement d'orientation du brin. Le repliement d'un brin sur lui-même pour former une double hélice donne lieu à une structure « en épingle à cheveux » ou « en tige-boucle » (**tableau 4**).

La taille de la région non appariée (boucle) est variable. Mais les conformations des séquences consensus fréquemment rencontrées GNRA ou UNCG (où R = une purine, et N = un nucléotide) sont rendues particulièrement stables et rigides par l'appariement de la première et de la dernière base, un fort empilement, et un réseau de liaisons hydrogène. Le rôle de ces boucles est varié : stabilisation, interaction longue distance dans l'ARN (ou ADN) ou interaction ADN(ARN)-protéine.

Des riboses interagissant par liaisons hydrogène entre leurs groupements 2'-OH (« ribose zipper ») participent à l'organisation suprahélicoïdale des oligonucléotides, en stabilisant le rapprochement électrostatiquement défavorable des hélices, pour faire émerger une architecture tridimensionnelle de la molécule. Des structures très compactes de type « pseudo-nœud » peuvent également se former par l'interaction d'une tige-boucle avec une portion simple brin (**tableau 4**).

L'empilement d'hélices et le compactage de l'ensemble sont enfin la conséquence d'interactions entre boucles : deux boucles « s'embrassent » (« kissing complexes ») par

appariement de leurs résidus complémentaires, ou encore une boucle s'insère soit dans une hélice, soit au sein d'une structure réceptrice complémentaire (« docking »).

Enfin, de nombreuses interactions stabilisantes mettent en jeu des cations et des molécules d'eau, occupant des sites de coordination spécifiques définis par l'arrangement tridimensionnel local de l'oligonucléotide. A ce titre, certains cations et molécules d'eau font partie intégrante de la structure finale de l'ensemble et sont indispensables à son maintien [147].

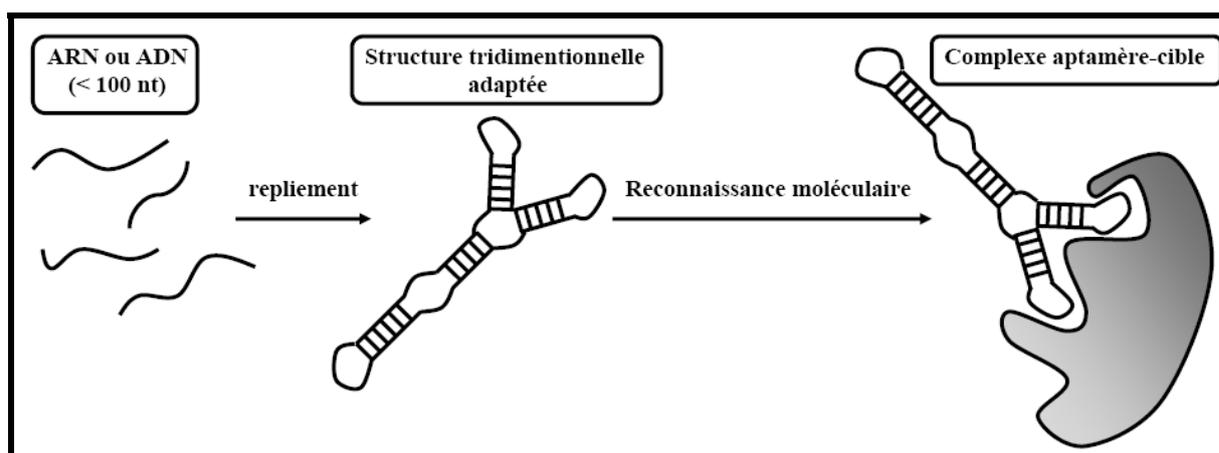
**Tableau 4** : Quelques motifs structuraux rencontrés dans les aptamères

Motifs structuraux	Présence		Description	Schéma représentatif
	ADN	ARN		
« Tige-boucle »  ou  « épingle à cheveux »	++	++	Motif le plus connu, constitué d'une région en double hélice terminée par quelques nucléotides non appariés formant une boucle. Parfois, on peut rencontrer des bases non appariées formant un renflement appelé « bulge ».	
Pseudo-nœud	+	+++	Le pseudo-nœud est constitué de l'interaction d'une boucle avec une séquence complémentaire située en dehors de la boucle. Cette séquence ne traversant pas la boucle est nommée « pseudo-nœud ».	
« tétrades de G »  ou  quadruplexes	+++	+	Les G-quartets comprennent 4 guanines associées dans un plan cyclique par l'intermédiaire des atomes d'azotes en N7, par des liaisons de type « Hoogsteen ». Chaque guanine est un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogène. Cette structure plane délimite en son centre une zone chargée électro-négativement par les liaisons carboxyles et permet ainsi le recrutement de cations qui stabilisent ces structures. Les G-quadruplexes (G4) correspondent à un empilement hydrophobe de plusieurs G-quartets et il y a autant de G-quartets que de guanines adjacentes répétées selon un multiple de 4 [149].	

### III.5 Liaison d'un aptamère à sa cible : quelques exemples de structures résolues

Que la cible reconnue soit une petite molécule, un oligosaccharide, un peptide, une protéine ou une structure complexe, la liaison avec l'aptamère implique un phénomène dynamique imposant un réarrangement conformationnel plus ou moins important d'une structure préexistante. Le repliement en une architecture tridimensionnelle permet à l'aptamère d'encapsuler complètement sa molécule cible en générant une poche de fixation spécifique.

La reconnaissance moléculaire de l'aptamère repose sur une complémentarité de forme (*figure 16*), des interactions d'empilement (« stacking ») entre les composés aromatiques et les bases nucléiques de l'aptamère, des interactions électrostatiques entre les groupements chargés ou des liaisons hydrogène [150-154].



**Figure 16:** Représentation schématique de la reconnaissance d'une molécule cible par un aptamère.

Des structures de complexes aptamère-cible, élucidées par diffraction aux rayons X ou par Résonance Magnétique Nucléaire, ont montré l'inclusion importante de la cible au sein de l'architecture oligonucléotidique : la cible semble être un élément intrinsèque de la structure globale du complexe.

Quelques exemples de ces structures résolues seront détaillées par la suite afin d'essayer d'expliquer les propriétés de discrimination des aptamères pour des molécules très proches et d'observer les différents éléments structuraux des aptamères intervenant dans la fixation de la molécule cible.

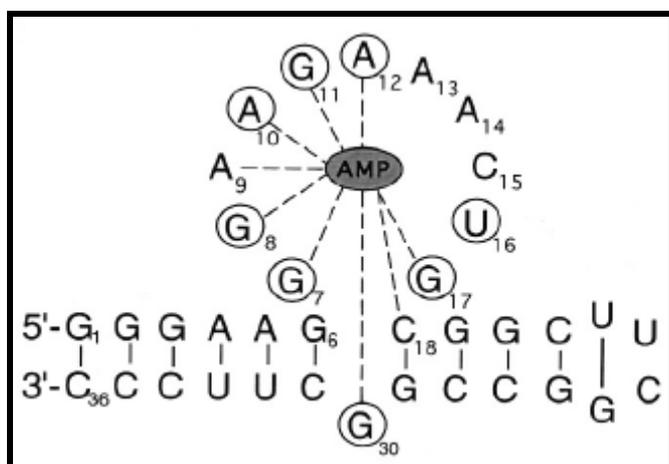
### III.5.1 Exemple d'un complexe aptamère-nucléotide

**Remarque :** pour éviter toutes confusions, lorsque la base est indiquée en italique, le nombre associé correspond à la position chimique au sein de la base. Sinon, ce nombre fait référence à la position de cette base dans la séquence de l'aptamère

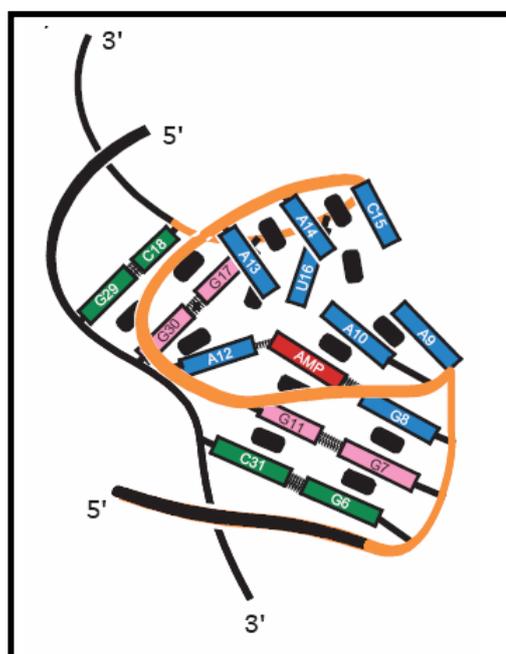
Sassanfar et Szostak [82] ont appliqué la sélection *in vitro* afin d'identifier un aptamère ARN fixant l'ATP, liée au niveau d'une colonne d'affinité par l'intermédiaire du carbone C8 de l'adénine (cf § II-1-3). Cet aptamère a la capacité d'interagir également avec l'AMP, l'ADP et l'adénosine de façon stoechiométrique. En revanche, les analogues triphosphates ne sont pas fixés par cet aptamère.

La structure du complexe aptamère ARN-AMP a été résolue par deux laboratoires différents [155,156]. Les oligonucléotides utilisés par ces équipes possèdent des tiges qui diffèrent par leur longueur et leur séquence. Cependant, la poche de fixation de l'AMP (boucle interne et séquence consensus) est identique, mis à part quelques erreurs expérimentales (*figure 17a et 18a*). La *figure 17* donne la structure secondaire de l'aptamère utilisé par Dieckmann et ses collaborateurs et montre également une illustration schématique du complexe aptamère-cible.

(a)

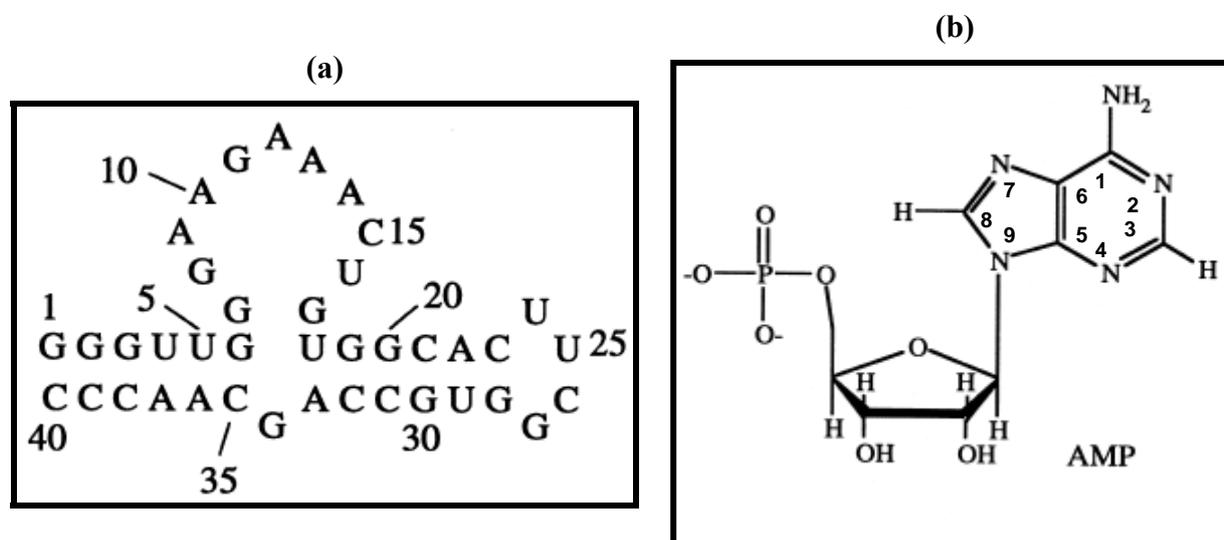


(b)



**Figure 17:** (a) Structure secondaire de l'aptamère ARN fixant l'AMP utilisé par Dieckmann : les bases conservées sont entourées et les pointillés indiquent les bases connectées à l'AMP. (b) Schéma du complexe aptamère ARN-AMP illustrant le repliement en  $\xi$ , les empilements de bases (rectangle noir), et les appariements de bases [72,156].

Par la suite, nous décrivons la structure du complexe aptamère-AMP utilisé par Jiang et ses collaborateurs (*figure 18*) [155] puisque les deux groupes fournissent des conclusions similaires concernant les caractéristiques « clefs » associées à la structure de l'ARN et à l'association du complexe.



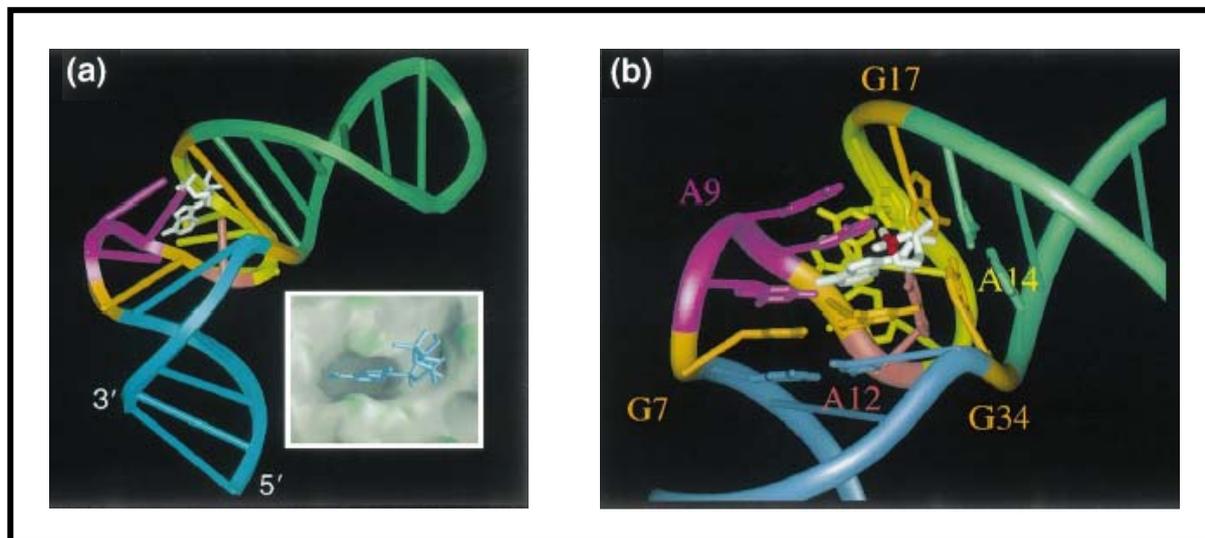
**Figure 18:** (a) Structure secondaire de l'aptamère ARN fixant l'AMP utilisé par Jiang. (b) Structure chimique de l'AMP [155].

La structure de cet aptamère est constituée de deux tiges d'ARNs orientées orthogonalement ( $106 \pm 9^\circ$ ) (*figure 19a*) et connectées par l'intermédiaire d'une boucle interne asymétrique, un segment de 11 nucléotides riche en purines faisant face à une guanine (G34). Une des tiges se termine par une tétraboucle UUCG. Le segment de 11 nucléotides (G7 à G17) lié à l'AMP s'arrange en formant un « S », la partie 5' (G7 à A12) est impliquée dans la liaison de l'AMP, et l'autre partie (A13 à G17) permet le maintien de la structure de l'édifice et la fermeture de la poche de fixation (*figure 19*).

La partie hydrophobe de l'AMP constituée par son cycle purine est intercalée dans un réseau de bases empilées, qui imite la structure d'un motif très stable que l'on retrouve dans beaucoup d'autres structures ribonucléiques : la tétraboucle GNRA [157] (*figure 20a*). Les bases G8-A9-A10 constituent les trois premiers résidus du motif GNRA et, l'AMP vient s'insérer comme quatrième base de la tétraboucle.

La reconnaissance moléculaire de la cible est réalisée par un mésappariement G8-AMP impliquant 2 liaisons hydrogène. L'AMP établit également une liaison hydrogène via son N3 avec l'amine exocyclique de l'adénine A12 lui étant perpendiculaire (*figure 20b*). Ainsi, la première partie de la boucle facilite la fixation de l'AMP en orientant A12 de façon orthogonale par rapport à l'AMP et G11 afin que le groupement amine exocyclique de A12

forme une liaison hydrogène avec le N3 de l'AMP. Le reste de la boucle undécanucléotidique est orienté de façon à former une « cage » emprisonnant l'AMP et l'empêchant d'interagir avec une mauvaise orientation. Cette « cage » est fermée aux deux extrémités par deux mésappariements G-G : G17-G34 en haut de l'AMP et G7-G11 en bas (*figure 20d*).

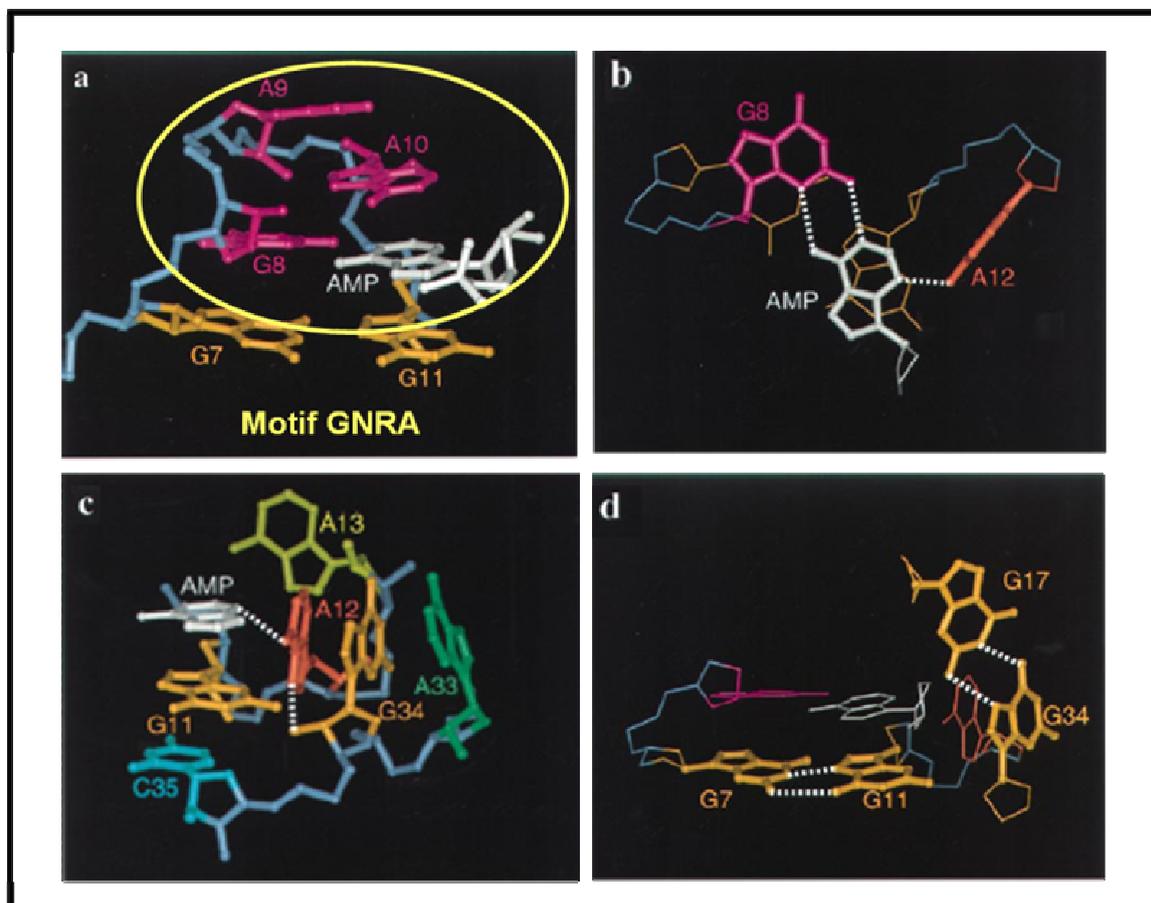


**Figure 19:** Représentation de la structure tertiaire du complexe aptamère-AMP (les tiges droite et gauche sont représentées respectivement en vert et bleu, les deux appariements G-G sont en orange, les résidus G8 à G10 constituant une partie du motif GNRA sont en magenta. Le résidu A12 est coloré en marron. L'encadré représente une vue de l'AMP encapsulé dans la poche de fixation de l'aptamère [154].

D'autre part, il peut être observé que la conformation des riboses des résidus G11, A12, et G34 est de type C2'endo alors qu'habituellement les riboses de l'ARN, sous la forme hélice A, possèdent une conformation C3'endo. Cette caractéristique de l'aptamère autorise une distorsion du squelette expliquant que des bases adjacentes G11-A12, A12-A13, et G34-C35 ne sont pas empilées alors que les résidus non adjacents tels que G11-C35 et A12-G34 sont empilés (*figure 20c*). Enfin, nous pouvons remarquer que la position C8 du cycle purine de l'AMP (site d'attachement du ligand au niveau du support solide de la colonne d'affinité lors de la sélection) et le groupement 5' phosphate ne sont pas impliqués dans la fixation et restent donc exposés au solvant.

L'aptamère ARN pour l'AMP est un bon exemple pour illustrer les phénomènes mis en jeu lors de la liaison d'une cible par l'ARN. En effet, cette reconnaissance implique une fixation adaptée, au cours de laquelle l'AMP induit un changement conformationnel du site de fixation pour l'ATP dans l'aptamère. En absence de ligand, la boucle interne contenant la guanine non appariée est exposée au solvant ; aucune résonance n'est observée entre la boucle interne et la guanine sur le spectre RMN de l'aptamère libre. Le repliement en structure

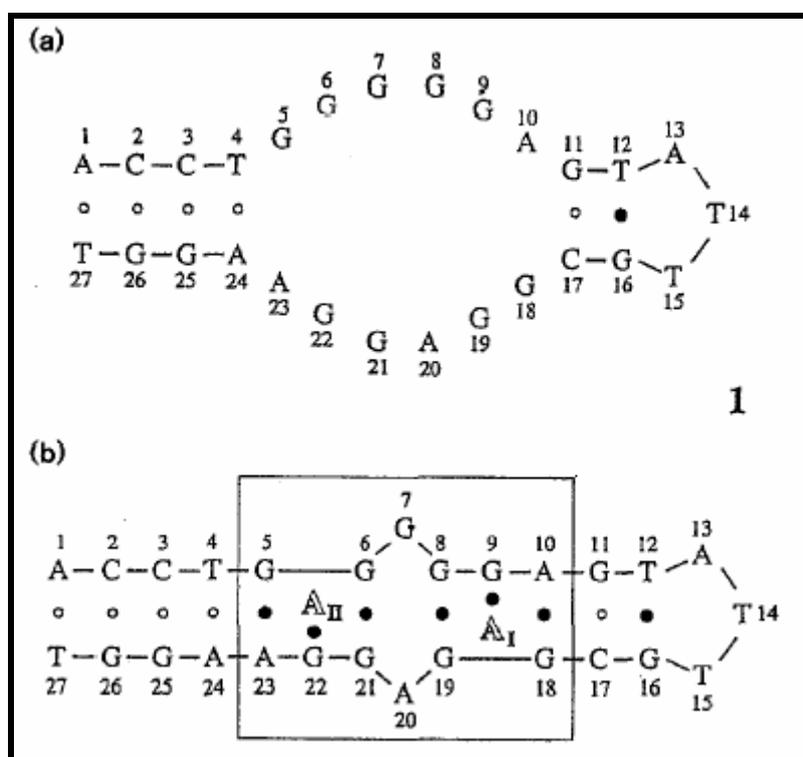
tridimensionnelle de l'aptamère, permettant d'encapsuler l'AMP, semble être initié par la formation du motif de type GNRA lors de l'ajout d'AMP. Ainsi, la résolution de la structure du complexe aptamère-AMP suggère l'implication d'un mécanisme de type « *induced fit* » similaire à celui adopté par les enzymes.



**Figure 20:** (a) Représentation structurale du motif GNRA et des bases G7 et G11 fermant le motif, (b) Description des liaisons hydrogène entre l'AMP et G8, A12. (c) Illustration de l'environnement à gauche de l'AMP : les pointillés indiquent les liaisons hydrogène entre l'amine exocyclique de A12 et le N3 de l'AMP et entre le N7 de A12 et le 2'-OH du ribose de G34. (d) Représentation des 2 mésappariements G-G : liaison Hoogsteen inversée G7(*anti*)-G11(*anti*) et liaison Hoogsteen G17(*anti*)-G34(*syn*) [152].

La méthode de sélection *in vitro* a également été utilisée pour identifier des aptamères ADN fixant leur ligand avec une affinité importante. Ainsi, un aptamère ADN fixant l'ATP a été sélectionné (*figure 21*) [83], cet aptamère forme également un complexe de haute affinité pour l'AMP. La structure du complexe aptamère ADN-AMP a été résolue par RMN [158], cet aptamère semble former une structure en G-quartet à deux plans. Une comparaison des structures des complexes aptamère ADN-AMP et aptamère ARN-AMP indique que ces complexes adoptent des structures secondaire et tertiaire différentes à cause de l'absence de l'hydroxyle en 2' dans l'ADN par rapport à l'ARN. De plus, une étude par RMN a également

montré que l'aptamère ADN lie deux molécules d'ATP alors que l'aptamère ARN n'en lie qu'une [158]. Cependant, de façon surprenante, ces complexes possèdent des appariements identiques permettant la reconnaissance et des éléments structuraux communs définissant leur poche de fixation. En effet, les deux aptamères reconnaissent la base de l'AMP par l'intermédiaire d'une guanine et forment un mésappariement planaire identique : la guanine reconnaît la face Watson-Crick de l'adénine par l'intermédiaire de son sillon mineur (*figure 20b*). De plus, dans chaque système, cette reconnaissance G-A(MP) se trouve empilée au dessus d'un mésappariement G-G impliquant la face Watson-Crick de l'une des guanine et le côté Hoogsteen de l'autre. Enfin, pour les deux complexes, la base adénine de l'AMP fait face à une autre adénine par son côté opposé. Cette adénine est impliquée dans un mésappariement G-A dans le complexe aptamère ADN-AMP alors que cette dernière n'est pas appariée dans le complexe impliquant l'aptamère ARN.

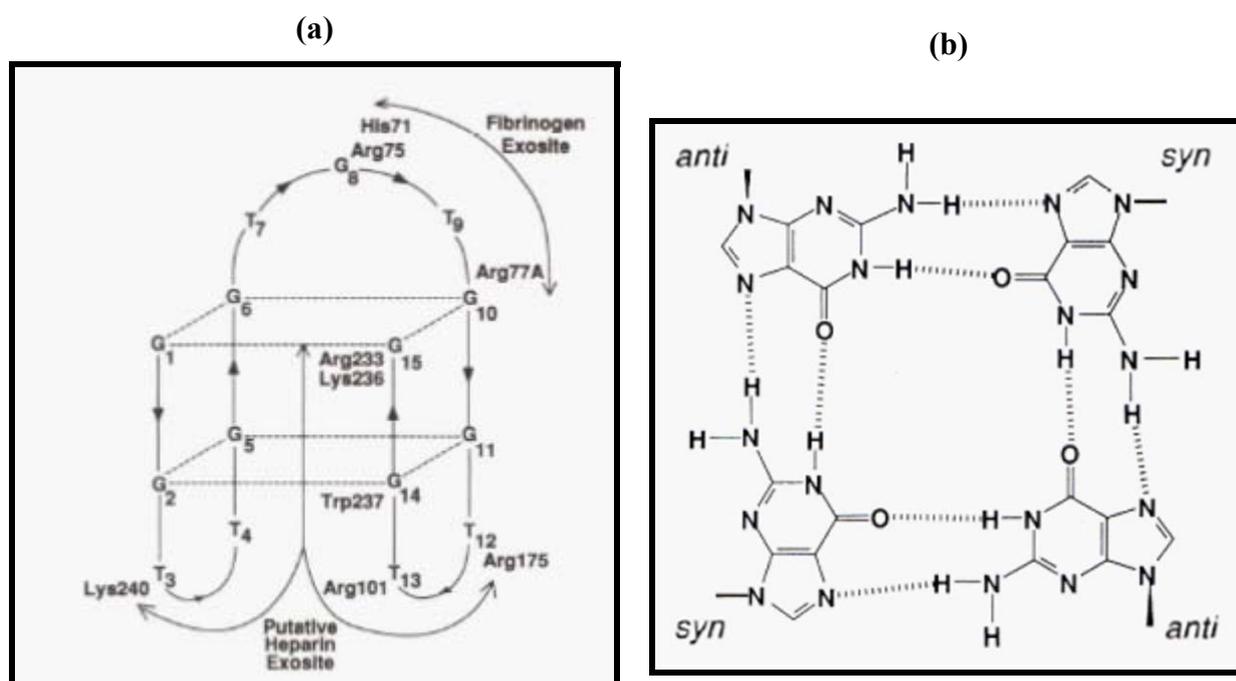


**Figure 21:** (a) Représentation structurale de l'aptamère ADN 27-mer fixant l'ATP identifié par sélection *in vitro* par Huizenga et coll. [83] : les appariements de type Watson-Crick sont représentés par des ronds et les mésappariements par des cercles remplis. (b) Représentation schématique du repliement secondaire de cet aptamère : A<sub>I</sub> et A<sub>II</sub> représentent les 2 AMP liés de façon non-équivalente [158].

### III.5.2 Exemple d'un complexe aptamère-protéine formant une structure particulière

Un aptamère ADN de 15 mer de long, dGGTTGGTGTGGTTGG, fixant la thrombine et possédant des propriétés anti-coagulantes, a été sélectionné *in vitro* (cf § II-3-2) [105].

La structure en 3 dimensions de cet aptamère en solution a été résolue par RMN [159-161] et la structure du complexe aptamère-thrombine a été évaluée par cristallographie aux rayons X [162]. Ces études ont montré que ces séquences G, T répétées adoptent une structure dite en « tétrade de G » dans laquelle chaque G (souligné) peut interagir via deux liaisons hydrogène avec les deux G voisins pour donner un arrangement en plan carré. Cet aptamère s'organise en une structure comportant deux « tétrades de G » empilées l'une sur l'autre, connectées par deux boucles TT et une TGT (*figure 22*). En raison de la forte densité électronique du fait de la présence des fonctions carbonyles des guanines au centre des plans carrés, la présence de cations monovalents et notamment du potassium lié par coordination, stabilise fortement ce type de structure.

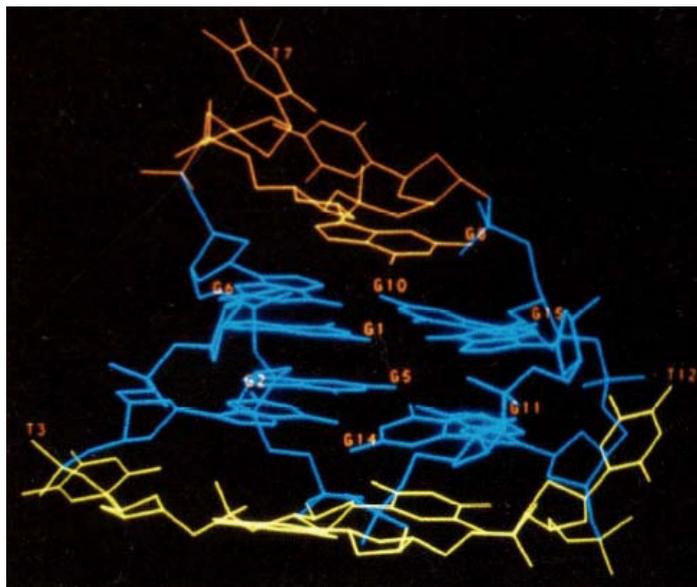


**Figure 22:** (a) Représentation schématique de la structure de l'aptamère ADN 15-mer replié et son interaction avec l' $\alpha$ -thrombine [162]. (b) Illustration des liaisons hydrogène mises en jeu entre les guanines au sein d'une « tétrade de G » [160].

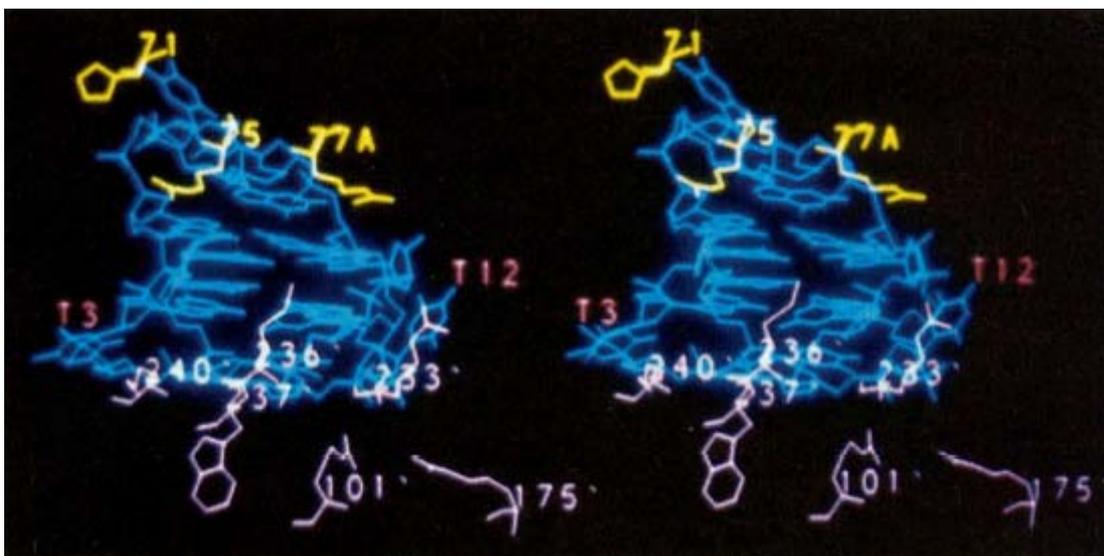
L'élucidation de la structure cristalline du complexe aptamère-thrombine a montré que l'aptamère est pris en sandwich entre deux molécules de thrombines chargées positivement [162] (*figure 23*).

Les structures des complexes résolues par RMN ou par cristallisation aux rayons X sont très similaires, mais la polarité de la chaîne est différente. Les deux boucles TT longent le sillon majeur dans le modèle résolu par cristallographie alors qu'elles traversent le sillon mineur dans le modèle élucidé par RMN (*figure 24*). Cette différence de structure peut être attribuée à des modifications conformationnelles liées à la fixation de la thrombine par l'aptamère [162].

(a)

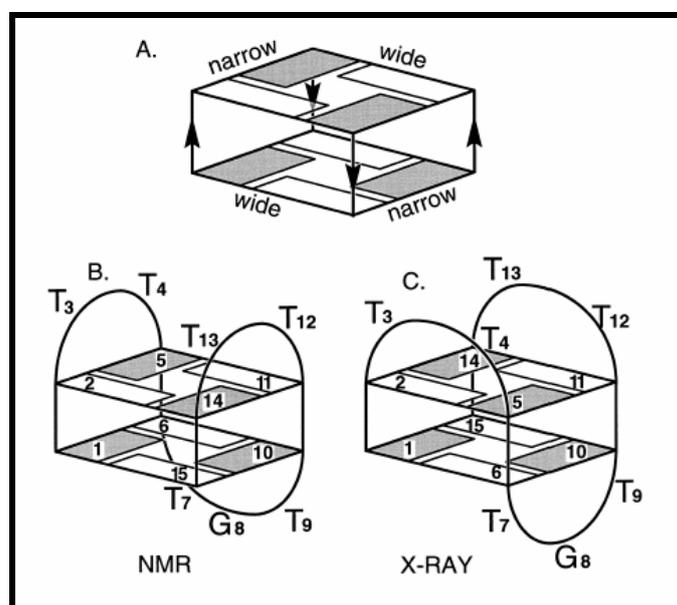


(b)



**Figure 23:** (a) Structure tertiaire de l'aptamère ADN dans le complexe (les tétrades de G sont représentées en bleu, les boucles TT sont en jaune et la boucle TGT en orange). (b) Représentation de l'interaction de l'aptamère avec la thrombine : l'aptamère est coloré en bleu, les chaînes latérales de la thrombine chargées positivement sont représentées en jaune (exosite fibrinogène) et en rose (site héparine) [162].

L'aptamère ADN sélectionné contre la thrombine forme donc une structure en « tétrade de G » mais les détails des interactions avec cette protéine ne sont pas clairement élucidés [163].



**Figure 24:** (A) Représentation schématique des bases guanines au sein d'une « tétrade de G ». Les nucléotides *syn* sont grisés. Les modèles obtenus par RMN et par cristallographie aux rayons X sont représentés en (B) et (C) respectivement [163].

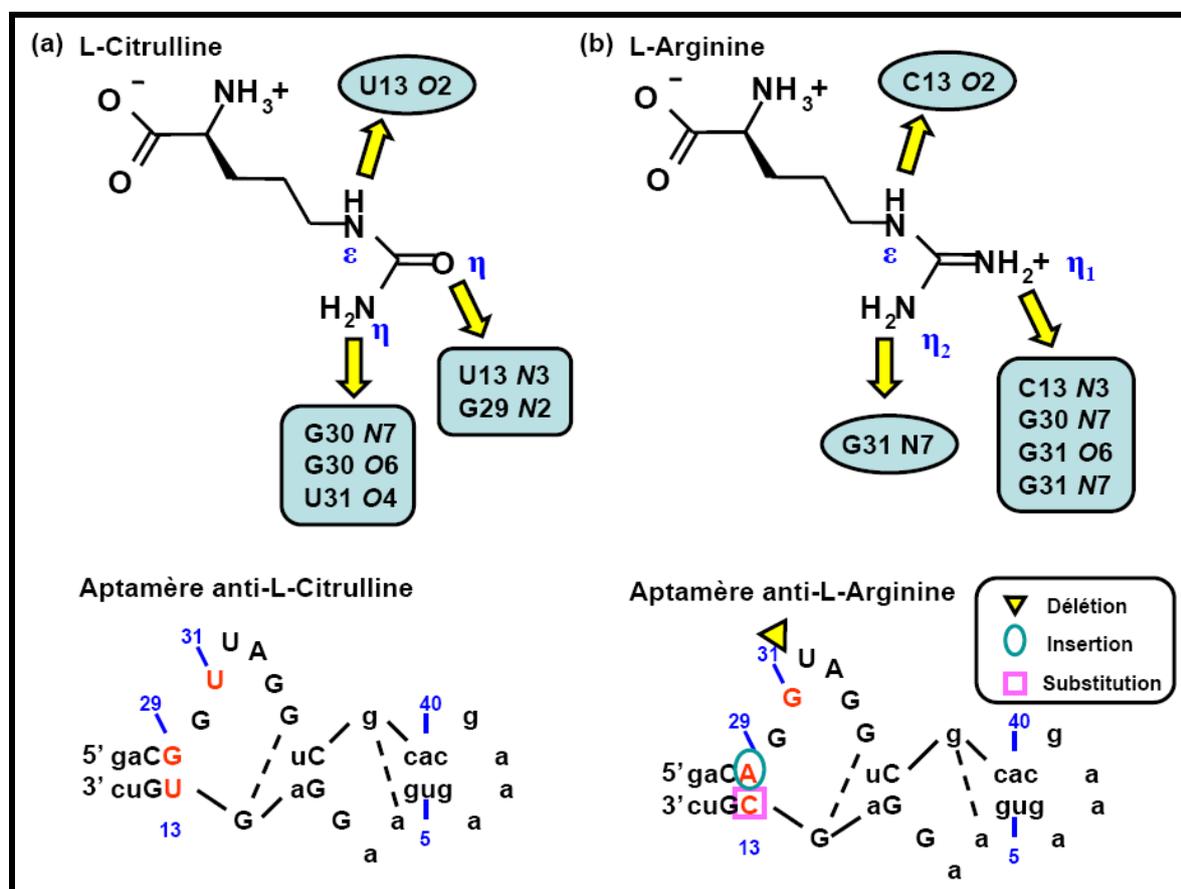
### III.5.3 Structure de complexes impliquant un aptamère hautement sélectif

#### III.5.3.1 Exemple du complexe aptamère-arginine/citrulline

Les aptamères fixant la citrulline et l'arginine ont été isolés à partir de deux sélections successives : l'aptamère spécifique de la L-arginine a été obtenu à partir de l'aptamère anti-L-citrulline muté (cf § II-1-5) [20]. Ces deux aptamères fixent leurs molécules cibles respectives avec une bonne affinité ( $K_d$  de l'ordre du micromolaire). Cependant, aucune affinité n'a été détectée pour des acides aminés analogues à leurs molécules d'intérêt.

Les aptamères résultants sont formés de deux boucles internes séparées par deux couples de bases nucléiques appariées et encadrées par des hélices de type Watson-Crick et se terminant d'un côté par une tétraboucle (**figure 25**). La séquence consensus des deux aptamères diffère par seulement trois nucléotides représentés en rouge. L'aptamère sélectionné pour la L-arginine a pu subir 3 mutations (une délétion, une insertion et une substitution) lors de la resélection à partir de l'aptamère fixant la L-citrulline. Nous pouvons

noter que la structure secondaire de la boucle interne la plus grande présente des similarités avec la boucle interne de l'aptamère fixant l'ATP décrit précédemment : une guanine non appariée (« bulge ») fait face à une boucle enrichie en purines. Des études par modifications chimiques [164] ont indiqué que le changement de tous les nucléotides présents dans la région conservée (excepté pour U32) interfère avec la fixation du ligand.



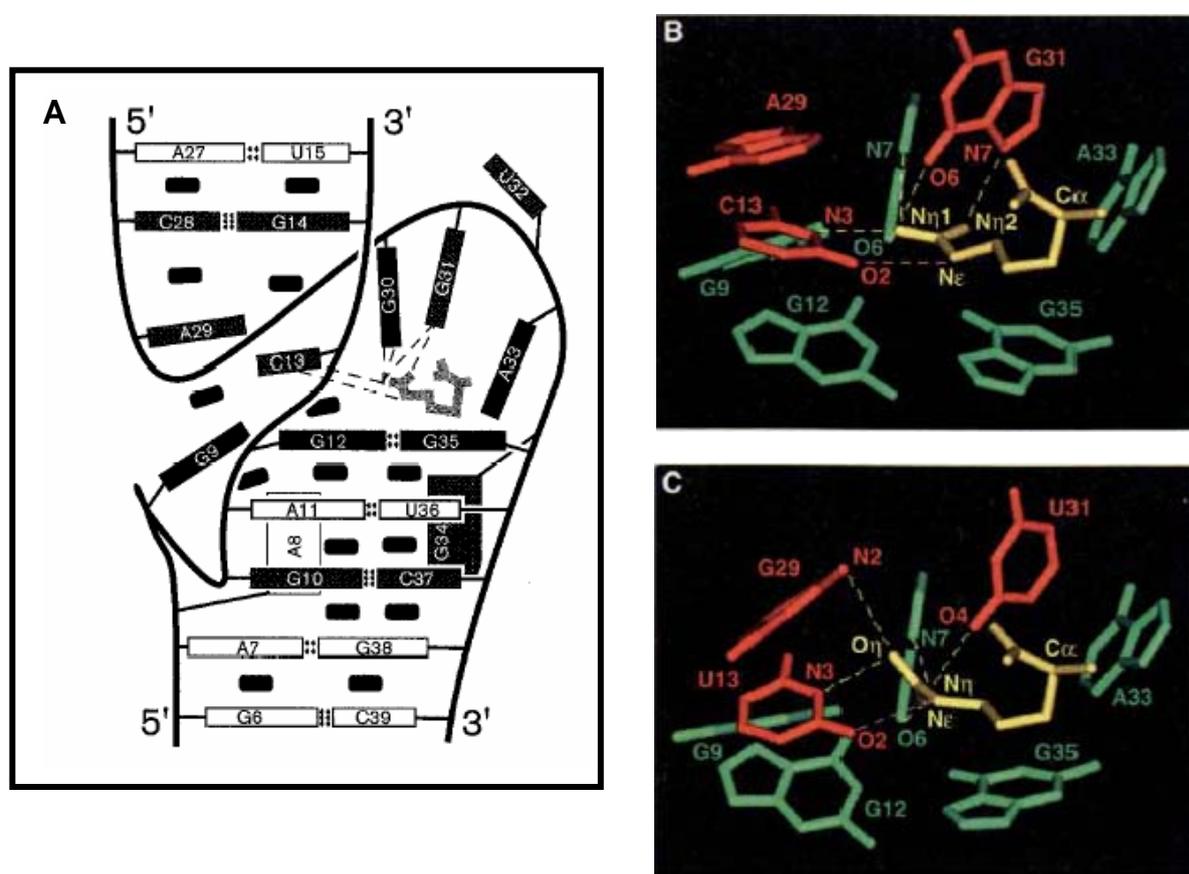
**Figure 25:** Représentation des structures de la L-citrulline (a) et de la L-arginine (b) ainsi que leurs aptamères respectifs. Les bulles indiquent les bases nucléiques de l'aptamère liées avec le groupement de l'acide aminé fléché. Les résidus en rouge représentent les bases qui diffèrent d'un aptamère à l'autre. Les mutations subies par l'aptamère fixant l'arginine sont indiquées par les symboles donnés en légende. Les bases conservées, parmi les différents aptamères isolés, sont indiquées en lettres majuscules alors que celles variantes sont indiquées en minuscules.

La conformation en trois dimensions des deux complexes aptamères liant leurs molécules cibles a été déterminée par une combinaison de spectroscopie RMN 2D (NOESY) et des études de dynamiques moléculaires [165]. Ainsi, ces analyses montrent comment la présence de trois mutations au niveau du site de fixation dans ces ARNs détermine lequel des 2 acides aminés est spécifiquement reconnu.

La reconnaissance moléculaire de la cible par ces deux aptamères implique la participation des résidus G12, C/U13, A/G29, G30 (*syn*), G/U31, A33, et G35 (*syn*) appartenant à la boucle interne la plus large. Les chaînes latérales aliphatiques de l'arginine et

de la citrulline s'empilent au dessus d'une plateforme formée par le mésappariement G12-G35 et la base G9 dans les deux complexes. Du côté opposé, la poche de fixation est fermée par les bases G30, U/G31 et A33 (**figure 26**).

La reconnaissance de la L-arginine par son aptamère ARN implique la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires entre les protons  $\text{NH}_2$  ( $\eta_1$  et  $\eta_2$ ) et  $\text{NH}$  ( $\epsilon$ ) de la cible et les atomes accepteurs de liaisons hydrogène autour du sillon majeur des bases G30 et G31 et la face Watson-Crick de C13 dans le complexe (**figure 26b**). La reconnaissance de la L-citrulline par son aptamère ARN implique au contraire la formation de liaisons hydrogène entre les protons  $\text{NH}_2$  ( $\eta$ ),  $\text{NH}$  ( $\epsilon$ ) et l'oxygène carbonyle de la cible et les fonctionnalités polaires des faces Watson-Crick des résidus U13, G29, et U31 dans le complexe (**figure 26c**).



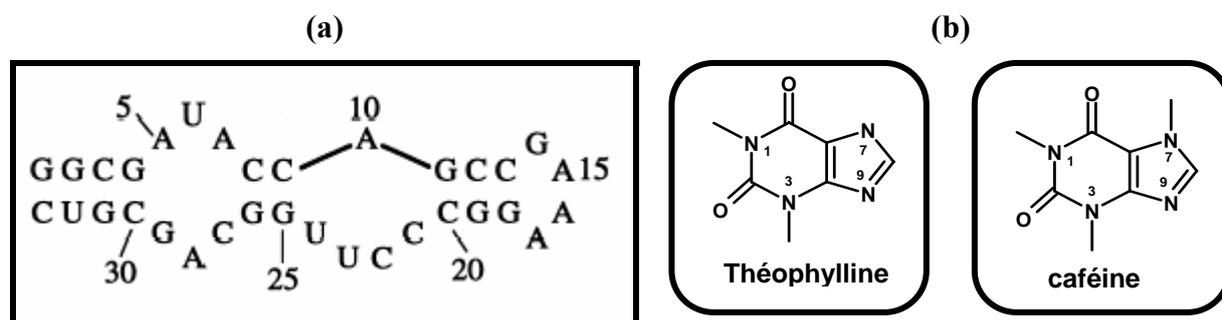
**Figure 26:** (A) Illustration schématique de la structure du complexe aptamère-arginine représentant les empilements de bases (rectangle noir) et les appariements de bases [150]. Représentation de la poche de fixation pour l'aptamère arginine (B) et pour l'aptamère citrulline (C). Les bases formant la poche de fixation de l'ARN sont représentées en vert et les trois nucléotides qui diffèrent entre les deux complexes sont représentés en rouge. L'arginine et la citrulline sont colorées en jaune [165].

La discrimination entre la L-citrulline et la L-arginine peut être expliquée par le fait qu'un groupement carbonyle accepteur de liaisons hydrogène dans la L-citrulline fixant les atomes donneurs  $\text{N3H}$  de U13 et  $\text{N2H}_2$  de G29 de son aptamère (**figure 26c**) a été remplacé par des protons donneurs d'hydrogène  $\text{NH}_2$  ( $\eta_1$ ) dans la L-arginine se fixant par liaisons

hydrogène à des atomes accepteurs : N3 de C13, N7 de G30 et O6 de G31 dans l'aptamère ARN fixant l'arginine (**figure 26b**). D'autre part, on peut noter qu'il n'est pas surprenant que les fonctions amine et carbonyle sur le carbone en  $\alpha$  ne soient pas impliquées dans la fixation à l'aptamère et soient donc exposées au solvant compte tenu du mode d'immobilisation de la cible lors de la SELEX [20].

### III.5.3.2 Exemple du complexe aptamère-théophylline

La sélection *in vitro* a également été utilisée pour identifier un aptamère ARN formant un complexe de haute affinité avec la théophylline (**cf § II-1-7**) [93]. La résolution de la structure du complexe aptamère-théophylline [166] a permis l'identification de nombreux motifs structuraux, formant une poche de fixation bien structurée, permettant de reconnaître la théophylline et de discriminer des structures similaires telles que la caféine (**figure 27**). La structure du complexe démontre comment les interactions entre ces différents motifs structuraux génèrent un site de fixation hautement spécifique pour sa cible.

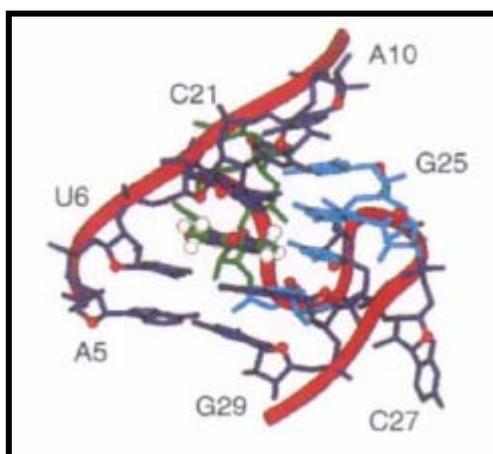


**Figure 27:** (a) Représentation de la structure secondaire de l'aptamère spécifique de la théophylline sélectionné par Jenison et coll. [154]. (b) représentation de la structure chimique de la théophylline et de la caféine.

L'aptamère ARN, sélectionné par Jenison et ses collaborateurs, est formé de 33 nucléotides organisés en deux boucles internes : une symétrique et une asymétrique, de deux régions en tiges appariées dont l'une d'elle se termine par une tétraboucle GNRA. La structure secondaire de cet aptamère possède des caractéristiques communes à l'aptamère spécifique de l'arginine et de la citrulline (**figure 25 et 27a**).

La structure tridimensionnelle de l'aptamère anti-théophylline a été générée par des analyses de spectroscopie RMN et de dynamique moléculaire [166]. Ces études ont indiqué un réarrangement conformationnel important des résidus de la boucle interne lors de la fixation, de façon stoechiométrique, de la théophylline. En effet, ces résidus nécessaires à la fixation de la théophylline sont peu structurés en son absence. Puis, cet ARN adopte une

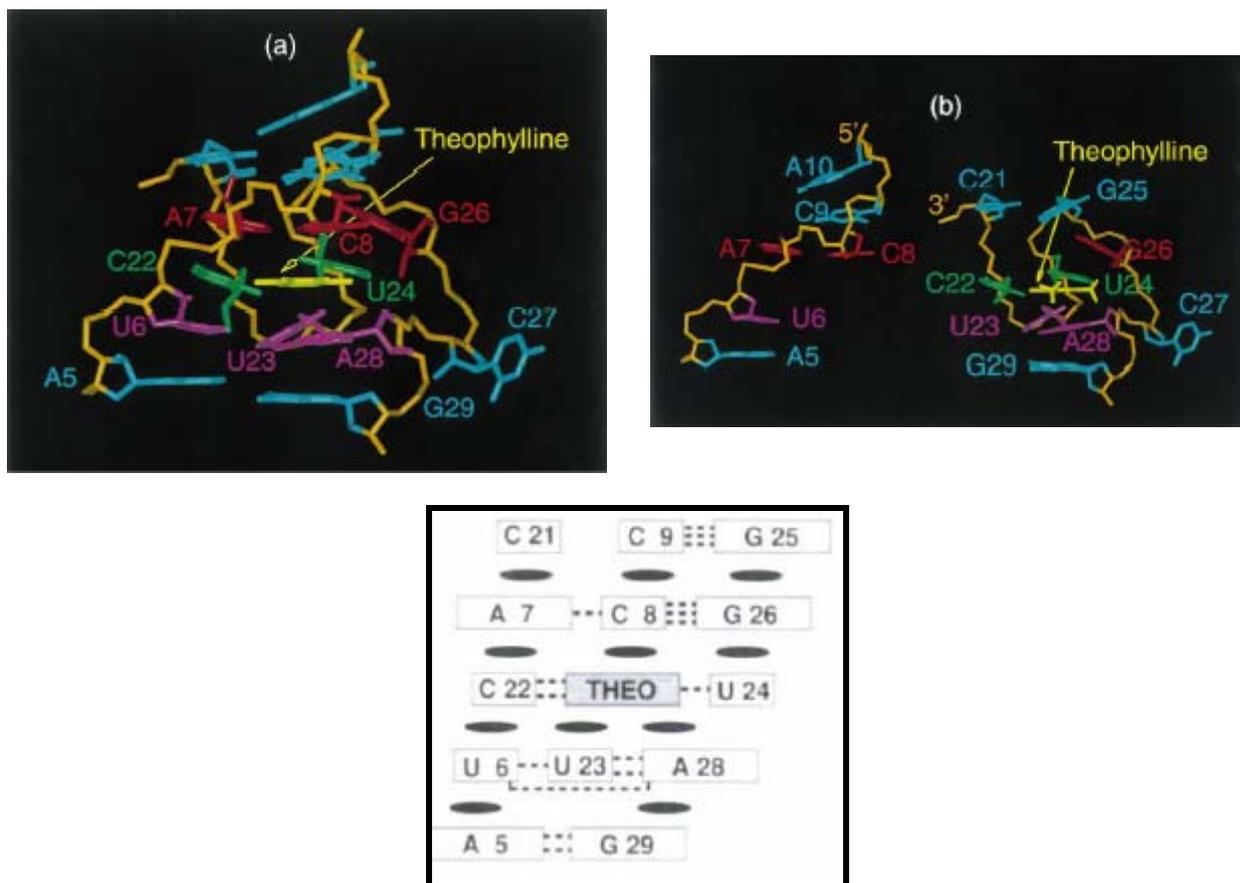
conformation particulière, le squelette du brin 3' se replie en formant un « S ». Les résidus du C21 au G29 constituent cette jonction en « S » où la première courbure du S se produit au niveau du U23 alors que G25 est l'apex de la seconde courbure (**figure 28**). La formation de ce motif est permise par l'inversion de l'orientation du ribose de la base U24, ce sucre possède une polarité 5'-3' qui est opposée à celle de ces voisins, ce qui induit un changement brusque de direction du squelette ARN.



**Figure 28:** Vue de la poche de fixation du complexe aptamère ARN-théophylline (résidus 5-10, et 21-29) [166].

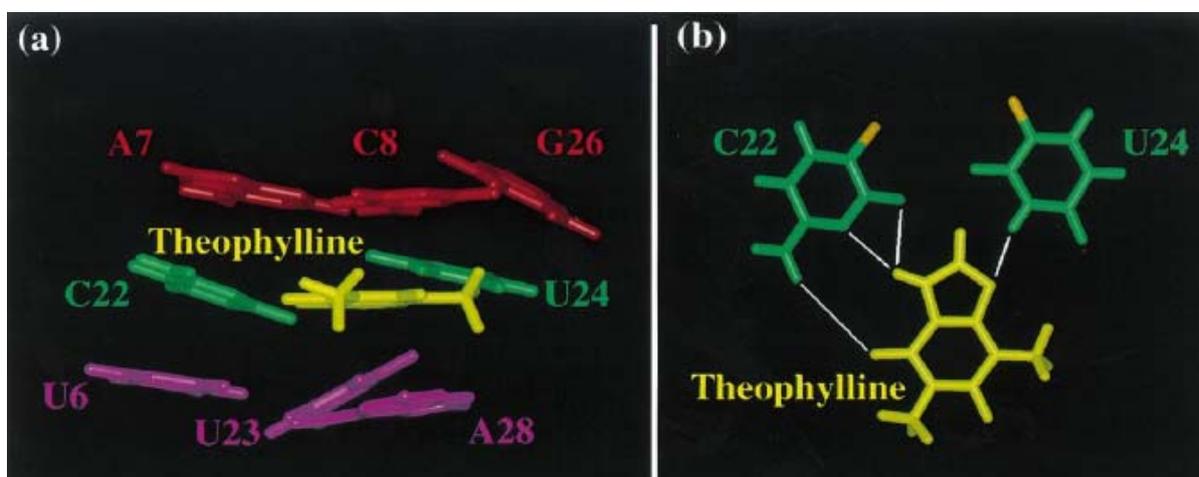
Dans cet aptamère, l'inversion de la polarité d'un sucre et la jonction en « S » sont des caractéristiques structurales cruciales permettant d'organiser les résidus des boucles internes pour former la poche de fixation pour la théophylline. Des appariements par empilement de bases semblent contribuer également à la stabilisation du complexe ARN-théophylline. Les résidus U6, C22, A7 et C21, par exemple, s'empilent par appariement interbrins des bases (« base zipper ») au niveau d'un seul côté de la poche de fixation. Du côté opposé à cet appariement, la base G26 (résidu 3) s'intercale entre les résidus U24 (résidu 1) et G25 (résidu 2) pour former un empilement de type 1-3-2 (**figure 29**). Ces résidus appariés de façon inhabituelle constituent la courbure finale de la jonction en « S ».

L'appariement de la théophylline dans la poche de fixation illustre clairement sa spécificité de fixation (**figure 30**). Le groupement N7 de la théophylline peut former une liaison hydrogène avec le N3 et le O2 de C22 alors que l'atome O6 de la théophylline peut interagir avec un proton de la fonction amine de C22. Le proton imino de U24 est connecté par liaison hydrogène au N9 de la théophylline. Il apparaît clairement que la présence d'un substituant méthyle en position N7, comme c'est le cas pour la caféine, devrait perturber la fixation complémentaire de la théophylline au sein de son site de fixation. Ceci permet d'expliquer l'affinité 10000 fois plus faible de cet aptamère pour la caféine [93].



**Figure 29:** (a) Représentation de la poche de fixation dans le complexe aptamère ARN-théophylline (b) Vue identique qu'en (a) mais les deux brins ont été séparés pour plus de clarté [154]. (c) Représentation schématique de l'appariement des bases (liaisons hydrogène en pointillés) et des interactions par empilement de bases [166].

La structure tridimensionnelle de ce complexe fournit une vision claire des interactions structurales qui gouvernent la capacité de cet ARN à fixer la théophylline et à discriminer la caféine.



**Figure 30:** (a) Représentation de l'intercalation de C22-théophylline-U24 entre les triplets de bases A7-(C8-G26) et U6-(U23-A28) dans le complexe aptamère ARN-théophylline. (b) Représentation des appariements entre les bases C22-théophylline-U24 [154].

La résolution de la structure de ces complexes aptamère-cible démontre que de petits ARNs ont la capacité de se replier en des structures compactes, permettant l'exposition de divers groupements fonctionnels dans une région restreinte, autorisant ainsi la discrimination entre des structures très voisines.

Cette spécificité de reconnaissance moléculaire combinée à une sélection relativement aisée d'aptamères spécifiques de cibles variées, ayant la possibilité d'être modifiés chimiquement, a attiré l'attention de nombreux scientifiques pour leur utilisation en thérapie, en diagnostic et pour des applications analytiques variées. Les aptamères ont fait l'objet de multiples utilisations et de nombreuses publications et revues les résumant. Seules les applications analytiques des aptamères seront décrites par la suite.

#### **IV Les applications analytiques des aptamères**

Pendant plusieurs années, les anticorps ont été les molécules les plus populaires pour fournir un ligand permettant la reconnaissance spécifique d'une molécule cible. Par conséquent, ils ont contribué à la plupart des applications médicales basées sur la reconnaissance moléculaire. Cependant, du fait de leur production *in vivo* par culture cellulaire ou chez des animaux, les anticorps possèdent un certain nombre de limitations.

Grâce aux progrès technologiques, la sélection *in vitro* a permis l'identification aisée d'aptamères permettant de surmonter les limitations des anticorps. Les aptamères sont apparus comme une nouvelle classe de molécules rivalisant avec les anticorps pour de multiples applications [76]. Le *tableau 5* permet une comparaison des avantages des aptamères par rapport aux anticorps.

Il apparaît clairement que les aptamères possèdent des caractéristiques supérieures. Ils sont généralement petits, faciles à synthétiser et à modifier de façon reproductible. Ils peuvent être liés de façon uniforme à une matrice et avec une densité supérieure à celle des anticorps, et leur fixation à des cibles variées se fait avec une affinité et une spécificité importante permettant même des discriminations parfois impressionnantes. Compte tenu de leurs caractéristiques, ils ont de plus en plus tendance à prendre la place des anticorps dans des applications analytiques. Le nom de certaines méthodes a même été modifié pour être adapté aux aptamères : la technique ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) est devenue ELONA (Enzyme Linked OligoNucleotide Assay), et nous avons vu apparaître des

applications en cytométrie de flux, des biocapteurs (« aptasensors »), et des balises moléculaires (« aptabeacon »)...

**Tableau 5** : comparaison des aptamères aux anticorps

Paramètres	Anticorps	Aptamères
<b>Identification</b>	L'identification des anticorps est restreinte à une production <i>in vivo</i> chez des animaux ou des lignées cellulaires.	Les aptamères sont identifiés par un processus <i>in vitro</i> ne nécessitant ni animaux ni lignées cellulaires.
<b>Production</b>	La production d'anticorps est laborieuse et peut être coûteuse pour des anticorps rares nécessitant le criblage d'un nombre important de colonies.	Les aptamères sont synthétisés rapidement, à faible coût et sont purifiés dans des conditions dénaturantes permettant l'obtention d'une excellente pureté.
<b>Limitation par rapport à la cible</b>	Les anticorps dirigés contre des cibles faiblement immunogéniques sont difficiles à obtenir.	Des molécules cibles faiblement immunogéniques peuvent être utilisées pour générer des aptamères à forte affinité.
<b>Sensibilité à la température</b>	Les anticorps sont sensibles à la température, ce qui conduit à des dénaturations irréversibles. Ils possèdent une faible durée de vie.	Les aptamères fonctionnels peuvent être régénérés facilement en quelques minutes après dénaturation, de façon réversible. Ils sont stables à long terme et peuvent être transportés à température ambiante.
<b>Reproductibilité de production</b>	La performance des anticorps semble varier d'un lot à l'autre, nécessitant une optimisation des immunoessais pour chaque lot d'anticorps.	Les aptamères sont produits par synthèse chimique avec une extrême précision et reproductibilité, il y a peu ou pas de variation d'un lot à l'autre.
<b>Modification des paramètres cinétiques</b>	Les paramètres cinétiques des interactions anticorps-cible ne peuvent être modifiés à la demande.	Les paramètres cinétiques des complexes aptamère-cible peuvent être changés en fonction de la méthodologie SELEX.
<b>Modifications chimiques</b>	Une diminution ou une perte d'affinité de l'anticorps pour la cible peut être causée par le marquage de l'anticorps.	Des molécules chimiques (biotine, fluorescéine...) peuvent être attachées à l'aptamère à des positions précises non impliquées dans la fixation.

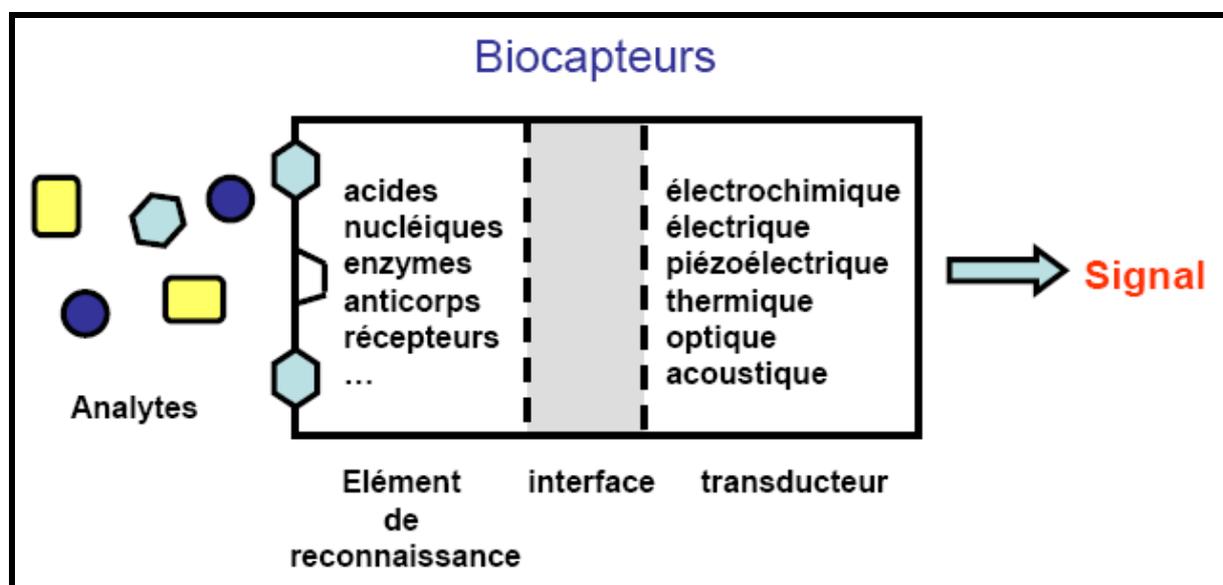
#### **IV.1 Les biocapteurs à base d'aptamères : « aptasensors »**

##### **IV.1.1 Quelques généralités sur les biocapteurs**

La reconnaissance moléculaire est un phénomène central dans la conception de biocapteurs. Depuis leur introduction en 1967, par Uplike et Hicks [167], de nombreux biocapteurs ont été développés.

D'après Gronow [168], un biocapteur est un outil ou un système analytique constitué d'un composé biologique immobilisé (acide nucléique, enzyme, anticorps, récepteur...),

appelé « ligand » permettant la reconnaissance moléculaire, relié à un transducteur chargé de convertir le signal biochimique en un signal physique quantifiable et aisément exploitable (figure 31).



**Figure 31** : Principe de fonctionnement d'un biocapteur.

Selon l'Union internationale de la chimie pure et appliquée (IUPAC), un biocapteur doit être petit et compact, avoir un signal réversible, donner des déterminations précises (réaction « on-off ») et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur [169]. Ainsi, pour une utilisation en routine, un biocapteur doit être réutilisable. L'analyte doit donc être décroché du ligand selon des conditions chimiques qui permettent à ce dernier de conserver toutes ses capacités de capture.

Dans le cas des immunocapteurs, la régénération des sites de fixation des anticorps immobilisés à la surface du biocapteur nécessite d'utiliser des conditions drastiques. Ainsi, l'utilisation de solutions acide ou alcaline, du chlorure de guanidinium, ou une modification brutale de la force ionique risque de diminuer l'aptitude de l'anticorps à capter l'antigène et peut conduire à une réduction de la durée de vie du capteur.

Au contraire, l'utilisation d'aptamères comme éléments de reconnaissance offre un certain nombre d'avantages [76,170-172]. La possibilité de régénérer les aptamères immobilisés est probablement la caractéristique la plus attractive pour leur utilisation en tant que biocapteurs (« aptasensors »). Comme il s'agit d'acides nucléiques, les aptamères peuvent subir des cycles répétés de dénaturation puis de renaturation afin de rétablir leur conformation active. Plusieurs méthodes sont disponibles pour régénérer un aptamère : la chaleur, la concentration en sels et en ions métalliques, l'ajout d'agents chélatants et le pH du milieu

même si ce dernier paramètre, poussé à l'extrême, risque de l'endommager. De plus, comme il l'a été montré précédemment, les aptamères ont la capacité de reconnaître différentes cibles, avec une forte affinité et spécificité, permettant ainsi la conception de biocapteurs pour une large variété de molécules. D'autre part, grâce à la possibilité de les modifier chimiquement, ils sont faciles à immobiliser, avec la densité désirée, à la surface du biocapteur et peuvent être synthétisés de façon reproductible et en grande quantité. Il est possible de marquer un aptamère en pré- ou post-SELEX avec différentes molécules permettant donc l'obtention d'aptamères aux propriétés désirées et offrant une grande variété de méthodes de détection. Enfin, des études structurales ont montré que l'association d'une cible à son aptamère s'accompagne généralement d'un changement de structure de l'oligonucléotide (cf § III-5). Ainsi, la conception des « aptasensors » repose sur la capacité d'associer un signal à ce changement conformationnel. On dispose, ainsi, d'un capteur permettant la détection de la molécule d'intérêt et éventuellement son dosage [77]. Cette approche permet donc une grande flexibilité dans la conception de nouveaux biocapteurs possédant une sensibilité et une sélectivité importantes.

De nombreux transducteurs ont été utilisés pour développer des biocapteurs. La nature du transducteur sert souvent de base pour la classification des différents biocapteurs.

#### ***IV.1.2 Les « aptasensors » électroniques***

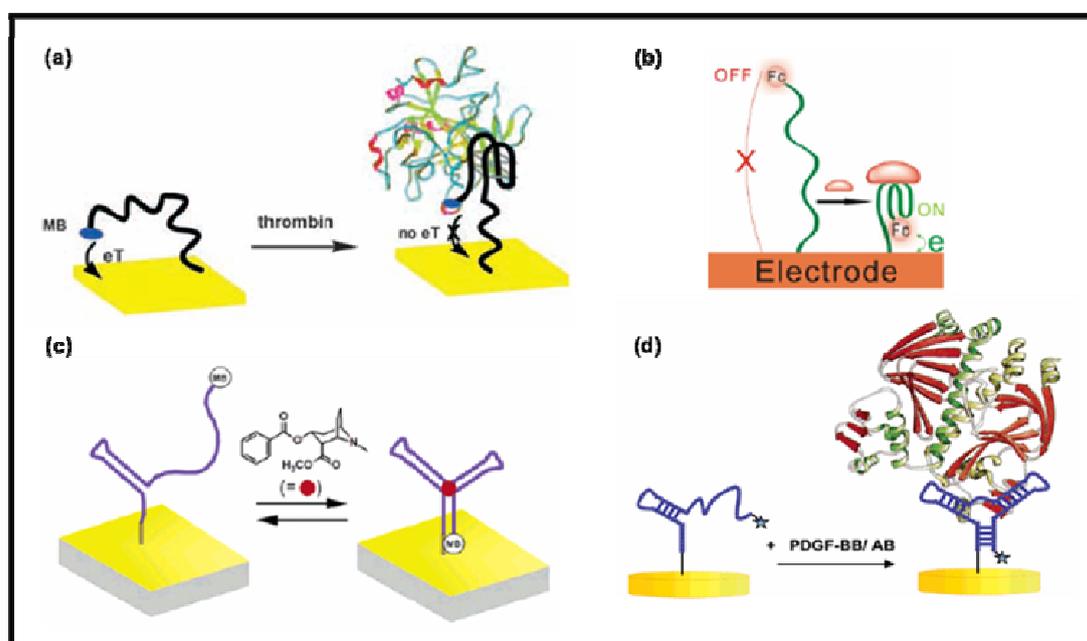
##### ***IV.1.2.1 Les « aptasensors » électrochimiques***

Le principe des biocapteurs électrochimiques repose sur l'immobilisation du ligand sur une électrode. La réponse biochimique faisant suite à l'addition d'un substrat (la molécule cible) est transformée en un signal électrique amplifié et mesurable.

En suivant ce principe, Xiao et ses collaborateurs [173] ont construit un « aptasensor » électrochimique par immobilisation covalente de l'aptamère anti-thrombine [105] à la surface d'une électrode d'or (*figure 32a*). Cet aptamère est marqué à l'une de ces extrémités par du bleu de méthylène et à l'extrémité opposée, un groupement thiol permet son immobilisation. En absence de thrombine, l'aptamère déplié est flexible ce qui permet une interaction entre le bleu de méthylène et l'électrode d'or se traduisant par un transfert d'électron du bleu de méthylène vers l'électrode. Lors de la fixation de la thrombine, l'aptamère se replie pour former une structure en quadruplexe, la distance entre le bleu de méthylène et l'électrode est

ainsi augmentée, empêchant le transfert d'électron. La réponse ampérométrique du bleu de méthylène est donc réduite en présence de thrombine. Cette méthode permet la détection de la thrombine avec une limite de détection de l'ordre de 10 nM. Ce biocapteur électrochimique peut être régénéré par traitement à l'aide d'une solution de guanidinium.

Cette méthode possède, cependant, un inconvénient puisqu'elle fournit un signal négatif (diminution du signal lié à la fixation de la molécule cible : « signal off »). Il est donc difficile de distinguer, par cette stratégie, un signal spécifique lié à la fixation de la cible d'un « faux-signal » qui serait à l'origine de contaminants ou de la dégradation du capteur. Pour surmonter ces limitations, plusieurs « aptasensors » permettant l'obtention d'une augmentation du signal (« signal on ») lors de la fixation de la cible ont été construits par la suite.



**Figure 32** : Représentation des « aptasensors » électrochimiques, basés sur le transfert d'électron entre le groupement rédox d'un aptamère et une électrode d'or, développés par Xiao *et al* [173], Radi *et al* [174,175], Baker *et al* [176] et Lai *et al* [177].

Une des approches utilise un aptamère bifonctionnalisé marqué à l'une de ses extrémités par un groupement électroactif, le ferrocène et par un thiol à son extrémité opposée [174,178,179] (*figure 32b*). En absence de la cible (thrombine ou potassium), la longue chaîne flexible de l'aptamère modifié empêche le contact électrique entre le ferrocène et l'électrode inhibant ainsi le transfert d'électron. En revanche, la formation de la structure en « tétrade de G » liée à la présence de la cible (thrombine ou potassium), permet l'orientation du groupement ferrocène à proximité de l'électrode. Ceci se traduit par un signal anodique

concentration dépendant. Par cette méthode une limite de détection de 0,5 nM a été obtenue et le biocapteur est complètement régénéré en milieu acide [174]

Une approche similaire basée sur un changement de conformation de l'aptamère a été utilisée par l'équipe de Heeger. En absence de molécule cible (cocaïne [176] (*figure 32c*), ou facteur de croissance des plaquettes sanguines (PDGF) [177] (*figure 32d*)), l'aptamère immobilisé est partiellement déplié, seule une de ses trois tiges formant une double hélice est appariée. Le bleu de méthylène est, dans cette conformation, inaccessible à l'électrode. En présence de la cible, l'aptamère se replie pour former une jonction articulée autour de trois tiges appariées (« three-way junction »), permettant un rapprochement entre le bleu de méthylène et l'électrode. Une augmentation du signal est donc observée lors de la fixation de la cible du fait du transfert d'électron.

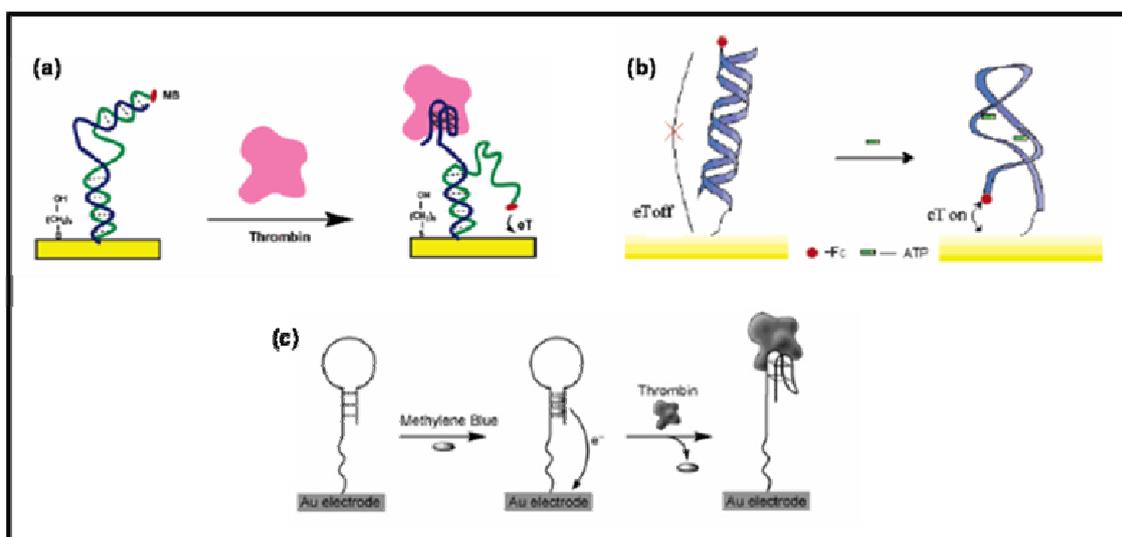
Ces deux approches décrites précédemment reposent uniquement sur la présence de l'aptamère. Ces « aptasensors » engendrent cependant de faibles rapports signal sur bruit [175]. Afin d'améliorer ce système, des capteurs ont été développés à partir d'un ADN hybride double brin immobilisé sur des électrodes d'or [180,181].

Xiao et ses collaborateurs ont construit un nouvel « aptasensor » [180] offrant une meilleure sensibilité par simple modification du biocapteur publié antérieurement [173]. Pour modifier le système, les auteurs ont introduit un oligonucléotide marqué au bleu de méthylène venant s'hybrider à l'aptamère fixant la thrombine immobilisée au niveau de l'électrode d'or (*figure 33a*). En présence de thrombine, la formation de la structure en quadruplexe induit la libération de la chaîne marquée au bleu de méthylène qui peut alors interagir avec l'électrode. Cette méthode permet la détection de la thrombine avec une limite de détection de 3 nM.

Une stratégie similaire a été développée en utilisant un ADN double brin formé par un aptamère anti-ATP [83] marqué par un ferrocène hybridé à son ADN complémentaire (*figure 33b*). En présence d'ATP, la séquence d'ADN complémentaire est libérée alors que l'aptamère forme une structure en trois dimensions rigide renfermant deux molécules d'ATP. Cette structure favorise l'exposition du ferrocène à proximité de l'électrode, un transfert d'électron a donc lieu ce qui aboutit à un signal électrochimique [181]. Cet « aptasensor » a la capacité de détecter l'ATP à des concentrations comprises entre 10 nM et 1 mM avec une sensibilité importante.

Un « aptasensor » électrochimique permettant de suivre les interactions aptamère-cible, en l'absence de marquage, a été conçu [182]. Les propriétés d'intercalation du bleu de

méthylène ont été utilisées dans cette étude pour détecter la thrombine. Pour cela, le bleu de méthylène a été intercalé à la surface d'un ADN formant une structure en « épingle à cheveux » contenant l'aptamère anti-thrombine (*figure 33c*). La fixation de la thrombine au niveau de l'aptamère entraîne une ouverture de la structure en « épingle à cheveux » ce qui libère le bleu de méthylène intercalé. Une diminution de intensité du signal est ainsi observée en présence de thrombine.



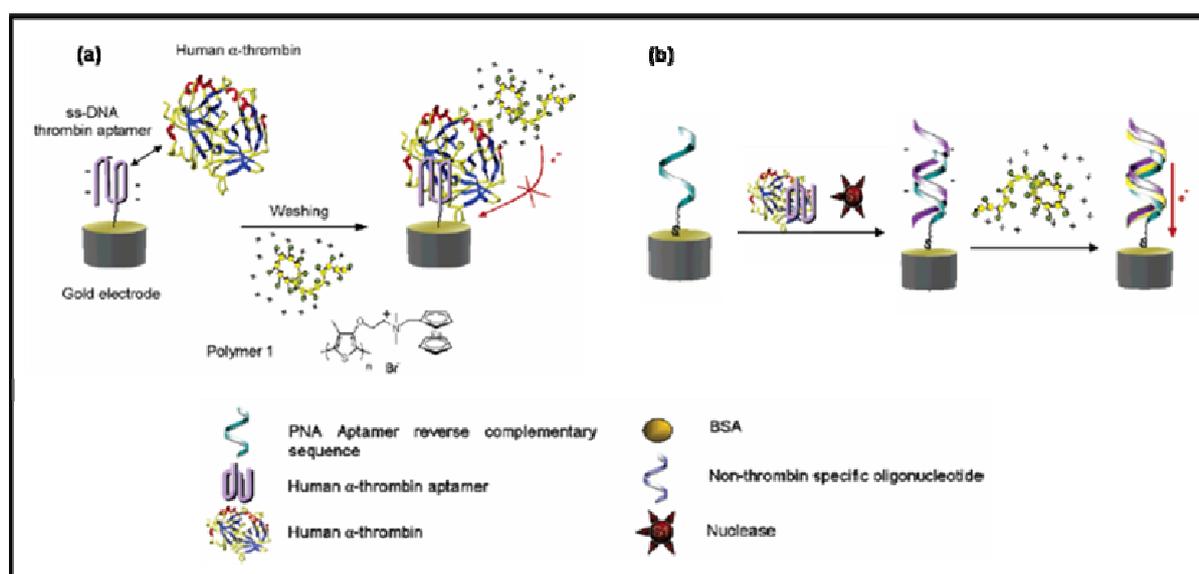
**Figure 33** : Représentation des « aptasenseurs » électrochimiques construits par (a) Xiao *et al* [180], (b) Zuo *et al* [181] et (c) Bang *et al* [182].

D'autres approches pour la conception d'« aptasenseurs » électrochimiques font intervenir des molécules cationiques rédox se liant à l'aptamère immobilisé à la surface de l'électrode via des interactions électrostatiques.

Par exemple, Le Floch et ses collaborateurs ont utilisé un dérivé polythiophène cationique (le poly-(3-alkoxy-4-méthyl)-thiophène) portant un substituant ferrocène pour étudier la détection de la thrombine [183]. Dans ce système, les interactions entre le groupement rédox positif et l'aptamère immobilisé donne un signal voltamétrique positif. En revanche, la fixation de la thrombine sur l'aptamère empêche la fixation de la molécule cationique ce qui aboutit à une réduction du signal électrochimique (*figure 34a*). Ce système présente l'inconvénient de la détection de signaux négatifs et d'autre part, il montre des limites de détection peu convenables (1  $\mu$ M).

Afin d'améliorer le système, une méthode de détection électrochimique indirecte de la thrombine a été développée (*figure 34b*). Cette méthode utilise la même molécule cationique que pour la méthode de détection directe mais cette dernière fait intervenir un PNA (Peptide

Nucleic Acid), complémentaire à l'aptamère anti-thrombine, immobilisé au niveau de l'électrode d'or. Après interaction entre la thrombine et son aptamère en solution, le mélange est traité en présence de nucléases afin de digérer les séquences d'acides nucléiques non liées à la thrombine. Puis, un traitement thermique permet la dissociation des complexes aptamère-thrombine. Les aptamères libérés sont ensuite hybridés avec le PNA immobilisé et ce duplexe ADN-PNA chargé négativement peut alors lier la molécule cationique rédox portant un ferrocène. Un signal voltamétrique est donc observé en présence de thrombine. Cet essai a permis la détection de la thrombine avec une limite de détection de 10 nM.

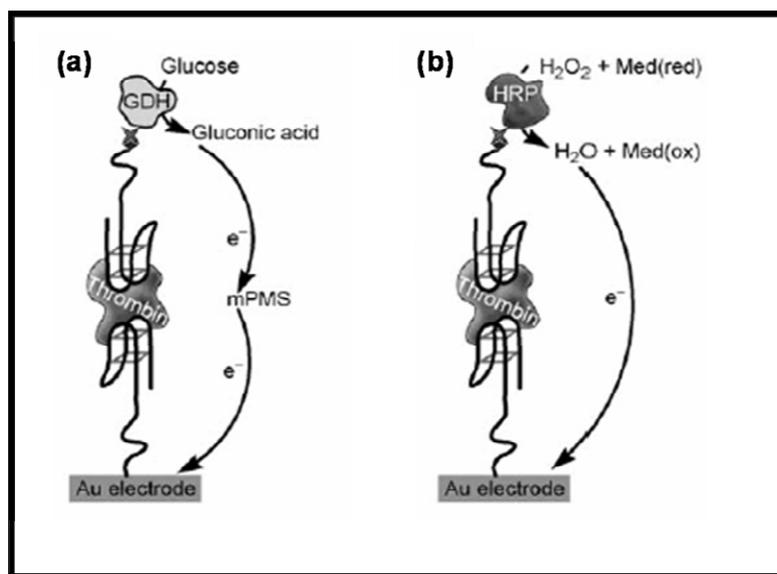


**Figure 34** : Description schématique de la détection électrochimique (a) directe et (b) indirecte de la thrombine [183].

Dans le but d'obtenir une spécificité importante et d'introduire des facteurs d'amplification permettant d'améliorer la sensibilité, des capteurs ont été construits en utilisant une configuration en « sandwich » [184,185]. Les auteurs ont choisi comme molécule cible la thrombine puisqu'il a été démontré qu'un aptamère sélectionné contre la thrombine [105] possède la capacité de lier différents sites de la protéine (sites de fixation de l'héparine et du fibrinogène) [162] (cf § III-5-2). Pour la conception de ces « aptasensors », les propriétés biocatalytiques d'enzymes ont été exploitées pour détecter et analyser les interactions entre l'aptamère spécifique de la thrombine et sa cible. Par exemple, la glucose déshydrogénase (GDH) a été employée comme marqueur biocatalytique pour la détection ampérométrique de la thrombine [184]. Un premier aptamère est immobilisé au niveau de la surface d'une électrode d'or pour fixer la thrombine, alors qu'un second aptamère biotinylé liant une glucose déshydrogénase modifiée par une avidine permet la détection de la formation du complexe (figure 35a). L'oxydation du glucose catalysée par la GDH en présence de 1-

méthoxy-5-méthylphénazinium méthylsulfate (mPMS) a permis la détection de la thrombine avec une limite de détection de 10 nM.

Mir et ses collaborateurs [185] ont développé une approche similaire en suivant la réduction du peroxyde d'hydrogène catalysée par une peroxydase (HRP : Horseradish peroxidase) greffée au niveau du second aptamère (*figure 35b*). Cette méthode a permis la détection de la thrombine avec une limite de détection de 80 nM.

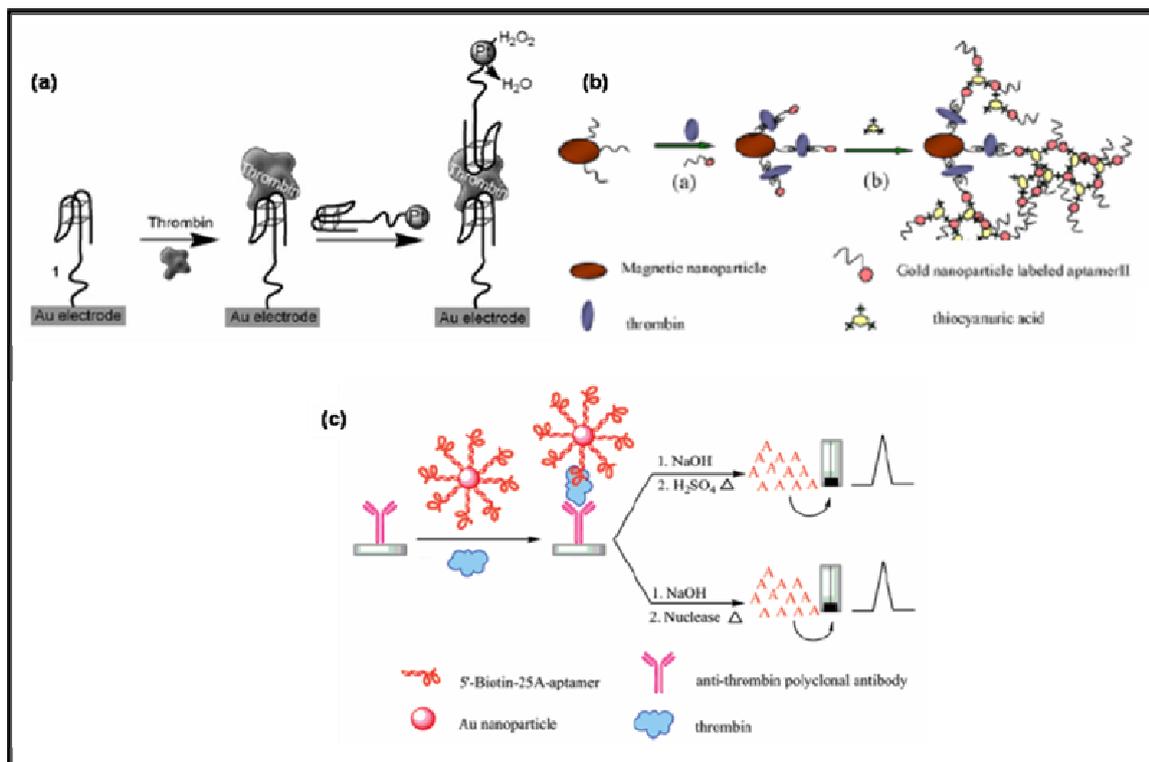


**Figure 35** : Description schématique de biocapteurs électrochimiques à configuration « sandwich » [186].

Un « aptasensor » a été construit en suivant le même principe que précédemment mais en substituant l'enzyme par des nanoparticules (NPs) de platine (Pt) [187]. Ces nanoparticules de platine catalysent la réduction électrochimique du peroxyde d'hydrogène et permettent une détection de la thrombine avec une limite de détection de l'ordre du nM (*figure 36a*). Cet essai permet donc une amélioration de la limite de détection d'un facteur 80 par rapport à un essai très similaire biocatalytique [185].

Zheng et ses collaborateurs ont également développé un « aptasensor » électrochimique ultrasensible permettant la détection de la thrombine [188]. Les auteurs ont construit un complexe en « sandwich » entre des nanoparticules sur lesquelles est immobilisé un premier aptamère utilisé comme agent de capture et de séparation, la thrombine et des nanoparticules d'or fixant un deuxième aptamère ayant un rôle de transduction du signal (*figure 36b*). Cet « aptasensor » est ultrasensible du fait de la présence d'acide thiocyanurique, un agent de « capping » efficace favorisant l'agrégation et donc l'amplification du signal. Cette méthode possède la capacité de reconnaître spécifiquement la

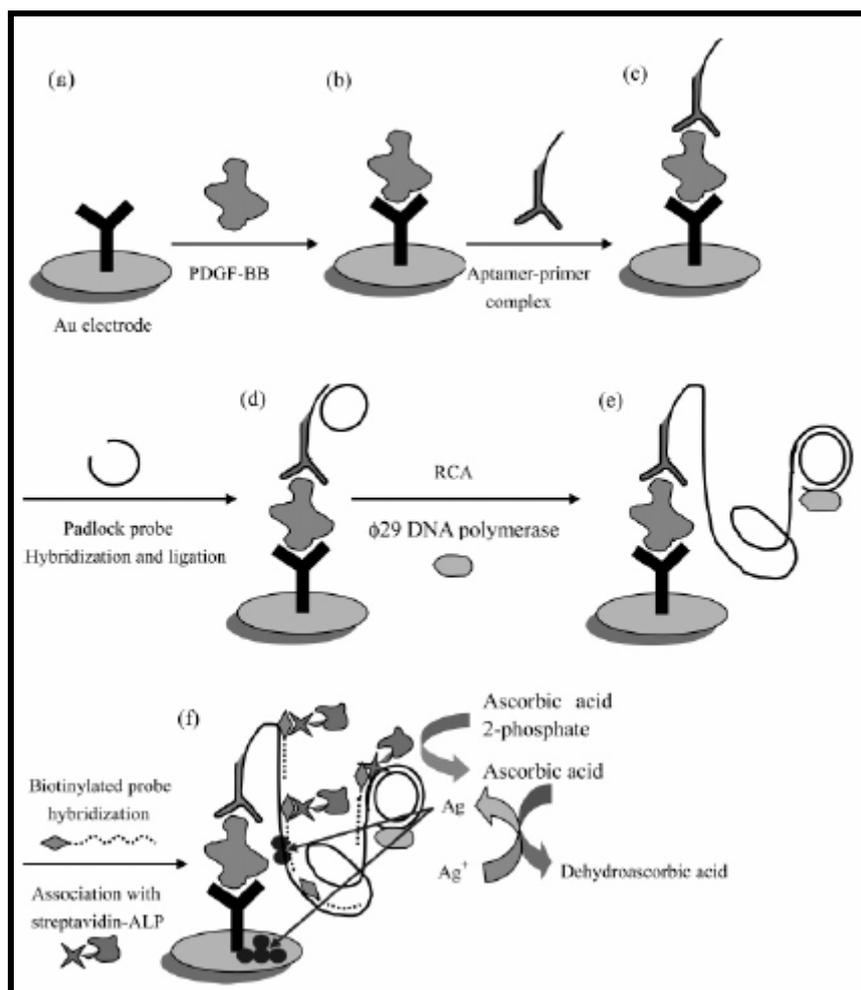
thrombine à des concentrations très faibles de l'ordre de l'attomolaire. Ce capteur a également été appliqué sur des échantillons de plasma permettant l'obtention de résultats satisfaisants.



**Figure 36** : Description schématique d'« aptasensors » ultrasensibles par l'utilisation de nanoparticules [186-189].

Ces nanoparticules ont également été utilisées comme transporteur d'aptamères lors de la conception d'« aptasensors ». Dans cet essai, les nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées avec plusieurs aptamères anti-thrombine contenant des séquences enrichies en adénine [189]. Ces nanoparticules sont fixées à la thrombine qui est elle-même liée à un anticorps anti-thrombine (*figure 36c*). Les bases adénines sont relarguées par une dégradation en milieu acide ou en présence de nucléases et sont détectées à la surface d'une électrode de graphite pyrolytique. Comme une nanoparticule contient plusieurs aptamères, le signal correspondant à la fixation de la thrombine est amplifié ce qui permet une limite de détection de 0,1 ng/mL.

Un aptamère a également été utilisé pour réaliser un immunoessai par amplification en cercle roulant (« Rolling Circle Amplification RCA ») [190]. Pour réaliser cet essai, un anticorps immobilisé au niveau d'une électrode d'or fixe la cible PDGF-BB, cette dernière est prise en sandwich par un antigène fixant une amorce permettant la synthèse de l'aptamère (*figure 37*).



**Figure 37 :** Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un immunoessai par amplification en cercle roulant (RCA) [190] (ALP : Phosphatase alcaline).

Cette amorce permet l'initiation de la RCA par fixation de l'ADN polymérase qui génère par la suite une centaine de copies de l'ADN circulaire immobilisé au niveau de cette amorce. Des sondes biotinylées, fixées au niveau de l'oligonucléotide, se lient à des phosphatases alcalines (ALP) modifiées par une streptavidine. Ces dernières catalysent la transformation de l'acide ascorbique-2-phosphate en acide ascorbique à la surface de l'électrode engendrant la réduction des ions métalliques argent qui sont déposés à la surface de l'ADN et de l'électrode générant ainsi un signal électrique lors de la fixation de la cible. Cette méthode, hautement sensible et spécifique, permet une limite de détection de l'ordre du fM.

Les biocapteurs électrochimiques ont, pour principaux avantages, leur sensibilité importante, leur simplicité, leur coût de revient relativement faible, leur rapidité de réponse et la possibilité de miniaturisation.

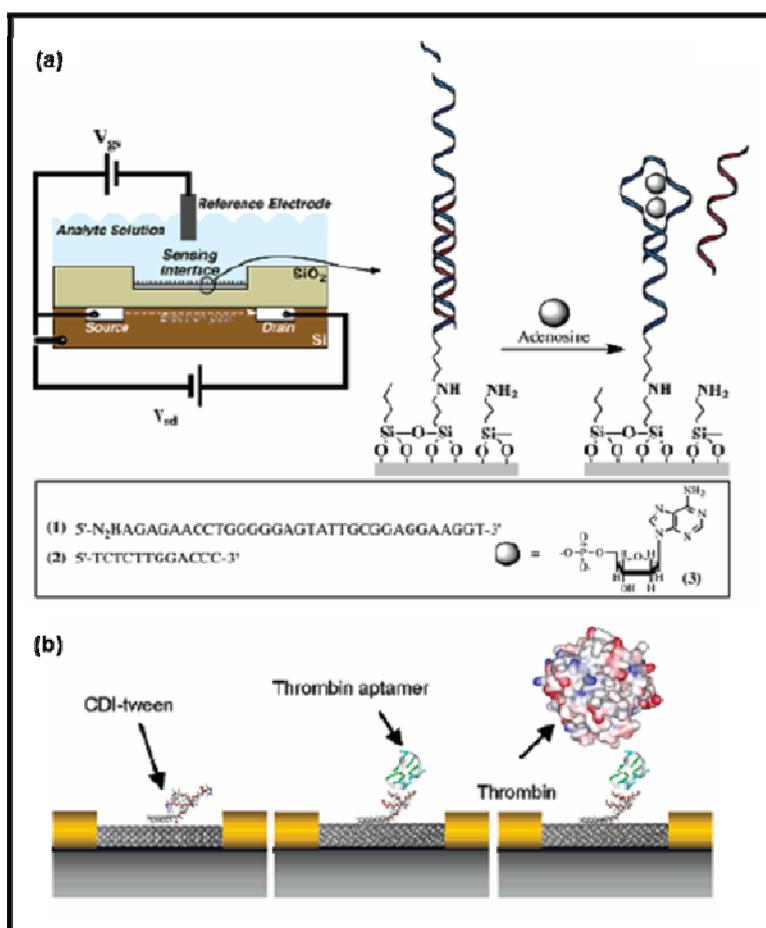
#### IV.1.2.2 Des transistors à effet de champs utilisés comme « aptasensors »

Les transistors à effet de champs (FET : « field-effect transistors ») mesurent une modification de potentiel survenant lors la fixation entre un analyte et un élément de reconnaissance. Les biocapteurs FET détectent donc la modification de charge lorsqu'une molécule cible fixe une sonde moléculaire à la surface du biocapteur [186].

Des biocapteurs utilisent la méthode de transduction dite « ISFETs » (« ion-selective fields-effect transistors »). Cette méthode emploie deux électrodes, une électrode source et une électrode de drainage, déposées sur un semi-conducteur (par exemple du silicium). Une surface membranaire est posée sur ce semi-conducteur, par l'intermédiaire d'une couche d'isolation mince, séparant ainsi les deux électrodes. Le potentiel de cette membrane peut être affecté par des modifications chimiques survenant à sa surface. Ce système est immergé dans un milieu électrolyte et une électrode de référence reflète le potentiel de la membrane (*figure 38a*). La fixation de l'adénosine sur son aptamère, par exemple, a été suivie par ISFET [191]. La surface de la membrane d' $\text{Al}_2\text{O}_3$  a été fonctionnalisée de façon à immobiliser l'aptamère (1). L'acide nucléique (2) est ensuite hybridé au niveau de cet aptamère. La fixation de l'adénosine sur son aptamère engendre un déplacement de l'ADN (2) et une réorganisation du complexe aptamère-adénosine à la surface du biocapteur. Ce phénomène affecte la charge locale à la surface du biocapteur et par conséquent le courant entre les deux électrodes, permettant, ainsi, la transduction de la fixation de l'adénosine par ISFET. La limite de détection de l'adénosine analysable par ce système est de 50  $\mu\text{M}$ .

L'utilisation de nanomatériaux fournit une nouvelle approche pour développer des biocapteurs, sans marquage, hautement sensible. Par exemple, des transducteurs à effet de champs recouverts de nanotubes de carbone (SWCNT-FET : « single-walled carbone nanotube field-effect transistor ») ont été fabriqués afin de contrôler la fixation entre un aptamère et sa molécule cible [192]. L'avantage d'utiliser des aptamères en biocapteurs de type FET est leur petite taille. En effet, il est difficile de suivre la fixation entre deux protéines dans des processus FETs faisant intervenir des anticorps comme éléments de reconnaissance (ImmunoFET). Dans ce cas, la reconnaissance a généralement lieu en dehors de la double couche électrique (zone de variation du potentiel électrique) à la surface de la membrane, et entraîne une faible variation du potentiel électrique. Ceci peut s'expliquer par le fait que la taille de l'anticorps (~ 10 nm) est beaucoup plus importante que la double couche électrique. Cependant, la taille des aptamères (1 - 2 nm) autorise une perturbation du potentiel lors de la fixation de protéines sur l'aptamère qui a lieu au niveau de la double couche électrique. Ainsi

les SWCNTs sont assemblés entre les électrodes source et de drainage, puis l'aptamère anti-thrombine est immobilisé de façon covalente au niveau de ces nanotubes de carbone (*figure 38b*). Lors de la fixation de la thrombine, les auteurs ont observé une baisse de la conductance alors qu'aucune variation n'est remarquée en présence d'une protéine (élastase) possédant des caractéristiques similaires à la thrombine. Cet « aptasensor » permet la détection de la thrombine avec une limite de détection de 10 nM et peut être régénéré par simple lavage en présence d'une solution acide de guanidine.



**Figure 38** : Description schématique de biocapteurs possédant un transducteur à effet de champs (FET) utilisant un aptamère comme élément de reconnaissance. (a) ISFET (« ion-selective fields-effect transistors ») [191]. (b) SWCNT-FET (« single-walled carbone nanotube field-effect transistor ») [192].

Dans un essai similaire CNT-FET, les performances d'un aptamère et d'un anticorps spécifique de la même cible ont été comparées [193]. La comparaison a montré que la fixation d'un aptamère anti-IgE [58] immobilisé à la surface d'un CNT-FET fournit des résultats bien supérieurs à ceux obtenus, dans les mêmes conditions par immobilisation d'un anticorps anti-IgE. L'essai en présence d'aptamères permet la détection de l'IgE avec une limite de détection de 250 pM.

Ces biocapteurs SWCNT-FET, utilisant des aptamères comme éléments de reconnaissance, se sont montrés hautement sensibles et sélectifs et peuvent être facilement régénérés.

#### **IV.1.2.3 Des « aptasensors » acoustiques**

Ces biocapteurs acoustiques sont basés sur la mesure de l'oscillation d'un cristal de quartz piézoélectrique (microbalance à quartz : QCM) sur lequel est immobilisé le composé biologique (aptamère). Un cristal de quartz peut osciller quand il est immergé partiellement ou complètement dans un liquide. Si les propriétés physicochimiques du liquide sont connues, un changement de masse à la surface du cristal va entraîner une modification quantifiable de la fréquence de résonance. L'association d'une protéine à son aptamère immobilisé à la surface du cristal induit une augmentation de la masse sur le transducteur résultant en une diminution de la fréquence de résonance du cristal.

Cette technique a été utilisée, par exemple, pour étudier les interactions de l'ARN TAR du VIH-1 avec la protéine Tat, responsable de l'infection virale [194]. Un ARN TAR biotinylé est immobilisé à la surface du capteur par un lien biotine-neutravidine. La fixation de deux peptides correspondant à des fragments de la protéine Tat induit une modification de la fréquence de résonance du cristal et de la résistance motrice.

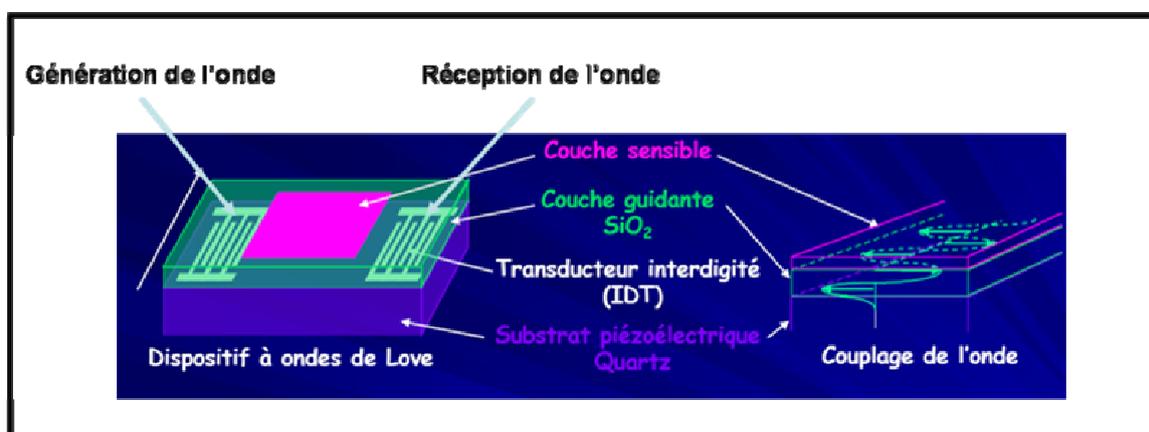
Liss et ses collaborateurs [195] ont comparé les performances de fixation de l'IgE au niveau d'un aptamère et d'un anticorps immobilisé à la surface d'une microbalance à quartz, tous deux spécifiques de l'IgE. Les deux récepteurs ont la capacité de détecter l'IgE sélectivement avec une limite de détection de 0,5 nM, mais la QCM aptamère possède une gamme de détection linéaire 10 fois plus importante. De plus, l'« aptasensor » peut être facilement régénéré en présence d'EDTA et est plus stable dans le temps que l'« immunosensor ».

Une comparaison similaire entre un aptamère et un anticorps constituant un biocapteur piézoélectrique a été présentée en utilisant la protéine Tat du VIH-1 comme molécule cible [196]. Très peu d'études ont été réalisées pour le développement de méthodes de détection de cette protéine et, très souvent, ces études ne sont pas conduites sur la protéine entière [194]. Le développement de cet « aptasensor » piézoélectrique pour la détection de la protéine Tat s'est montré très spécifique, reproductible et régénérable. Les deux récepteurs, aptamère et

anticorps, permettent la détection de la protéine Tat à une concentration minimale de 0,25 ppm avec une reproductibilité comparable (CV = 6%).

Une étude a été réalisée afin de comparer la capacité de détection de la thrombine entre un « aptasensor » électrochimique et un « aptasensor » piézoélectrique [197]. Un aptamère biotinylé spécifique de la thrombine est immobilisé au niveau d'un support modifié par de l'avidine, puis la thrombine est fixée au niveau de l'aptamère. La modification de la fréquence de résonance du cristal ou la réduction du bleu de méthylène au niveau de l'aptamère permet de déterminer la fixation de la thrombine au niveau de l'aptamère. La méthode électrochimique permet de détecter la thrombine avec une limite de détection de 10 nM alors que le biocapteur utilisant la QCM comme méthode de transduction autorise une sensibilité 10 fois plus importante.

La détection de complexe aptamère-protéine a également été réalisée à l'aide de capteur à onde acoustique de surface (SAW) de type onde de love [198]. Les capteurs de type onde de love sont constitués d'au moins deux réseaux d'électrodes interdigitées, déposées à chaque extrémité d'un cristal piézoélectrique, et agissant comme respectivement transmetteur et receveur (*figure 39*). Lorsqu'une pression est appliquée au niveau du transmetteur, ceci engendre un stress mécanique au niveau du cristal qui génère une onde acoustique qui est propagée à la surface du cristal et détectée par l'électrode receveuse. La présence d'une couche d'aptamère immobilisée à la surface du cristal cause une modification de la fréquence du cristal lors de la fixation du ligand. Cette méthode a été appliquée avec succès pour la détection de la thrombine et du peptide Rev du VIH-1 en présence de leurs aptamères respectifs. Ces protéines ont été détectées avec une limite de détection de 75 pg/cm<sup>2</sup>.



**Figure 39** : Représentation schématique d'un biocapteur à onde acoustique de surface de type onde de love.

Les biocapteurs piézoélectriques apportent une réponse rapide, mais ont pour inconvénient la fixation de composés non spécifiques et un manque de sensibilité. Comme nous venons de le montrer, l'utilisation d'aptamères comme éléments de reconnaissance permet, compte tenu de leurs caractéristiques, d'améliorer la sensibilité et la spécificité de ces types de biocapteurs.

#### ***IV.1.3 Les « aptasensors » optiques***

Les aptamères ont également été utilisés comme éléments de reconnaissance pour la conception de biocapteurs optiques faisant intervenir un marquage fluorescent (méthodes fluorescentes) ou ne nécessitant pas de marquage (RPS).

##### ***IV.1.3.1 Les biocapteurs fluorescents***

Dans ce type de biocapteurs, l'interaction entre l'aptamère et sa cible se traduit par une émission de fluorescence.

Le premier « aptasensor » optique publié a été utilisé pour la détection de la L-adénosine par immobilisation d'un aptamère ARN biotinylé, spécifique de la L-adénosine, à la surface d'une fibre optique fonctionnalisée par de l'avidine [199]. Ce capteur permet de mesurer les constantes de fixation de la L-adénosine marquée par la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La L-adénosine a été détectée par cette méthode à une concentration de l'ordre du  $\mu\text{M}$  à l'aide d'une fixation par compétition en présence de L-adénosine non marquée.

Potyraïlo et ses collaborateurs ont construit un « aptasensor » permettant une détection directe en une seule étape d'un analyte non marqué [200]. Pour cela, l'aptamère anti-thrombine [105], marqué par la FITC en 5', est immobilisé de façon covalente au niveau d'un support modifié chimiquement. L'anisotropie de fluorescence est utilisée pour détecter la fixation de la thrombine sur son aptamère marqué. En effet, cette fixation résulte en une augmentation de la taille qui conduit à une modification de la vitesse de diffusion rotationnelle et donc de l'anisotropie de fluorescence. Cet essai est rapide (10 min), sensible (LOD = 5 nM), et spécifique de la molécule cible.

Un autre exemple d'« aptasensor » optique permettant la détection de la thrombine a été décrit [201]. Dans ce système, l'aptamère anti-thrombine est immobilisé à la surface de

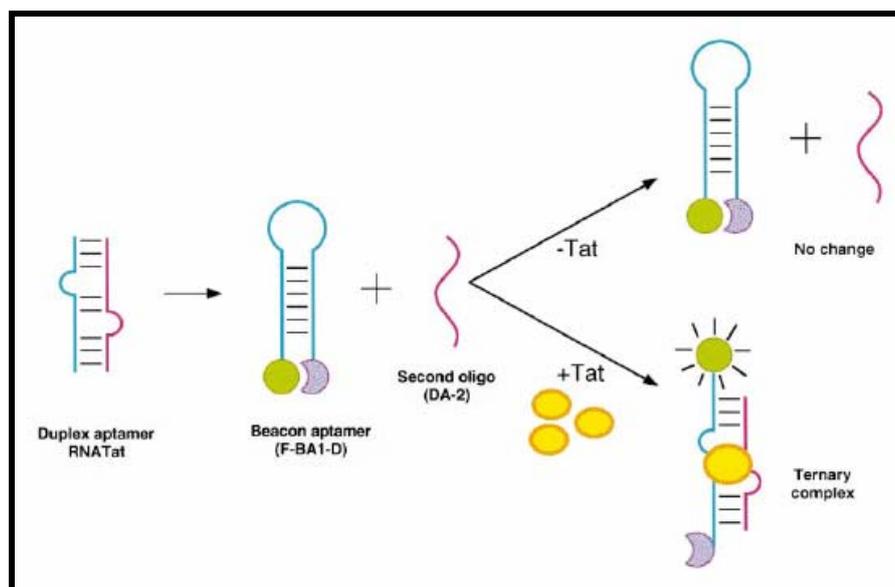
microsphères de silice, ces billes étant distribuées dans des micropuits à l'extrémité distale de la fibre optique. La fibre est elle-même couplée à un système microscopique à épifluorescence et son extrémité est incubée avec une thrombine marquée à la fluorescéine. Les billes sur lesquelles est immobilisé l'aptamère, fixent sélectivement leur molécule cible avec une limite de détection de 1 nM.

Un biocapteur à base d'aptamères a également été construit pour l'analyse de différentes protéines impliquées dans des cancers (l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et le facteur de croissance des fibroblastes basiques (bFGF)) [202]. Les différents aptamères marqués à la fluorescéine sont immobilisés à la surface d'un support en verre puis l'anisotropie de fluorescence est utilisée pour étudier les constantes de fixation entre l'aptamère et sa molécule cible. Cette méthode permet la détection et la quantification spécifique de protéines impliquées dans des cancers dans des extraits cellulaires ou dans des échantillons de sérum humain ce qui est très prometteur pour la détection de cancers.

Plusieurs approches pour la construction de biocapteurs reposent sur la détection d'un signal fluorescent via la conception de balises moléculaires (« molecular beacon ») [203]. Ces biocapteurs, utilisant un aptamère comme élément de reconnaissance, nommés « aptamer beacons » ou « aptabeacon », combinent la spécificité de fixation des aptamères avec le signal de transduction efficace des balises moléculaires. L'aptamère est conjugué à deux groupements : l'un est un fluorophore, l'autre un inhibiteur de fluorescence (quencher). L'éloignement des deux composés permet une émission de fluorescence alors que leur rapprochement l'interdit. Si le réarrangement structural consécutif à l'association/dissociation du ligand et de l'aptamère provoque une variation de la distance entre fluorophore et inhibiteur, on dispose d'un capteur permettant de détecter la présence du ligand par une mesure de l'intensité de fluorescence. La conception des « aptabeacons » repose sur ce principe.

La première étude portant sur l'utilisation d'« aptabeacon » a été publiée par Yamamoto et Kumar en 2000 [204], à partir d'un aptamère spécifique de la protéine Tat du VIH-1 [205]. Pour construire cette balise moléculaire, les auteurs ont utilisé deux oligomères ARNs à partir de l'aptamère préalablement sélectionné. L'un des oligomères, ayant la capacité de se replier en une structure en « épingle à cheveux », a été modifié chimiquement par le greffage d'un fluorophore et d'un quencher aux extrémités 5' et 3' et l'autre oligomère est utilisé comme sonde. En absence de la protéine Tat, les deux oligonucléotides existent

indépendamment. En revanche, lorsque la protéine est introduite, l'« aptasensor » change de conformation pour interagir avec l'autre partie de l'aptamère afin de fixer la protéine Tat. L'ouverture de la structure en « épingle à cheveux » engendre une séparation physique entre le fluorophore et le quencher ce qui résulte en une émission de fluorescence (*figure 40*). Cependant, cette stratégie peut être difficilement applicable à des aptamères ne possédant pas de telles caractéristiques structurales.

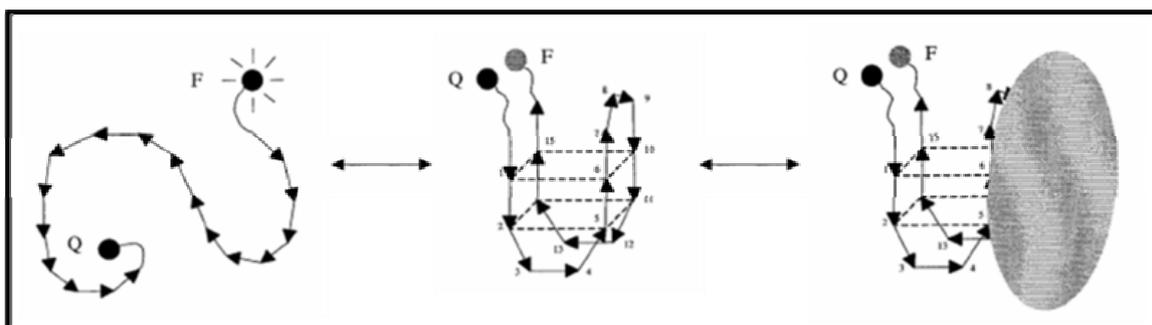


**Figure 40 :** Représentation schématique d'un « aptabeacon » permettant la détection de la protéine Tat virale [204].

Une étude similaire a été réalisée par Stojanovic et son équipe [206] où un aptamère séparé en deux oligonucléotides différents a la capacité de s'autoassembler en présence de sa molécule cible. L'un des oligonucléotides est marqué par un fluorophore et l'autre par un inhibiteur de fluorescence. Ainsi, lors de l'ajout de ligand, les deux oligonucléotides s'assemblent pour former l'aptamère et il y a alors un quenching de la fluorescence. Un aptamère anti-cocaïne et un aptamère anti-ATP ont été construits en utilisant cette stratégie et se sont avérés non seulement sensibles mais également sélectifs pour leur molécule cible. Il a également été possible d'utiliser simultanément les deux capteurs afin de détecter la présence de la cocaïne et de l'ATP par modification de la fluorescence.

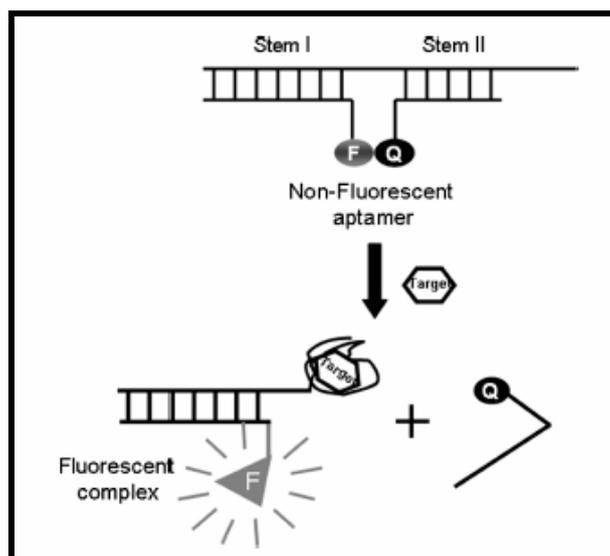
D'autres études, portant sur la création de balises moléculaires à partir d'aptamères possédant une spécificité pour la thrombine, ont été réalisées. Une étude similaire à celle décrite précédemment a été effectuée par Hamaguchi et ses collaborateurs à l'aide d'un aptamère anti-thrombine [207].

Li et son équipe [208] ont construit deux types d'« aptabeacons ». Le premier est formé d'un aptamère marqué par un couple fluorophore-quencher comme pour le système décrit précédemment. Le deuxième est marqué par deux fluorophores (une paire donneur-accepteur) basés sur la technique de transfert d'énergie de fluorescence (ou FRET pour Fluorescence Resonance Energy Transfert). Ainsi, en absence de thrombine, l'« aptabeacon » possède une structure en équilibre entre un état déplié non structuré et une structure compacte en quadruplexe (*figure 41*). Lors de l'ajout de thrombine l'équilibre se déplace en faveur de la structure en quadruplexe ce qui engendre le rapprochement entre fluorophore (F) et quencher (Q), entraînant un « quenching » de la fluorescence. En revanche dans le système de type FRET, la fixation de la thrombine aboutit à une augmentation de la fluorescence. Pour ces deux systèmes, les auteurs ont observé en temps réel l'interaction entre l'aptamère et la molécule cible de façon spécifique et avec une sensibilité importante (concentration en thrombine de 112 pM).



**Figure 41 :** Représentation schématique du fonctionnement de l'« aptabeacon » construit par Li *et al.* [208].

Nutiu et ses collaborateurs [209] ont développé une approche générale à partir d'un aptamère modèle fixant l'ATP [83]. Les auteurs ont formé un duplexe entre l'aptamère marqué par un fluorophore en 5' (nommé F-ADN) et un petit oligonucléotide modifié par un quencher (nommé Q-ADN) (*figure 42*). En absence de la cible, l'aptamère fixe le Q-ADN, amenant le fluorophore à proximité du quencher, et inhibant ainsi la fluorescence. Lorsque la cible est introduite, l'aptamère forme de préférence un complexe avec cette dernière, ce qui aboutit à un relargage de la séquence Q-ADN et à une émission de fluorescence. Cette méthode est facile à généraliser, elle a également été appliquée à l'aptamère spécifique de la thrombine et est spécifique de la molécule cible.

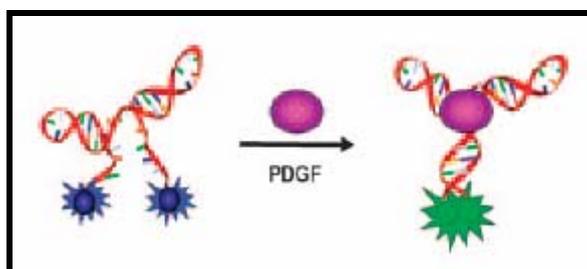


**Figure 42 :** Représentation de la stratégie développée par Nutiu et ses collaborateurs [209] permettant la détection d'une molécule cible [210].

Stojanovic et ses collaborateurs [211] ont créé un capteur en déstabilisant l'une des trois tiges de l'aptamère spécifique de la cocaïne formant une jonction articulée autour de trois tiges appariées (« three-way junction »). Les deux extrémités de l'aptamère ont été marquées par un fluorophore en 5' et par un quencher en 3'. En absence de cocaïne, l'aptamère est partiellement déplié. En présence de la cible, l'aptamère est replié pour former sa conformation active ce qui permet un rapprochement entre le fluorophore et le quencher et permet ainsi la détection et la quantification de la cible. Ce capteur est sélectif de la cocaïne et de ses métabolites et permet également la détection de la cocaïne dans le sérum.

Une nouvelle approche a été conçue, à partir d'un aptamère anti-PDGF, permettant de suivre la présence de la molécule cible à partir d'une modification de la longueur d'onde d'émission de fluorescence lors de la fixation de cette dernière [212]. L'aptamère anti-PDGF, marqué à chacune de ses extrémités par un groupement pyrène, est capable de modifier la longueur d'onde d'émission de fluorescence, par changement de conformation à partir de son état monomère ( $\lambda \sim 400$  nm) pour former un état dimère excité nommé excimère ( $\lambda \sim 485$  nm) lors de la fixation de sa molécule cible (**figure 43**). Les auteurs ont été capables de détecter le PDGF, de façon spécifique et sans traitement au préalable, à des concentrations de l'ordre du pM dans des échantillons cellulaires. Pour permettre une détection spécifique, les auteurs ont utilisé le fait que l'excimère possède une durée de fluorescence bien meilleure que le monomère ( $\sim 40$  ns contre  $\sim 5$  ns). Cette méthode offre une plus grande sélectivité et une meilleure sensibilité que la stratégie similaire développée par Yamana et ses collaborateurs

[213] sur un aptamère anti-ATP. Elle possède également un grand potentiel pour l'analyse de protéines pour des études biomédicales puisqu'elle est applicable à des aptamères spécifiques pour d'autres protéines.

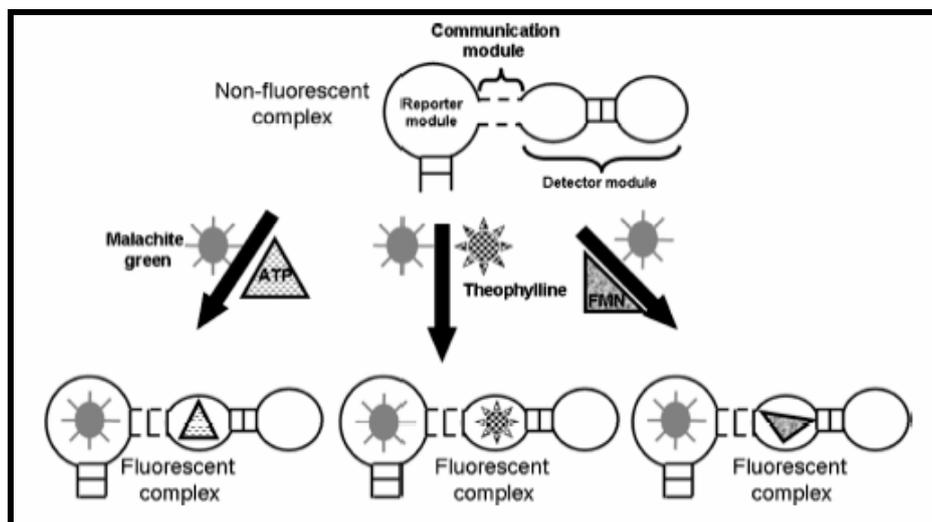


**Figure 43 :** Illustration schématique d'une stratégie permettant la détection du PDGF par modification de la longueur d'onde d'émission de fluorescence liée à sa fixation [212].

Une des stratégies utilisée pour modifier un aptamère avec un fluorophore et pour signaler la présence d'une molécule cible est d'attacher le fluorophore à une position spécifique de l'aptamère, qui soit compatible avec son changement de conformation lors de la fixation de la cible, et qui permette de conserver son affinité pour celle-ci [214]. Deux aptamères différents, l'un sélectionné à partir d'un pool d'ARNs et l'autre à partir d'un pool d'ADNs ont été modifiés avec différents colorants en différentes positions autorisant la fixation de la cible. D'après les analyses structurales de ces aptamères, le résidu 13 à proximité du site de fixation de l'aptamère ARN anti-adénosine [82] ne participe pas à la fixation de l'ATP. Un groupement acridine a été incorporé à la place de l'adénosine en position 13. De la même manière, le résidu 7 de l'aptamère en série ADN anti-adénosine [83] se trouve à proximité du site de fixation de l'ATP mais ne possède pas d'interaction directe avec l'ATP. Donc, un fluorophore a été introduit à la place du résidu 7 et un autre entre le résidu 7 et 8 (cf § III-5-1). Ces aptamères modifiés montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence lors de la fixation de l'ATP. En revanche, en présence d'analogues de l'ATP ou d'une version mutée de l'aptamère, aucune augmentation significative de la fluorescence n'est observée. Ces deux aptamères modifiés permettent donc une détection quantitative de l'ATP avec une bonne spécificité et reproductibilité.

Un biocapteur aptamérique modulaire permettant de suivre la reconnaissance entre un aptamère et sa cible grâce à une émission de fluorescence lors du changement de conformation de l'aptamère a été construit par Stojanovic et ses collaborateurs [215]. Cet aptamère modulaire est formé de 3 domaines : un domaine « signal » (aptamère pour le vert de malachite), un domaine de reconnaissance (aptamère spécifique de l'analyte) et un

domaine formant une tige permettant la connexion entre les deux éléments précédents (module de communication) (*figure 44*).



**Figure 44** : Représentation schématique d'un capteur aptamérique modulaire [210].

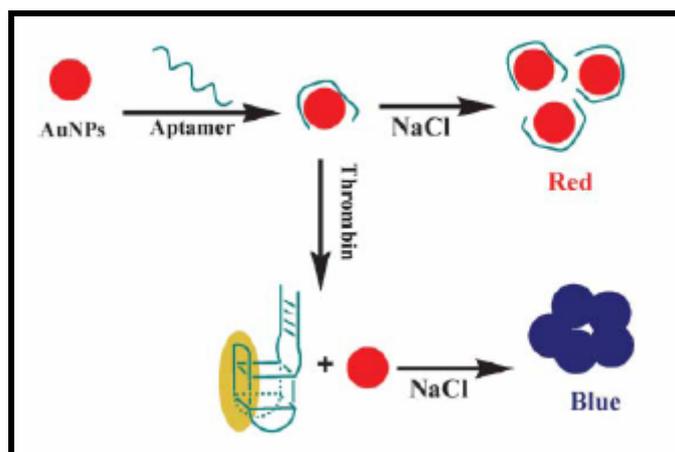
Dans ce système, la liaison du ligand au niveau du module de détection stabilise le module de communication ce qui permet au domaine « signal » de créer un site de fixation pour le vert de malachite. Dans ce système la fixation du vert de malachite est corrélée à la fixation de la cible. En substituant seulement le module détecteur par un autre aptamère, il est possible de détecter d'autres molécules cibles telles que la flavine mononucléotide (FMN) et la théophylline. Ce système peut être utilisé pour des diagnostics *in vitro* mais également pour la détection *in vivo*.

#### IV.1.3.2 Les biocapteurs colorimétriques

Dans ce type de biocapteurs, l'interaction entre l'aptamère et sa cible se traduit par l'apparition d'une couleur dans le milieu réactionnel.

Un nombre important d'« aptasensors » colorimétriques ont été développés dans la littérature, la plupart d'entre eux utilisent des nanoparticules d'or (AuNPs) comme éléments de capture [175]. Les propriétés colorimétriques des nanoparticules d'or, décrites par Rothberg et ses collaborateurs [216], permettent de distinguer, à l'œil nu, un ADN déplié d'un ADN replié. En effet, en solution, les nanoparticules sont stabilisées par l'adsorption d'ions négatifs (par exemple les ions citrates) créant une répulsion entre les différentes particules d'or ce qui permet d'éviter leur agrégation par attraction de type Van der Waals. En présence d'un ADN double brin ou d'un ADN replié (lors de la fixation de la cible par exemple), la

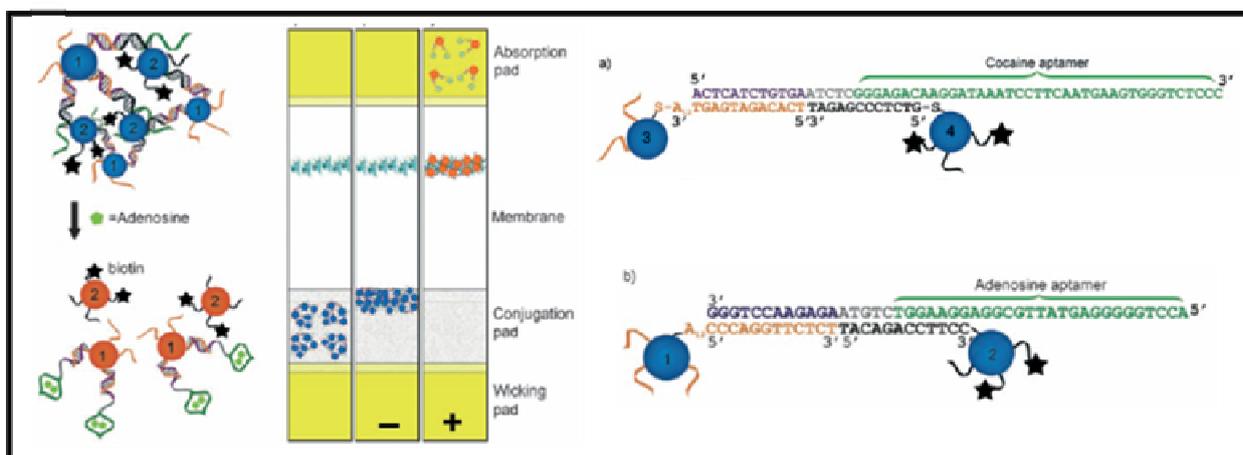
répulsion entre les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN et les ions citrates adsorbés dominant l'interaction électrostatique entre l'or et l'ADN double brin empêchant ainsi l'adsorption de cet ADN sur les nanoparticules d'or. Dans ces conditions, en présence de sels les nanoparticules s'aggrègent ce qui conduit à une coloration bleu-pourpre. En revanche, l'ADN simple brin déplié est suffisamment flexible pour partiellement dérouler ses bases nucléiques. Il peut donc être ainsi exposé aux nanoparticules d'or. La charge négative du squelette phosphaté de l'ADN est suffisamment lointaine pour permettre une attraction de type Van der Waals entre les bases et les nanoparticules d'or. Ceci permet la fixation de l'ADN sur les particules d'or, évitant ainsi l'aggrégation des particules. Dans ce cas, la solution se colore en rouge. Il est donc possible par cette approche de visualiser à l'oeil nu le changement de conformation de l'aptamère lié à la reconnaissance de sa molécule cible qui se traduit par le passage d'une solution colorée en rouge (aptamère déplié) à une solution colorée en bleu-pourpre (aptamère replié). Cette stratégie a été appliquée avec succès pour la détection d'ions potassium [217] et de protéines (la thrombine) [218] (*figure 45*).



**Figure 45 :** Représentation schématique d'une stratégie permettant la détection colorimétrique de la thrombine [218].

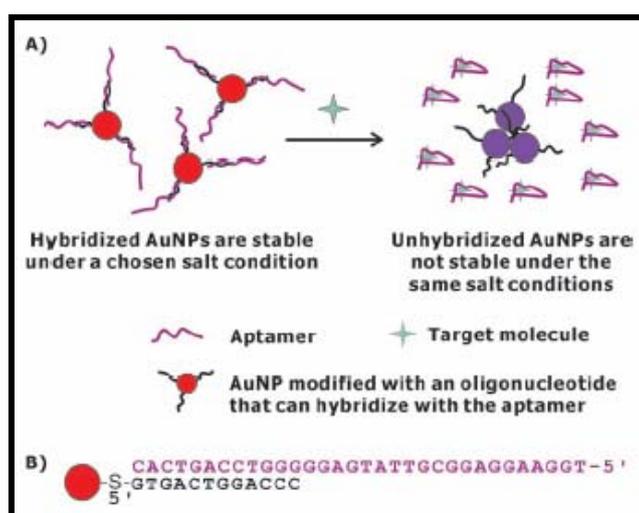
Des aptamères ont également été employés pour assembler des nanoparticules et former un biocapteur colorimétrique. Une étude a été réalisée par Liu et son équipe où l'aptamère est utilisé comme « linker » pour assembler des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des ADNs simples brins [219,220]. En présence de la molécule cible, le changement de conformation de l'aptamère déstabilise une partie de l'ADN liée à une nanoparticule ce qui aboutit à la libération de la nanoparticule fixée alors à un ADN simple brin. Ainsi, les nanoparticules agrégées colorées en bleu-pourpre avant fixation de la cible sont séparées en des nanoparticules colorées en rouge après fixation de la cible (*figure 46*).

Cet essai peut être appliqué pour l'analyse d'une grande variété de molécules par simple remplacement de la séquence de l'aptamère. Il a également été utilisé pour la détection de l'adénosine et de la cocaïne dans le sérum humain par un test rapide sur bandelette (« dipstick » test) où la nanoparticule biotinylée est liée de façon spécifique au niveau de la bandelette sur laquelle est immobilisée de la streptavidine [221].



**Figure 46:** Représentation schématique du biocapteur construit par Liu et son équipe permettant la détection colorimétrique de la cible sur des bandelettes [221].

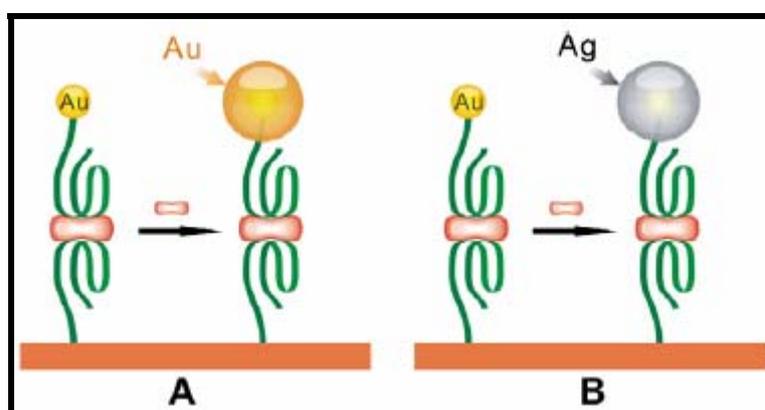
Une autre approche a été réalisée par hybridation d'un aptamère au niveau d'un ADN simple brin complémentaire fixé à des nanoparticules d'or dispersées en solution et colorées en rouge [222]. Lors de la fixation de la cible, l'aptamère acquiert sa conformation active et se dissocie des nanoparticules d'or. Ces dernières alors instables s'agrègent immédiatement en présence de sels ce qui conduit à une coloration bleu-pourpre (*figure 47*).



**Figure 47:** (a) Principe de fonctionnement du biocapteur construit par Zhao et ses collaborateurs. (b) Séquences des molécules d'ADN utilisées pour la construction de cet « aptasensor » permettant la détection de l'adénosine [222].

Des nanoparticules d'or fonctionnalisées par un aptamère ont également été envisagées pour la détection amplifiée de protéines en utilisant une configuration en « sandwich ». Un aptamère anti-thrombine a été lié de façon covalente au niveau d'une monocouche de siloxane fonctionnalisée par un groupement maléimide puis, la thrombine a été fixée sur cette interface [223]. Ensuite, le même aptamère fonctionnalisé par des nanoparticules d'or est associé au niveau du deuxième site de fixation de la thrombine. Cette interface « en sandwich » est alors incubée dans une solution de croissance contenant  $\text{HAuCl}_3$  et des agents réducteurs (*figure 48a*). L'accroissement des nanoparticules d'or permet une amélioration de la sensibilité de la détection colorimétrique ce qui correspond à une concentration en thrombine de 2 nM.

Plus récemment, Li et ses collaborateurs ont développé une approche similaire faisant intervenir une amplification du signal en présence d'argent (*figure 48b*) [224]. Afin de faciliter la visualisation des nanoparticules d'or, les auteurs ont utilisé une procédure d'amplification du signal par réduction des ions argentés en présence d'hydroquinone en argent métallique à la surface des nanoparticules d'or ; cette étape permet la visualisation des nanoparticules avec une limite de détection de 83 aM.



**Figure 48:** Représentation schématique d'« aptasensors » colorimétriques [175] construits par une configuration en « sandwich » et amplifiés en présence d'or [223] et d'argent [224].

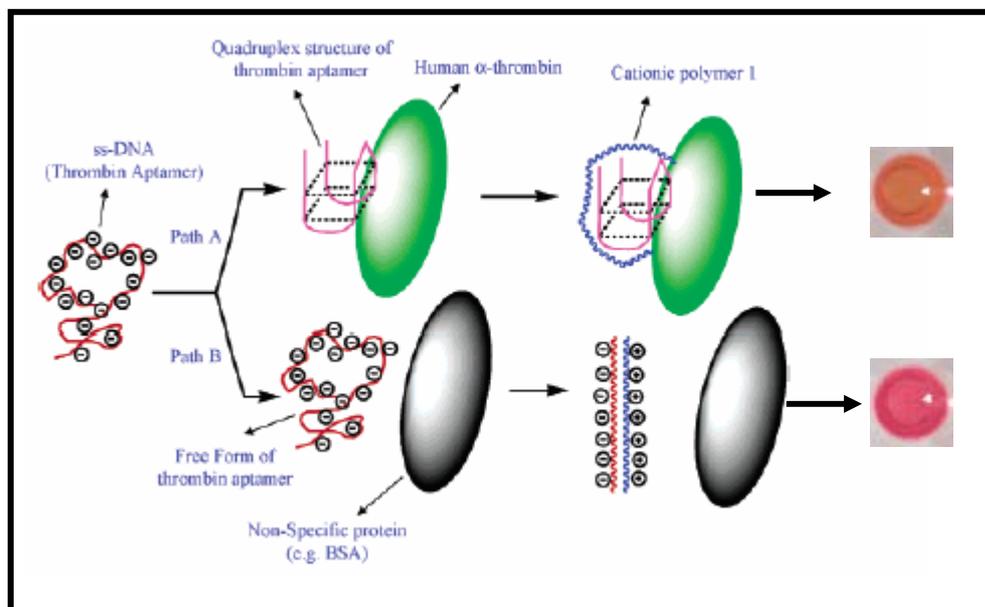
Plusieurs études ont également été réalisées pour le développement d'« aptasensors » sans marquage de l'aptamère. En effet, il peut être souvent difficile de choisir la position adéquate pour le marquage d'un aptamère puisqu'il persiste parfois des incertitudes concernant les sites de fixation de la cible et sur la modification éventuelle de conformation de l'aptamère. De plus, le marquage d'aptamères en série ARN, qui correspondent à une partie majoritaire des aptamères sélectionnés, est très souvent difficile à cause de l'instabilité de l'ARN [78].

Stojanovic et ses collaborateurs ont utilisé un aptamère anti-cocaïne afin de développer un biocapteur colorimétrique spécifique de cette molécule [225]. Après incubation de l'aptamère en présence d'un colorant, l'addition de la cocaïne engendre un déplacement du colorant se traduisant par une atténuation de l'absorbance proportionnelle à la concentration de cocaïne ajoutée. Aucune variation du spectre d'absorbance n'est observée en présence de métabolites de la cocaïne. Ceci indique une sélectivité importante de ce biocapteur. De plus, celui-ci s'est avéré plus sensible et plus sélectif que les biocapteurs fluorescents construits avec le même aptamère [211,214], indiquant que l'attachement covalent d'un colorant est plus intrusif que l'attachement non covalent, engendrant probablement des modifications de la structure de l'aptamère.

Jiang et ses collaborateurs [226] ont développé une méthode de détection en utilisant les propriétés de luminescence d'un complexe au rutherfordium  $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})]^{2+}$  (phen = 1,10-phenanthroline, dppz = dipyrido[3,2-a : 2',3'-c]phenazine). Ce complexe montre une forte luminescence lorsqu'il est intercalé entre des acides nucléiques appariés mais il perd cette propriété lorsqu'il est en solution aqueuse à cause de la solvation des atomes d'azotes du phénazine qui empêche le transfert de charge entre le métal et le ligand. Le complexe métallique peut s'intercaler au sein de l'ADN libre, il est de cette façon protégé des molécules d'eau, ce qui aboutit à une émission intense de luminescence. En revanche, lors de la fixation de la cible, l'émission de luminescence décroît (« signal off ») à cause de la perte de complexes intercalés du fait du changement de conformation de l'aptamère et du blocage de ses sites par la cible fixée. Cette méthode, très simple, n'impliquant aucun marquage, a été appliquée pour la détection de protéines importantes dans le domaine biomédical : l'IgE, le PDGF-BB et la thrombine en utilisant des aptamères ADN et ARNs.

Finalement, Ho et son équipe ont développé un « aptasensor » optique basé sur l'utilisation d'un aptamère ADN simple brin fixant spécifiquement les ions potassium ou l' $\alpha$ -thrombine humaine [227]. Pour construire ce biocapteur, les auteurs ont utilisé un dérivé polythiophène cationique (poly(3-alkoxy-4-methyl-thiophene) soluble dans l'eau permettant la transduction spécifique de la fixation de l'aptamère à sa cible à travers un signal optique (colorimétrique ou fluorescent). Cet essai simple, rapide, sensible et sélectif, ne nécessitant aucune modification chimique de l'aptamère ou de la cible, est basé sur une modification de conformation du squelette du dérivé polythiophène cationique lors de sa complexation avec un ADN simple brin anionique. Le polymère cationique a des propriétés optiques différentes lorsqu'il est complexé avec un ADN simple brin et un ADN double brin (*figure 49*). Cette

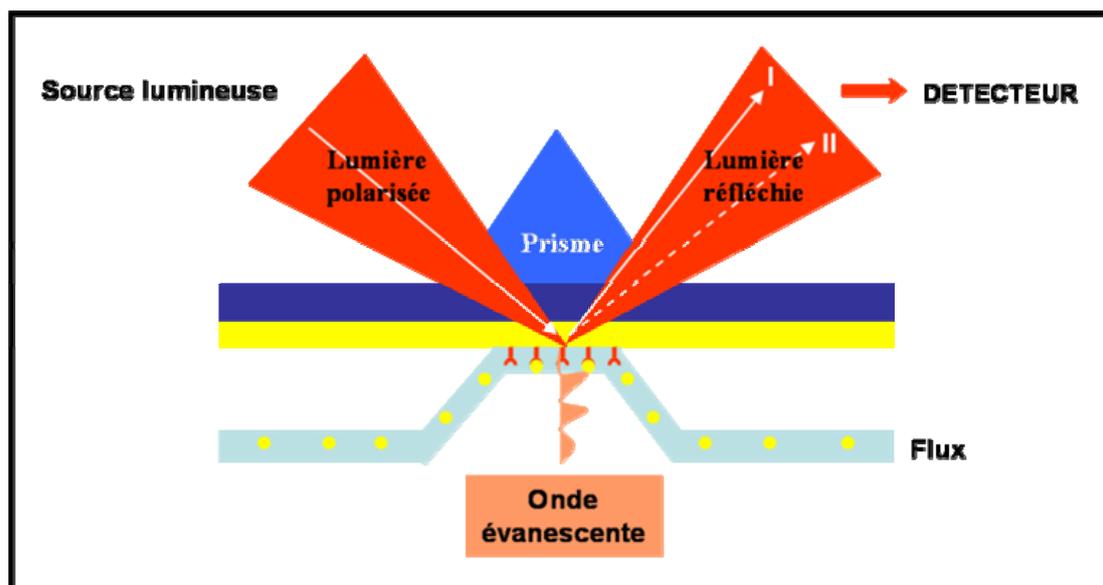
méthode permet la détection spécifique de la thrombine à une concentration du fM en quelques minutes et peut être adaptée à d'autres molécules.



**Figure 49:** Description schématique de la détection spécifique de l'α-thrombine humaine par utilisation d'un aptamère ADN spécifique de la thrombine et d'un polymère cationique [227].

#### IV.1.3.3 Les biocapteurs à résonance plasmonique de surface (RPS)

La résonance plasmonique de surface (RPS) est une technique permettant la mesure des variations de l'indice de réfraction au voisinage d'une interface entre un métal et le milieu étudié. Le principe est le suivant : lorsqu'un faisceau de lumière polarisé monochromatique illumine une interface transparente entre deux milieux d'indice de réfraction différents, la lumière incidente peut suivre deux voies : soit une partie de la lumière incidente est réfléchie et l'autre réfractée (cas le plus général), soit toute la lumière incidente est réfléchie (*figure 50*). Dans ces conditions, une composante électromagnétique de la lumière, appelée onde évanescente, pénètre le milieu d'indice de réfraction inférieur sur une courte distance équivalente à sa longueur d'onde. Si une fine couche de métal, riche en électrons libres (par exemple une couche d'or), est déposée sous le verre et est traversée par cette onde évanescente, les photons de cette onde vont entrer en résonance avec les nuages électroniques du métal. Ce phénomène est appelé résonance plasmonique de surface et le faisceau réfléchi va présenter une chute d'intensité à un angle défini. Cet angle d'intensité minimum se nomme l'angle de résonance.



**Figure 50:** Représentation du principe de résonance plasmonique de surface.

Quelques publications sont parues, dans la littérature dans lesquelles la méthode RPS est utilisée pour créer des biocapteurs à base d'aptamères. Dans un tel système, les molécules cibles sont injectées à débit constant par un circuit microfluidique au contact de l'interface sur lequel l'aptamère a été immobilisé. Les changements de masse induits par l'association ou la dissociation des complexes aptamère-cible modifient l'indice de réfraction du milieu et décalent la position de l'angle de résonance (*figure 50*). L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Il a été montré que le signal est proportionnel à la quantité de molécules fixées [171]. De plus, cette technique présente l'avantage de ne pas recourir au marquage des molécules.

Des études ont été réalisées en utilisant cette technologie pour étudier les interactions entre des aptamères sélectionnés et leurs molécules cibles. Ainsi, ces études ont été menées, par exemple, pour des aptamères dirigés contre la protéine Tat du VIH-1 [228], la tubuline [229] et la MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) [230]

Mascini et ses collaborateurs [231] ont construit deux « aptasensors » en utilisant deux méthodes différentes de transduction : RPS et QCM. Un aptamère spécifique de la protéine Tat du VIH-1 a été immobilisé à la surface du transducteur et sa capacité à fixer la molécule cible a été étudiée en terme de sensibilité, reproductibilité et sélectivité. Les deux biocapteurs ont été construits en utilisant la même chimie d'immobilisation basée sur la fixation d'un aptamère biotinylé et une couche de streptavidine fixée préalablement sur la surface d'or du transducteur (cristal de quartz ou puce).

Plus récemment, Mascini et son équipe ont développé un biocapteur permettant la détection de l'IgE en utilisant un aptamère spécifique de cette cible comme élément de reconnaissance couplé à une transduction par RPS [232]. Les auteurs ont immobilisé au niveau de la puce l'aptamère spécifique pour le domaine Fc de l'IgE et ont également réalisé un contrôle en présence d'un ADN polyT. Il a été observé que l'IgE se fixe exclusivement sur la surface sur laquelle est immobilisé l'aptamère spécifique de la cible. La spécificité de l'aptamère a également été testée en présence d'analogues de la protéine. Ce capteur s'est avéré très spécifique et peut être facilement régénéré.

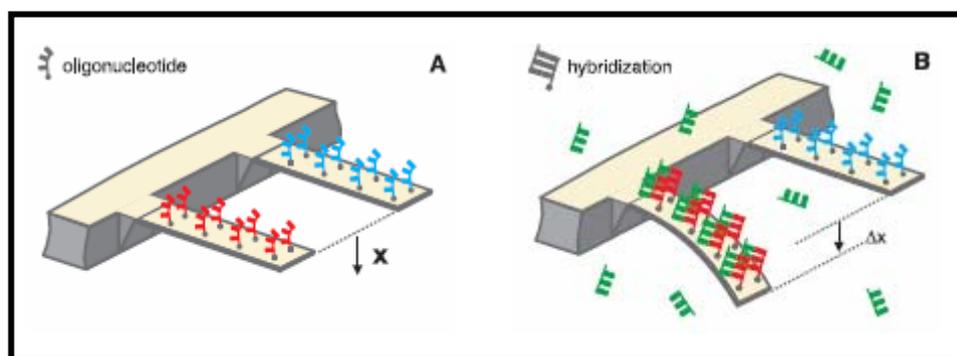
La technologie de résonance de plasmonique de surface par imagerie (RPSi) amplifiée enzymatiquement a été également développée pour détecter la thrombine et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [233]. Dans ce système, la protéine cible est fixée à son aptamère immobilisé à la surface d'une micromatrice (« microarray »), puis, un anticorps conjugué à la peroxydase de Raifort (« horseradish peroxidase » : HRP) est introduit pour créer une structure en « sandwich » formée par le complexe aptamère-cible-anticorps. Ce complexe est ensuite exposé au substrat de la HRP : le tétraméthylbenzidine (TMB). Ceci engendre la formation d'un précipité noir-bleu à la surface de la micromatrice. Une très faible quantité de ce précipité sur la surface d'or se traduit par une réponse RPSi significativement amplifiée. De faibles limites de détection sont obtenues avec cette méthode (500 fM pour la thrombine et 1 pM pour le VEGF).

Enfin, un « aptasensor » basé sur la technologie RPS a été, très récemment, conçu pour détecter une protéine fixant le rétinol (RBP4), celle-ci étant utilisée comme bio-marqueur dans le diagnostic du diabète de type 2 [234]. Un aptamère ADN simple brin, fixant la RBP4 avec une affinité et une spécificité importantes, a été immobilisé à la surface d'une puce d'or et utilisé pour détecter cette protéine dans des échantillons de sérum. Les résultats obtenus ont montré que ce biocapteur est plus sensible que les essais réalisés par ELISA. En plus de cette sensibilité, il présente l'avantage d'être rapide, réutilisable, et sans marquage.

#### ***IV.1.4 Les « aptasensors » de type « cantilevers »***

En 2000, Fritz et son équipe ont développé une nouvelle forme de biocapteurs, ne nécessitant aucun marquage, capable de détecter des interactions biomoléculaires via la courbure de microcantilevers recouverts par des oligonucléotides ADNs (ou anticorps) comme éléments de reconnaissance [235].

Les microcantilevers sont de petites lames alignées sous la forme d'un peigne. Pour la conception de biocapteurs, la surface de ces lames peut être recouverte par des aptamères de séquences spécifiques de la molécule cible que l'on veut détecter. Lors de la présence de la cible, cette dernière est liée au niveau des séquences d'oligonucléotides fixées sur les lames, ce qui induit une contrainte de surface qui courbe de quelques nanomètres la lame concernée. Cette courbure peut ensuite être détectée (*figure 51*).



**Figure 51 :** Représentation schématique du principe de fonctionnement d'un biocapteur cantilever. (a) La surface de l'une des lames du cantilever peut être recouverte d'un aptamère spécifique (en rouge) de la molécule cible que l'on veut détecter alors que la deuxième lame peut être recouverte d'une séquence d'oligonucléotide contrôle (en bleu). (b) Lors de l'ajout de la molécule cible (en vert), cette dernière se lie au niveau de son aptamère spécifique ce qui engendre une courbure de la lame concernée. Ainsi, la différence de courbure entre les deux lames peut être mesurée [235].

Alors que les biocapteurs microcantilevers souffrent d'une faible spécificité [236], l'utilisation d'aptamères permet de surmonter cette limitation. Il peut être noté que les aptamères semblent être de meilleurs récepteurs pour la conception de ces capteurs puisque leur changement de conformation lors de la fixation de la cible contribue à une contrainte de surface et donc une courbure de la lame plus importante [236].

Savran et ses collaborateurs ont publié l'utilisation d'un biocapteur cantilever microfabriqué fonctionnalisé par un aptamère ADN, modifié par un thiol, permettant la détection sans marquage de l'ADN polymérase *Taq* (*Thermus aquaticus*) [237]. En utilisant une détection par interférométrie, la différence de courbure entre ce cantilever et un cantilever référent, modifié par une séquence d'oligonucléotide non spécifique de la cible, a été déterminée. Une modification de la contrainte de surface a été observée lors de la fixation de la polymérase sur l'aptamère causant une courbure du cantilever entre 3 et 32 nm selon la concentration en ligand. La détection de la protéine, par ce capteur, peut être réalisée en milieu complexe (lysats d'*E. coli*) de façon spécifique avec une détection sélective de l'ordre du pM. De plus le système peut être facilement régénéré.

Plus récemment, un microcantilever opérant en mode vibrationnel (oscillation) utilisant un aptamère spécifique de l'hélicase du virus de l'hépatite C (VCH) a été fabriqué pour la détection sans marquage de cette protéine [238]. Ce système permet la détection de la protéine à une concentration de 100 pg/ml.

## **IV.2 L'utilisation des aptamères dans des techniques bioanalytiques**

### **IV.2.1 Les applications des aptamères en cytométrie de flux**

La cytométrie de flux est une méthode extrêmement puissante pour l'analyse des cellules et des microparticules. Cette technique est utilisée en recherche et pour la réalisation de diagnostics cliniques. Ces essais peuvent être construits sur des microsphères portant le ligand ou l'analyte. Puisque les particules peuvent être distinguées sur la base de leur couleur et de leur taille, la cytométrie de flux est un système attrayant pour une analyse multiplexe.

Dans cette technique, il est possible de remplacer les anticorps, usuellement utilisés, par des aptamères. Il est ainsi facile de détecter des aptamères fluorescents liés à leurs cibles à la surface d'une cellule ou d'une microparticule. Il a été prouvé que les capacités de liaison des aptamères ne sont pas influencées par la taille du fluorophore et, de plus, elles peuvent être facilement améliorées en incluant ce dernier dans la méthode de sélection SELEX. Il est également important de tenir compte du fait que la cytométrie de flux est parfois utilisée pour l'analyse de cellules du système immunitaire. Or, ces dernières peuvent posséder à leur surface des récepteurs à la région Fc des anticorps, ce qui est générateur d'interférences. En raison de leur nature, les aptamères permettent de contourner ce problème.

Un aptamère ADN sélectionné contre l'élastase des neutrophiles humains (HNE) [239] a été modifié par le greffage d'une fluorescéine sur différentes positions en utilisant divers bras espaceurs. Cet aptamère modifié a été utilisé pour le marquage de billes couplées à la HNE par cytométrie de flux [240]. Bien que chaque dérivé d'aptamères testé ait la capacité de lier sa cible à la surface des billes, il a été remarqué que l'intensité de fluorescence est dépendante du site et du mode d'immobilisation de la fluorescéine.

En utilisant cette approche, des aptamères ADNs tronqués, marqués à la fluorescéine ont été synthétisés afin de marquer les cellules exprimant la L-sélectine [241,242]. Ces aptamères spécifiques de la L-sélectine ont ainsi permis le marquage spécifique des leucocytes et des neutrophiles, exprimant cette protéine, présente dans des échantillons de

cellules sanguines humaines. Les résultats de cette étude sont très similaires à ceux obtenus avec un anticorps anti-L-sélectine.

Afin de mimer davantage les capacités des anticorps (molécules bivalentes) dans les expériences de cytométrie de flux, les études décrites précédemment utilisant des aptamères monovalents ont été réalisées en utilisant des aptamères dimérisés. L'aptamère anti-HNE dimérisé a montré une affinité de fixation pour sa cible dix fois supérieure à celle de son équivalent monomérique [240]. L'effet de la dimérisation des aptamères sur le marquage cellulaire a également été étudié par l'équipe de Ringquist [242]. L'aptamère fixant la L-sélectine à la surface des cellules montre une affinité 20 fois meilleure lors de sa dimérisation. De plus, la vitesse de dissociation de l'aptamère dimérisé est dix fois plus faible que son équivalent monomérique et la demie vie des aptamères divalents à la surface d'une cellule est supérieure à celle des anticorps (14 minutes contre 5,5 minutes).

Afin de réaliser des expériences de marquage cellulaire par cytométrie de flux, un aptamère a été sélectionné en utilisant une protéine recombinante humaine CD4 immobilisée à la surface de billes [243]. Ces aptamères, contenant des pyrimidines fluorées en 2', obtenus par sélection *in vitro*, ont été conjugués à une fluorescéine ou à une phycoérythrine afin d'analyser leur capacité de fixation à des protéines CD4 humaines exprimées à la surface des cellules. Ces aptamères monovalents marqués à la fluorescéine ou multivalents conjugués à la phycoérythrine permettent le marquage spécifique des cellules exprimant la CD4 (cellules T ou monocytes) dans un mélange hétérogène de cellules sanguines humaines. L'utilisation simultanée d'aptamères et d'anticorps marqués d'une couleur différente a été possible par cette méthode, montrant que l'utilisation d'aptamères seuls ou en association avec des anticorps peut être utile pour le développement de nouveaux essais diagnostiques.

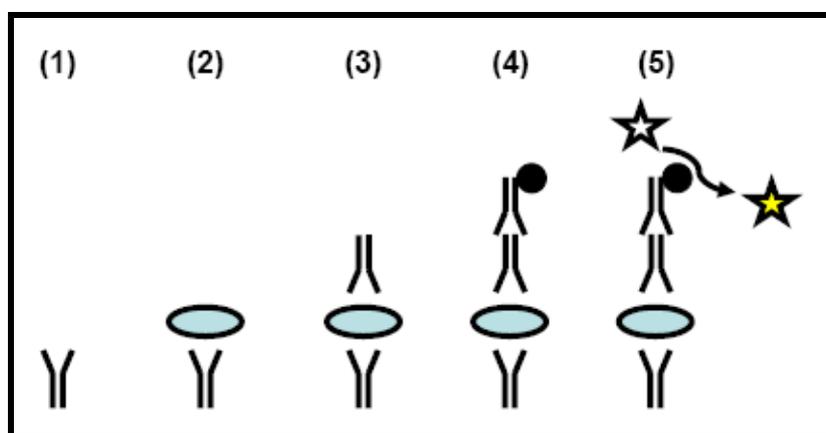
En 2001, un aptamère ADN sélectionné pour fixer sélectivement des microvaisseaux du cerveau de rats glioblastoma a été utilisé comme marqueur histologique d'une tumeur du cerveau [244]

#### **IV.2.2 Les applications des aptamères en technologie de type ELISA : la technique ELONA ou ELAA**

Le test ELISA (acronyme de *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) est un test immunologique destiné à détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. Dans la technique ELISA dite « en sandwich » (*figure 52*), les puits d'une microplaque sont tapissés avec un anticorps de capture capable de lier spécifiquement l'antigène recherché (1).

L'anticorps de capture assure la spécificité du test. La solution à tester est ensuite déposée dans les puits de la microplaque et si l'antigène recherché est présent il va se lier spécifiquement à l'anticorps de capture (2). Ensuite, un anticorps de détection est ajouté et se fixe à l'antigène (3). Un autre anticorps, l'anticorps traceur, capable de se lier à l'anticorps de détection est alors ajouté dans les puits (4). L'anticorps traceur est couplé à une enzyme catalysant la formation d'un produit coloré ou fluorescent (5). La réaction peut ainsi être détectée et quantifiée.

Les aptamères permettent de réaliser cette expérience de la même manière [170], le test est alors nommé ELONA (*Enzyme Linked Oligonucleotide Assay*) ou ELAA (*Enzyme Linked Aptamer Assay*).



**Figure 52 :** Principe de fonctionnement d'un test ELISA « en sandwich » (d'après [137]).

Le premier test ELONA est apparu en 1996, où Drolet et ses collaborateurs [245] ont construit un essai hybride ELISA/ELONA « en sandwich » permettant la détection du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans le sérum. Un anticorps monoclonal spécifique du VEGF est immobilisé à la surface des puits de la microplaque et utilisé comme agent de capture de la cible. Après fixation du VEGF, l'aptamère ARN, spécifique de la cible, marqué par une fluorescéine est lié. Puis, un anticorps anti-fluorescéine couplé à une phosphatase alcaline est ajouté et facilite la détection. Les quantités relatives de VEGF dans chaque puit sont mesurées par une addition du substrat chimiluminescent de cette enzyme. Cet essai permet de détecter de façon spécifique des concentrations en VEGF de l'ordre du pM et fournit des résultats similaires à ceux obtenus par ELISA.

Par la suite, des essais hybrides similaires ont été réalisés à la surface de microbilles en utilisant des aptamères, immobilisés ou marqués, comme agents de capture ou de détection [246-248].

Kawazoe et son équipe [249] ont décrit l'application d'un essai compétitif par utilisation d'un aptamère marqué à la fluorescéine permettant la détection du réactif vert 19 (RG : *reactive green 19*). Cet aptamère en série ADN est incubé avec un gel ayant immobilisé le RG 19, puis une solution contenant le RG 19 est ajoutée et la fluorescence liée à la libération des aptamères marqués au FITC est mesurée.

Un essai de fixation compétitif similaire utilisant un aptamère ADN obtenu par sélection *in vitro* contre la thyroxine ( $T_4$ ) a été décrit [250]. Des aptamères fixant sélectivement la  $T_4$  ont été sélectionnés puis marqués, soit par la biotine, soit par un radioisotope. Ces aptamères ont ensuite été utilisés pour détecter la  $T_4$  en présence de thyronine ( $T_3$ ), une molécule possédant une structure chimique similaire. Pour réaliser cet essai, l'aptamère ADN modifié est lié au niveau de la thyroxine  $T_4$  immobilisée au niveau d'un support en gel, puis ces billes de gel sont incubées en présence d'une solution contenant des quantités variées en  $T_3$  et  $T_4$ . Après incubation à température ambiante, une partie du surnageant est prélevée et transférée au niveau d'une membrane de nylon. La quantité d'aptamères ADNs biotinylés est détectée en présence d'une phosphatase alcaline conjuguée à de la streptavidine.

Différents essais ELAA ou mixtes ELISA/ELAA utilisant un aptamère anti-thrombine ont été optimisés en testant différents paramètres critiques pour une performance optimale de l'aptamère. L'efficacité de ces essais a été comparée [251]. Le système mixte ELISA/ELAA « en sandwich », réalisé en 4 heures, montre une limite de détection très faible ( $< 1$  nM) alors que l'essai ELAA par compétition apparaît comme le plus efficace en terme de limite de détection (1,8 nM) et de rapidité (1,5 h). Cependant, cette étude a montré que les conditions devaient être optimisées pour chaque système et ne sont donc pas généralisables.

Baldrich et ses collaborateurs [252] ont utilisé, pour la première fois, les aptamères dans des essais ELONA par déplacement. Pour cela, il se sont basés sur l'observation suivante : les aptamères nécessitent une structure en trois dimensions pour fixer leur molécule cible. Donc, ils ont émis l'hypothèse que les aptamères devraient posséder une meilleure affinité pour leur cible naturelle par rapport à une forme modifiée de la cible (par exemple une cible conjuguée à une enzyme). Cette hypothèse a été confirmée, par RPS, où l'affinité de l'aptamère anti-thrombine, est plus faible pour la thrombine conjuguée à une enzyme que pour son analogue naturel ( $K_d$  de 1,1 et de 0,3  $\mu$ M respectivement). Pour réaliser cet essai, les auteurs ont utilisé différents modes de fixation. Par exemple, ils ont immobilisé des aptamères au niveau d'une microplaque, puis la thrombine conjuguée à une enzyme marquée a été fixée. L'addition de thrombine naturelle permet ainsi le déplacement de la cible modifiée possédant

une affinité inférieure pour l'aptamère, ce qui conduit à une diminution du signal (essai ELONA « direct » par déplacement). Cet essai est extrêmement rapide (10 min), très sensible et montre une limite de détection plus faible que celle obtenue par des essais ELAA par compétition et est comparable aux essais hybrides aptamère-anticorps (LOD de 4,5 et < 1 nM par une détection optique et électrochimique respectivement). De plus, les microplaques peuvent être conservées pendant plusieurs mois. Il est important de noter qu'aucun déplacement n'a été observé en remplaçant l'aptamère par un anticorps anti-thrombine ce qui démontre les propriétés remarquables des aptamères pour des essais par déplacement.

Très récemment, un aptamère ADN, nommé SELH2A, a été sélectionné contre l'antigène H2A de *Leishmania infantum* et utilisé pour détecter cet antigène H2A par ELONA [253]. *Leishmania infantum* est un protozoaire généralement transmis par une piqûre d'insectes, impliqué dans la leishmaniose viscérale. Cet aptamère reconnaît spécifiquement l'antigène H2A de *Leishmania infantum* et ne se fixe pas à d'autres protéines du parasite. Ainsi, son utilisation est d'un grand intérêt pour détecter l'antigène H2A puisqu'aucun anticorps commercial n'est disponible pour cette protéine.

Toutes ces études ont donc montré que les aptamères pouvaient remplacer les anticorps dans des essais bioanalytiques.

### **IV.3 L'utilisation des aptamères comme ligands d'affinité en chromatographie, en électrochromatographie et en électrophorèse capillaire**

#### **IV.3.1 Les applications des aptamères en chromatographie et en électrochromatographie d'affinité**

##### ***IV.3.1.1 Principe général de la chromatographie d'affinité***

La chromatographie d'affinité est rapidement devenue une méthode de choix de séparation en biochimie, biotechnologie et en sciences pharmaceutiques. Elle peut être définie comme une technique de chromatographie liquide dont le principe repose sur la reconnaissance entre une molécule d'un échantillon à analyser, séparer ou purifier et une molécule greffée à la surface d'une résine, que l'on appelle ligand, ces deux espèces interagissant de manière hautement spécifique. Le ligand est classiquement immobilisé à la surface du support d'une façon covalente ou par un lien biotine-streptavidine. Le cas le plus

simple (approche « directe ») implique l'injection de l'échantillon dans une colonne d'affinité sous des conditions dans lesquelles la molécule cible se fixe au niveau du ligand immobilisé avec une affinité importante. Le tampon d'élution est ensuite appliqué pour dissocier l'analyte retenu.

Bien que différents ligands aient été utilisés en chromatographie d'affinité, la méthode la plus populaire concerne l'utilisation des anticorps pour créer des colonnes d'immunoaffinité efficaces. Bien que les anticorps possèdent une affinité et une spécificité importantes pour leurs cibles, il existe cependant un certain nombre de contraintes qui limitent leur efficacité en chromatographie d'affinité. En effet, leur immobilisation sur des colonnes conduit à des fixations non uniformes menant à de faible capacité de fixation et/ou affinité. De plus, un anticorps présente généralement une taille importante, limitant la densité de ligand à la surface de la colonne. Enfin, une limitation supplémentaire concerne les conditions d'élution, celles-ci peuvent parfois être drastiques, nécessitant l'utilisation de pH extrême, de détergents, de solvants organiques ou de sels chaotropiques pouvant mener à la dénaturation de l'anticorps et/ou probablement de la molécule cible (protéines par exemple) [254].

A l'inverse des anticorps, un certain nombre de publications ont montré un grand intérêt pour l'utilisation d'aptamères (ADNs ou ARNs) comme ligands d'affinité en chromatographie et en électrochromatographie. En effet, la taille relativement faible des aptamères autorise des densités plus importantes de fixation au niveau des phases stationnaires. De plus, les conditions d'élution et d'immobilisation du ligand peuvent être modulées. Les aptamères sont aujourd'hui utilisés pour la séparation, la détection et la purification de protéines et, pour la séparation de petites molécules incluant les énantiomères (**tableau 6**). La séparation des énantiomères par utilisation d'aptamères sera présentée dans la dernière partie de ce chapitre.

**Tableau 6** : Etudes concernant l'utilisation des aptamères comme ligands d'affinité en chromatographie liquide (CL), en électrochromatographie capillaire (ECC) et en électrophorèse capillaire d'affinité (ECA) [255].

Molécules cibles	Oligonucléotides	Systèmes de séparation	Applications	Réf.
<b>Petites molécules</b>				
• Molécules non-ciblées	ADN G-quartet	ECC	Séparation	[121,256-258]
• Adénosine et analogues	ADN	Nano-CL	Séparation	[259,260]
• FMN et autres espèces	ARN	ECC	Capture Séparation	[261,262]
<b>Protéines</b>				
• L-Sélectine	ADN	CL	Capture	[254]
• Facteur de transcription 1 de la thyroïde	ADN	Billes magnétiques	Capture	[263]
• Thrombine	ADN	ECC	Capture	[264]
• ARN polymérase et répliquase du VHC	ARN	CL/puce	Capture	[265,266]
• Protéines non-ciblées	ADN G-quartet	ECC	Séparation	[267-269]
• Cytochrome c	ADN G-quartet	CC monolithes	Séparation	[270]
• IgE/Thrombine	ADN	ECA-LIF	Séparation / Détection	[271,272]
• Ricine	ARN	ECA-LIF	Détection	[273]
• Transcriptase inverse du VIH-1	ADN	ECA-LIF	Détection	[274-276]
	ADN	ECA-LIF	Stoechiométrie de fixation	[277]
	ADN	ECA-LIF-PCR	Détection	[278]
• Thrombine	ADN	ECA-LIF	Détection / Interaction prot- prot	[279]
	ADN	NECEEM	Détection	[280]
• ADN polymérase <i>Taq</i>	ADN	NECEEM	Interaction ADN-prot	[281]
• Thrombine	ADN	ECA sur micropuce	Interaction ADN-prot	[282]

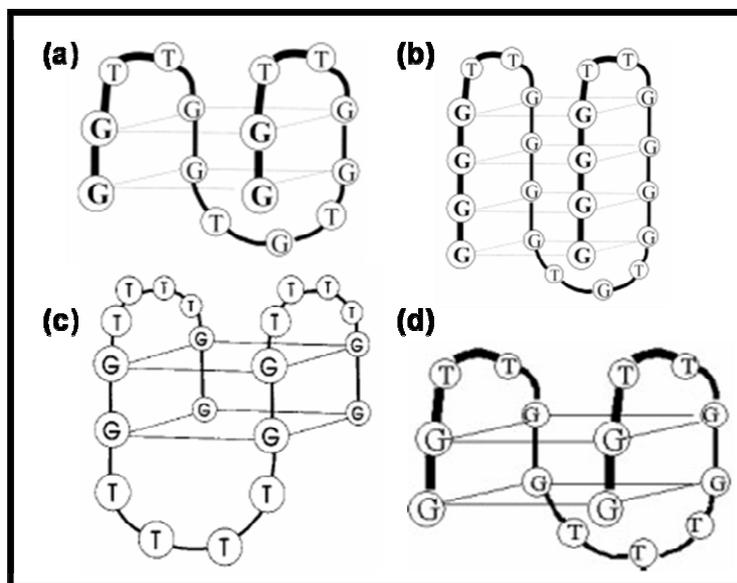
(CC : Chromatographie Capillaire, LIF : fluorescence induite par laser)

#### IV.3.1.2 Utilisation d'aptamères pour la séparation de petites molécules

Mc Grown et son équipe ont publié pour la première fois l'utilisation d'aptamères ADN comme phase stationnaire pour la séparation de petits solutés [121]. Deux aptamères ADN, l'aptamère anti-thrombine 15-mer (5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3') et un analogue 20-mer (5'-GGTTTTGGTTTTGGTTTTGG-3') dans lequel les boucles connectant les G-quartets contenant seulement des thymidines ont été étendues (*figure 53a et c*), ont été utilisés pour la séparation d'acides aminés (D-Trp et D-Tyr), d'énantiomères d'acides aminés (D-Trp et L-Trp) et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (naphtalène, phénanthrène, benzopyrène, ou benzopérylène) en utilisant une approche par électrochromatographie capillaire. L'influence de l'addition de solvants organiques (acétonitrile (ACN) ou méthanol) dans la phase mobile sur la séparation de ces molécules a été testée. Il a été montré que la présence d'ACN (jusqu'à 60%) dans la phase mobile, à l'inverse du méthanol, stabilise la structure en G-quartet de l'aptamère et améliore la résolution des naphtalènes et des benzopérylènes. L'influence de la présence de G-quartet sur la séparation a également été évaluée. Il a été observé que la conformation en G-quartet des aptamères joue un rôle dans la séparation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. En effet, en présence d'une phase mobile hydro-organique (30% de méthanol) contenant du KCl, une résolution partielle des naphtalènes et benzopyrènes est obtenue. En revanche en absence de KCl, aucune résolution n'est observée. Par cette étude, les auteurs ont donc montré la capacité des aptamères formant des G-quartets à séparer des composés non ciblés tels que les acides aminés et leurs énantiomères et, à achever la résolution partielle d'HAPs en milieu hydro-organique.

Par la suite, cette équipe a étudié la capacité des aptamères en G-quartet (à deux (*figure 53a*) et quatre plans (*figure 53b*)) à séparer des dipeptides (Trp-Arg et Arg-Trp) par électrochromatographie capillaire [256]. L'étude de l'influence de la température sur la séparation de ces dipeptides a suggéré que la résolution était améliorée lorsque la conformation de l'aptamère Q-quartet en deux plans est partiellement déstabilisée. En utilisant l'aptamère G-quartet à 4 plans, plus stable, une résolution plus faible est obtenue et l'augmentation de la température à 40°C n'a pas d'effet. Cette observation conforte donc l'hypothèse précédente. Cependant, une expérience de contrôle réalisée sur l'aptamère en G-quartet à deux plans, en absence de KCl, montre une séparation seulement partielle des dipeptides. Ces résultats suggèrent donc que la conformation de l'aptamère la plus favorable pour la séparation de dipeptides est une conformation où le G-quartet est partiellement déstabilisé.

Cette étude a été étendue à l'analyse d'homodipeptides et de dipeptides alanyl par l'utilisation de trois structures en G-quartet différentes : l'aptamère spécifique de la thrombine, l'analogue à 4 plans et un analogue à l'aptamère anti-thrombine où la base guanine en position 8 a été remplacée par une thymine (*figure 53a, b et d*) [257].



**Figure 53 :** Structures des aptamères en G-quartet utilisés par Mc Grown et son équipe. (a) Aptamère sélectionné contre la thrombine, analogues de l'aptamère anti-thrombine à 4 plans (b) et à deux plans (c) (d) [121,256,267-269].

Cette étude a montré que le remplacement d'une guanine par une thymine dans la boucle centrale de l'aptamère anti-thrombine permet une augmentation de l'affinité de l'ADN pour le dipeptide Ala-Glu ce qui indique que le site d'interaction est proche de la boucle centrale du G-quartet. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cet aptamère muté, moins stable, peut faciliter l'interaction avec le dipeptide du fait d'une plus grande flexibilité de sa structure. Cette hypothèse a été confirmée par l'étude sur l'homodipeptide Trp-Trp où une meilleure résolution est obtenue en présence de l'aptamère à 2 plans par rapport à l'étude réalisée en présence de l'aptamère à 4 plans plus stable. Plus récemment, cette équipe a étudié la séparation de 4 peptides du fibrinogène relativement proche par électrochromatographie capillaire en faisant varier la température et la concentration en cations de la phase mobile, deux paramètres clés pour la (dé)stabilisation des G-quartets de l'ADN [258]. Cette étude a montré que la déstabilisation des phases stationnaires G-quartet facilite la séparation des quatre peptides mais il est clairement établi que cette structure est nécessaire, au moins en partie, puisqu'aucune séparation n'est observée en absence d'ion  $K^+$  dans la phase mobile ou en présence d'une séquence d'aptamère au hasard n'ayant pas la capacité de se replier en G-quartet.

Kennedy et son équipe ont été les premiers chercheurs à publier l'immobilisation d'un aptamère, possédant la capacité de lier sélectivement des molécules cibles de structures très proches, pour permettre leurs séparations par chromatographie d'affinité [259]. En utilisant un aptamère ADN préalablement sélectionné [83] et caractérisé pour fixer l'adénosine et l'ATP, les auteurs ont décrit la préparation et la caractérisation d'une colonne d'affinité aptamère permettant la séparation de l'adénosine et de dérivés tels que l'AMP, l'ATP, l'ADP et le NAD. Pour préparer cette colonne, ils ont incubé l'aptamère en série ADN biotinylé en 5' en présence d'un support chromatographique sur lequel est couplé de façon covalente de la streptavidine. Ce mélange de phase stationnaire ayant immobilisé l'aptamère par un lien biotine-streptavidine est ensuite introduit dans un capillaire de faible diamètre (50 ou 150 µm) en silice fondue. Une analyse frontale est réalisée sur cette colonne d'affinité. Cette étude a montré que l'immobilisation de l'aptamère à la surface d'une colonne n'altère pas ses capacités de fixation. Le nombre de site actif de l'aptamère est 3,3 fois (soit 20 nmoles pour un volume de colonne de 100 µL) plus important que celui obtenu classiquement lors de l'immobilisation d'anticorps. De plus, des constantes de dissociation très faibles ont été mesurées (3 à 138 µM) pour les cibles testées, autorisant ainsi, leurs séparations. L'influence de diverses conditions opératoires telles que le diamètre des particules et du capillaire, la composition de la phase mobile (tampon, pH, force ionique, concentration en magnésium) ont été évaluées afin d'obtenir une séparation optimale. En absence d'ions magnésium dans la phase mobile, l'aptamère perd toute son affinité pour les molécules testées avec une exception pour l'adénosine où une rétention résiduelle est observée. Cette perte d'affinité est réversible puisque le passage d'une phase contenant du magnésium permet une régénération de l'affinité. Cet effet est probablement causé par un changement de la structure tertiaire active de l'aptamère.

En utilisant une approche identique, une colonne d'affinité similaire a été conçue afin de développer un essai efficace permettant la détection de l'adénosine dans des échantillons de microdialyses [260]. Les conditions opératoires ont été optimisées afin d'éluer l'adénosine 3 minutes après l'injection et obtenir ainsi la possibilité d'injecter des échantillons toutes les 5 minutes dans la colonne. Différents modes d'élutions ont été testés pour optimiser la détection UV de la cible qui est fortement retenue en présence de 20 mM de magnésium. L'utilisation d'une élution par compétition en présence de cations tel que  $\text{Ni}^{2+}$ , permettant la complexation des atomes d'azotes de l'adénosine impliqués dans la fixation à l'aptamère, semble être la méthode la plus efficace d'élution de l'adénosine. La limite de détection de cette méthode est

de 30 nM (ou 120 fmol) et cette colonne aptamère montre une bonne stabilité puisque 200 injections ont été réalisées sans perte de rétention. Cet essai, ne nécessitant aucune préparation, a été appliqué avec succès pour la détermination de la concentration en adénosine dans des échantillons de microdialyse collectés à partir du cortex somatosensoriel de rats anesthésiés à l'hydrate de chloral.

Un aptamère en série ARN sélectionné contre la flavine mononucléotide (FMN) [283] a été utilisé pour des applications en électrochromatographie capillaire [261]. Cet aptamère ARN de 35 bases, spécifique de la FMN et de la flavine adénine dinucléotide (FAD), modifié en 5' par une amine, a été immobilisé de façon covalente à la surface interne d'un capillaire afin de réaliser une étude par électrochromatographie capillaire à tube ouvert. Sa structure a été résolue par spectroscopie RMN et par modélisation moléculaire [284,285]. Il a été ainsi montré que la reconnaissance entre l'aptamère ARN et sa cible est médiée par une interaction entre une adénine (A26) de l'aptamère et la FMN. Des liaisons hydrogène entre le phosphate de la FMN et une guanine (G27) de l'aptamère ARN sont également impliquées dans cette reconnaissance spécifique. D'autre part, il a été montré que la structure de cet aptamère est stabilisée en présence de cations  $Mg^{2+}$ . L'influence de ces cations sur la rétention de la FMN et de la FAD a été évaluée. Une augmentation de la rétention pour la FAD est observée pour une concentration en  $Mg^{2+}$  comprise entre 0 et 0,5 mM alors que l'affinité pour la FMN est maximale à une concentration de 0,2 mM. Pour expliquer ce phénomène, les auteurs ont proposé que la présence d'une quantité importante en cations  $Mg^{2+}$  peut masquer le phosphate de la FMN impliqué dans l'interaction avec l'aptamère. L'interaction entre la guanine (G27) et ce groupement est alors diminuée alors que les groupements phosphates de la FAD doivent être plus protégés dans la poche de l'aptamère.

Cette colonne aptamère a été par la suite étudiée afin d'évaluer sa capacité à discriminer entre la molécule cible (FMN ou FAD) et des molécules ne possédant pas le groupement flavine impliqué dans la reconnaissance entre l'aptamère et sa cible [262]. Bien que la FMN et la FAD n'aient pas pu être discriminées sur cette phase stationnaire aptamère, la FMN et une molécule analogue au groupement flavine (anthracène) ont été séparés. De plus, cette colonne semble être stable en présence d'acétonitrile dans la phase mobile. En revanche, la stabilité de cette colonne en série ARN, n'a pas été testée dans le temps.

#### IV.3.1.3 Utilisation d'aptamères comme agents de capture, de purification ou de séparation de protéines

Drolet et ses collaborateurs ont été les premiers à présenter une étude concernant l'utilisation d'aptamères en série ADN immobilisés comme phase stationnaire d'affinité [254]. Un aptamère de 36 nucléotides, spécifique et hautement affin ( $K_d = 2$  nM) [241] pour la L-sélectine humaine, a été utilisé pour la purification chromatographique d'un récepteur recombinant, la L-sélectine-globuline (LS-Rg), une protéine de fusion formée du domaine extracellulaire de la L-sélectine humaine fusionnée à l'amine terminale de la chaîne lourde de l'IgG1 humaine, à partir de cellules ovariennes de hamsters (CHO). L'extrémité 5' biotinylée de l'aptamère ADN anti-L-sélectine a été immobilisée au niveau d'un support sépharose-streptavidine. Après injection sur cette colonne d'affinité, la protéine de fusion est éluée dans des conditions qui ne dénaturent pas les protéines, en se basant sur l'influence des cations divalents sur les structures tertiaires des aptamères. Ainsi, un gradient d'EDTA (Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique) est utilisé pour libérer la protéine capturée. Cette étude a montré une bonne efficacité des aptamères comme ligands d'affinité pour la purification de protéines (pureté de 63% avec un rendement de 83% ; facteur de purification de 1500 en une seule étape).

Doyle et ses collaborateurs ont également publié la purification par affinité du facteur de transcription 1 de la thyroïde (TTF1) en utilisant un aptamère hautement spécifique et affin, immobilisé sur des billes magnétiques [263]. La chromatographie d'affinité a été réalisée en une seule étape de purification à partir d'un mélange de protéines, présent dans la fraction soluble d'un lysat de bactéries. L'éluion de la protéine TTF1 à partir de la matrice d'affinité a été menée en utilisant un traitement par des DNases recombinantes. Le rendement des protéines TTF1 purifiées est de 25-50 %.

Plus récemment, un aptamère ADN, fixant la thrombine, a été utilisé comme système de capture de protéines en chromatographie capillaire d'affinité [264]. Un aptamère de 15 nucléotides de long, modifié en 5' par un thiol, a été attaché de façon covalente à la surface interne d'un capillaire de silice fondue par l'intermédiaire d'un lien organique. Après capture de la protéine par une incubation pendant une nuit à 25°C, la thrombine liée est libérée en utilisant une solution d'urée à 8M et une température de capillaire de 50°C. Les résultats obtenus ont montré que la phase stationnaire aptamère est capable de fixer environ 3 fois plus de thrombine que les colonnes contrôles utilisées (colonne vide ou colonne remplie de

l'oligonucléotide dont la séquence est au hasard). Cette étude a montré que des rétentions non spécifiques de la thrombine surviennent, liées à l'adsorption de protéines au niveau de la surface du capillaire dépourvue d'aptamère. Probablement à cause de la faible surface de recouvrement de l'aptamère au niveau du capillaire ou d'une fixation inefficace de la phase stationnaire, environ 0,08 molécules de thrombine par nm<sup>2</sup> ont été capturées par ce système pour une densité de phase stationnaire de 2 aptamères attachés par nm<sup>2</sup>. L'étude a également été réalisée en présence de Sérum Albumine Bovine (SAB) seule ou en mélange avec la thrombine. Il a été démontré que la SAB n'est pas retenue par les différentes colonnes utilisées et, qu'elle n'empêche pas la fixation de la thrombine lorsque le mélange SAB-thrombine est utilisé [264].

En utilisant une stratégie élégante d'éluion basée sur une méthode photolytique, la détection de l'ARN polymérase et de l'ARN répliqueuse du virus de l'Hépatite C (VHC) a été réalisée à partir d'un mélange de protéines par chromatographie d'affinité sur puce, par utilisation de microbilles [265,266]. L'aptamère en série ARN, dirigé contre la protéine (ARN polymérase [265] ou l'ARN répliqueuse du VHC [266]), est couplé aux microbilles par l'intermédiaire d'un lien photoactivable. Les billes sur lesquelles l'aptamère est immobilisé sont ensuite introduites dans une puce composée de microcanaux transparents. Un échantillon de protéines est alors injecté dans la microchambre et incubé pendant 5 à 30 minutes. Après lavage, le microcanal est irradié par une lumière UV à 360 nm puis la protéine capturée est éluee par passage de la phase mobile.

Dans l'étude concernant la détection de l'ARN polymérase du VHC [265], après éluion, la protéine est soumise à des traitements successifs à la trypsine, puis le mélange de peptide est concentré et appliqué à une analyse de spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. La limite de détection de ce système a été estimée à environ 10 fmol d'ARN polymérase VHC.

Dans l'étude pour l'analyse de l'ARN répliqueuse du VHC [266], la protéine est marquée par une fluorescéine et la cible éluee est quantifiée par une mesure de l'intensité de fluorescence en utilisant un microscope confocal. Il a été démontré que ce système est capable de détecter l'ARN répliqueuse du VHC à partir d'un mélange de protéines contenant 170 fmol de la protéine cible.

Mc Grown et son équipe ont étudié les capacités de séparation d'aptamères formant des structures en G-quartet pour des protéines non ciblées.

Ainsi, en 2003, les auteurs ont utilisé, en électrochromatographie capillaire un aptamère ADN, formant une structure en G-quartet à quatre plans (*figure 53b*) de bonne stabilité, immobilisé de façon covalente au niveau d'un capillaire, pour séparer des protéines non ciblées qui diffèrent seulement de deux acides aminés ( $\beta$ -lactoglobulines A et B), [267]. En utilisant, comme expérience de contrôle, un capillaire couplé à un oligonucléotide de composition similaire possédant une séquence au hasard, n'ayant pas la capacité de former une structure en G-quartet, les auteurs n'ont observé aucune séparation en présence de ce type de séquence. Il a été démontré que les structures en G-quartet en quatre plans jouent un rôle dans la discrimination de protéines non ciblées.

Cette étude a ensuite été étendue à la séparation de plusieurs protéines bovines du lait [268]. Deux structures : l'aptamère ADN en G-quartet à quatre plans, utilisé pour l'étude précédente [267] et, un aptamère ADN anti-thrombine formant une structure en G-quartet à deux plans ont été testés (*figure 53a et b*). Les structures en deux plans, telles que l'aptamère anti-thrombine, n'ont pas la capacité de former une structure en G-quartet en absence de cations tels que  $K^+$ . Au contraire, les structures en 4 plans ont la capacité des structures en G-quartet même en l'absence de cations et sont exceptionnellement stables. La température de fusion ( $T_m$ ) liée au dépliement de la structure en G-quartet a été déterminée [267,286,287]. Elle est de 34°C pour l'aptamère spécifique de la thrombine et est supérieure à 70°C pour l'aptamère formant une structure à 4 plans en présence de 1 mM de KCl. En absence de KCl, l'aptamère à 2 plans anti-thrombine n'a pas la capacité de former une structure en G-quartet alors que l'aptamère à 4 plans montre une température de fusion de 28°C. Il a été montré que la structure en G-quartet à quatre plans permet une bonne résolution des caséines alors que les phases stationnaires formant deux plans ne permettent pas la séparation de ces protéines. Etant donné que les expériences ont été menées en absence d'ions potassium, les auteurs ont attribué ces différences de comportement à une perte des structures en G-quartet pour la structure oligonucléotidique la moins stable. Ce travail a montré que les phases stationnaires de type G-quartet ont la capacité de séparer des protéines possédant des structures très similaires.

Finalement, les deux phases stationnaires en G-quartet (2 plans et 4 plans) ont été étudiées en présence de 1 mM d'ions potassium pour séparer l'albumine de différentes espèces [269]. Il apparaît que les phases stationnaires à deux plans se comportent différemment par rapport aux structures à quatre plans pour la résolution de ces molécules. En effet, la structure à 2 plans semble offrir plus de flexibilité par rapport à la structure à 4 plans

plus rigide, ce qui pourrait faciliter les interactions avec les protéines et donc expliquer ces différences de résolution entre les deux types de structures.

Bien que toutes ces études aient démontré les avantages à utiliser des phases stationnaires ADNs formant des G-quartets pour la séparation de protéines non ciblées ou de protéines possédant des interactions faibles avec l'aptamère, il semblerait, cependant, que cette stratégie soit d'un intérêt limité puisque les séparations sont basées seulement sur des interactions non spécifiques avec l'ADN immobilisé (espèces non ciblées) et sont essentiellement non prédictibles [288].

Toutes ces séparations ont été réalisées sur des colonnes remplies [254,259,260,265,266] ou des capillaires à tube ouvert [121,256,261,262,264,267-269]. Une limitation de ces derniers est leur faible capacité d'immobilisation à cause de la surface limitée de la paroi interne du capillaire. D'un autre côté, les colonnes remplies possèdent soit un volume mort important quand elles sont remplies avec de grosses particules soit des pressions importantes lorsqu'elles contiennent de petites particules. Les colonnes monolithes formées de polymères poreux réticulés présentent un certain nombre d'avantages, incluant une facilité de préparation, des cinétiques de transfert de masse rapide, des pressions faibles et des capacités d'immobilisation importantes.

Très récemment, Zhao et son équipe ont développé une nouvelle technique de chromatographie capillaire d'affinité combinant les avantages des aptamères et des monolithes pour séparer des protéines [270]. Un aptamère sélectionné contre le cytochrome c [289] a été lié par un lien biotine-streptavidine à la surface d'une colonne monolithique. Une étude par analyse frontale a montré que 164 pmoles d'aptamères ont été immobilisés par  $\mu\text{L}$  de colonne soit une immobilisation 14 fois plus importante que celle obtenue en électrochromatographie capillaire à tube ouvert (immobilisation 12 pmoles d'aptamères/ $\mu\text{L}$ ) [264]. Cette immobilisation est comparable à celle obtenue avec des colonnes remplies par des microbilles (200 pmoles/ $\mu\text{L}$ ) [259]. Cette phase stationnaire possède la capacité de retenir spécifiquement le cytochrome c. En revanche, d'autres protéines (HSA, IgG, transferrine, Hb) sont éluées dans le volume mort. Etant donné que l'aptamère immobilisé possède une structure en G-quartet, les auteurs ont étudié la capacité de celui-ci à séparer la thrombine, une protéine reconnue également par un aptamère en G-quartet. Il s'est avéré que la thrombine possède une affinité importante pour l'aptamère immobilisé qui est même supérieure à celle de la molécule cible. Les auteurs ont donc réalisé la séparation de trois protéines : la transferrine, éluée dans le volume mort, le cytochrome c et la thrombine éluée en présence

d'une solution concentrée en NaCl. Cette méthode a permis la détection du cytochrome c et de la thrombine dans des échantillons de sérum sans interférences avec d'autres protéines.

### **IV.3.2 Les applications des aptamères en électrophorèse capillaire d'affinité**

#### ***IV.3.2.1 Principe général de l'électrophorèse capillaire d'affinité***

L'électrophorèse capillaire (EC) peut être menée en présence d'un champ électrique important et fournit donc des séparations efficaces pour une large variété de molécules cibles. Cette technique offre de nombreux avantages : elle est rapide et hautement sensible, elle nécessite de faible volume d'échantillon et est automatisée.

L'électrophorèse capillaire d'affinité (ECA) peut être définie comme une méthode de séparation électrophorétique où la séparation est influencée par des interactions biomoléculaires réversibles durant le processus de séparation [290]. La séparation et la caractérisation des interactions entre les différentes espèces affines ainsi que la quantification des concentrations en analytes sont de haute importance en ECA. Pour une analyse quantitative, les ligands peuvent interagir avant et/ou durant le processus électrophorétique. L'analyse de mélanges cible-ligand pré-incubés est une approche utile pour l'analyse quantitative d'analytes formant un complexe de haute affinité avec le ligand. Ces essais sont basés sur la séparation, par EC, entre les complexes ligand-molécule cible et leurs équivalents libres [288].

Cette technique peut être réalisée d'une façon directe (essai non compétitif) ou d'une manière compétitive (essai compétitif) :

- Dans un essai compétitif, la molécule cible marquée entre en compétition avec la cible non marquée, dans l'échantillon, pour la fixation à leur ligand d'affinité (présent en quantité limitée). La séparation du mélange par EC conduit généralement à deux pics distincts correspondant à la cible marquée libre et à la cible marquée complexée au ligand ce qui permet de quantifier la cible.
- Dans un essai direct (non compétitif), le ligand est marqué puis est ajouté à l'échantillon à concentration constante afin de fixer sa cible. La détection et la quantification du pic correspondant au complexe ligand-cible ou du pic correspondant au ligand libre sont reliées à la quantité d'analyte en solution.

Généralement, ces essais, réalisés par EC, utilisent une détection par fluorescence induite par laser (LIF) afin d'obtenir une meilleure sensibilité et sélectivité. Les essais directs possèdent, en principe, plusieurs avantages par rapport aux essais compétitifs notamment, une large gamme dynamique, des limites de détection qui sont moins dépendantes des constantes de fixation entre l'analyte et le ligand et la capacité à distinguer des espèces similaires [271].

Différents systèmes d'interaction ont été évalués par EC en utilisant des protéines, des anticorps ou des ADNs doubles brins comme ligands d'affinité [290]. Les essais par EC basés sur la formation de complexes anticorps-antigène sont les plus fréquents. Cependant, les anticorps présentent quelques inconvénients pour une application dans des essais non compétitifs. En effet, ils sont électrophorétiquement hétérogènes c'est-à-dire que leur migration en EC ne donne pas un seul pic. De plus, il peut être difficile de séparer l'anticorps libre du complexe antigène-anticorps spécialement si l'antigène est petit et n'affecte pas la mobilité électrophorétique du complexe. Enfin, si le marqueur fluorescent est trop proche du site de fixation de l'anticorps, il peut interférer avec la fixation [271,272].

En revanche, les aptamères possèdent plusieurs avantages par rapport aux anticorps, ce qui les rend spécialement intéressants pour une application en ECA directe. En effet, ils sont faciles à marquer, ils possèdent des propriétés électrophorétiques prédictibles (rapport masse/charge bien défini) et un poids moléculaire relativement faible ce qui simplifie la séparation du complexe aptamère-cible par rapport au ligand libre [272].

#### ***IV.3.2.2 Utilisation d'aptamères pour la séparation de protéines***

En tenant compte des avantages des aptamères, Kennedy et ses collaborateurs ont été les premiers à les introduire comme ligand en ECA [271]. Dans cette étude, l'aptamère sélectionné contre l'IgE [58], marqué par un fluorophore, est utilisé pour la quantification de sa cible par un essai non compétitif utilisant une détection par LIF. Une solution contenant l'aptamère marqué et l'IgE est préincubée pendant 3 minutes avant d'être injectée de façon hydrodynamique dans le capillaire de séparation. Afin de diminuer, au maximum, la dissociation du complexe durant l'analyse électrophorétique, le mélange est injecté du côté le plus court du capillaire (7 cm) et un vide est appliqué en sortie du capillaire afin d'augmenter la vitesse de migration du complexe. De cette façon, le temps d'analyse a été hautement réduit (< 1 minute). Cet essai, hautement spécifique, a permis la détection de l'IgE avec une gamme dynamique linéaire de  $10^5$  et une limite de détection de 46 pM. Cet essai peut également être

conduit sur des échantillons complexes tels que le sérum humain sans aucune interférence ou sur d'autres protéines (exemple : la thrombine) en modifiant simplement l'aptamère utilisé. Ceci suggère que ces essais devraient être d'une grande utilité dans des applications cliniques par exemple.

Par la suite, cette équipe a étudié, par ECA, l'effet de la nature du tampon, du champ électrique et du temps de séparation sur la détection du complexe aptamère-ligand [272]. Les résultats obtenus ont montré que les meilleures conditions pour la détection de ce complexe impliquent l'utilisation d'une longueur de capillaire minimale et d'un champ électrique optimal pour réaliser la séparation.

Plus récemment, Haes et ses collaborateurs ont publié l'utilisation d'un essai par ECA pour la détection de la ricine en utilisant un aptamère marqué par un fluorophore [273]. Cet essai permet la détection de la ricine à une concentration de 500 pM (ou 7,1 amoles) en présence d'autres protéines telles que la SAB et la caséine.

Un essai direct similaire a été développé, par Le et son équipe [274], pour la détection spécifique de la transcriptase inverse du VIH-1 à partir de l'aptamère ADN RT26, de 81 nucléotides, anti-transcriptase inverse du VIH-1 [60], marqué par la carboxyfluorescéine. Cet essai est capable de quantifier spécifiquement la transcriptase inverse du VIH-1 à une concentration supérieure à 50 nM et, n'est pas affecté par la présence d'autres transcriptases inverses. De plus, la transcriptase inverse du VIH-1 peut être détectée, sans interférences, dans des cultures cellulaires diluées au 1/100<sup>ème</sup>.

Cet essai par EC a été amélioré, par la suite, en utilisant une technique de concentration par l'ADN (« DNA-driven focusing technique ») [275]. L'aptamère ADN, RT12 de 84 nucléotides de long [60], fixant spécifiquement la transcriptase inverse du VIH-1 a été marqué et utilisé pour cette étude. Les complexes aptamère-protéine ont été séparés d'une manière efficace par EC et détectés par LIF. La clef de cette procédure est l'établissement de conditions électrophorétiques pour lesquelles la mobilité du complexe aptamère-protéine est comprise entre la mobilité des électrolytes présents dans l'échantillon et ceux présents dans le tampon de migration. Ces conditions sont obtenues en utilisant des anions différents, aux mobilités différentes, dans l'échantillon et dans le tampon de migration. Ainsi, le tampon TRIS-glycine a été employé comme tampon de migration puisque la glycine est caractérisée par une faible mobilité électrophorétique alors que l'acétate possédant une mobilité plus importante est utilisé dans l'échantillon. En utilisant cette stratégie, l'efficacité

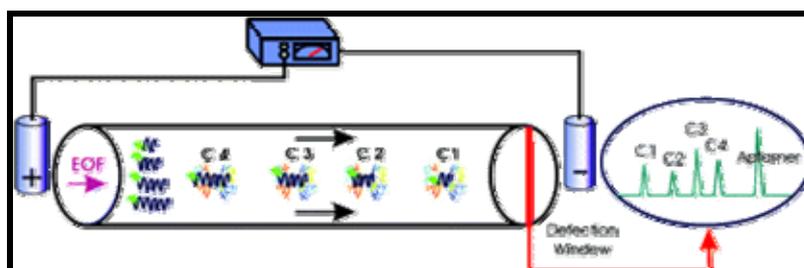
de séparation du complexe aptamère-protéine atteint 5 millions de plateaux /m et la sensibilité de la détection a été améliorée d'un facteur 70 à 120. Cette technique peut être appliquée à l'analyse d'acides nucléiques, à l'analyse de l'affinité des aptamères, à des immunoessais pour la détection des dommages d'un ADN et à des essais de fixation basés sur ADN/ARN.

Ce groupe a ensuite publié l'étude de la stoechiométrie de fixation entre la transcriptase inverse du VIH-1 et quatre aptamères ADNs par EC en utilisant une détection par polarisation de fluorescence induite par laser [277]. Parmi les quatre aptamères étudiés (RT12, RT26, RT1t49 un aptamère de 49 nucléotides et, ODN93 un aptamère de 81 nucléotides contenant un segment riche en bases G pouvant former une structure en G-quartet), l'analyse par ECA a montré que deux stoechiométries de fixation (complexe 1 : 1 et 1 : 2) étaient possible entre la transcriptase inverse du VIH-1 et chacun des aptamères RT12, RT26 et ODN 93, suggérant que ces aptamères ont la capacité de se fixer au niveau des sous-unités p66 et p51 de la protéine. En revanche, l'aptamère RT1t49, plus petit est capable de former seulement un complexe 1 : 1, probablement à cause de son incapacité à se lier à la sous-unité p50 de la protéine. Afin de vérifier la présence des complexes 1 : 1 et 1 : 2, des analyses par polarisation de fluorescence ont été réalisées. Il a été observé que les valeurs de polarisation pour le complexe 1 : 2 sont inférieures à celles obtenues pour le complexe 1 : 1, probablement à cause d'un transfert d'énergie entre les deux aptamères fluorescents (FRET) fixés sur la protéine. Cela laisse penser que la distance entre les deux fluorophores dans le complexe 1 : 2 est probablement inférieure à 100 Å.

Le et ses collaborateurs ont développé une méthode originale et ultrasensible par ECA permettant la détection de la transcriptase inverse du VIH-1 [278]. Le complexe aptamère-protéine est séparé de la fraction correspondant à l'aptamère libre par EC, puis, la fraction du complexe est collectée. Le complexe est ensuite dissocié et l'aptamère est amplifié par PCR afin de déterminer la quantité d'analytes présente dans l'échantillon. Le fait d'amplifier l'aptamère spécifique pour la protéine permet une amélioration significative de la détection de la protéine puisque 180 molécules de cette protéine (soit 30 fM) ont pu être détectées de façon spécifique.

Cette équipe a également publié le développement d'un essai électrophorétique hautement sensible permettant la détection simultanée, par fluorescence, de différentes protéines et de protéines isomères, à partir d'aptamères de tailles différentes [276] (*figure 54*). La mobilité électrophorétique de différentes protéines est modifiée par la présence d'aptamères fixant les différentes protéines cibles. L'utilisation d'aptamères fluorescents, possédant des longueurs différentes en nucléotides joue à la fois un rôle de modulateur de

charge pour la séparation des protéines mais également un rôle de sonde fluorescente afin de permettre une détection ultrasensible. La détection simultanée de différentes protéines (la transcriptase inverse du VIH-1, la thrombine, l'IgE, et des deux isomères du PDGF) à des concentrations de l'ordre du pM dans des échantillons de sérum humain dilué, démontre l'application potentielle de cet essai pour le développement de biomarqueurs pour des tests cliniques ou pour le diagnostic médical.



**Figure 54 :** Principe d'un essai ultrasensible permettant la détection simultanée de diverses protéines [276].

Des essais électrophorétiques réalisés également sur l'aptamère anti-thrombine [271,272] ont montré que cet aptamère possède une affinité ( $K_d = 200$  nM) pour sa cible nettement inférieure à celle publiée pour d'autres aptamères utilisés en ECA tels que les aptamères anti-IgE ( $K_d \sim 10$  nM) ou anti-transcriptase inverse du VIH-1 ( $K_d = 1-2$  nM). Lors de l'utilisation de l'aptamère anti-thrombine, une dissociation du complexe aptamère-protéine est observée durant le processus électrophorétique et une faible limite de détection est obtenue (40 nM). Dans le but de surmonter cette limitation, Tan et ses collaborateurs [279] ont proposé l'utilisation d'un capillaire plus long afin d'éviter, toute interférence entre le pic d'aptamère libre et celui correspondant au complexe aptamère-protéine. Le complexe aptamère-protéine devrait être complètement dissocié pendant l'analyse. La détection de la thrombine est donc basée seulement sur les changements de l'intensité du pic correspondant à l'aptamère libre. Cette méthode autorise une distinction entre le pic correspondant au conformère inactif linéaire et le pic correspondant au conformère actif replié en G-quartet de l'aptamère. La limite de détection obtenue par cette méthode est améliorée d'un facteur 4 (10 nM contre 40 nM) par rapport à des données précédentes [271] puisque seul le conformère actif est considéré dans cette méthode. Cet essai par ECA a également été appliqué à l'étude quantitative, en temps réel, des interactions protéine (thrombine)-protéine (anti-thrombine III). Il a été observé qu'une augmentation de la concentration en anti-thrombine III (AT III) induit une diminution du pic correspondant au complexe aptamère-thrombine et une augmentation du pic d'aptamère libre. Ceci indique que la fixation de AT III à la thrombine

engendre une modification de la conformation de la thrombine rendant sa fixation à l'aptamère instable.

Dans le but de stabiliser le complexe aptamère-thrombine, cette équipe a également testé l'utilisation de polymère linéaire soluble (PEG) dans le tampon électrophorétique. De tels polymères sont connus retarder l'étape de dissociation et augmenter la concentration locale en analytes. En utilisant un capillaire rempli plus court, l'addition de 2% de PEG permet la détection du pic correspondant au complexe aptamère-thrombine avec de faibles interférences avec le pic de l'aptamère libre. Une limite de détection pour la thrombine de 10 nM est également obtenue en utilisant l'effet stabilisant du PEG.

Berezovski et son équipe ont proposé une nouvelle méthode permettant l'analyse de protéines lors de l'utilisation d'aptamères à faible affinité [280]. Cette méthode est basée sur une analyse par NECEEM par injection d'une protéine en mélange avec son aptamère marqué. Le principe de la NECEEM a été décrit au paragraphe § I-4-3-3. Cette étude par NECEEM a été appliquée à l'analyse de la thrombine en utilisant son aptamère spécifique marqué indirectement par une séquence additionnelle de 16 nucléotides qui est associée à une séquence complémentaire de 15 nucléotides liée à la fluorescéine. L'électrophorégramme NECEEM obtenu montre un premier pic correspondant à l'aptamère libre et une courbe exponentielle associée à la dissociation monomoléculaire du complexe, le second pic qui correspondrait à l'association aptamère-thrombine n'est pas détecté du fait de sa dissociation complète durant le processus électrophorétique. En utilisant cette approche, une limite de détection de 60 nM en thrombine a été obtenue, cette dernière est comparable à la limite de détection acquise par l'utilisation de méthode en équilibre [259]. Cette méthode basée sur la NECEEM est intéressante car elle peut être appliquée à l'analyse de protéines lorsque le complexe aptamère-protéine est peu stable.

Cette équipe a également publié une étude thermodynamique de l'association entre un ADN et une protéine par NECEEM en faisant varier la température [281]. L'influence de cette dernière sur la constante de fixation à l'équilibre ( $K_a$ ) et sur les constantes de vitesse de formation et de dissociation du complexe ( $k_{on}$  et  $k_{off}$  respectivement) a été étudiée pour le complexe aptamère-ADN polymérase *Taq*. Ces paramètres cinétiques sont obtenus à partir des surfaces des pics correspondant au complexe aptamère-protéine, ADN dissocié du complexe et ADN libre (cf § 1-4-3-3). Cette étude a montré que la stabilité du complexe à l'équilibre est maintenue entre 15°C et 36°C. En revanche, pour une température supérieure à 36°C, elle diminue rapidement. Cette modification de la stabilité du complexe semble être liée

à un changement de conformation de la structure secondaire de l'aptamère qui affecte à la fois l'association et la dissociation du complexe. A partir d'une courbe de Van't Hoff, les variations d'entropie et d'enthalpie pour la fixation de la protéine à son aptamère ont été quantifiées. A faibles températures, l'association aptamère-protéine est dirigée par l'entropie alors qu'à hautes températures, la fixation est gouvernée par les variations d'enthalpie.

Gong et ses collaborateurs ont utilisé une autre technique pour permettre la détection d'un complexe aptamère-protéine possédant une affinité faible et des cinétiques de dissociation rapides [282]. L'analyse des interactions entre la thrombine et son aptamère marqué a été réalisée sur une micropuce (« microchip »). L'EC sur micropuce est une technique plus flexible autorisant un ajustement de la distance de séparation ainsi que le positionnement du détecteur. L'utilisation d'une distance de séparation courte ainsi qu'un champ électrique élevé permet une séparation rapide réduisant à la fois la dissociation du complexe et la perte de protéines par adsorption non-spécifique au niveau des parois du capillaire durant la séparation. En utilisant cette technique, une séparation rapide du complexe aptamère-thrombine et de l'aptamère libre est obtenue en moins de 10 secondes sur la micropuce en utilisant une distance de détection courte de 1 cm et un champ électrique de 670 V/cm. Une constante de dissociation similaire aux études précédentes a été observée ( $K_d = 43$  nM) et la limite de détection (5 nM) est inférieure à celle préalablement obtenue en utilisant une analyse par EC traditionnelle (40 nM) [271].

Tous ces exemples, extraits de la littérature, indiquent que les aptamères sont une nouvelle classe de ligands spécifiques de très grande importance pour la séparation, la purification et la quantification de cibles diverses en chromatographie, en électrochromatographie et en EC.

#### **IV.3.3 Les applications des aptamères comme sélecteurs chiraux en micro-CLHP**

Les aptamères ont été immobilisés sur des surfaces chromatographiques et utilisés comme phase stationnaire en chromatographie d'affinité pour la séparation de leurs molécules cibles ou pour des composés non ciblés.

Les séparations énantiomériques, par utilisation de phases stationnaires chirales (PSCs), ont un intérêt croissant dans les domaines pharmaceutique et biologique. Très souvent, un énantiomère d'un médicament peut être pharmaceutiquement actif alors que son image dans un miroir peut être toxique (cas du thalidomide par exemple) ou inactif (cas de

l'ibuprofène par exemple). L'intérêt des industriels pour le développement de nouvelles méthodologies de séparation permettant l'analyse et la purification d'antipodes optiques augmente de plus en plus.

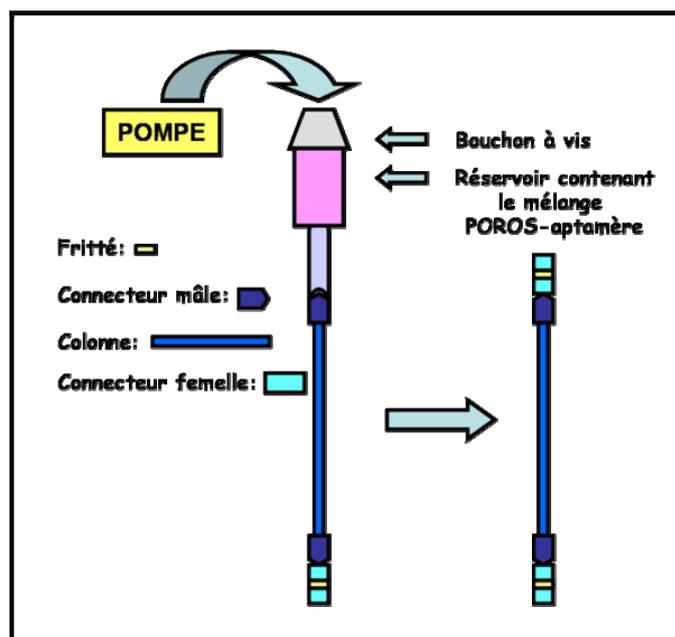
Bien que la plupart des aptamères ne soient pas sélectionnés par des étapes de contre-sélections énantiosélectives, le contrôle efficace de la SELEX aboutit à une forte spécificité. Ceci permet à l'aptamère de reconnaître, en règle générale, stéréospécifiquement sa cible. Sur la base de cette observation, l'équipe de Chimie analytique du DPM utilise depuis 2002 des aptamères comme sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible pour la séparation d'énantiomères en chromatographie liquide et plus récemment en électrophorèse capillaire (travaux de thèse) [146].

Dans cette partie, je présenterai la situation de cette thématique à mon arrivée au laboratoire en décrivant les différentes applications réalisées antérieurement à ma thèse.

#### ***IV.3.3.1 Méthode générale de fabrication des colonnes aptamères***

Au laboratoire, nous utilisons un mode de fabrication similaire à celui utilisé par Kennedy et ses collaborateurs [259]. L'immobilisation de l'aptamère est réalisée par l'intermédiaire d'un lien biotine-streptavidine. Chaque aptamère est biotinylé en 5' afin de permettre sa fixation à un support chromatographique de polystyrène divinyl benzène contenant des greffons streptavidine (POROS-streptavidine). Avant l'immobilisation, l'aptamère biotinylé en 5' est dénaturé par chauffage dans un tampon similaire à celui utilisé lors de la méthode SELEX, puis il est renaturé à température ambiante pendant 30 minutes. L'immobilisation des aptamères est obtenue en mélangeant les particules du support chromatographique POROS-streptavidine avec l'aptamère pendant plusieurs heures à faible température. Ensuite, les microcolonnes de diamètre interne compris entre 300-800  $\mu\text{m}$  sont remplies par les particules modifiées avec l'aptamère en utilisant le système de remplissage sous haute pression (« packing device ») décrit à la *figure 55*.

Le nombre de moles d'aptamères immobilisés est déterminé en calculant la différence d'absorbance de la solution d'aptamères, avant et après immobilisation, à la longueur d'onde de 260 nm (exception lecture à 280 nm pour [291]). Généralement, la quantité d'aptamères fixés est comprise entre 150 et 200 pmoles pour un volume de colonne de 1  $\mu\text{L}$ .



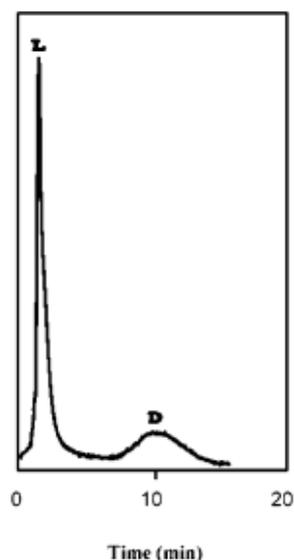
**Figure 55 :** Principe du remplissage d'une colonne capillaire aptamère.

#### IV.3.3.2 Les PSCs à base d'aptamères en série ADN

Tout d'abord, un aptamère en série ADN (biotinylé en 5'), caractérisé par son énantiosélectivité envers un oligopeptide [48] (cf § II-1-8), la vasopressine, a été immobilisé sur un support chromatographique en suivant la procédure décrite au paragraphe précédent [291]. En suivant cette procédure, 21 nmoles d'aptamères ont été fixées pour une colonne de 100  $\mu$ L. Or, la capacité de fixation maximale sur un support POROS-streptavidine est de 12,5 nmoles d'anticorps biotinylés pour 100  $\mu$ L. Ce résultat indique donc que l'aptamère peut se fixer plus intensément qu'un anticorps, probablement parce que l'encombrement stérique est plus faible. Cette phase stationnaire aptamère a ensuite été utilisée pour la séparation chromatographique des énantiomères de la vasopressine. Un mélange racémique a été injecté dans des conditions similaires à celles employées pour la sélection de l'aptamère. Dans ces conditions, le D-peptide est retenu sur la colonne alors que l'énantiomère L est élué dans le volume mort, ce qui indique que l'aptamère immobilisé se lie significativement et énantiosélectivement au D-peptide (*figure 56*).

Afin d'analyser le mécanisme responsable de cette énantiosélectivité et de définir les conditions optimales d'utilisation de la colonne, l'influence de différents paramètres (température de la colonne, pH et concentration en sels de la phase mobile) sur la rétention des énantiomères L et D du peptide a été étudiée. Ces études ont montré qu'une

déshydratation à l'interface de fixation, des interactions de type charge-charge et des transitions conformationnelles contribuent à la fixation de la D-vasopressine sur la phase aptamère. Cette colonne aptamère s'est avérée être stable pendant plusieurs mois.



**Figure 56 :** Chromatogramme de la séparation des énantiomères de la vasopressine par utilisation d'une phase stationnaire aptamère. Colonne : 2,1 x 30 mm. Température : 20°C. Phase mobile : tampon phosphate 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 6. Débit : 150 µL/min. Injection : 100 nL à 0,9 mM. Détection à 195 nm. [291].

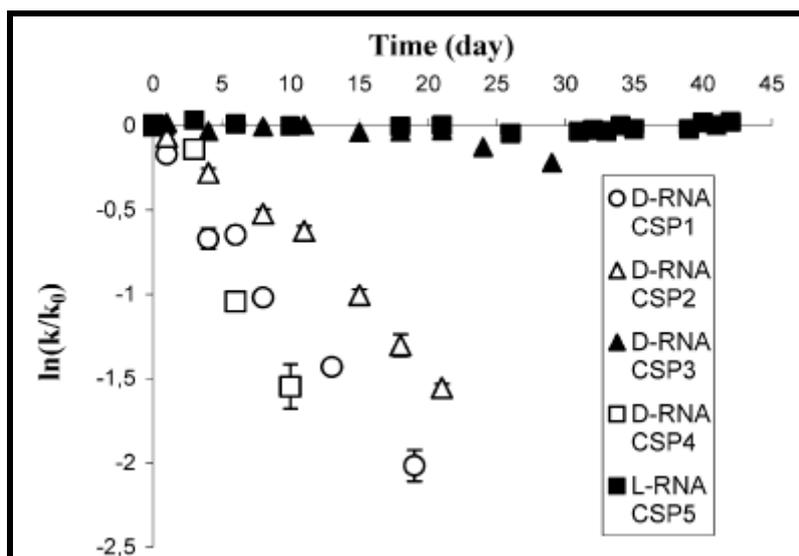
Cette approche a été appliquée par la suite à la résolution chirale de petites molécules d'intérêt biologique [292]. Les séparations énantiomériques de l'adénosine et du tyrosinamide ont été réalisées avec succès en utilisant des aptamères en série ADN caractérisés par leur affinité pour la D-adénosine [83] et le L-tyrosinamide [293]. Un facteur d'énantiosélectivité apparent d'environ 3,5 (à 20°C) est observé pour la PSC aptamère spécifique de la D-adénosine alors qu'une énantiosélectivité très importante ( $\alpha = 80$ ) est obtenue lorsque l'aptamère anti-L-tyrosinamide est utilisé. La stabilité de ces colonnes a également été testée. La colonne aptamère anti-D-adénosine a été utilisée pendant 2 mois sans perte de sélectivité alors que les performances de la colonne spécifique du L-tyrosinamide diminuent fortement dans le temps. Il semblerait que la capacité de saturation (nombre de sites actifs) diminue, par perte de la conformation active de l'aptamère ou par dénaturation nucléotidique. Ces résultats sont intéressants car comme prédit par Famulok et ses collaborateurs [87], il semblerait qu'une procédure de sélection efficace permettant la fixation d'une cible avec une affinité importante pourrait résulter en la découverte d'oligonucléotides énantiospécifiques. Une condition nécessaire est que l'immobilisation de la cible à une matrice doit autoriser une exposition adéquate des groupements fonctionnels de l'énantiomère au pool d'oligonucléotides pendant les processus de sélection *in vitro*.

Ces premiers résultats ont donc montré qu'un aptamère ADN, dirigé spécifiquement contre un énantiomère, peut être utilisé avec succès comme PSC pour des cibles spécifiques. De plus, ces colonnes aptamères sont intéressantes du fait de leur stéréospécificité importante, leur stabilité et leur efficacité qui est comparable aux PSCs spécifiques déjà existantes (polymères à empreintes moléculaires, anticorps).

La plupart des aptamères publiés dans la littérature sont des séquences d'oligonucléotides en série ARN (70% des aptamères sont des ARNs) [137]. Etant donné que la capacité des aptamères, sélectionnés en série ARN, à fixer leurs molécules cibles avec des stéréosélectivités très importantes a été démontrée [87,89], l'application des aptamères comme sélecteurs chiraux a été étendue à des oligonucléotides en série ARN.

#### ***IV.3.3.3 Les PSCs à base d'aptamères en série ARN***

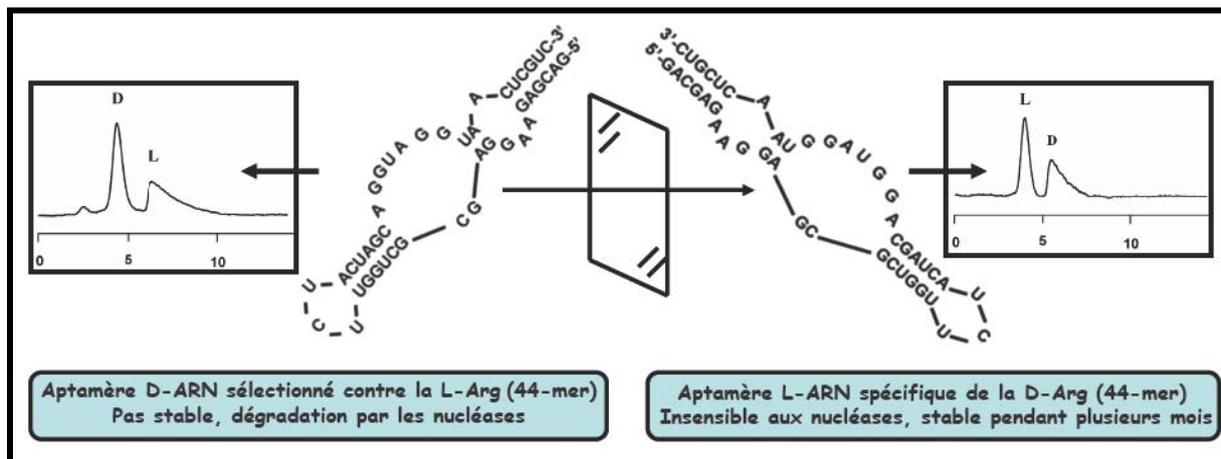
L'inconvénient majeur de l'utilisation d'aptamères en série ARN est l'instabilité inhérente à l'ARN, évoquée précédemment. Les propriétés énantiosélectives et la stabilité d'une PSC constituée d'un aptamère ARN sélectionné contre la L-arginine [20] ont été étudiées au laboratoire [294]. Comme attendu, il a été montré qu'une PSC aptamère ARN, étudiée dans les mêmes conditions d'utilisation et de stockage que les PSCs aptamères ADNs décrites précédemment, est rapidement dégradée par les RNases présentes dans l'environnement (*figure 57 CSP 1-2-4*). Afin de confirmer l'hypothèse d'une dégradation de l'aptamère ARN par les RNases, deux PSCs D-ARN identiques ont été réalisées. L'une d'entre elles (*figure 57 CSP 2*) est stockée de la même façon que précédemment alors que la seconde est stockée dans une phase mobile contenant un inhibiteur de RNases (*figure 57 CSP 3*). Une stabilité 10 fois plus importante a été observée lors de l'utilisation d'inhibiteur de RNases confirmant ainsi l'instabilité des aptamères ARNs dans les conditions habituelles d'utilisation et de stockage. Pour surmonter cette sévère limitation d'un point de vue pratique, il a été fondamental de développer des PSCs aptamères intrinsèquement résistantes à la dégradation enzymatique. Pour ce faire une stratégie très intéressante, impliquant l'approche image-miroir, a été utilisée.



**Figure 57 :** Etude de la stabilité des PSCs aptamères ARNs dans le temps ( $k$  : facteur de rétention au temps  $t$ ,  $k_0$  : facteur de rétention dans les conditions initiales) [294].

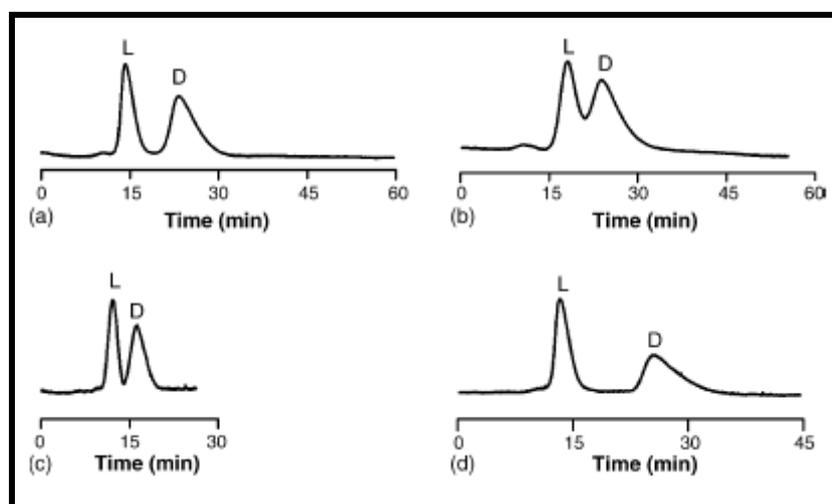
Le principe de cette stratégie a été décrit au § I-4-2-2. Une PSC formée à partir d'un aptamère ARN en série L (*figure 57 CSP 5*) a été conçue afin de vérifier ce concept. Il a été démontré qu'une PSC formée d'un aptamère ARN en série L, image dans un miroir de l'aptamère ARN en série D naturel, est stable pendant une longue période (~ 1600 volumes de colonne) dans des conditions chromatographiques d'utilisation et de stockage normales. De plus, comme prédit par le principe d'inversion chirale, l'image miroir de l'aptamère naturel reconnaît avec la même affinité et spécificité l'image miroir de la cible. La D-Arginine est significativement retenue sur la PSC L-ARN alors que la L-Arginine ne possède plus d'affinité pour cette PSC. Une inversion de l'ordre d'éluion des énantiomères par rapport à celui obtenu avec des colonnes ARNs en série D est donc observée (*figure 58*).

Après avoir résolu les problèmes de l'instabilité des aptamères ARNs, l'équipe de chimie analytique du DPM a essayé de résoudre un autre inconvénient majeur des aptamères lié à leur spécificité importante. En effet, pour une application en séparation chirale, un aptamère hautement spécifique semble peu intéressant puisque chaque PSC aptamère a la capacité de résoudre seulement un couple d'énantiomères. Pour ce faire, un aptamère en série ARN, décrit dans la littérature [123] et possédant des capacités de fixation pour la L-tyrosine et d'autres molécules comme la L-DOPA a été étudié [295].



**Figure 58 :** Illustration schématique de la stratégie image-miroir et du principe d'inversion chirale à partir d'un aptamère ARN sélectionné contre l'arginine.

L'aptamère L-ARN spécifique de la D-tyrosine a été utilisé et a permis la séparation de onze couples d'énantiomères d'acides aminés (tyrosine,  $\alpha$ -méthyl-tyrosine, DOPA, tryptophane, 1-méthyl-tryptophane, 5-hydroxyl-tryptophane, N-acétyl-tryptophane, 3-benzothiényl-alanine, 2-quinolyl-alanine, 2-naphtyl-alanine, 1-naphtyl-alanine) sur une vingtaine testée. Dans tous les cas étudiés, les énantiomères en série D sont plus retenus que les énantiomères en série L, ce qui est en accord avec le principe d'inversion chirale (*figure 59*).



**Figure 59 :** Résolution chromatographique du (a) tryptophane, (b) 2-quinolyl-alanine, (c) N-acétyl-tryptophane et, (d) 1-méthyl-tryptophane en utilisant une PSC aptamère ARN en série L spécifique de la tyrosine. Colonne : 350 x 0,76 mm (d.i) ; phase mobile : tampon Tris-HCl 8 mM, NaCl 25 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 7,4 ; température de colonne : 10°C ; concentration injectée : 0,50 mM ; volume injecté : 100 nL ; débit : 15  $\mu$ L/min ; détection à 220 nm [295].

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence la nécessité de trois points d'interaction entre la cible et le site actif de l'aptamère pour obtenir une reconnaissance

stéréospécifique, comme proposé par Dalglish [296]. Les groupements carboxylique et amino sur le carbone  $\alpha$  jouent un rôle prépondérant dans le processus de liaison et de reconnaissance chirale et, une orientation adéquate de la chaîne latérale, présentant un groupement aromatique, est nécessaire pour une liaison optimale du composé au niveau du site actif. Enfin, cette étude a montré que l'aptamère ARN immobilisé peut être utilisé dans des conditions de phase mobile hydro-organique sans altération de la stabilité de la PSC.

## V Conclusion

Le développement de la méthode SELEX s'est avéré particulièrement intéressant pour la sélection d'oligonucléotides « aptamères » possédant une affinité égale voir supérieure à celle des anticorps. Des aptamères, en série ADN et ARN, hautement spécifiques ont ainsi été identifiés contre différentes classes de cibles. Ces aptamères ont été utilisés avec succès dans de nombreuses applications analytiques montrant des propriétés très prometteuses pour le développement de biocapteurs (« aptasensors ») et d'essais ELONA, en cytométrie de flux et comme ligand d'affinité en chromatographie liquide, en électrochromatographie et en électrophorèse capillaire. Les aptamères ont également été utilisés comme de nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques d'un énantiomère prédésigné. Les aptamères ont des caractéristiques très avantageuses. Leur petite taille, leur chimie bien définie, leur nature, leur synthèse chimique relativement aisée, leur affinité, leur spécificité et leur capacité de discrimination les rendent particulièrement attrayants par rapport aux anticorps. De plus, ces nouveaux sélecteurs chiraux sont caractérisés par une énantiosélectivité prédéterminée et élevée. D'autre part, l'ordre d'éluion énantiomérique peut être aisément inversé en modifiant soit la configuration de l'aptamère (stratégie image-miroir) soit celle de l'énantiomère utilisé comme cible lors de la SELEX. Ceci peut être d'un grand intérêt pour une analyse quantitative, par exemple.

Cependant, les aptamères présentent également des limitations importantes qui peuvent restreindre leurs applications :

- L'instabilité des ARNs est problématique notamment en chromatographie et en électrochromatographie où la PSC doit être réutilisable et donc stable dans le temps. Cette limitation a été résolue en appliquant la stratégie image-miroir. D'autres solutions ont été proposées notamment la substitution de l'hydroxyle en 2' du ribose des ARNs par un

groupement fonctionnel plus stable tels que le 2'-OMe, 2'-F ou 2'-NH<sub>2</sub> permettant de protéger les aptamères en série ARN.

- Comparés aux sélecteurs chiraux « conventionnels », les PSCs aptamères sont caractérisées par des cinétiques de désorption plus faibles ce qui est responsable d'une plus faible efficacité et d'une traînée des pics.

- Une autre restriction est leur spécificité importante. En effet, une simple modification de la cible peut engendrer une perte d'affinité (exemple de l'aptamère sélectionné contre la théophylline qui possède une discrimination importante pour la caféine qui ne diffère de la théophylline que par la présence d'un groupement méthyle sur l'azote en position 7). Généralement une PSC aptamère ne peut être utilisée que pour la séparation d'un seul couple d'énantiomères. Cependant, une étude réalisée sur un aptamère anti-tyrosine a permis la séparation de onze couples d'énantiomères [295].

- En raison du prix relativement élevé des aptamères (300 € pour 100 nmoles d'oligonucléotides), les applications sont limitées à des systèmes miniaturisés tels que les puces (« chips »), l'électrophorèse capillaire, et la micro/nano-CLHP. Cette contrainte exclut, à l'heure actuelle, une application en chromatographie énantiosélective à l'échelle préparative.

- Une autre contrainte est associée à la méthodologie SELEX. Bien qu'extrêmement efficace, celle-ci nécessite des équipements sophistiqués, des réactifs extrêmement coûteux et est relativement longue à réaliser. Cependant, de nombreuses variantes de la technologie SELEX ont été développées et cette dernière a même été automatisée afin d'améliorer la sélection des aptamères (cf § I).

- Le nombre d'aptamères dirigés contre de petites molécules chirales, pouvant présenter un intérêt pharmaceutique, est relativement limité.

- Enfin, les PSCs développées peuvent être utilisées seulement en mode chromatographique à polarité de phase inversée en présence d'un faible pourcentage de solvants organiques (10% d'ACN) [295], ce qui limite les conditions d'utilisation de ces colonnes et donc les applications analytiques.

## **Objectifs de la thèse :**

Cette thèse intitulée : « Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : application à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire » a eu pour objectifs :

- L'étude par micro-CLHP d'autres aptamères sélectionnés, en série ADN et ARN, possédant des propriétés énantiosélectives.
- Le développement d'une immobilisation covalente de l'aptamère pour former des PSCs possédant de nouvelles caractéristiques et offrant ainsi la possibilité d'élargir les conditions d'utilisation et d'application de ces colonnes aptamères.
- Etendre l'étude de ces nouveaux sélecteurs chiraux à une analyse par électrophorèse capillaire et réaliser un essai permettant de détecter une impureté énantiomérique.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Tuerk C. and Gold L., "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", Science, **1990**, 249, (4968), 505-510.
2. Ellington A. D. and Szostak J. W., "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", Nature, **1990**, 346, (6287), 818-822.
3. Joyce G. F., "Amplification, mutation and selection of catalytic RNA", Gene, **1989**, 82, (1), 83-87.
4. Wang C.- I., Yang Q., Craik C. S. and John N. A., "Phage display of proteases and macromolecular inhibitors", Methods in Enzymology, **1996**, 267, 52-68.
5. Toulme J.-J. and Giegé R., "Les aptamères: des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro", Médecine/Sciences, **1998**, 14, (2), 155-166.
6. Robertson D. L. and Joyce G. F., "Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA", Nature, **1990**, 344, (6265), 467-468.
7. Ellington A. D. and Szostak J. W., "Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures", Nature, **1992**, 355, (6363), 850-852.
8. Osborne S. E. and Ellington A. D., "Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry", Chemical Reviews, **1997**, 97, (2), 349-370.
9. Osborne S. E., Matsumura I. and Ellington A. D., "Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects", Current Opinion in Chemical Biology, **1997**, 1, (1), 5-9.
10. Wilson D. S. and Szostak J. W., "In Vitro Selection of functional nucleic acids", Annual Review of biochemistry, **1999**, 68, (1), 611-647.
11. Famulok M., Mayer G. and Blind M., "Nucleic Acid Aptamers-From Selection in Vitro to Applications in Vivo", Accounts of Chemical Research, **2000**, 33, (9), 591-599.
12. Bowser M. T., "SELEX: Just another separation?" Analyst, **2005**, 130, (2), 128-130.
13. Stoltenburg R., Reinemann C. and Strehlitz B., "SELEX--A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands", Biomolecular Engineering, **2007**, 24, (4), 381-403.
14. Gopinath S. C. B., "Methods developed for SELEX", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2007**, 387, 171-182.

15. Rhie A., Kirby L., Sayer N., Wellesley R., Disterer P., Sylvester I., Gill A., Hope J., James W. and Tahiri-Alaoui A., "*Characterization of 2'-Fluoro-RNA Aptamers That Bind Preferentially to Disease-associated Conformations of Prion Protein and Inhibit Conversion*", Journal of Biological Chemistry, **2003**, 278, (41), 39697-39705.
16. Mendonsa S. D. and Bowser M. T., "*In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (18), 5387-5392.
17. Mendonsa S. D. and Bowser M. T., "*In Vitro Evolution of Functional DNA Using Capillary Electrophoresis*", Journal of the American Chemical Society, **2004**, 126, (1), 20-21.
18. Cox J. C. and Ellington A. D., "*Automated selection of anti-Protein aptamers*", Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2001**, 9, (10), 2525-2531.
19. Misono T. S. and Kumar P. K. R., "*Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance*", Analytical Biochemistry, **2005**, 342, (2), 312-317.
20. Famulok M., "*Molecular recognition of aminoacids y RNA aptamers: an L-citrulline binding RNA Motif and its evolution into an L-arginine binder*", Journal of the American Chemical Society, **1994**, 116, 1698-1706.
21. Jensen K. B., Atkinson B. L., Willis M. C., Koch T. H. and Gold L., "*Using in vitro Selection to Direct the Covalent Attachment of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Protein to High-Affinity RNA Ligands*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1995**, 92, (26), 12220-12224.
22. Golden M. C., Collins B. D., Willis M. C. and Koch T. H., "*Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers*", Journal of Biotechnology, **2000**, 81, (2-3), 167-178.
23. Bock C., Coleman M., Collins B., Davis J., Foulds G., Gold L., Greef C., Heil J., Heilig J. S., Hicke B., Hurst M. N., Husar G. M., Miller D., Ostroff R., Petach H., Schneider D., Vant-Hull B., Waugh S., Weiss A., Wilcox S. K. and Zichi D., "*Photoaptamer arrays applied to multiplexed proteomic analysis*", Proteomics, **2004**, 4, (3), 609-618.
24. Eulberg D. and Klussmann S., "*Spiegelmers: Biostable Aptamers*", ChemBioChem, **2003**, 4, (10), 979-983.
25. Lin Y., Qiu Q., Gill S. C. and Jayasena D., "*Modified RNA sequence pools for in vitro selection*", Nucleic Acids Research, **1994**, 22, 5229-5234.
26. Jellinek D., Green L. S., Bell C., Lynott C. K., Gill N., Vargeese C., Kirschenheuter G., McGee D. P. C., Abesinghe P. and et al., "*Potent 2'-Amino-2'-deoxypyrimidine RNA Inhibitors of Basic Fibroblast Growth Factor*", Biochemistry, **1995**, 34, (36), 11363-11372.

27. O'Connell D., Koenig A., Jennings S., Hicke B., Han H.-L., Fitzwater T., Chang Y.-F., Varki N., Parma D. and Varki A., "*Calcium-dependent oligonucleotide antagonists specific for L-selectin*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1996**, 93, (12), 5883-5887.
28. Pagratis N. C., Bell C., Chang Y.-F., Jennings S., Fitzwater T., Jellinek D. and Dang C., "*Potent 2'-amino-, and 2'-fluoro-2'- deoxyribonucleotide RNA inhibitors of keratinocyte growth factor*", Nature Biotechnology, **1997**, 15, (1), 68-73.
29. Lin Y., Nieuwlandt D., Magallanez A., Feistner B. and Jayasena S. D., "*High-affinity and specific recognition of human thyroid stimulating hormone (hTSH) by in vitro-selected 2'-amino-modified RNA*", Nucleic Acids Research, **1996**, 24, (17), 3407-3414.
30. Aurup H., Tuschl T., Benseler F., Ludwig J. and Eckstein F., "*Oligonucleotide duplexes containing 2'-amino-2'-deoxycytidines: thermal stability and chemical reactivity*", Nucleic Acids Research, **1994**, 22, (1), 20-24.
31. Miller P. S., Bhan P. and Kan L.-S., "*Syntheses and Interactions of Oligodeoxyribonucleotides Containing 2'-Amino-2'-Deoxyuridine*", Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, **1993**, 12, (8), 785 - 792.
32. Ruckman J., Green L. S., Beeson J., Waugh S., Gillette W. L., Henninger D. D., Claesson-Welsh L. and Janjic N., "*2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain*", Journal of Biological Chemistry, **1998**, 273, (32), 20556-20567.
33. Green L. S., Jellinek D., Bell C., Beebe L. A., Feistner B. D., Gill S. C., Jucker F. M. and Janjic N., "*Nuclease-resistant nucleic acid ligands to vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*", Chemistry & Biology, **1995**, 2, (10), 683-695.
34. Burmeister P. E., Lewis S. D., Silva R. F., Preiss J. R., Horwitz L. R., Pendergrast P. S., McCauley T. G., Kurz J. C., Epstein D. M., Wilson C. and Keefe A. D., "*Direct In Vitro Selection of a 2'-O-Methyl Aptamer to VEGF*", Chemistry & Biology, **2005**, 12, (1), 25-33.
35. Chelliserrykattil J. and Ellington A. D., "*Evolution of a T7 RNA polymerase variant that transcribes 2'-O-methyl RNA*", Nature Biotechnology, **2004**, 22, (9), 1155-1160.
36. Micklefield J., "*Backbone Modification of Nucleic Acids: Synthesis, Structure and Therapeutic Applications*", Current Medicinal Chemistry, **2001**, 8, 1157-1179.
37. Andreola M.-L., Calmels C., Michel J., Toulme J.-J. and Litvak S., "*Towards the selection of phosphorothioate aptamers. Optimizing in vitro selection steps with phosphorothioate nucleotides*", European Journal of Biochemistry, **2000**, 267, (16), 5032-5040.

38. He G. X., Williams J. P., Postich M. J., Swaminathan S., Shea R. G., Terhorst T., Law V. S., Mao C. T., Sueoka C., Coutre S. and Bischofberger N., "*In Vitro and in Vivo Activities of Oligodeoxynucleotide-Based Thrombin Inhibitors Containing Neutral Formacetal Linkages*", Journal of Medicinal Chemistry, **1998**, 41, (22), 4224-4231.
39. Latham J. A., Johnson R. and Toole J. J., "*The application of a modified nucleotide in aptamer selection: novel thrombin aptamers containing -(1 -pentynyl)-2'-deoxyuridine*", Nucleic Acids Research, **1994**, 22, (14), 2817-2822.
40. Petersen M. and Wengel J., "*LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics*", Trends in Biotechnology, **2003**, 21, (2), 74-81.
41. Darfeuille F., Hansen J. B., Orum H., Primo C. D. and Toulme J.-J., "*LNA/DNA chimeric oligomers mimic RNA aptamers targeted to the TAR RNA element of HIV-1*", Nucleic Acids Research, **2004**, 32, (10), 3101-3107.
42. Schmidt K. S., Borkowski S., Kurreck J., Stephens A. W., Bald R., Hecht M., Friebe M., Dinkelborg L. and Erdmann V. A., "*Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function*", Nucleic Acids Research, **2004**, 32, (19), 5757-5765.
43. Richardson F. C., Tennant B. C., Meyer D. J., Richardson K. A., Mann P. C., McGinty G. R., Wolf J. L., Zack P. M. and Bendele R. A., "*An evaluation of the toxicities of 2'-fluorouridine and 2'-fluorodocytidine-HCl in F344 rats and woodchucks (Marmota monax)*", Toxicologic Pathology, **1999**, 27, (6), 607-617.
44. Richardson F. C., Zang C., Lehrman S. R., Koc H., Swenberg J. A., Richardson K. A. and Bendele R. A., "*Quantification of 2'-fluoro-2'-deoxyuridine and 2'-fluoro-2'-deoxycytidine in DNA and RNA isolated from rats and woodchucks using LC/MS/MS*". Chemical Research in Toxicology, **2002**, 15, (7), 922-926.
45. White R. R., Shan S., Rusconi C. P., Shetty G., Dewhirst M. W., Kontos C. D. and Sullenger B. A., "*Inhibition of rat corneal angiogenesis by a nuclease-resistant RNA aptamer specific for angiopoietin-2*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **2003**, 100, (9), 5028-5033.
46. Rusconi C. P., Scardino E., Layzer J., Pitoc G. A., Ortel T. L., Monroe D. and Sullenger B. A., "*RNA aptamers as reversible antagonists of coagulation factor IXa*", Nature, **2002**, 419, (6902), 90-94.
47. Klusmann S., Nolte A., Bald R., Erdmann A. and Furste J. P., "*Mirror-image RNA that binds D-adenosine*", Nature Biotechnology, **1996**, 14, 1112-1115.
48. Williams K. P., Liu X.-H., Schumacher T. N. M., Lin H. Y., Ausiello D. A., Kim P. S. and Bartel D. P., "*Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin*", Proceedings of the National Academy of sciences, **1997**, 94, (21), 11285-11290.
49. Nolte A., Klusmann S., Bald R., Erdmann V. A. and Furste J. P., "*Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine*", Nature Biotechnology, **1996**, 14, (9), 1116-1119.

50. Eulberg D., Jarosch F., Vonhoff S. and Klussmann S., "*Spiegelmers for Therapeutic Applications – Use of Chiral Principles in Evolutionary Selection Techniques*", The Aptamer Handbook, **2006**, 18, 417-442.
51. Cox J. C., Hayhurst A., Hesselberth J., Bayer T. S., Georgiou G. and Ellington A. D., "*Automated selection of aptamers against protein targets translated in vitro: from gene to aptamer*", Nucleic Acids Research, **2002**, 30, (20), e108.
52. Cox J. C., Rudolph P. and Ellington A. D., "*Automated RNA Selection*", Biotechnology Progress, **1998**, 14, (6), 845-850.
53. Cox J. C., Rajendran M., Riedel T., Davidson E. A., Sooter L. J., Bayer T. S., Schmitz-Brown M. and Ellington A. D., "*Automated Acquisition of Aptamer Sequences*", Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, **2002**, 5, 289-299.
54. Eulberg D., Buchner K., Maasch C. and Klussmann S., "*Development of an automated in vitro selection protocol to obtain RNA-based aptamers: identification of a biostable substance P antagonist*", Nucleic Acids Research, **2005**, 33, (4), e45.
55. Hybarger G., Bynum J., Williams R. F., Valdes J. J. and Chambers J. P., "*A microfluidic SELEX prototype*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2006**, 384, 191-198.
56. Mosing R. K., Mendonsa S. D. and Bowser M. T., "*Capillary Electrophoresis-SELEX Selection of Aptamers with Affinity for HIV-1 Reverse Transcriptase*", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (19), 6107-6112.
57. Mendonsa S. D. and Bowser M. T., "*In Vitro Selection of Aptamers with Affinity for Neuropeptide Y Using Capillary Electrophoresis*", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (26), 9382-9383.
58. Wiegand T. W., Williams P. B., Dreskin S. C., Jouvin M. H., Kinet J. P. and Tasset D., "*High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I*", Journal of Immunology, **1996**, 157, (1), 221-230.
59. Mosing R. K. and Bowser M. T., "*Microfluidic selection and applications of aptamers*", Journal of Separation Science, **2007**, 30, (10), 1420-1426.
60. Schneider D. J., Feigon J., Hostomsky Z. and Gold L., "*High-affinity ssDNA inhibitors of the reverse transcriptase of type 1 human immunodeficiency virus*", Biochemistry, **1995**, 34, (29), 9599-9610.
61. Proske D., Hofliger M., Soll R. M., Beck-Sickinger A. G. and Famulok M., "*A Y2 Receptor Mimetic Aptamer Directed against Neuropeptide Y*", Journal of Biological Chemistry, **2002**, 277, (13), 11416-11422.
62. Berezovski M., Drabovich A., Krylova S. M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A. and Krylov S. N., "*Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium*

- Mixtures: A Universal Tool for Development of Aptamers*", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (9), 3165-3171.
63. Drabovich A., Berezovski M. and Krylov S. N., "*Selection of Smart Aptamers by Equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (ECEEM)*", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (32), 11224-11225.
  64. Mallikaratchy P., Stahelin R. V., Cao Z. and Tan W., "*Selection of DNA ligands for protein kinase C-delta*", Chemical Communications, **2006**, 3229-3231.
  65. Hesselberth J., Robertson M. P., Jhaveri S. and Ellington D., "*In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications*", Reviews in Molecular Biotechnology, **2000**, 74, (1), 15-25.
  66. Berezovski M., Drabovich A., Krylova S. M., Musheev M., Okhonin V., Petrov A. and Krylov S. N., "*Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures: A Universal Tool for Development of Aptamers*", Journal of the American Chemical Society, **2004**, 127, (9), 3165-3171.
  67. Berezovski M. and Krylov S. N., "*Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures - A Single Experiment Reveals Equilibrium and Kinetic Parameters of Protein-DNA Interactions*", Journal of the American Chemical Society, **2002**, 124, (46), 13674-13675.
  68. Drabovich A. P., Berezovski M., Okhonin V. and Krylov S. N., "*Selection of Smart Aptamers by Methods of Kinetic Capillary Electrophoresis*", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (9), 3171-3178.
  69. Berezovski M., Musheev M., Drabovich A. and Krylov S. N., "*Non-SELEX Selection of Aptamers*", Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128, (5), 1410-1411.
  70. Berezovski M., Musheev M., Drabovich A., Jitkova J. V. and Krylov S. N., "*Non-SELEX: selection of aptamers without intermediate amplification of candidate oligonucleotides*", Nature Protocols, **2006**, 1, (3), 1359-1369.
  71. Klusmann S., "*The Aptamer Handbook. Functional Oligonucleotides and Their Applications*", WILEY-VCH Verlag GmbH & Co., KGaA, Weinheim, **2006**, 1-511.
  72. Wilson D. S. and Szostak J. W., "*In vitro selection on functional nucleic acids*", Annual Review of Biochemistry, **1999**, 68, (1), 611-647.
  73. Famulok M., "*Oligonucleotide aptamers that recognize small molecules*", Current Opinion in Structural Biology, **1999**, 9, (3), 324-329.
  74. Stoltenburg R., Reinemann C. and Strehlitz B., "*SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*", Biomolecular Engineering, **2007**, 24, 381-403.
  75. Gold L., Polisky B., Uhlenbeck O. and Yarus M., "*Diversity of Oligonucleotide Functions*", Annual Review of Biochemistry, **1995**, 64, (1), 763-797.

76. Jayasena S. D., "Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics", Clinical Chemistry, **1999**, 45, (9), 1628-1650.
77. Toulme J.-J., Da Rocha S., Dausse E., Azema L., Lebars I. and Moreau S., "Les aptamères : du concept à l'outil", Medecine Nucleaire, **2007**, 31, (9), 478-484.
78. Tombelli S., Minunni M. and Mascini M., "Analytical applications of aptamers", Biosensors and Bioelectronics, **2005**, 20, (12), 2424-2434.
79. Mann D., Reinemann C., Stoltenburg R. and Strehlitz B., "In vitro selection of DNA aptamers binding ethanolamine", Biochemical and Biophysical Research Communications, **2005**, 338, (4), 1928-1934.
80. Ciesiolka J., Gorski J. and Yarus M., "Selection of an RNA domain that binds  $Zn^{2+}$ ", RNA, **1995**, 1, (5), 538-550.
81. Hofmann H. P., Limmer S., Hornung V. and Sprinzl M., " $Ni^{2+}$ -binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair", RNA, **1997**, 3, (11), 1289-1300.
82. Sassanfar M. and Szostak J. W., "An RNA motif that binds ATP", Nature, **1993**, 364, (6437), 550-553.
83. Huizenga D. E. and Szostak J. W., "A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP", Biochemistry, **1995**, 34, (2), 656-665.
84. Sazani P. L., Larralde R. and Szostak J. W., "A Small Aptamer with Strong and Specific Recognition of the Triphosphate of ATP", Journal of the American Chemical Society, **2004**, 126, (27), 8370-8371.
85. Lauhon C. T. and Szostak J. W., "RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors", Journal of the American Chemical Society, **1995**, 117, (4), 1246-1257.
86. Connell G. J., Illangesekare M. and Yarus M., "Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites", Biochemistry, **1993**, 32, (21), 5497-5502.
87. Geiger A., "RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity", Nucleic Acids Research, **1996**, 24, 1029-1036.
88. Harada K. and Frankel A. D., "Identification of two novel arginine binding DNAs", EMBO Journal, **1995**, 14, (23), 5798-5811.
89. Majerfeld I., "RNA Affinity for Molecular L-Histidine; Genetic Code Origins", Journal of molecular Evolution, **2005**, 61, 226-235.
90. Majerfeld I. and Yarus M., "Isoleucine:RNA sites with associated coding sequences", RNA, **1998**, 4, (4), 471-478.

91. Majerfeld I. and Yarus M., "An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe", Nature Structural & Molecular Biology, **1994**, 1, (5), 287-292.
92. Yang Q., Goldstein I. J., Mei H.-Y. and Engelke D. R., "DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1998**, 95, (10), 5462-5467.
93. Jenison R. D., Gill S. C., Pardi A. and Polisky B., "High-resolution molecular discrimination by RNA", Science, **1994**, 263, (5152), 1425-1429.
94. Anderson P. C. and Mecozi S., "Unusually Short RNA Sequences: Design of a 13-mer RNA that Selectively Binds and Recognizes Theophylline", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (15), 5290-5291.
95. Nieuwlandt D., Wecker M. and Gold L., "In Vitro Selection of RNA Ligands to Substance P", Biochemistry, **1995**, 34, (16), 5651-5659.
96. Purschke W. G., Eulberg D., Buchner K., Vonhoff S. and Klussmann S., "An L-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo", Proceedings of the National Academy of Sciences, **2006**, 103, (13), 5173-5178.
97. Wang Y. and Rando R. R., "Specific binding of aminoglycoside antibiotics to RNA", Chemistry & Biology, **1995**, 2, (5), 281-290.
98. Lato S. M., Boles A. R. and Ellington A. D., "In vitro selection of RNA lectins: using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution", Chemistry & Biology, **1995**, 2, 291-303.
99. Lato S. M. and Ellington A. D., "Screening chemical libraries for nucleic-acid-binding drugs by in vitro selection: A test case with lividomycin", Molecular Diversity, **1996**, 2, 103-110.
100. Kwon M., Chun S. M., Jeong S. and Yu J., "In vitro selection of RNA against kanamycin B", Molecular Cell, **2001**, 11, 303-311.
101. Wallis M. G., Ahsen U. V., Schroeder R. and Famulok M., "A novel RNA motif for neomycin recognition", Chemistry & Biology, **1995**, 2, 543-552.
102. Boiziau C., Dausse E., Yurchenko L. and Toulme J.-J., "DNA Aptamers Selected Against the HIV-1 trans-Activation-responsive RNA Element Form RNA-DNA Kissing Complexes", The Journal of Biological Chemistry, **1999**, 274, (18), 12730-12737.
103. Duconge F. and Toulme J.-J., "In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1", RNA, **1999**, 5, (12), 1605-1614.
104. Tuerk C., MacDougal S. and Gold L., "RNA Pseudoknots that Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase", Proceedings of the National Academy of sciences, **1992**, 89, (15), 6988-6992.

105. Bock L. C., Griffin L. C., Latham J. A., Vermaas E. H. and Toole J. J., "*Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin*", Nature, **1992**, 355, (6360), 564-566.
106. Drolet D. W., Jenison R. D., Smith D. E., Pratt D. and Hicke B. J., "*A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX)*", Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening **1999**, 2, 271-278.
107. White R., Rusconi C., Scardino E., Wolberg A., Lawson J., Hoffman M. and Sullenger B., "*Generation of Species Cross-reactive Aptamers Using "Toggle" SELEX*", Molecular Therapy, **2001**, 4, (6), 567-573.
108. Jellinek D., Green L. S., Bell C. and Janjic N., "*Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor*", Biochemistry, **1994**, 33, (34), 10450-10456.
109. Ringquist S., Jones T., Snyder E. E., Gibson T., Boni I. and Gold L., "*High-Affinity RNA Ligands to Escherichia coli Ribosomes and Ribosomal Protein S1: Comparison of Natural and Unnatural Binding Sites*", Biochemistry, **1995**, 34, (11), 3640-3648.
110. Pan W., Craven R. C., Qiu Q., Wilson C. B., Wills J. W., Golovine S. and Wang J. F., "*Isolation of virus-neutralizing RNAs from a large pool of random sequences.*" Proceedings of the National Academy of Sciences, **1995**, 92, (25), 11509-11513.
111. Shangguan D., Li Y., Tang Z., Cao Z. C., Chen H.W., Mallikaratchy P., Sefah K., Yang C. J. and Tan W., "*From the Cover: Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **2006**, 103, (32), 11838-11843.
112. Ciesiolka J. and Yarus M., "*Small RNA-divalent domains*", RNA, **1996**, 2, (8), 785-793.
113. Ruta J., Ravelet C., Grosset C., Fize J., Ravel A., Villet A. and Peyrin E., "*Enantiomeric Separation Using an L-RNA Aptamer as Chiral Additive in Partial-Filling Capillary Electrophoresis*", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (9), 3032-3039.
114. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Aptamer-Based Enantioselective Competitive Binding Assay for the Trace Enantiomer Detection*", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (12), 4716-4719.
115. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Fize J., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Competitive ACE assay based on a « hybrid » pre-incubation/on-capillary mixing format using an enantioselective aptamer as affinity ligand*", Journal of Separation Science, **2008**, sous presse.
116. Ruta J., Grosset C., Ravelet C., Fize J., Villet A., Ravel A. and Peyrin E., "*Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine l-RNA aptamer microbore column*", Journal of Chromatography B, **2007**, 845, (2), 186-190.

117. Knight R. D. and Landsteiner L. K., "*Rhyme or reason: RNA-arginine interactions and the genetic code*", Chemistry & Biology, **1998**, 5, R215-R220.
118. Connell G. J. and Yarus M., "*RNAs with dual specificity and dual RNAs with similar specificity*", Science, **1994**, 264, (5162), 1137-1141.
119. Tao J. and Frankel A. D., "*Arginine-Binding RNAs Resembling TAR Identified by in Vitro Selection*", Biochemistry, **1996**, 35, (7), 2229-2238.
120. Yarus M., Caporaso J. G. and Knight R., "*Origins of the Genetic Code : The escaped Triplet Theory*", Annual Review of Biochemistry, **2005**, 74, 179-198.
121. Kotia R. B., Li L. and McGown L. B., "*Separation of Nontarget Compounds by DNA Aptamers*", Analytical Chemistry, **2000**, 72, (4), 827-831.
122. King D. J., Ventura D. A., Brasier A. R. and Gorenstein D. G., "*Novel Combinatorial Selection of Phosphorothioate Oligonucleotide Aptamers*", Biochemistry, **1998**, 37, (47), 16489-16493.
123. Mannironi C., Scerch C., Fruscoloni P. and Tocchini-Valentini G., "*Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: The evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif*", RNA, **2000**, 6, 520-527.
124. Poncelet S. M., Limet J. N., Noel J. P., Kayaert M. C., Galanti L. and Collet-cassart D., "*Immunoassay of Theophylline by Latex Particle Counting*", Journal of Immunoassay and Immunochemistry, **1990**, 11, (1), 77 - 88.
125. Fan T. P., Hu D. E., Guard S., Gresham G. A. and Watling K. J., "*Stimulation of angiogenesis by substance P and interleukin-1 in the rat and its inhibition by NK1 or interleukin-1 receptor antagonists.*" British Journal of Pharmacology, **1993**, 110, (1), 43-9.
126. Reigadas S., Castanotto D., Faure A., Ventura M., Rossi J. J. and Toulme J.-J., "*Endogenous expression of an anti-TAR aptamer reduces HIV-1 replication*", RNA Biology, **2006**, 3, (4), 150-156.
127. Green L., Waugh S., Binkley J. P., Hostomska Z., Hostomsky Z. and Tuerk C., "*Comprehensive Chemical Modification Interference and Nucleotide Substitution Analysis of an RNA Pseudoknot Inhibitor to HIV-1 Reverse Transcriptase*", Journal of Molecular Biology, **1995**, 247, (1), 60-68.
128. Chen H. and Gold L., "*Selection of high-affinity RNA ligands to reverse transcriptase: Inhibition of cDNA synthesis and RNase H activity*", Biochemistry, **1994**, 33, (29), 8746-8756.
129. Li W. X., Kaplan A. V., Grant G. W., Toole J. J. and Leung L. L., "*A novel nucleotide-based thrombin inhibitor inhibits clot-bound thrombin and reduces arterial platelet thrombus formation*", Blood, **1994**, 83, (3), 677-682.

130. Griffin L. C., Tidmarsh G. F., Bock L. C., Toole J. J. and Leung L. L., "*In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits*", Blood, **1993**, 81, (12), 3271-3276.
131. Kubik M. F., Stephen A. W., Schneider D., Marlar R. A. and Tasset D., "*High-affinity RNA ligands to human alpha-thrombin*", Nucleic Acids Research, **1994**, 22, 2619-2626.
132. Soussi Gounni A., Lamkhioued B., Ochiai K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron A., Kinet J.-P. and Capron M., "*High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites*", Nature, **1994**, 367, (6459), 183-186.
133. Rosen L. S., "*Clinical Experience With Angiogenesis Signaling Inhibitors: Focus on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Blockers*", Cancer Control, **2002**, 9, (2), 36-44.
134. Tucker C. E., Chen L.-S., Judkins M. B., Farmer J. A., Gill S. C. and Drolet D. W., "*Detection and plasma pharmacokinetics of an anti-vascular endothelial growth factor oligonucleotide-aptamer (NX1838) in rhesus monkeys*", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **1999**, 732, (1), 203-212.
135. Eyetech Study, "*Preclinical and phase IA clinical evaluation of an anti-VEGF pegylated aptamère (EYE001) for the treatment of exudative age-related macular degeneration*", Retina, **2002**, 22, 143-152.
136. Eyetech Study, "*Anti-vascular endothelial growth factor therapy for subfoveal choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration: Phase II study results*", Ophthalmology, **2003**, 110, (5), 979-986.
137. <http://aptamer.icmb.utexas.edu/index.php>, **2007**.
138. Shamah S. M., Healy J. M. and Cload S. T., "*Complex Target SELEX*", Accounts of Chemical Research, **2008**, 41, (1), 130-138.
139. Herr J. K., Smith J. E., Medley C. D., Shangguan D. and Tan W., "*Aptamer-Conjugated Nanoparticles for Selective Collection and Detection of Cancer Cells*", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (9), 2918-2924.
140. Kiga D., Futamura Y., Sakamoto K. and Yokoyama S., "*An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition*", Nucleic Acids Research, **1998**, 26, (7), 1755-1760.
141. Wallace S. T. and Schroeder R., "*In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics*", RNA, **1998**, 4, (1), 112-123.
142. Gal S. Wan., Amontov S., Urvil P. T., Vishnuvardhan D., Nishikawa F., Kumar P. K. R. and Nishikawa S., "*Selection of a RNA aptamer that binds to human activated*

- protein C and inhibits its protease function*", European Journal of Biochemistry, **1998**, 252, (3), 553-562.
143. James W., "Aptamers", Encyclopedia of Analytical Chemistry, **2000**, 4848-4871.
144. Eaton B. E., Gold L. and Zichi D. A., "Let's get specific: the relationship between specificity and affinity", Chemistry & Biology, **1995**, 2, (10), 633-638.
145. Wang Y., Killian J., Hamasaki K. and Rando R. R., "RNA Molecules That Specifically and Stoichiometrically Bind Aminoglycoside Antibiotics with High Affinities", Biochemistry, **1996**, 35, (38), 12338-12346.
146. Peyrin E., Grosset C., Ravel A., Villet A. and Jourdan E., "Acides nucléiques en tant que nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques", **2003**, FR 2855822, Brevet.
147. Chauveau F., Pestourie C. and Tavitian B., "Aptamers: selection and scope of applications", Pathologie Biologie, **2006**, 54, (4), 251-258.
148. Hermann T. and Patel D. J., "Stitching together RNA tertiary architectures", Journal of Molecular Biology, **1999**, 294, (4), 829-849.
149. Riou J.-F., Gomez D., Lemarteleur T. and Trentesaux C., "L'ADN G-quadruplexe : mythe ou réalité ? " Bulletin du cancer, **2003**, 90, (4), 305-313.
150. Feigon J., Dieckmann T. and Smith F. W., "Aptamer structures from A to zeta", Chemistry & Biology, **1996**, 3, (8), 611-617.
151. Patel D. J., "Structural analysis of nucleic acid aptamers", Current Opinion in Chemical Biology, **1997**, 1, (1), 32-46.
152. Patel D. J., Suri A. K., Jiang F., Jiang L., Fan P., Kumar R. A. and Nonin S., "Structure, recognition and adaptive binding in RNA aptamer complexes", Journal of Molecular Biology, **1997**, 272, (5), 645-664.
153. Hermann T. and Patel D. J., "Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers", Science, **2000**, 287, (5454), 820-825.
154. Patel D. J. and Suri A. K., "Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics", Reviews in Molecular Biotechnology, **2000**, 74, (1), 39-60.
155. Jiang F., Kumar R. A., Jones R. A. and Patel D. J., "Structural basis of RNA folding and recognition in an AMP-RNA aptamer complex", Nature, **1996**, 382, (6587), 183-186.
156. Dieckmann T., Suzuki E., Nakamura G. K. and Feigon J., "Solution structure of an ATP-binding RNA aptamer reveals a novel fold", RNA, **1996**, 2, (7), 628-640.
157. Heus H. A. and Pardi A., "Structural features that give rise to unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops", Science, **1991**, 253, 191-194.

158. Lin C. H. and Patei D. J., "Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP", Chemistry & Biology, **1997**, 4, (11), 817-832.
159. Macaya R. F., Schultze P., Smith F. W., Roe J. A. and Feigon J., "Thrombin-Binding DNA Aptamer Forms a Unimolecular Quadruplex Structure in Solution", Proceedings of the National Academy of Sciences, **1993**, 90, (8), 3745-3749.
160. Wang K. Y., McCurdy S., Shea R. G., Swaminathan S. and Bolton P. H., "A DNA aptamer which binds to and inhibits thrombin exhibits a new structural motif for DNA", Biochemistry, **1993**, 32, (8), 1899-1904.
161. Schultze P., Macaya R. F. and Feigon J., "Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG)", Journal of Molecular Biology, **1994**, 235, (5), 1532-1547.
162. Padmanabhan K., Padmanabhan K. P., Ferrara J. D., Sadler J. E. and Tulinsky A., "The structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer", Journal of Biological Chemistry, **1993**, 268, (24), 17651-17654.
163. Kelly J. A., Feigon J. and Yeates T. O., "Reconciliation of the X-ray and NMR Structures of the Thrombin-Binding Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG)", Journal of Molecular Biology, **1996**, 256, (3), 417-422.
164. Burgstaller P., Kochoyan M. and Famulok M., "Structural probing and damage selection of citrulline and arginine-specific aptamers identify base positions requiring for binding", Nucleic Acids Research, **1995**, 23, (23), 4769-4776.
165. Yang Y., Kochoyan M., Burgstaller P., Westhof E. and Famulok M., "Structural Basis of Ligand Discrimination by Two Related RNA Aptamers Resolved by NMR Spectroscopy", Science, **1996**, 272, (5266), 1343-1347.
166. Zimmermann G. R., Jenison R. D., Wick C. L., Simorre J.-P. and Pardi A., "Interlocking structural motifs mediate molecular discrimination by a theophylline-binding RNA", Nature Structural & Molecular Biology, **1997**, 4, (8), 644-649.
167. Updike S. J. and Hicks G. P., "The Enzyme Electrode", Nature, **1967**, 214, (5092), 986-988.
168. Gronow M., "Biosensors", Trends in Biochemical Sciences, **1984**, 9, (8), 336-340.
169. Dupont D., "Applications des biocapteurs dans l'industrie agroalimentaire", Techniques de l'ingénieur, **2005**, 4010, 1-15.
170. O'Sullivan C., "Aptasensors - the future of biosensing?" Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2002**, 372, (1), 44-48.

171. Luzi E., Minunni M., Tombelli S. and Mascini M., "New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding", TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2003**, 22, (11), 810-818.
172. You K. M., Lee S. H., Im A. and Lee S. B., "Aptamers as functional nucleic acids : in vitro selection and biotechnological applications ", Biotechnology and Bioprocess Engineering, **2003**, 8, 64-75.
173. Xiao Y., Lubin A. A., Heeger A. J. and Plaxco K. W., "Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor", Angewandte Chemie International Edition, **2005**, 44, (34), 5456-5459.
174. Radi A. E., AceroSanchez J. L., Baldrich E. and O'Sullivan C. K., "Reagentless, Reusable, Ultrasensitive Electrochemical Molecular Beacon Aptasensor", Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128, (1), 117-124.
175. Song S., Wang L., Li J., Fan C. and Zhao J., "Aptamer-based biosensors", TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2008**, 27, (2), 108-117.
176. Baker B. R., Lai R. Y., Wood M. S., Doctor E. H., Heeger A. J. and Plaxco K. W., "An Electronic, Aptamer-Based Small-Molecule Sensor for the Rapid, Label-Free Detection of Cocaine in Adulterated Samples and Biological Fluids", Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128, (10), 3138-3139.
177. Lai R. Y., Plaxco K. W. and Heeger A. J., "Aptamer-Based Electrochemical Detection of Picomolar Platelet-Derived Growth Factor Directly in Blood Serum", Analytical Chemistry, **2007**, 79, 229-233.
178. Radi A. E. and O'Sullivan C. K., "Aptamer conformational switch as sensitive electrochemical biosensor for potassium ion recognition", Chemical Communications, **2006**, (32), 3432 - 3434.
179. Mir M. and Katakis L., "Aptamers as elements of bioelectronic devices", Molecular Biosystems, **2007**, 3, 620-622.
180. Xiao Y., Piorek B. D., Plaxco K. W. and Heeger A. J., "A Reagentless Signal-On Architecture for Electronic, Aptamer-Based Sensors via Target-Induced Strand Displacement", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (51), 17990-17991.
181. Zuo X., Song S., Zhang J., Pan D., Wang L. and Fan C., "A Target-Responsive Electrochemical Aptamer Switch (TREAS) for Reagentless Detection of Nanomolar ATP", Journal of the American Chemical Society, **2007**, 129, (5), 1042-1043.
182. Bang G. S., Cho S. and Kim B.-G., "A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors", Biosensors and Bioelectronics, **2005**, 21, (6), 863-870.
183. Le Floch F., Ho H. A. and Leclerc M., "Label-Free Electrochemical Detection of Protein Based on a Ferrocene-Bearing Cationic Polythiophene and Aptamer", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (13), 4727-4731.

184. Ikebukuro K., Kiyohara C. and Sode K., "Novel electrochemical sensor system for protein using the aptamers in sandwich manner", Biosensors and Bioelectronics, **2005**, 20, (10), 2168-2172.
185. Mir M., Vreeke M. and Katakis I., "Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor", Electrochemistry Communications, **2006**, 8, (3), 505-511.
186. Willner I. and Zayats M., "Electronic Aptamer-Based Sensors", Angewandte Chemie International Edition, **2007**, 46, (34), 6408-6418.
187. Polsky R., Gill R., Kaganovsky L. and Willner I., "Nucleic Acid-Functionalized Pt Nanoparticles: Catalytic Labels for the Amplified Electrochemical Detection of Biomolecules", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (7), 2268-2271.
188. Zheng J., Feng W., Lin L., Zhang F., Cheng G., He P. and Fang Y., "A new amplification strategy for ultrasensitive electrochemical aptasensor with network-like thiocyanuric acid/gold nanoparticles", Biosensors and Bioelectronics, **2007**, 23, (3), 341-347.
189. He P., Shen L., Cao Y. and Li D., "Ultrasensitive Electrochemical Detection of Proteins by Amplification of Aptamer-Nanoparticle Bio Bar Codes", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (21), 8024-8029.
190. Zhou L., Ou L. J., Chu X., Shen G. L. and Yu R. Q., "Aptamer-Based Rolling Circle Amplification: A Platform for Electrochemical Detection of Protein", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (19), 7492-7500.
191. Zayats M., Huang Y., Gill R., Ma C. a and Willner I., "Label-Free and Reagentless Aptamer-Based Sensors for Small Molecules", Journal of the American Chemical Society, **2006**, 128, (42), 13666-13667.
192. So H. M., Won K., Kim Y. H., Kim B. K., Ryu B. H., Na P. S., Kim H. and Lee J. O., "Single-Walled Carbon Nanotube Biosensors Using Aptamers as Molecular Recognition Elements", Journal of the American Chemical Society, **2005**, 127, (34), 11906-11907.
193. Maehashi K., Katsura T., Kerman K., Takamura Y., Matsumoto K. and Tamiya E., "Label-Free Protein Biosensor Based on Aptamer-Modified Carbon Nanotube Field-Effect Transistors", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (2), 782-787.
194. Furtado L. M., Su H., Thompson M., Mack D. P. and Hayward G. L., "Interactions of HIV-1 TAR RNA with Tat-Derived Peptides Discriminated by On-Line Acoustic Wave Detector", Analytical Chemistry, **1999**, 71, (6), 1167-1175.
195. Liss M., Petersen B., Wolf H. and Prohaska E., "An Aptamer-Based Quartz Crystal Protein Biosensor", Analytical Chemistry, **2002**, 74, (17), 4488-4495.

196. Minunni M., Tombelli S., Gullotto A., Luzi E. and Mascini M., "*Development of biosensors with aptamers as bio-recognition element: the case of HIV-1 Tat protein*", Biosensors and Bioelectronics, **2004**, 20, (6), 1149-1156.
197. Hianik T., Ostatná V., Zajacová Z., Stoikova E. and Evtugyn G., "*Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods*", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2005**, 15, (2), 291-295.
198. Schlensog M. D., Gronewold T. M. A., Tewes M., Famulok M. and Quandt E., "*A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands*", Sensors and Actuators B: Chemical, **2004**, 101, (3), 308-315.
199. Kleinjung F., Klussmann S., Erdmann V. A., Scheller F. W., Furste J. P. and Bier F. F., "*High-Affinity RNA as a Recognition Element in a Biosensor*", Analytical Chemistry, **1998**, 70, (2), 328-331.
200. Potyrailo R. A., Conrad R. C., Ellington A. D. and Hieftje G. M., "*Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors*", Analytical Chemistry, **1998**, 70, (16), 3419-3425.
201. Lee M. and Walt D. R., "*A Fiber-Optic Microarray Biosensor Using Aptamers as Receptors*", Analytical Biochemistry, **2000**, 282, (1), 142-146.
202. McCauley T. G., Hamaguchi N. and Stanton M., "*Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules*", Analytical Biochemistry, **2003**, 319, (2), 244-250.
203. Tyagi S. and Kramer F. R., "*Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization*", Nature Biotechnology, **1996**, 14, (3), 303-308.
204. Yamamoto R., Baba T. and Kumar P. K., "*Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1*", Genes to Cells, **2000**, 5, (5), 389-396.
205. Yamamoto R., Katahira M., Nishikawa S., Baba T., Taira K. and Kumar P. K., "*A novel RNA motif that binds efficiently and specifically to the Tat protein of HIV and inhibits the trans-activation by Tat of transcription in vitro and in vivo*", Genes to Cells, **2000**, 5, (5), 371-388.
206. Stojanovic M. N., De Prada P. and Landry D. W., "*Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly*", Journal of the American Chemical Society, **2000**, 122, (46), 11547-11548.
207. Hamaguchi N., Ellington A. D. and Stanton M., "*Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins*", Analytical Biochemistry, **2001**, 294, (2), 126-131.
208. Li J. J., Fang X. and Tan W., "*Molecular Aptamer Beacons for Real-Time Protein Recognition*", Biochemical and Biophysical Research Communications, **2002**, 292, (1), 31-40.

209. Nutiu R. and Li Y., "*Structure-Switching Signaling Aptamers*", Journal of the American Chemical Society, **2003**, *125*, (16), 4771-4778.
210. Gopinath S. C. B., Misono T. S. and Kumar P. K. R., "*Prospects of Ligand-Induced Aptamers*", Critical Reviews in Analytical Chemistry, **2008**, *38*, 34-47.
211. Stojanovic M. N., De Prada P. and Landry D. W., "*Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine*", Journal of the American Chemical Society, **2001**, *123*, (21), 4928-4931.
212. Yang C. J., Jockusch S., Vicens M., Turro N. J. and Tan W., "*Light-switching excimer probes for rapid protein monitoring in complex biological fluids*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **2005**, *102*, (48), 17278-17283.
213. Yamana K., Ohtani Y., Nakano H. and Saito I., "*Bis-pyrene labeled DNA aptamer as an intelligent fluorescent biosensor*", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2003**, *13*, (20), 3429-3431.
214. Jhaveri S. D., Kirby R., Conrad R., Maglott E. J., Bowser M., Kennedy R. T., Glick G. and Ellington A. D., "*Designed Signaling Aptamers that Transduce Molecular Recognition to Changes in Fluorescence Intensity*", Journal of the American Chemical Society, **2000**, *122*, (11), 2469-2473.
215. Stojanovic M. N. and Kolpashchikov D. M., "*Modular Aptameric Sensors*", Journal of the American Chemical Society, **2004**, *126*, (30), 9266-9270.
216. Li H. and Rothberg L., "*Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles*", Proceedings of the National Academy of Sciences, **2004**, *101*, (39), 14036-14039.
217. Wang L., Liu X., Hu X., Song S. and Fan C., "*Unmodified gold nanoparticles as a colorimetric probe for potassium DNA aptamers*", Chemical Communications, **2006**, (36), 3780-3782.
218. Wei H., Li B., Li J., Wang E. and Dong S., "*Simple and sensitive aptamer-based colorimetric sensing of protein using unmodified gold nanoparticle probes*", Chemical Communications, **2007**, (36), 3735 - 3737.
219. Liu J. and Lu Y., "*Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticles*", Angewandte Chemie International Edition, **2006**, *45*, (1), 90-94.
220. Liu J. and Lu Y., "*Preparation of aptamer-linked gold nanoparticle purple aggregates for colorimetric sensing of analytes*", Nature Protocols, **2006**, *1*, (1), 246-252.
221. Liu J., Mazumdar D. and Lu Y., "*A Simple and Sensitive "Dipstick" Test in Serum Based on Lateral Flow Separation of Aptamer-Linked Nanostructures*", Angewandte Chemie International Edition, **2006**, *45*, (47), 7955-7959.

222. Zhao W., Chiuman W., Brook M. A. and Li Y., "Simple and Rapid Colorimetric Biosensors Based on DNA Aptamer and Noncrosslinking Gold Nanoparticle Aggregation", ChemBioChem, **2007**, 8, (7), 727-731.
223. Pavlov V., Xiao Y., Shlyahovsky B. and Willner I., "Aptamer-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Optical Detection of Thrombin", Journal of the American Chemical Society, **2004**, 126, (38), 11768-11769.
224. Li Y.-Y., Zhang C., Li B.-S., Zhao L.-F., Li X.-B., Yang W.-J. and Xu S.-Q., "Ultrasensitive Densitometry Detection of Cytokines with Nanoparticle-Modified Aptamers", Clinical chemistry, **2007**, 53, (6), 1061-1066.
225. Stojanovic M. N. and Landry D. W., "Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine", Journal of the American Chemical Society, **2002**, 124, (33), 9678-9679.
226. Jiang Y., Fang X. and Bai C., "Signaling Aptamer/Protein Binding by a Molecular Light Switch Complex", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (17), 5230-5235.
227. Ho H. A. and Leclerc M., "Optical Sensors Based on Hybrid Aptamer/Conjugated Polymer Complexes", Journal of the American Chemical Society, **2004**, 126, (5), 1384-1387.
228. Kawakami J., Imanaka H., Yokota Y. and Sugimoto N., "In vitro selection of aptamers that act with Zn<sup>2+</sup>", Journal of Inorganic Biochemistry, **2000**, 82, (1-4), 197-206.
229. Fukusaki E.-I., Hasunuma T., Kajiyama S.-I., Okazawa A., Itoh T. J. and Kobayashia A., "SELEX for Tubulin Affords Specific T-Rich DNA Aptamers", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2001**, 11, 2927-2930.
230. Rhodes A., Smithers N., Chapman T., Parsons S. and Rees S., "The generation and characterisation of antagonist RNA aptamers to MCP-1", FEBS Letters, **2001**, 506, 85-90.
231. Tombelli S., Minunni M., Luzzi E. and Mascini M., "Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein", Bioelectrochemistry, **2005**, 67, (2), 135-141.
232. Tombelli S., Minunni M. and Mascini M., "Analytical applications of aptamers", Optical Sensing Technology and Applications, **2007**, 6585, 65850W-9.
233. Li Y., Lee H. J. and Corn R. M., "Detection of Protein Biomarkers Using RNA Aptamer Microarrays and Enzymatically Amplified Surface Plasmon Resonance Imaging", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (3), 1082-1088.
234. Lee S. J., Youn B.-S., Park J. W., Niazi J. H., Kim Y. S. and Gu M. B., "ssDNA Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Retinol Binding Protein 4 for the Early Diagnosis of Type 2 Diabetes", Analytical Chemistry, **2008**, 80, 2867-2873.

235. Fritz J., Baller M. K., Lang H. P., Rothuizen H., Vettiger P., Meyer E., Guntherodt H., Gerber C. and Gimzewski J. K., "*Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics*", Science, **2000**, 288, (5464), 316-318.
236. De-los-Santos-Álvarez N., Lobo-Castañón M. J., Miranda-Ordieres A. J. and Tuñón-Blanco P., "*Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices*", TrAC Trends in Analytical Chemistry, **2008**, *In Press, Corrected Proof*,
237. Savran C. A., Knudsen S. M., Ellington A. D. and Manalis S. R., "*Micromechanical Detection of Proteins Using Aptamer-Based Receptor Molecules*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (11), 3194-3198.
238. Hwang K. S., Lee S.-M., Eom K., Lee J. H., Lee Y.-S., Park J. H., Yoon D. S. and Kim T. S., "*Nanomechanical microcantilever operated in vibration modes with use of RNA aptamer as receptor molecules for label-free detection of HCV helicase*", Biosensors and Bioelectronics, **2007**, 23, (4), 459-465.
239. Lin Y., Padmapriya A., Morden K. M. and Jayasena S. D., "*Peptide conjugation to an in vitro-selected DNA ligand improves enzyme inhibition*", Proceedings of the National Academy of sciences, **1995**, 92, 11044-11048.
240. Davis K. A., Abrams B., Lin Y. and Jayasena S. D., "*Use of a high affinity DNA ligand in flow cytometry*", Nucleic Acids Research, **1996**, 24, (4), 702-706.
241. Hicke B. J., Watson S. R., Koenig A., Lynott C. K., Bargatze R. F., Chang Y.-F., Ringquist S., Moon-McDermott L., Jennings S., Fitzwater T., Han H.-L., Varki N., Albinana I., Willis M. C., Varki A. and Parma D., "*DNA Aptamers Block L-Selectin Function In Vivo . Inhibition of Human Lymphocyte Trafficking in SCID Mice*", The Journal of Clinical Investigation, **1996**, 98, (12), 2688-2692.
242. Ringquist S. and Parma D., "*Anti-L-selectin oligonucleotide ligands recognize CD62L-positive leukocytes: Binding affinity and specificity of univalent and bivalent ligands*", Cytometry, **1998**, 33, (4), 394-405.
243. Davis K. A., Lin Y., Abrams B. and Jayasena S. D., "*Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry*", Nucleic Acids Research, **1998**, 26, (17), 3915-3924.
244. Blank M., Weinschenk T., Priemer M. and Schluesener H., "*Systematic Evolution of a DNA Aptamer Binding to Rat Brain Tumor Microvessels. Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen*", Journal of Biological Chemistry, **2001**, 276, (19), 16464-16468.
245. Drolet D. W., Moon-McDermott L. and Romig T. S., "*An enzyme-linked oligonucleotide assay*", Nature Biotechnology, **1996**, 14, (8), 1021-1025.
246. Rye P. D. and Nustad K., "*Immunomagnetic DNA Aptamer Assay*", BioTechniques, **2001**, 30, (2), 290-295.

247. Yang X., Li X., Prow T. W., Reece L. M., Bassett S. E., Luxon B. A., Herzog N. K., Aronson J., Shope R. E., Leary J. F. and Gorenstein D. G., "*Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers*", Nucleic Acids Research, **2003**, 31, (10), e54-.
248. Bruno J. G. and Kiel J. L., "*Use of Magnetic Beads in Selection and Detection of Biotxin Aptamers by Electrochemiluminescence and Enzymatic Methods*", BioTechniques, **2002**, 32, (1), 178-183.
249. Kawazoe N., Ito Y. and Imanishi Y., "*Bioassay Using a Labeled Oligonucleotide Obtained by in Vitro Selection*", Biotechnology Progress, **1997**, 13, (6), 873-874.
250. Ito Y., Fujita S., Kawazoe N. and Imanishi Y., "*Competitive Binding Assay for Thyroxine Using in Vitro Selected Oligonucleotides*", Analytical Chemistry, **1998**, 70, (16), 3510-3512.
251. Baldrich E., Restrepo A. and O'Sullivan C. K., "*Aptasensor Development: Elucidation of Critical Parameters for Optimal Aptamer Performance*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (23), 7053-7063.
252. Baldrich E., Acero J. L., Reekmans G., Laureyn W. and O'Sullivan C. K., "*Displacement Enzyme Linked Aptamer Assay*", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (15), 4774-4784.
253. Ramos E., Pineiro D., Soto M., Abanades D. R., Martin M. E., Salinas M. and Gonzalez V. M., "*A DNA aptamer population specifically detects Leishmania infantum H2A antigen*", Laboratory Investigation, **2007**, 87, (5), 409-416.
254. Romig T. S., Bell C. and Drolet D. W., "*Aptamer affinity chromatography:: combinatorial chemistry applied to protein purification*", Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, **1999**, 731, (2), 275-284.
255. Peyrin E., "*Aptamers as Ligands for Affinity Chromatography and Capillary Electrophoresis Applications*", The Aptamer Handbook, **2006**, 324-342.
256. Charles J. A. M. and McGown L. B., "*Separation of Trp-Arg and Arg-Trp using G-quartet-forming DNA oligonucleotides in open-tubular capillary electrochromatography*", Electrophoresis, **2002**, 23, (11), 1599-1604.
257. Vo T. U. and McGown L. B., "*Selectivity of quadruplex DNA stationary phases toward amino acids in homodipeptides and alanyl dipeptides*", Electrophoresis, **2004**, 25, (9), 1230-1236.
258. Vo T. U. and McGown L. B., "*Effects of G-quartet DNA stationary phase destabilization on fibrinogen peptide resolution in capillary electrochromatography*", Electrophoresis, **2006**, 27, (4), 749-756.
259. Deng Q., German I., Buchanan D. and Kennedy R. T., "*Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase*", Analytical Chemistry, **2001**, 73, (22), 5415-5421.

260. Deng Q., Watson C. J. and Kennedy R. T., "Aptamer affinity chromatography for rapid assay of adenosine in microdialysis samples collected in vivo", Journal of Chromatography A, **2003**, 1005, (1-2), 123-130.
261. Clark S. L. and Remcho V. T., "Electrochromatographic Retention Studies on a Flavin-Binding RNA Aptamer Sorbent", Analytical Chemistry, **2003**, 75, (21), 5692-5696.
262. Clark S. L. and Remcho V. T., "Open tubular liquid chromatographic separations using an aptamer stationary phase", Journal of Separation Science, **2003**, 26, (15-16), 1451-1454.
263. Murphy M. B., Fuller S. T., Richardson P. M. and Doyle S. A., "An improved method for the in vitro evolution of aptamers and applications in protein detection and purification", Nucleic Acids Research, **2003**, 31, (18), e110.
264. Connor A. C. and McGown L. B., "Aptamer stationary phase for protein capture in affinity capillary chromatography", Journal of Chromatography A, **2006**, 1111, (2), 115-119.
265. Cho S., Lee S.-H., Chung W.-J., Kim Y.-K., Lee Y.-S. and Kim B.-G., "Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker", Electrophoresis, **2004**, 25, (21-22), 3730-3739.
266. Chung W.-J., Kim M.-S., Cho S., Park S.-S., Kim J.-H., Kim Y.-K., Kim B.-G. and Lee Y.-S., "Microaffinity purification of proteins based on photolytic elution: Toward an efficient microbead affinity chromatography on a chip", Electrophoresis, **2005**, 26, (3), 694-702.
267. Rehder M. A. and McGown L. B., "Open-tubular capillary electrochromatography of bovine beta-lactoglobulin variants A and B using an aptamer stationary phase", Electrophoresis, **2001**, 22, (17), 3759-3764.
268. Rehder-Silinski M. A. and McGown L. B., "Capillary electrochromatographic separation of bovine milk proteins using a G-quartet DNA stationary phase", Journal of Chromatography A, **2003**, 1008, (2), 233-245.
269. Dick L. W., Swintek B. J. and McGown L. B., "Albumins as a model system for investigating separations of closely related proteins on DNA stationary phases in capillary electrochromatography", Analytica Chimica Acta, **2004**, 519, (2), 197-205.
270. Zhao Q., Li X.-F. and Le X. C., "Aptamer-Modified Monolithic Capillary Chromatography for Protein Separation and Detection", Analytical Chemistry, **2008**, 80, (10), 3915-3920.
271. German I., Buchanan D. D. and Kennedy R. T., "Aptamers as Ligands in Affinity Probe Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **1998**, 70, (21), 4540-4545.

272. Buchanan D. D., Jameson E. E., Perlette J., Malik A. and Kennedy R. T., "Effect of buffer, electric field, and separation time on detection of aptamer-ligand complexes for affinity probe capillary electrophoresis", Electrophoresis, **2003**, 24, (9), 1375-1382.
273. Haes A. J., Giordano B. C. and Collins G. E., "Aptamer-Based Detection and Quantitative Analysis of Ricin Using Affinity Probe Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **2006**, 78, (11), 3758-3764.
274. Pavski V. and Le X. C., "Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Using Aptamers as Probes in Affinity Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **2001**, 73, (24), 6070-6076.
275. Wang H., Lu M. and Le X. C., "DNA-Driven Focusing for Protein-DNA Binding Assays Using Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (15), 4985-4990.
276. Zhang H., Li X. F. and Le X. C., "Tunable Aptamer Capillary Electrophoresis and Its Application to Protein Analysis", Journal of the American Chemical Society, **2008**, 130, (1), 34-35.
277. Fu H., Guthrie J. W. and Le X. C., "Study of binding stoichiometries of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence polarization using aptamers as probes", Electrophoresis, **2006**, 27, (2), 433-441.
278. Zhang H., Wang Z., Li X.-F. and Le X. C., "Ultrasensitive Detection of Proteins by Amplification of Affinity Aptamers", Angewandte Chemie International Edition in English, **2006**, 45, (10), 1576-1580.
279. Huang C. C., Cao Z., Chang H. T. and Tan W., "Protein-Protein Interaction Studies Based on Molecular Aptamers by Affinity Capillary Electrophoresis", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (23), 6973-6981.
280. Berezovski M., Nutiu R., Li Y. and Krylov S. N., "Affinity Analysis of a Protein-Aptamer Complex Using Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures", Analytical Chemistry, **2003**, 75, (6), 1382-1386.
281. Berezovski M. and Krylov S. N., "Thermochemistry of Protein-DNA Interaction Studied with Temperature-Controlled Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (5), 1526-1529.
282. Gong M., Nikcevic I., Wehmeyer K. R., Limbach P. A. and Heineman W. R., "Protein-aptamer binding studies using microchip affinity capillary electrophoresis", Electrophoresis, **2008**, 29, (7), 1415-1422.
283. Burgstaller P. and Famulok M., "Isolation of RNA Aptamers for Biological Cofactors by In Vitro Selection", Angewandte Chemie International Edition in English, **1994**, 33, (10), 1084-1087.

284. Fan P., Suri A. K., Fiala R., Live D. and Patel D. J., "*Molecular Recognition in the FMN - RNA Aptamer Complex*", Journal of Molecular Biology, **1996**, 258, (3), 480-500.
285. Schneider C. and Sühnel J., "*A molecular dynamics simulation of the flavin mononucleotide-RNA aptamer complex*", Biopolymers, **1999**, 50, 287-302.
286. Abramo K. H., Dissertation, **1998**.
287. Clark E. J., Dissertation, **2000**.
288. Ravelet C., Grosset C. and Peyrin E., "*Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers*", Journal of Chromatography A, **2006**, 1117, (1), 1-10.
289. Chinnapen D. J. F. and Sen D., "*Hemin-Stimulated Docking of Cytochrome c to a Hemin-DNA Aptamer Complex*", Biochemistry, **2002**, 41, (16), 5202-5212.
290. Heegaard N. H. H., "*Applications of affinity interactions in capillary electrophoresis*", Electrophoresis, **2003**, 24, (22-23), 3879-3891.
291. Michaud M., Jourdan E., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "*A DNA aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC*", Journal of the American Chemical Society, **2003**, 125, 8672-8679.
292. Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "*Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (4), 1015-1020.
293. Vianini E., Palumbo M. and Gatto B., "*In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide*", Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2001**, 9, (10), 2543-2548.
294. Brumbt A., Ravelet C., Grosset C., Ravel A., Villet A. and Peyrin E., "*Chiral Stationary Phase Based on a Biostable L-RNA Aptamer*", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (7), 1993-1998.
295. Ravelet C., Boulkedid R., Ravel A., Grosset C., Villet A., Fize J. and Peyrin E., "*A L-RNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds*", Journal of Chromatography A, **2005**, 1076, (1-2), 62-70.
296. Dalgliesh C. E., "*The optical resolution of aromatic amino acids on paper chromatograms*", Journal of the Chemical Society, **1952**, 137, 3940-3952.





*RESULTATS ET  
DISCUSSION*

**A  
PTAMER**



Cette partie regroupe les principaux résultats, obtenus au cours de ma thèse, qui ont fait l'objet de cinq publications proposées dans ce manuscrit.

Cette partie sera traitée sous la forme de deux chapitres :

- Dans un premier chapitre, les études réalisées par micro-CLHP seront exposées, en mettant l'accent sur les différentes stratégies d'immobilisation de l'aptamère développées au laboratoire et durant cette thèse.
- Dans un deuxième chapitre, la possibilité d'utiliser ce type de sélecteur chiral « sur mesure » en électrophorèse capillaire sera présentée.





*Chapitre I- Etudes des  
aptamères par micro-  
CLHP*

# A PTAMER



## *Publication N°1*

**Etude des propriétés  
énantiosélectives d'un nouvel  
aptamère, en série ARN,  
récemment sélectionné pour  
son affinité pour l'histidine**

**APTAMER**



Au laboratoire, nous étudions les propriétés énantiosélectives des aptamères en série ADN ou ARN sélectionnés contre un énantiomère cible afin de développer de nouvelles phases stationnaires chirales (PSCs) en micro-CLHP.

Un aptamère ARN en série D, récemment choisi pour son affinité pour la L-histidine [1] a particulièrement attiré notre attention. En effet, cet aptamère de 40 nucléotides possède une haute affinité pour la L-histidine ( $K_d \sim 10 \mu\text{M}$ ) et une énantiosélectivité importante ( $\alpha = 1000$ ). Afin de créer une nouvelle PSC aptamère, la stratégie image-miroir a été appliquée et un aptamère ARN en série L, biotinylé en 5', a été immobilisé par l'intermédiaire d'un lien biotine-streptavidine sur un support chromatographique selon la procédure décrite au chapitre précédent (cf § IV-3-3-1). Par la suite, l'effet de la modification de divers paramètres chromatographiques (pH et concentration en magnésium de la phase mobile, température de la colonne) sur la rétention de la molécule cible a été évalué. Les conditions optimales pour la séparation chirale des énantiomères de l'histidine ont été déterminées.



# Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine L-RNA aptamer microbore column<sup>☆</sup>

Josephine Ruta, Catherine Grosset, Corinne Ravelet, Jennifer Fize,  
Annick Villet, Anne Ravel, Eric Peyrin<sup>\*</sup>

*Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607,  
Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie de Grenoble, Avenue de Verdun, 38240 Meylan, France*

Received 9 May 2006; accepted 17 June 2006  
Available online 25 July 2006

## Abstract

In this paper, we report a new anti-amino acid aptamer chiral stationary phase (CSP). The enantiomers of histidine were separated using an immobilized histidine-specific L-RNA aptamer (40-mer) and an aqueous buffer as mobile phase. The effects of the variation of different operating parameters, including the mobile phase pH and the MgCl<sub>2</sub> concentration as well as the column temperature, on the solute retention were assessed. The results suggested that (i) the protonated form of histidine was involved in the stereospecific RNA binding and (ii) Mg<sup>2+</sup> was essential for the target enantiomer binding to the specific aptamer sites. From a practical point of view, it appeared that the baseline resolution in a minimum analysis time can be achieved at a column temperature of 35 °C for an eluent containing 10 mM of MgCl<sub>2</sub>, pH 5.5.  
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Aptamer; Histidine; Chiral separation

## 1. Introduction

The detection and quantification of amino acid enantiomers is important in many areas of science. For example, it is now well established that D-amino acids, found at a low level in higher order organisms in the form of free amino acids, peptides and proteins, can play a preponderant role in biochemistry and physio-pathology: D-serine functions as an important neuromodulator, D-aspartate is implied in developmental and endocrine functions and D-arginine plays a role in the urea cycle [1]. In addition, in forensic science, racemization methods which are based on the age-dependent non-enzymatic changes of L-form amino acids to D-form are one of the most reliable and accurate methods for the estimation of chronological age [2]. Furthermore, the enantiomeric ratio of amino acids can be used as a reliable parameter to assess food quality [3]. Therefore, it is appeared of very great interest to develop efficient ana-

lytical methodologies to separate and quantify the amino acid enantiomers. A variety of chiral selectors such as crown-ethers, macrocyclic antibiotics and ligand-exchange selectors have been successfully used for the HPLC and CE enantiomeric separation of native amino acids.

Single-stranded oligonucleotides obtained from very large combinatorial libraries (DNA or RNA aptamers) have been used successfully as affinity stationary phases in liquid chromatography (LC) or capillary electrochromatography (CEC) for the purification/separation of a variety of molecules, from compounds as large as proteins [4] to compounds as small as amino acids, adenosine and derivatives or flavin mononucleotide [5–7]. The enantioselective properties of DNA or RNA aptamers selected against a target enantiomer were accounted by our group to create a new class of target-specific chiral selectors for use as chiral stationary phases (CSPs) in HPLC or additives in capillary electrophoresis [8–12]. The aptamer CSPs were developed for the chromatographic resolution of the racemates of different analytes [8,9]. At the present time, the anti-amino acid aptamer CSPs have been designed for the enantiomeric separation of various native amino acids, including aromatic species (tyrosine, tryptophan, etc.) [10] and arginine [11].

<sup>☆</sup> This paper was presented at the 10th International Symposium on Biochromatography, Lille, France, 26–28 April 2006.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Tel.: +33 4 76 04 10 33; fax: +33 4 76 04 10 07.  
E-mail address: [eric.peyrin@ujf-grenoble.fr](mailto:eric.peyrin@ujf-grenoble.fr) (E. Peyrin).

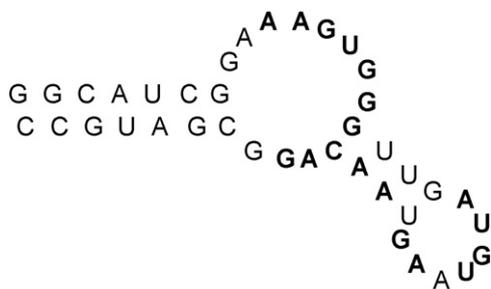


Fig. 1. Sequence and secondary structure of the 40-mer RNA aptamer used as chiral selector. The consensus sequence is shown in bold [12].

In this paper, we describe a new anti-amino acid aptamer CSP which was able to separate the enantiomers of histidine. The sequence of a 40-mer RNA aptamer (Fig. 1), specifically selected against L-histidine, was used [13] and the mirror-image strategy, previously described to design biostable RNA CSPs, was applied [10,11]. The anti-histidine aptamer was immobilized on a chromatographic support via a biotin-streptavidin bridge and the RNA modified particles were packed into a microbore column. The effects of various chromatographic parameter changes (mobile phase pH and magnesium concentration, column temperature) on the solute retention were evaluated and the optimal conditions for the chiral separation were assessed.

## 2. Experimental and methods

### 2.1. Reagents and materials

Histidine enantiomers were obtained from Sigma–Aldrich (Saint–Quentin, France). Hepes, NaCl and MgCl<sub>2</sub> were supplied by Sigma–Aldrich. Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge. L-RNA oligonucleotide was synthesized and 5'-biotinylated by CureVac (Tubingen, Germany). Biotin phosphoramidite containing a 16 atom spacer arm based on triethylene glycol was used for the aptamer biotinylation. The oligoribonucleotide was purified by HPLC. The streptavidin POROS bulk media (20 μm polystyrene particles) was purchased from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France).

### 2.2. Stationary phase preparation and column packing

Prior to immobilization, the biotinylated aptamer was renatured by heating oligonucleotide at 90 °C for 5 min in an aqueous buffer (50 mM Hepes buffer, 250 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> adjusted at pH 7.0) used as the *in vitro* selection buffer and left to stand at room temperature for 30 min. The immobilization of the aptamer was attained by mixing 60 nmol of oligonucleotide (in the aqueous buffer) per 1000 μl of the streptavidin media slurry during 3 h at ambient temperature. Unbound RNA was removed by washing with the same buffer. The amount of oligonucleotide coupled to the chromatographic support was estimated by subtracting the UV absorbance, at 260 nm, of the unbound RNA solution from the initial solution. It was equal to 16 nmol of biotinylated oligonucleotide bound per 100 μl of sup-

port media. The RNA modified particles were packed in-house into a PEEK microbore column (260 mm × 0.80 mm) using a previously described slurry-packing procedure [9]. When not in use, the column was stored in the aqueous buffer containing sodium azide (0.05%).

### 2.3. Control stationary phase

Non-modified streptavidin particles were also packed into a PEEK microbore column of same dimensions (260 mm × 0.80 mm) as a control stationary phase, following the procedure reported previously. It has been shown that streptavidin is able to discriminate the enantiomers of some analytes such as warfarin, trimipramine or adenosine [14,15]. In order to evaluate possible enantioselective properties of the immobilized streptavidin toward the solute, a racemic mixture of histidine was injected onto a microbore column packed with non-modified streptavidin POROS particles. The enantiomers of histidine were not separated and were not retained by the column. This result indicates that the streptavidin chromatographic support was roughly inert toward the various compounds and did not affect the chiral recognition.

### 2.4. Apparatus

The HPLC system consisted of a LC Shimadzu pump 10AT (Sarreguemines, France), a Shimadzu SIL-10AD auto injector, a Shimadzu SPD-10A UV–vis detector (detection at 217 nm), a Shimadzu SCL-10A system controller with Class-VP software (Shimadzu) and an oven Igloocil (Interchim).

### 2.5. Chromatographic parameters

Solute samples were prepared in the mobile phase and injected (100 nl) in triplicate. The mobile phase flow rate was 15 μl/min for the L-RNA CSP and the control streptavidin column (non-modified streptavidin particles). The retention factor and the efficiency of the column were estimated through the calculation of the first and second moments of the peaks, as previously described [16]. The resolution  $R_s$  was calculated using the following relation:  $R_s = [2(t_{R2} - t_{R1})]/(w_2 + w_1)$ , where  $t_R$  is the retention time determined at the peak apex and  $w$  is the peak width. The asymmetry factor  $A_s$  was determined by calculating the width ratio of the second (or right) part of the peak over the first (or early) part of the peak at 10% of the peak height.

## 3. Results and discussion

### 3.1. The oligonucleotidic sequence used in this study

The minimal sequence of the 40-mer RNA aptamer used in the present work was obtained via a SELEX procedure directed against L-histidine (see Fig. 1 for the secondary structure). This oligonucleotide is known to strongly discriminate between L- and D-histidine [12]. The dissociation constants, determined by isocratic competitive affinity chromatography, are in the

micromolar range:  $K_d = \sim 10 \mu\text{M}$  for the L-histidine-aptamer association and  $\sim 10,000 \mu\text{M}$  for the D-histidine-aptamer association [13]. As previously designed [11], the mirror-image approach was applied to create a biostable L-RNA CSP in order to use such aptamer in a routine chromatographic context.

### 3.2. Enantioselective properties of the anti-D-histidine L-RNA stationary phase

In the first stage of this work, the chromatographic properties of the L-RNA aptamer stationary phase were evaluated at ambient temperature ( $25^\circ\text{C}$ ) and using as mobile phase an aqueous buffer similar to that prepared for the SELEX procedure (50 mM HEPES buffer, 250 mM NaCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  adjusted at pH 7.0). The sample was injected at an enantiomer concentration of 2 mM, which corresponded to the lowest concentration allowing the target detection. As expected from the data reported by Yarus and co-workers [13], the L-RNA CSP was able to discriminate the enantiomers of histidine, the D-enantiomer being more retained than the L-enantiomer: the retention factors for D-histidine was  $0.98 \pm 0.04$  while the non-target enantiomer was weakly retained by the column ( $0.19 \pm 0.05$ ). This is consistent with the principle of chiral inversion, i.e., the mirror-image of the “natural” aptamer recognizes with the same affinity and specificity the mirror image of the target [10,11].

### 3.3. Effects of chromatographic condition changes on the solute retention

Firstly, experiments were performed to analyze the role of the eluent pH. As the  $\text{p}K_a$  of histidine is known to be around 6.0, the mobile phase pH was varied between 5.5 and 7.5 (for a  $25^\circ\text{C}$  column temperature) in order to evaluate the possible role of the solute protonation on the solute retention. The  $k_L$  values varied very slightly, if any, over the eluent pH range. In contrast, the target retention factor was roughly constant for the pH values of 5.5 and 6.0 and decreased significantly as the eluent pH was increased from 6.5 and 7.5. No chiral resolution was obtained for an eluent pH equal to 7.5. Fig. 2 shows the variation of the solute retention factor as a function of the eluent pH. Because the  $k_D$  value increased as pH dropped near the known  $\text{p}K_a$  of histidine, it is suggested that the protonated form of histidine was involved in the stereospecific RNA binding and then electrostatic interactions played a role in the target association with the aptamer CSP. Such behavior is in accordance with the previous results reported by Majerfeld et al. [13]. It can be noted that the mobile phase pH change could also modify the active site conformation and/or the binding capacity of the aptamer CSP.

Further experiments were conducted at various column temperatures ( $20\text{--}35^\circ\text{C}$ ), under different mobile phase pH conditions. The data revealed that, whatever the mobile phase pH, an increase in the column temperature was responsible for a decrease in the target retention factor while the  $k_L$  value did not change significantly. As an example, Fig. 3 presents the variation of the retention factor for D- and L-histidine in relation to the column temperature, for a mobile phase pH value equal to 6.0. As previously reported [10], the target enantiomer behavior could be

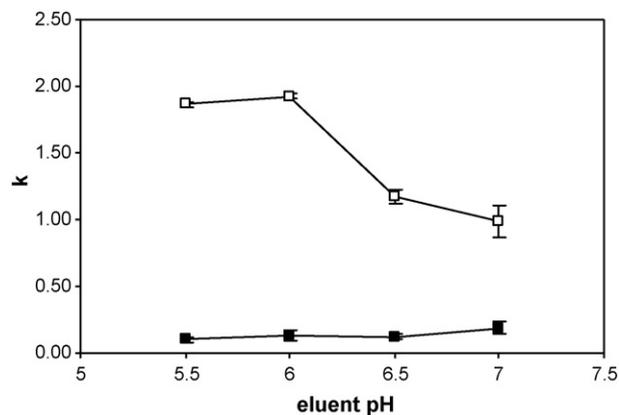


Fig. 2. Plots of  $k$  vs. mobile phase pH for D-histidine (open symbol) and L-histidine (filled symbol). Column: 260 mm  $\times$  0.80 mm (i.d.); mobile phase: HEPES buffer 50 mM, NaCl 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM; column temperature:  $25^\circ\text{C}$ ; injected concentration: 2 mM; injection volume: 100 nl; flow rate:  $15 \mu\text{l}/\text{min}$ ; detection at 217 nm.

explained by the involvement of specific interactions which were enthalpically driven and/or a temperature-dependent change of the conformation/binding capacity of the aptamer CSP.

The effects of the eluent  $\text{MgCl}_2$  concentration on the target retention were also analyzed. It is well established that divalent cations such as  $\text{Mg}^{2+}$  are particularly important for inducing and stabilizing RNA tertiary structural motifs [17]. So, in order to evaluate the role of the three-dimensional conformation of the RNA ligand on the target recognition, the  $\text{MgCl}_2$  concentration in the aqueous eluent was varied from 10 to 0 mM. Fig. 4 presents the  $k$  versus  $\text{MgCl}_2$  concentration plot for the two enantiomers, at a column temperature of  $20^\circ\text{C}$  and for an eluent pH of 6.5. The target retention factor was weakly affected, if any, as the mobile phase magnesium concentration decreased from 10 to 2 mM. However, when the eluent  $\text{MgCl}_2$  concentration further decreased, a strong reduction of the target retention was observed. On the other hand, the L-histidine retention factor did not change significantly when the eluent salt concentration

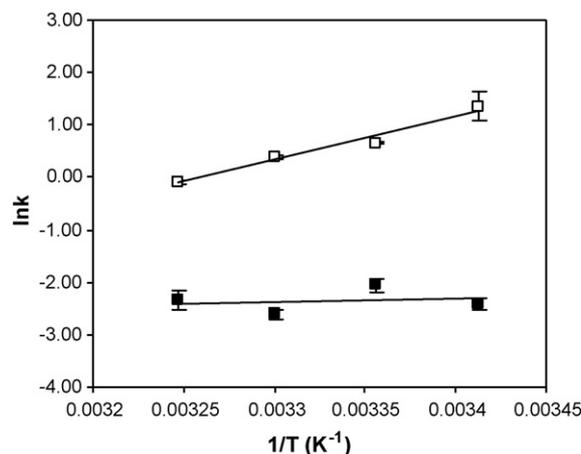


Fig. 3. Plots of  $\ln k$  vs.  $1/T$  for D-histidine (open symbol) and L-histidine (filled symbol). Column: 260 mm  $\times$  0.80 mm (i.d.); mobile phase: HEPES buffer 50 mM, NaCl 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pH 6.0; injected concentration: 2 mM; injection volume: 100 nl; flow rate:  $15 \mu\text{l}/\text{min}$ ; detection at 217 nm.

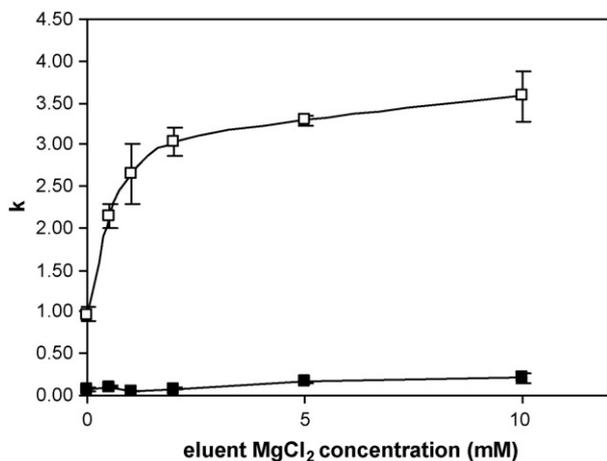


Fig. 4. Plots of  $k$  vs. mobile phase  $\text{MgCl}_2$  concentration for D-histidine (open symbol) and L-histidine (filled symbol). Column: 260 mm  $\times$  0.80 mm (i.d.); mobile phase: Hepes buffer 50 mM, NaCl 250 mM, pH 6.5; column temperature: 20 °C; injected concentration: 2 mM; injection volume: 100 nl; flow rate: 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; detection at 217 nm.

was modified. Such behavior seems to indicate that a change in the tertiary structure of the RNA occurred at low  $\text{Mg}^{2+}$  concentration, affecting the target affinity for the RNA through a modification of the three-dimensional shape of the aptamer specific site. This is in accordance with previous results obtained for other aptamer-ligand associations [5,18]. Alternatively, a modification of the affinity constant or the RNA binding capacity could be also involved in the reduction of the target enantiomer retention factor.

#### 3.4. Efficiency, peak asymmetry and chiral resolution

For all the pH or the magnesium concentration conditions, low efficiency and significant peak asymmetry were typically observed for the low temperature range (20–25 °C). As an example, at a pH of 5.5, an  $\text{MgCl}_2$  concentration of 10 mM and a column temperature equal to 25 °C,  $N_L = 144 \pm 42$ ,  $N_D = 31 \pm 5$ ,  $A_{sL} = 2.67 \pm 0.40$  and  $A_{sD} = 6.27 \pm 0.25$ . Such poor performances can result, at least in part, from extra-column band-broadening effects, the high particle diameter used (20  $\mu\text{m}$ ) and concentration overload of binding sites (non-linear effects). Furthermore, the band-broadening and the peak distortion were higher for D-histidine. This indicates that slower mass transfer kinetics were involved in the target-aptamer association [8,10]. Moreover, under the same pH and magnesium conditions, the peak shape and efficiency can be improved for the D-enantiomer when the column temperature was increased ( $N_D = 94 \pm 8$ ,  $A_{sD} = 3.45 \pm 0.60$  at  $T = 35$  °C). On the other hand, the efficiency performances for the L-enantiomer did not change significantly with the temperature increasing ( $N_L = 179 \pm 50$ ,  $A_{sL} = 2.23 \pm 0.25$  at  $T = 35$  °C). The desorption kinetics of the target from the specific binding sites of the aptamer CSP were expected to become faster as the temperature increased so that efficiency and peak shape were improved [19].

Concerning the chiral resolution, it is important to point out that such increase in the efficiency performances was able to

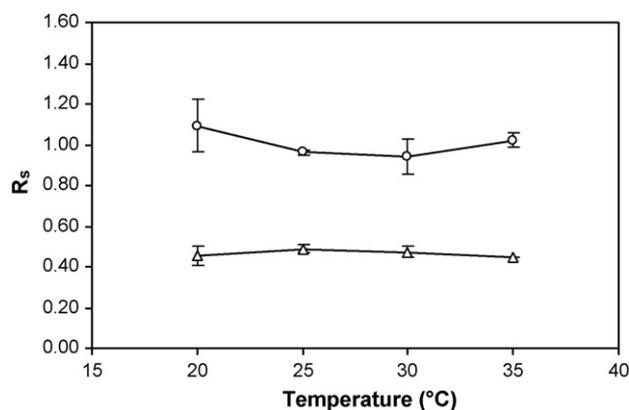


Fig. 5. Plots of  $R_s$  vs. the column temperature at a mobile phase pH of 7.0 (triangle) and 5.5 (circle). Column: 260 mm  $\times$  0.80 mm (i.d.); mobile phase: Hepes buffer 50 mM, NaCl 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM; injected concentration: 2 mM; injection volume: 100 nl; flow rate: 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; detection at 217 nm.

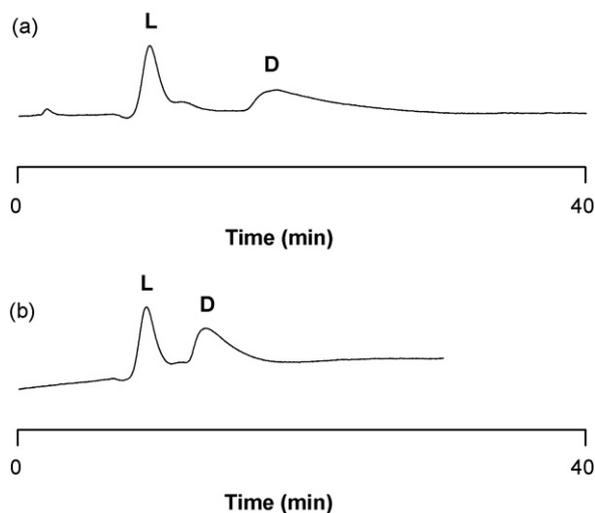


Fig. 6. Chromatograms obtained when a racemic mixture of histidine was injected onto the histidine-specific L-RNA aptamer CSP. Column: 260 mm  $\times$  0.80 mm (i.d.); mobile phase: Hepes buffer 50 mM, NaCl 250 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, pH 5.5; injected concentration: 2 mM; injection volume: 100 nl; flow rate: 15  $\mu\text{l}/\text{min}$ ; detection at 217 nm. (a)  $T = 25$  °C; (b)  $T = 35$  °C.

counterbalance the temperature-dependent reduction of the target retention factor. This is exemplified in Fig. 5 for two mobile phase pH values: the  $R_s$  value did not vary significantly when the temperature increased from 20 to 35 °C. So, from a practical point of view, the temperature increase allowed to reduce the analysis time without alteration of the resolution. Fig. 6 illustrates such column temperature effects on the chiral separation for a mobile phase pH 5.5, at 10 mM  $\text{MgCl}_2$ .

#### 4. Conclusion

In this paper, we report a new L-RNA aptamer CSP which is able to separate the histidine enantiomers. The effects of some chromatographic parameters on the solute retention have been evaluated. The results suggest that (i) the protonated form of histidine is involved in the stereospecific RNA binding and (ii)  $\text{Mg}^{2+}$  is essential for the target binding to the specific aptamer

sites. In addition, it appears that both the separation of the histidine enantiomers and the analysis time can be easily modulated by varying the mobile phase nature and the column temperature. The baseline resolution in a minimum analysis time can be achieved at a column temperature of 35 °C for an eluent containing 10 mM of MgCl<sub>2</sub>, pH 5.5.

## References

- [1] S.A. Fuchs, R. Berger, L.W.J. Klomp, T.J. de Koning, *Mol. Genet. Metab.* 85 (2005) 168.
- [2] G. Lubec, B. Lubec, *Amino Acids* 4 (1993) 1.
- [3] R. Marchelli, A. Dossena, G. Palla, *Trends Food Sci. Technol.* 7 (1996) 113.
- [4] T.S. Romig, C. Bell, D.W. Drolet, *J. Chromatogr. B* 731 (1999) 275.
- [5] Q. Deng, I. German, D. Buchanan, R.T. Kennedy, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5415.
- [6] R.B. Kotia, L. Li, L.B. McGown, *Anal. Chem.* 72 (2000) 827.
- [7] S.L. Clark, V.T. Remcho, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1451.
- [8] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8672.
- [9] M. Michaud, E. Jourdan, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, *Anal. Chem.* 76 (2004) 1015.
- [10] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 62.
- [11] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1993.
- [12] J. Ruta, C. Ravelet, C. Grosset, J. Fize, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, *Anal. Chem.* 78 (2006) 3032.
- [13] I. Majerfeld, D. Puthenvedu, M. Yarus, *J. Mol. Evol.* 61 (2005) 226.
- [14] Y. Tanaka, S. Terabe, *Chromatographia* 49 (1999) 489.
- [15] C. Ravelet, M. Michaud, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, E. Peyrin, *J. Chromatogr. A* 1036 (2004) 155.
- [16] A.M. Talbert, G.E. Tranter, E. Holmes, P.L. Francis, *Anal. Chem.* 74 (2002) 446.
- [17] P. Brion, E. Westhof, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26 (1997) 113.
- [18] F.M. Jucker, R.M. Philips, S.A. McCallum, A. Pardi, *Biochemistry* 42 (2003) 2560.
- [19] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 311.



Une nouvelle phase stationnaire chirale aptamère capable de séparer les énantiomères de l'histidine a été créée et étudiée. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont montré que la forme protonnée de l'histidine semble impliquée dans la fixation stéréospécifique à l'aptamère, observation déjà réalisée par Majerfeld et ses collaborateurs lors de la sélection de l'aptamère [1]. En outre, le rôle essentiel, bien connu [2-5], des cations divalents (notamment le  $Mg^{2+}$ ) pour stabiliser la conformation active des aptamères a été démontré dans cette étude. Enfin, il apparaît que les performances chromatographiques et le temps d'analyse peuvent être modulés en modifiant la nature de la phase mobile et la température de la colonne.

De nombreuses PSCs aptamères ont été créées, au laboratoire, en utilisant la stratégie d'immobilisation par l'intermédiaire d'un lien biotine streptavidine (*tableau 7*). Bien que ce lien soit connu pour maintenir les propriétés de fixation des ligands immobilisés [2], il paraît, cependant, important de noter que ce type d'immobilisation présente un certain nombre de limitations pour une utilisation en chromatographie :

- Bien que le lien soit très fort en solution, la constante d'association entre la biotine et la streptavidine est réduite lorsque la protéine est immobilisée sur une surface [6].
- En outre, la dissociation du complexe biotine-streptavidine peut se produire à des températures relativement basses dans des solutions aqueuses ou dans un milieu contenant une faible concentration en sels [7].
- De plus, comme cela est classiquement observé pour les protéines, la streptavidine immobilisée peut être irréversiblement dénaturée sous des conditions standards de chromatographie à polarité de phase inversée [8] (pourcentage maximum en solvant organique testé : 10% [9]).

Il apparaît donc d'un grand intérêt de développer une nouvelle stratégie d'immobilisation des aptamères afin de créer des PSCs aptamères beaucoup plus robustes, utilisables dans des conditions plus extrêmes, afin d'étendre leur domaine d'utilisation. Ceci a été l'objectif de la deuxième publication.



## *Publication N°2*

**Développement d'une  
stratégie d'immobilisation  
covalente pour créer des  
PSCs aptamères plus  
robustes**

**APTAMER**



Afin de développer une stratégie d'immobilisation covalente des aptamères, nous avons utilisé le support commercial (Macrosphère-WCX, Alltech Assoc.) synthétisé par Jarrett et ses collaborateurs [10] et nous nous sommes inspirés de leur protocole de couplage précédemment employé faisant intervenir une activation en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS) et de (1-éthyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDAC). Cette procédure d'immobilisation a été appliquée à un aptamère ADN liant spécifiquement la D-adénosine [11]. Cet aptamère avait été préalablement immobilisé d'une manière non covalente (lien biotine-streptavidine) et étudié par Michaud *et al* en 2004 [12].

Au cours de cette étude, nous avons caractérisé les propriétés de cette nouvelle PSC aptamère grâce à une analyse frontale. Les effets de la variation de différents paramètres chromatographiques sur la rétention, l'énantioséparation et la résolution des énantiomères de l'adénosine ont été analysés. Enfin, la stabilité de la colonne et diverses conditions de stockage ont été évaluées.



# Covalently bonded DNA aptamer chiral stationary phase for the chromatographic resolution of adenosine

Joséphine Ruta · Corinne Ravelet · Jérôme Désiré ·  
Jean-Luc Décout · Eric Peyrin

Received: 21 June 2007 / Revised: 7 August 2007 / Accepted: 9 August 2007 / Published online: 26 September 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** In this work, a target-specific aptamer chiral stationary phase (CSP) based on the oligonucleotidic selector binding to silica particles through a covalent linkage was developed. An anti-D-adenosine aptamer was coupled, using an in-situ method, by way of an amide bond to macroporous carboxylic acid based silica. Frontal chromatography analysis was performed to evaluate the column properties, i.e., determination of the stationary phase binding capacity and the dissociation constant of the target-immobilized aptamer complex. It was found that such covalent immobilization was able to maintain the aptamer binding properties at a convenient level for an efficient enantioseparation. Subsequently, the separation of adenosine enantiomers was investigated under different operating conditions, including changes in the eluent's ionic strength and the proportion of organic modifiers as well as column temperatures. It was demonstrated that, under various conditions of use and storage, the present CSP was stable over time.

**Keywords** Chiral stationary phase · Aptamers · Adenosine enantiomers

## Introduction

The development of chiral selectors (CSs) specifically designed against the racemate to be resolved (target-specific CSs) has received much attention in the last decade. Target-specific CSs have been mainly designed using molecular

imprinting technology, the production of enantioselective antibodies or a combinatorial strategy. Two categories of combinatorial methods have been described for the generation and the development of specific CSs [1]. The combinatorial strategy from a small library of low molecular weight selectors was the first combinatorial method described. More recently, a very efficient combinatorial approach from a very large library of single-stranded oligonucleotides has allowed the creation of a new class of CSs based on nucleic DNA and RNA aptamers. Nucleic acid aptamers have been successfully used as chiral stationary phases (CSPs) and chiral additives for high performance liquid chromatography (HPLC) or capillary electrophoresis applications [2–8].

At the present time, different aptamer-based CSPs have been developed using specific oligonucleotides bound to the chromatographic particles via a noncovalent biotin–streptavidin bridge [2–6]. Despite the simplicity and the rapidity of such an immobilization method, this kind of binding procedure presents, in terms of reusability and column lifetime, some major drawbacks for practical chromatographic use. Although the streptavidin–biotin link is very strong in solution, the magnitude of the streptavidin–biotin binding constant is greatly reduced when the protein is bound to a surface [9]. In addition, dissociation of the biotin–streptavidin complex can occur at relatively low temperatures, notably in nonionic aqueous solutions or in a medium containing a low salt concentration [10]. Furthermore, as classically observed with proteins, the immobilized streptavidin can be also irreversibly denatured under standard reversed-phase chromatographic conditions, for example, by using a mobile phase containing organic modifiers [11]. So, it appears of great interest to use another kind of oligonucleotide immobilization strategy in order to design more robust aptamer-based CSPs.

J. Ruta · C. Ravelet · J. Désiré · J.-L. Décout · E. Peyrin (✉)  
Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063,  
Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607,  
Université Joseph Fourier-CNRS, 3804 Grenoble, France  
e-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr

Various immobilization procedures have been described to link covalently macromolecular receptors such as proteins or nucleic acids to silica surfaces [11–16]. Jarrett et al. [15, 16] have notably described a coupling procedure involving the immobilization of ligands containing primary amino groups on macroporous carboxylic acid based silica by way of an amide bond. It was demonstrated that such a technique (1) offers a more efficient and a faster coupling than those involving the use of glycidyoxypropyl-silica and (2) is useful for an in situ coupling procedure [15]. In this paper, we evaluate a target-specific aptamer CSP based on the selector binding to silica particles through this kind of covalent linkage. A 5'-amino-modified anti-D-adenosine DNA aptamer, previously used as a target-specific CS [3], was coupled to carboxylic acid based silica using an in situ method. The resulting CSP was subjected to a frontal analysis in order to characterize the properties of the stationary phase. The effects of various chromatographic parameter changes on the adenosine retention, apparent enantioselectivity and resolution were analyzed. The storage conditions and the column stability over time were also evaluated.

## Experimental

### Reagents and materials

D-Adenosine was obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). *N*-Hydroxysuccinimide (NHS) and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC) were supplied by Accros Organics (Noisy le Grand, France). L-Adenosine was purchased from Chemgenes (Ashland, USA). Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub> and thiourea were supplied by Prolabo (Paris, France). Methanol, ethanol and 2-propanol (HPLC grade) were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). HPLC water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse-osmosis cartridge. Macrosphere-WCX carboxylic acid based silica (300-Å pore size, 7-µm particle diameter, 500 µmol of free carboxylate per gram of silica) was supplied by Alltech (Templemars, France). Such carboxylic acid based silica contains an eight-atom chain terminating in a carboxyl group, allowing adequate spacing between coupled ligands and the support surface (Fig. 1a). The 5'-amino-modified DNA oligonucleotide (sequence 5'-ATTATACCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGGTA TAAT; note, ATTATA and TAATAT sequences were inserted at the 5' and 3' ends of the highly conserved sequence) with a C12 spacer arm (Fig. 1b) was synthesized and HPLC-purified by Bioneer (Buckingham, UK). Unless otherwise stated, the mobile phase used was constituted of

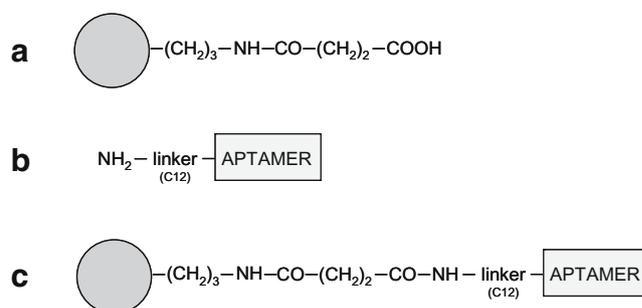
20 mM phosphate buffer, 25 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> (adjusted to pH 6.0).

### Apparatus

The HPLC system consisted of a Shimadzu 10AT liquid chromatograph pump (Sarreguemines, France), a Shimadzu SIL-10AD autoinjector, a Shimadzu SPD-10A UV-vis detector (detection at 260 nm), a Shimadzu SCL-10A system controller with Class-VP software (Shimadzu) and an Igloocil oven (Interchim). The column temperature was fixed at 24 °C, unless otherwise specified.

### Column preparation

Firstly, PEEK microbore columns (200 mm×1.0 mm) were packed in-house from a water-methanol (50:50, v/v) slurry of native WCX silica particles, as previously described [3]. Subsequently, synthesis of the CSP was accomplished inside the prepacked column. The previously reported coupling protocol [16] was slightly modified for the aptamer immobilization. Briefly, the column was placed in the chromatograph and washed with water and 2-propanol. For the silica activation, 200 mg NHS and 330 mg EDAC were then applied to the column at a flow rate of 50 µL/min using 2-propanol as the mobile phase. The resulting activated silica column was washed with 2-propanol, methanol, water and phosphate buffer (400 mM, pH 7.2). Prior the coupling procedure, the 5'-amino-modified DNA aptamer was renatured by heating oligonucleotide at 70 °C for 5 min in the buffer and was left to stand at room temperature for 30 min. The aptameric solution (90 nmol) was then circulated through the column at a low flow rate for about 100 min at room temperature to allow the ligand coupling (Fig. 1c). The column was then washed extensively with buffer to allow the *N*-hydroxysuccinimidyl esters to hydrolyze back to unreactive support. When not in use,



**Fig. 1** (a) Macrosphere carboxylic acid based silica, (b) 5'-amino-modified aptamer and (c) DNA aptamer coupled to derivatized silica by an amide bond (activation using *N*-hydroxysuccinimide and 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride; see the text)

the column was stored in a buffer containing sodium azide (0.05%) or in various buffer–organic solvent mixtures.

#### Determination of the binding parameters by frontal analysis chromatography

Frontal analysis chromatography was used to quantitatively evaluate column loading and the dissociation constant ( $K_d$ ) between D-adenosine and the immobilized DNA aptamer. This method is based on the following relationships between  $K_d$  and the chromatographic parameters, assuming a langmuirian behavior:

$$(V_R - V_M) = \frac{m_L}{K_d + C}, \quad (1)$$

where  $m_L$  is the total amount of active binding sites of aptamer in the column,  $V_M$  is the column void volume and  $V_R$  is the volume required to elute a continuously applied concentration of D-adenosine ( $C$ ) from the column. Rearrangement of the above equation gives the following form:

$$\frac{1}{C(V_R - V_M)} = \frac{K_d}{m_L} \frac{1}{C} + \frac{1}{m_L}. \quad (2)$$

According to Eq. 2, a plot of  $1/[C(V_R - V_M)]$  versus  $1/C$  should yield a straight line with slope corresponding to  $K_d/m_L$  and ordinate intercept corresponding to  $1/m_L$ .

The interaction of D-adenosine with the immobilized aptamer was quantified by subjecting solutions of D-adenosine ( $C=5\text{--}50\ \mu\text{M}$ ) on the column using an aqueous buffer as the mobile phase. The injection system, equipped with a 530- $\mu\text{L}$  sample loop, was switched to the inject position for the entire chromatogram. The experiments were carried out at a flow rate of 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , where local equilibrium conditions were established. The first derivative for the advancing elution profile of the plateau was determined to obtain the mean elution volume of the boundary ( $V_R$ ).  $V_M$  was determined similarly using thiourea as a noninteracting solute. Here, it is important to point out that the adenosine enantiomers did not present any significant nonspecific interaction with a control column (of the same dimensions and packed with unmodified silica particles), i.e., solutes were eluted in the void volume.

#### Determination of the chromatographic parameters

Solute samples were prepared in the mobile phase (0.1 mM of each enantiomer) and injected (100 nL) in triplicate. The mobile phase flow rate was 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ . The apparent retention factor  $k$  was determined using the following relation:

$$k = (t_R - t_0)/t_0, \quad (3)$$

where  $t_R$  is the retention time of the enantiomer and  $t_0$  the retention time of the unretained species (thiourea). Although

this is not the most accurate approach for estimating the retention factor,  $t_R$  was determined through the apex of the solute peak. This simplification was justified because no thermodynamic or kinetic data were extracted from this chromatographic parameter. The retention times and column void time were corrected for the extra-column void time. They were assessed by injections of solute onto the chromatographic system when no column was present. The apparent enantioselectivity  $\alpha$  was then calculated as follows:

$$\alpha = k_2/k_1, \quad (4)$$

where  $k_2$  is the retention factor for the more retained enantiomer (D-adenosine) and  $k_1$  is the retention factor for the less retained enantiomer (L-adenosine). The efficiency of the column was characterized by estimating the number of theoretical plates  $N$  as follows:

$$N = 5.54(t_R/w_{50})^2, \quad (5)$$

where  $w_{50}$  is the peak width at half-height. The asymmetry factor  $A_s$  was determined by calculating the ratio of the second (or right part) of the peak to the first (or early part) of the peak at 10% of the peak height. The chromatographic resolution  $R_s$  was calculated using the following relation:

$$R_s = [1.18(t_{R2} - t_{R1})]/(W_{50(1)} + W_{50(2)}), \quad (6)$$

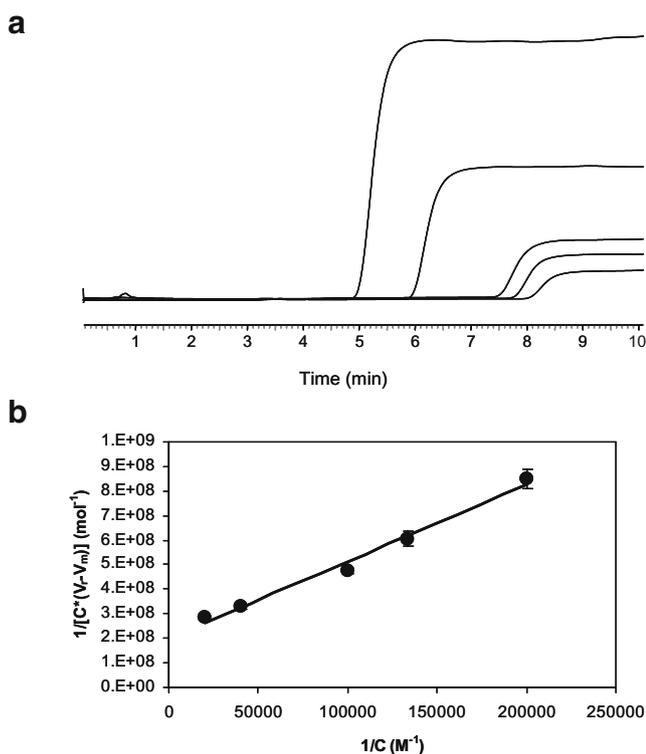
where the subscripts 1 and 2 refer to the first (nontarget) and last (target) enantiomers eluted.

## Results and discussion

### Evaluation of the properties of the covalently bonded anti-D-adenosine DNA CSP

In the first stage of this work, the properties of the covalently bonded DNA aptamer CSP were evaluated at ambient temperature (24 °C) and using as the mobile phase an aqueous buffer similar to that prepared for the SELEX procedure (20 mM phosphate buffer, 25 mM KCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$  adjusted to pH 6.0). Frontal analysis chromatography was carried out in order to determine the active (available) binding sites ( $m_L$ ) and the dissociation constant for the D-adenosine-immobilized aptamer association ( $K_d$ ). Fig. 2 shows representative frontal analysis curves as well as the plot of  $1/C(V_R - V_M)$  versus  $1/C$  ( $R=0.994$ ).

Using Eq. 2, we found  $m_L$  was to be  $5.3 \pm 0.5$  nmol for a bed volume of 157  $\mu\text{L}$  (column dimensions 20 cm  $\times$  1-mm, inner diameter). Using an immobilization strategy based on the biotin–streptavidin bridge, Deng et al. [17] previously reported an anti-adenosine aptamer stationary phase characterized by a binding capacity of about 20 nmol for a bed volume of 100  $\mu\text{L}$ . The lower binding capacity obtained here could be due to a coupling efficiency which would be



**Fig. 2** (a) Frontal analysis chromatography elution profiles for D-adenosine on the adenosine-specific DNA aptamer chiral stationary phase (CSP) ( $C=5\text{--}50\ \mu\text{M}$ , from right to left). Column,  $200\ \text{mm}\times 1.0\text{-mm}$  inner diameter; mobile phase,  $20\ \text{mM}$  phosphate buffer,  $25\ \text{mM}$  KCl,  $1.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  adjusted to pH 6.0; flow rate,  $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ ; detection at  $260\ \text{nm}$ ;  $24\ ^\circ\text{C}$ . (b)  $1/[C(V_R - V_M)]$  versus  $1/C$  for D-adenosine. In some cases, the error bar is obscured by the symbol

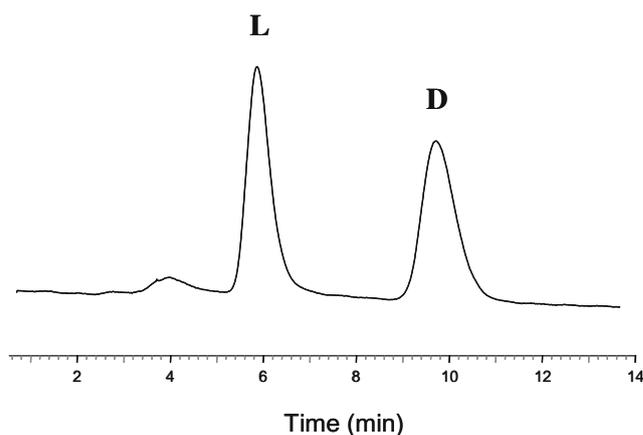
lower than that reported by Jarrett et al. [15, 16]. In addition, inefficient orientations of the CS onto the surface could be responsible for the low  $m_L$  value. Furthermore, it is well established that aptamers can adopt inactive conformations in relation to the medium composition or the temperature [7, 18]. The presence of a significant proportion of such conformers could also affect the binding capacity of the anti-adenosine aptamer column.

From the frontal analysis data, the  $K_d$  value for D-adenosine was estimated to be  $17\pm 2.4\ \mu\text{M}$ . This binding affinity was found to be on the same order of magnitude as those previously reported for two anti-adenosine aptamer stationary phases based on a biotin–streptavidin immobilization ( $14\pm 6$  and  $3\pm 1\ \mu\text{M}$ ) or for the anti-D-adenosine aptamer in solution ( $6\pm 3\ \mu\text{M}$ ) [17, 19]. The discrepancy observed with two of these previously reported values could be due to the present immobilization process, which would affect the binding properties through some conformational changes of the aptamer binding sites. This could be also explained by the fact that (1) the aptamer sequence used in the present study was slightly different from that employed in the previous studies (see “Experimental”), (2) the operating conditions were not strictly identical and (3)

different methods were applied for the evaluation of the binding constant.

The enantioseparation properties of the DNA aptamer CSP were evaluated under the operating conditions selected for the frontal analysis. Fig. 3 shows a representative chromatogram obtained after injection of a racemic mixture of adenosine. The retention factors of D-adenosine and L-adenosine were found to be  $2.53\pm 0.03$  and  $0.93\pm 0.02$ , respectively. This was responsible for an apparent enantioselectivity  $\alpha$  of  $2.74\pm 0.08$ . Under identical mobile phase and column temperature conditions, a similar apparent enantioselectivity has been observed using an anti-adenosine DNA aptamer column (bed volume of approximately  $170\ \mu\text{L}$ ) based on a noncovalent biotin–streptavidin immobilization ( $\alpha=3.44$ ) [3]. Concerning the band broadening and the peak shape, the number of theoretical plates per meter and the  $A_s$  values for the two enantiomers were estimated to be approximately 1,000–3,000 and approximately 1.30–1.50, respectively. As a comparison, the number of theoretical plates per meter observed for other target-specific bioaffinity CSPs such as antibody-based CSPs (using  $5\ \mu\text{m}$  silica particles) varied from 1,500 to 6,000 in relation to the type of immobilization strategy [12]. Finally, the chromatographic resolution  $R_s$  was found to be  $2.47\pm 0.32$  in such operating conditions.

It can be concluded from both the frontal analysis and the zonal elution data that the covalent immobilization reported here constitutes a convenient approach as it allows the maintenance of suitable D-adenosine binding ability and chiral discrimination properties for an efficient enantioseparation.

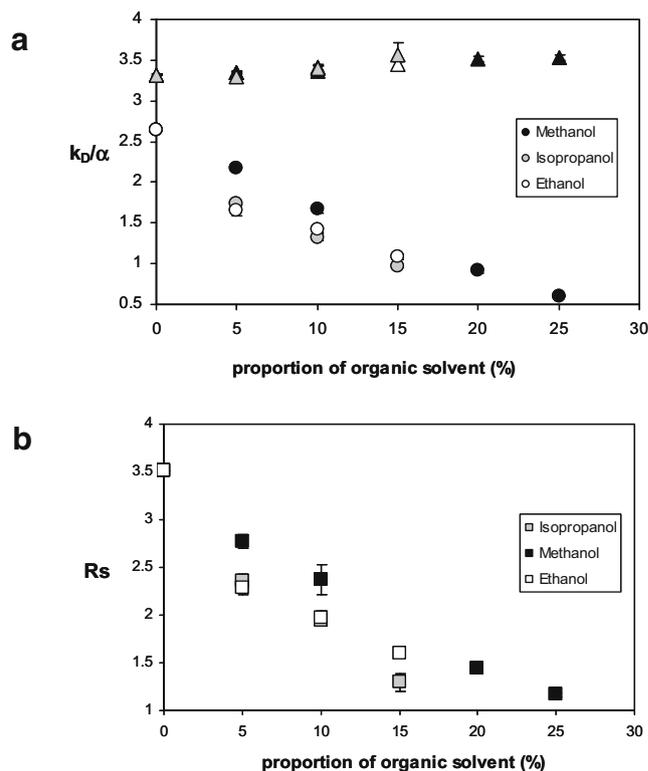


**Fig. 3** Chromatogram obtained when a racemic mixture of adenosine was injected onto the adenosine-specific DNA aptamer CSP. Column,  $200\ \text{mm}\times 1.0\text{-mm}$  inner diameter; mobile phase,  $20\ \text{mM}$  phosphate buffer,  $25\ \text{mM}$  KCl,  $1.5\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  adjusted to pH 6.0; injection volume,  $100\ \text{nL}$ ; flow rate,  $50\ \mu\text{L}/\text{min}$ ; detection at  $260\ \text{nm}$ ;  $24\ ^\circ\text{C}$ . L L-adenosine, D D-adenosine

### Effects of operating chromatographic conditions on the enantioseparation

It is well established that monovalent and/or divalent cations are particularly important for inducing and stabilizing the active conformational structure of aptamers [20]. So, experiments were firstly performed to analyze the role of the mobile phase salt concentration on the binding and enantioseparation properties of the aptamer CSP. The  $\text{MgCl}_2$ , KCl and sodium phosphate concentrations in the eluent were varied from 1.5–2 to 15–25 mM in relation to the type of salt. The solute retention factors and apparent enantioselectivity did not change significantly over the KCl and sodium phosphate concentration range. In contrast, an increase in the  $k$  and  $\alpha$  values was obtained for the higher 15 mM  $\text{Mg}^{2+}$  concentration (compare Figs. 3, 6). Subsequently, a racemic mixture of adenosine was injected using a pure aqueous mobile phase (without any salt) after column equilibration with water for more than 20 column volumes. Surprisingly, it was found that the column performances were not altered under these conditions. The adenosine enantiomers were efficiently separated with chromatographic parameters similar to those obtained using the aqueous buffer as the eluent. It can be hypothesized from this result that some essential cations, involved in the stabilization of the active conformation of the aptamer, were not removed from the immobilized nucleic acid even after a column flushing with several water volumes. On the other hand, when the column was flushed with 20 column volumes of a sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.0) containing 5 mM EDTA, the enantioseparation was completely abolished under pure aqueous mobile phase conditions. The enantioselective properties of the DNA aptamer CSP were then totally restored by the passage of the buffered mobile phase containing 15 mM  $\text{MgCl}_2$  (20 column volumes). All these data suggest that the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  constitutes a major factor to promote and/or stabilize the active conformation of the aptamer. This is consistent with previous works which have shown that functional tertiary structures of nucleic acids are mainly dependent on the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration [21, 22].

Additional experiments were performed using organic solvents of different polarities (methanol, ethanol, 2-propanol) as eluent modifiers. The proportion of alcohol modifiers in the aqueous buffer mobile phase was increased from 0 to 15–25% in relation to the type of organic solvent. Fig. 4 presents the variation of the adenosine chromatographic parameters as a function of the organic modifier fraction of the mobile-phase. These data revealed that, whatever the type of organic modifier, an increase in the amount of organic solvent was responsible for a decrease in the retention factor of the analyte and the resolution. On the other hand, the apparent enantioselectivity was slightly

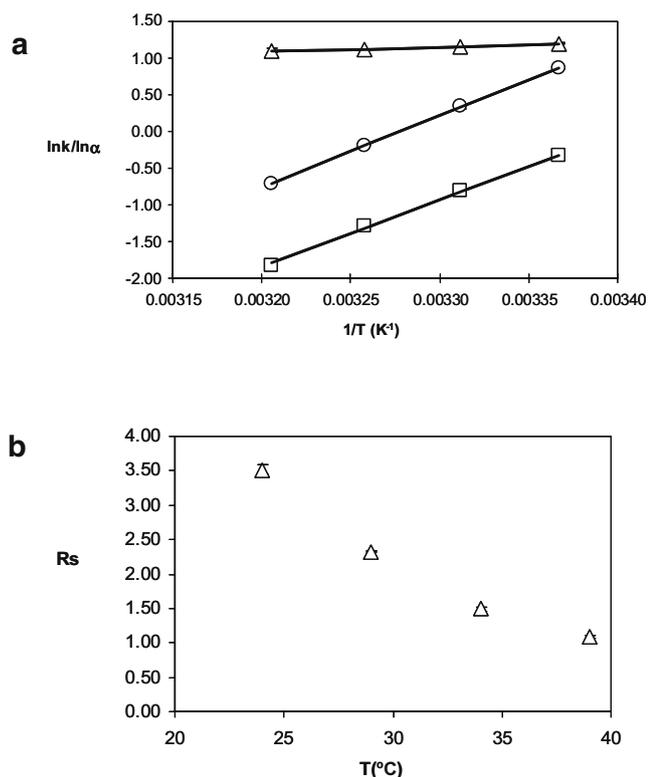


**Fig. 4** (a)  $k_d$  (circles) and  $\alpha$  (triangles) versus the proportion of organic solvent in the mobile phase. (b)  $R_s$  versus proportion of organic solvent in the mobile phase. In some cases, the error bar is obscured by the symbol. Column, 200 mm  $\times$  1.0-mm inner diameter; mobile phase, 20 mM phosphate buffer, 25 mM KCl, 15 mM  $\text{MgCl}_2$  adjusted to pH 6.0; injection volume, 100 nL; flow rate, 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; detection at 260 nm; 24  $^\circ\text{C}$

enhanced. As an example, the  $\alpha$  value increased from  $3.31 \pm 0.01$  to  $3.54 \pm 0.03$  when the proportion of methanol in mobile phase varied from 0 to 25%. Such results suggest that some hydrophobic effects were involved in the analyte-immobilized aptamer interaction but did not participate in the chiral discrimination mechanism. Solvent-dependent changes of the binding capacity or the active conformation of the immobilized DNA aptamer could also be responsible for the variation of the chromatographic parameters.

Further experiments were conducted over the 24–39  $^\circ\text{C}$  column temperature range using the aqueous buffer mobile phase. As shown in Fig. 5, the solute retention and the resolution were strongly reduced as the column temperature increased. A slight decrease in the apparent enantioselectivity was also observed (from  $3.31 \pm 0.01$  to  $3.00 \pm 0.03$ ). As previously reported [3, 6], this behavior could be explained by the involvement of enantiospecific interactions which were enthalpically driven and/or a temperature-dependent change of the conformation/binding capacity of the aptamer CSP.

From a practical point of view, it appears from these results that both the separation of the adenosine enantiomers and the analysis time can be easily modulated by

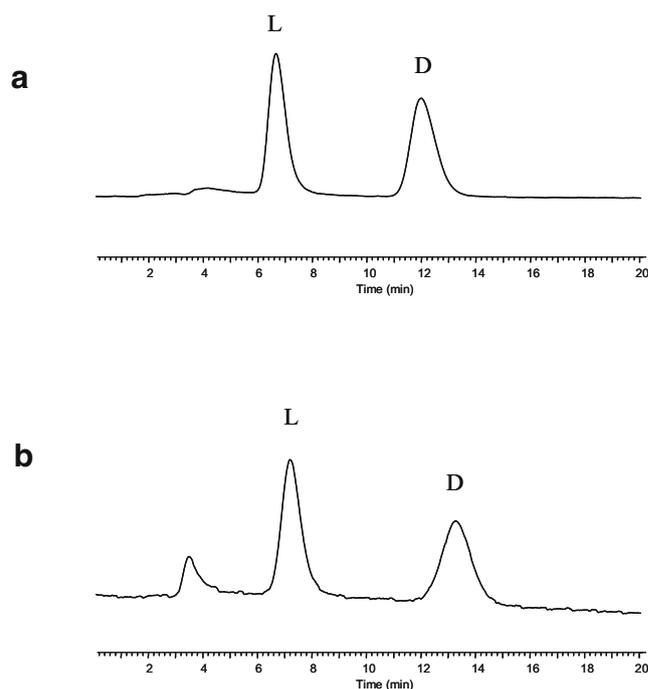


**Fig. 5** (a)  $\ln k/\ln \alpha$  (triangles) versus  $1/T$  for D-adenosine (circles) and L-adenosine (squares). (b)  $R_s$  versus the column temperature. In some cases, the error bar is obscured by the symbol. Column, 200 mm  $\times$  1.0-mm inner diameter; mobile phase, 20 mM phosphate buffer, 25 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> adjusted to pH 6.0; injection volume, 100 nL; flow rate, 50  $\mu$ L/min; detection at 260 nm

varying the composition of the mobile phase and the column temperature. The baseline resolution was achieved in a short analysis time (less than 10 min) by increasing (1) the column temperature to 34 °C or (2) the amount of organic modifiers (using, for example, 15% of methanol or ethanol in the buffered mobile phase).

#### Evaluation of the column stability

The stability of the aptamer CSP was evaluated during the course of this work under different chromatographic conditions, involving changes in the column temperature, eluent salt concentration and addition of organic modifiers to the mobile phase (see earlier). When not in use, the column was indifferently stored in the buffer containing sodium azide (0.05%) or in different buffer–organic solvent mixtures. The chromatographic performances of the column were compared in the initial conditions and after several experiments, using the buffered solution as the reference mobile phase. Fig. 6 presents two chromatograms obtained in the initial conditions and after the passage of more than 2,500 column volumes of the mobile phase. A slight increase in the solute retention factors was obtained



**Fig. 6** Chromatograms obtained when a racemic mixture of adenosine was injected onto the adenosine-specific DNA aptamer CSP. (a) In initial conditions. (b) After the passage of more than 2,500 mobile phase column volumes. Column, 200 mm  $\times$  1.0-mm inner diameter; mobile phase, 20 mM phosphate buffer, 25 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> adjusted to pH 6.0; injection volume, 100 nL; flow rate, 50  $\mu$ L/min; detection at 260 nm; 24 °C

(Fig. 6), without any change in the apparent enantioselectivity. This demonstrates the good stability of the covalently bonded aptamer CSP in a routine chromatographic use context.

Additional experiments were performed to evaluate the stability of the column under storage conditions traditionally employed for reversed-phase columns. The column was flushed with 20 column volumes of a pure aqueous mobile phase containing a high proportion of organic solvent (water–methanol, 50:50, v/v) and stored under these conditions for some days. The binding and enantio-separation properties of the aptamer CSP were found to be unaltered by such treatment.

In order to obtain further information about the stability of the stationary phase, the column was also tested in harsh operating conditions. The aptamer-based column was subjected to a very high temperature (60 °C) for 6 h, using a flow rate of 50  $\mu$ L/min. The column was then stored under a buffered mobile phase for 1 day at 4 °C. Although a loss in retention was observed ( $k_d$  was found to decrease by about 15%), the apparent enantioselectivity remained unchanged. The retention properties can be fully restored after about 1 week of storage under the buffered mobile phase.

## Conclusion

In this paper, we have reported the preparation and the evaluation of a covalently bonded DNA aptamer CSP. The amide-bond-based covalent immobilization approach appears to be of interest as it allows one to obtain (1) valuable enantiodiscrimination properties and (2) good stability over the time, even under various conditions of use and storage. From a practical applicability point of view, these stability results suggest that this kind of covalent linkage constitutes a significant improvement relatively to the biotin–streptavidin link strategy previously used for the design of aptamer CSPs [2–6].

## References

1. Ravelet C, Peyrin E (2006) *J Sep Sci* 29:1322–13331
2. Michaud M, Jourdan E, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E (2003) *J Am Chem Soc* 125:8672–8679
3. Michaud M, Jourdan E, Ravelet C, Villet A, Ravel A, Grosset C, Peyrin E (2004) *Anal Chem* 76:1015–1020
4. Brumbt A, Ravelet C, Grosset C, Ravel A, Villet A, Peyrin E (2005) *Anal Chem* 77:1993–1998
5. Ravelet C, Boulkedid R, Ravel A, Grosset C, Villet A, Fize J, Peyrin E (2005) *J Chromatogr A* 1076:62–70
6. Ruta J, Grosset C, Ravelet C, Fize J, Villet A, Ravel A, Peyrin E (2007) *J Chromatogr B* 845:186–190
7. Ruta J, Ravelet C, Grosset C, Fize J, Ravel A, Villet A, Peyrin E (2006) *Anal Chem* 78:3032–3039
8. Ruta J, Ravelet C, Baussanne I, Decout JL, Peyrin E (2007) *Anal Chem* 79:4716–4719
9. Fujita K, Silver J (1993) *Biotechniques* 14:608–617
10. Holmberg A, Blomstergren A, Nord O, Lukacs M, Lundeberg J, Uhlén M (2005) *Electrophoresis* 26:501–510
11. Millot MC (2003) *J Chromatogr B* 797:131–159
12. Franco EJ, Hofstetter H, Hofstetter O (2006) *J Sep Sci* 29:1458–1469
13. Kotia RB, Li L, McGown LB (2000) *Anal Chem* 72:827–831
14. Clark SL, Remcho VT (2003) *J Sep Sci* 26:1451–1454
15. Jarrett HW (1987) *J Chromatogr* 405:179–189
16. Goss TA, Bard M, Jarrett HW (1990) *J Chromatogr* 508:279–287
17. Deng Q, German I, Buchanan D, Kennedy RT (2001) *Anal Chem* 73:5415–5421
18. Huang CC, Cao Z, Chang HT, Tan W (2004) *Anal Chem* 76:6973–6981
19. Huizenga DE, Szostak JW (1995) *Biochemistry* 34:656–665
20. Smirnov I, Shafer RH (2000) *Biochemistry* 39:1462–1468
21. Brion P, Westhof E (1997) *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:113–137
22. Draper DE (1996) *Trends Biochem Sci* 21:145–149



Cette stratégie d'immobilisation covalente est donc intéressante puisqu'elle permet d'une part, une énantioséparation convenable sous différentes conditions : en phase mobile aqueuse tamponnée ou même, de façon surprenante, en phase aqueuse pure et en phase hydro-organique en présence d'un pourcentage plus élevé en solvants organiques (15 - 25%). D'autre part, cette colonne s'est avérée être stable sous diverses conditions d'utilisation et de stockage et peut être facilement régénérée en faisant passer la phase mobile concentrée en magnésium pendant 20 volumes de colonne.

Dans la partie suivante, une étude comparative des deux types d'immobilisation sera présentée.





*Comparaison des deux  
modes d'immobilisation*

**A**PTAMER



La stratégie d'immobilisation via le lien biotine-streptavidine a permis la conception de plusieurs PSCs aptamères en série ARN et ADN (**tableau 7**). Ce mode d'immobilisation est intéressant puisqu'il est facile à mettre en œuvre, rapide, le rendement d'immobilisation est convenable (70%) et surtout l'affinité de l'aptamère pour sa cible est maintenue après immobilisation. Cependant, il présente un certain nombre d'inconvénients, évoqués précédemment, qui limitent son utilisation en chromatographie de routine.

Le mode d'immobilisation covalente présente, en revanche, des avantages pour une utilisation chromatographique de routine. En effet, la liaison amide est résistante en présence d'un pourcentage plus important de solvant organique par rapport à la liaison biotine-streptavidine. Un pourcentage maximum de 10% de solvant organique dans la phase mobile a été testé pour le lien biotine-streptavidine alors que la PSC aptamère anti-D-adénosine a été utilisée en présence d'un pourcentage plus élevé (100% d'éthanol pur ou seulement 15 - 25% de solvants organiques, pour des raisons de solubilité, en présence d'une phase mobile tamponnée). De plus, cette colonne est stable sous des conditions extrêmes de phase mobile, sous 100% d'eau pure ou en présence d'un mélange eau/méthanol (50:50, v/v) et peut être stockée sous ces conditions hydro-organiques pendant plusieurs jours. En outre, la colonne a également été soumise à des conditions plus drastiques en la chauffant à haute température (60°C) pendant 6 heures puis en la stockant pendant un jour à très basse température (4°C). Après ces traitements, la PSC aptamère anti-D-adénosine récupère ses propriétés énantiosélectives après passage d'environ 20 volumes de colonne de phase mobile tamponnée concentrée en magnésium.

Les deux modes d'immobilisation ont été comparés en réalisant une analyse frontale. Pour la PSC aptamère anti-D-histidine, le nombre de sites actifs obtenu est de 3,3 nmoles pour 100 µL de colonne ce qui correspond environ à 13% de la quantité d'aptamères immobilisés (résultats non publiés). Une valeur similaire est obtenue pour le mode d'immobilisation covalente (**tableau 7**). Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de conformations inactives de l'aptamère ou une mauvaise orientation de l'aptamère à la surface du support. Pour le même aptamère ADN anti-D-adénosine, Deng et ses collaborateurs [2] ont obtenu une valeur environ 6 fois plus importante pour une immobilisation via le lien biotine-streptavidine. Cette différence de valeur peut s'expliquer par une plus faible efficacité de couplage, qui est d'ailleurs inférieure à celle obtenue par Jarrett et son équipe [10].



**Tableau 7** : Tableau comparatif des PSCs à base d'aptamères et comparaison des deux modes d'immobilisation (non covalente et covalente)

Cibles	PSC	<sup>1</sup> Système séparatif	<sup>2</sup> Quantité aptamère <sup>a</sup> imm.	<sup>2</sup> Nbre de sites actifs	% de sites actifs	$\alpha$ / <sup>b</sup> h	K <sub>d</sub>	Stabilité	<sup>c</sup> $\eta$ moyen d'imm.	Phases mobiles	Stockage colonne	T° max testée	Tps de prep de la <sup>e</sup> col	Réfs
Oligopeptide (arginine-vasopressine)	ADN (55 mer)	Narrowbore CL (30 x 2,1)	20	<sup>f</sup> nd	nd	nd / 35-40	1 $\mu$ M [13]	≥ 5 mois	70%	<sup>g</sup> PM tamponnée + sels et/ou <sup>h</sup> MO ≤10%	PM tamponnée + azidure de sodium (0,05% ; m/v)	40°C	3 h	[14]
Adénosine	ADN (37 mer)	Micro-CL (370 x 0,76)	~ 26	nd	nd	3,6 / nd (20°C)	45 $\mu$ M (L) 6 $\mu$ M (D) [11]	≥ 2 mois						[12]
Tyrosinamide	ADN (49 mer)	Micro-CL (250 x 0,76)	~ 26	nd	nd	~ 80 / nd (20°C)	45 $\mu$ M (L) [15]	1 mois						[12]
Arginine	ARN série D et L (44 mer)	Micro-CL (370 x 0,76 ou 340 x 0,51)	14 à 20	nd	nd	nd / nd	56 $\mu$ M (L) 410 $\mu$ M (D) [16]	qq j (D-ARN) à plusieurs mois (L-ARN)						[17]
AA aromatiques et dérivés	L-ARN (63 mer)	Micro-CL (350 x 0,76)	~ 20	nd	nd	1,3-30 / 25-120 (10 °C)	25 $\mu$ M (L) 250 $\mu$ M (D) [18]	≥ 3 mois						[9]
Histidine	L-ARN (40 mer)	Micro-CL (260 x 0,8)	~ 16	3,3	13	20 / nd (10°C)	10000 $\mu$ M (L) 10 $\mu$ M (D) [1]	≥ 2 mois						[19]
Adénosine	ADN (37 mer)	Micro-CL (200 x 1)	nd	3,4	nd	3,31 / 28-85 (24°C)	17,0 ± 2,4 $\mu$ M (D)	Plusieurs mois	nd	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PM tamponnée + sels</li> <li>• H<sub>2</sub>O 100%</li> <li>• H<sub>2</sub>O-MeOH (50 :50, v/v)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PM tamponnée + azidure de sodium (0,05% ; m/v)</li> <li>• H<sub>2</sub>O-MeOH (50:50, v/v)</li> </ul>	60°C	1 j.	[20]

<sup>a</sup> Imm. : immobilisé/immobilisation; <sup>b</sup> h : hauteur de plateau réduite ; <sup>c</sup>  $\eta$  : rendement ; <sup>d</sup> prep : préparation ; <sup>e</sup> col : colonne ; <sup>f</sup> nd : non déterminé ; <sup>g</sup>PM : Phase Mobile ; <sup>h</sup> MO : Modificateur Organique. <sup>1</sup> Dimension des colonnes en mm ; <sup>2</sup> nmoles pour 100  $\mu$ L colonne



Enfin, la valeur de la constante de dissociation déterminée par analyse frontale est du même ordre de grandeur que celle obtenue par Deng et ses collaborateurs [2] et les paramètres chromatographiques obtenus sont convenables.

Nous pouvons donc en conclure que l'immobilisation via le lien biotine-streptavidine peut être intéressante pour une étude chromatographie réalisée à température modérée, en présence d'un très faible pourcentage de solvant organique. Cependant, d'un point de vue pratique, l'immobilisation covalente offre des conditions d'utilisation bien plus étendues (conditions plus drastiques) et une bien meilleure stabilité pour des résultats chromatographiques similaires. Il est, cependant, important de noter que cette méthode d'immobilisation covalente n'a pas été totalement optimisée, des expérimentations supplémentaires doivent être réalisées dans cette optique.

Après avoir étudié l'utilisation des aptamères comme sélecteurs chiraux d'une cible prédéterminée en micro-CLHP, nous nous sommes intéressés à la possibilité d'étendre cette application en électrophorèse capillaire. Les travaux expérimentaux réalisés par électrophorèse capillaire seront présentés dans le chapitre suivant.





*Chapitre II- Etudes des  
aptamères par  
électrophorèse capillaire*

**A**PTAMER



## *Publication N°3*

**Utilisation d'un aptamère  
comme additif chiral pour la  
séparation d'énantiomères  
par électrophorèse capillaire**

**A  
PTAMER**



L'électrophorèse capillaire (EC) est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ses qualités intrinsèques : efficacité et résolution élevées, rapidité des séparations, conditionnement aisé du capillaire de séparation, compatibilité avec de nombreux détecteurs et faible consommation d'échantillons, de tampon de migration et surtout de sélecteur chiral. En raison du coût relativement élevé des aptamères, l'utilisation de cette technique peut présenter un avantage majeur.

L'objectif de cette étude était d'évaluer, par EC, les propriétés énantiométriques d'un aptamère en série L-ARN spécifique de la D-Arginine, caractérisée par une constante de dissociation très élevée ( $K_d = 330$  nM) et une énantiométrie très forte ( $\alpha = 12000$ ) [21]. Afin d'éviter tout problème d'interférence du fait de l'absorbance de cet aptamère en UV, le mode en remplissage partiel (« *partial filling* ») a été choisi pour séparer les énantiomères de l'arginine. Cette technique très couramment utilisée [22-29], consiste à remplir partiellement le capillaire avec l'aptamère, la partie restante du capillaire étant remplie par du tampon sans sélecteur chiral. Les expériences sont menées de façon à ce que le sélecteur chiral ne passe pas devant la fenêtre de détection ou migre à une vitesse beaucoup plus faible que les solutés à détecter. Cette technique est intéressante car la solution d'aptamères, n'étant pas électrolysée, elle peut être utilisée de nombreuses fois. Ainsi, la consommation d'aptamères est considérablement réduite (consommation d'environ 60 pmoles d'aptamères par injection pour cette étude).

Au cours de ce travail, l'effet de la variation de la température du capillaire, de la concentration en échantillon et de la longueur de la zone de remplissage en aptamère sur le comportement électrophorétique des énantiomères de l'arginine ont été étudiés. Des expériences par spectrophotométrie UV ont été menées de manière à identifier les différentes étapes de fusion de l'ARN et d'étudier la présence de différents conformères de l'aptamère en fonction de la température.



# Enantiomeric Separation Using an L-RNA Aptamer as Chiral Additive in Partial-Filling Capillary Electrophoresis

Josephine Ruta, Corinne Ravelet, Catherine Grosset, Jennifer Fize, Anne Ravel, Annick Villet, and Eric Peyrin\*

Département de Pharmacochimie Moléculaire, UMR 5063 CNRS, ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie de Grenoble, Avenue de Verdun, 38240 Meylan, France

In this paper, we report the chiral resolution of arginine using an anti-arginine L-RNA aptamer chiral selector in partial-filling CE. The effects of the capillary temperature, sample load, and aptamer plug length on the enantiomeric separation were assessed. Very high chiral resolving capability was observed at low or moderate capillary temperatures (the target peak being not detected in the separation window), whereas the practical chiral resolution was achieved only at high enough temperatures (50–60 °C). Over this high-temperature range, the electrophoretic behavior of the target enantiomer appeared to result from a combination of binding site heterogeneity, slow desorption kinetics, and concentration overload of aptamer binding sites. From additional thermal UV melting experiments, three RNA conformations were identified for the 50–60 °C temperatures. It was suggested that the presence of these different RNA conformations was a plausible source of the binding site heterogeneity.

Since the first reports of the systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) procedure by three independent laboratories,<sup>1–3</sup> the development of in vitro selection has allowed the discovery of aptamers against various targets, such as small molecules including amino acids and nucleosides, proteins, cells etc. The use of aptamers as tools in analytical chemistry is a very promising and exciting field of research due to their capabilities to bind specifically the target molecules with an affinity equal or superior to those of antibodies. The aptamers present many advantages over antibodies. Aptamers can be regenerated within minutes via a denaturation–renaturation step and are, at least for DNA aptamers, relatively stable over the time. The in vitro selection can be manipulated to obtain binding and kinetic properties desirable for specific assays. The aptamers can be produced by chemical synthesis, resulting in little or no batch-to-batch variation, and reporter molecules can be attached to aptamers at precise locations. In addition, they are produced through an in vitro process which does not require animals. Taking into account all these background features, various

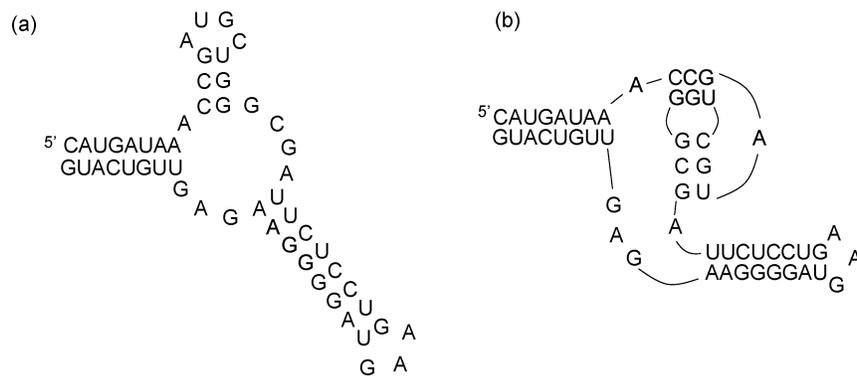
analytical aptamer-based formats have been developed, including ELISA-type (ELONA) assays,<sup>4</sup> biosensors (aptasensors),<sup>5</sup> aptazymes,<sup>6</sup> flow cytometry,<sup>7</sup> and separation methods. Previous reports have shown great interest in employing aptamers as specific ligands in affinity capillary electrophoresis (CE) for the quantification of proteins<sup>8</sup> and determination of the binding parameters<sup>9</sup> or in affinity chromatography for the separation/purification of proteins<sup>10</sup> and small molecules.<sup>11</sup> Notably, both immobilized DNA and RNA aptamers have been successfully exploited by our group as a new class of target-specific chiral stationary phases (CSPs) for the chromatographic resolution of various racemates.<sup>12–15</sup> However, at the present time, the use of aptamers as chiral additives in capillary electrophoresis (CE) has not been yet explored.

The chiral resolution of arginine or arginine derivatives has been previously reported in CE using as additives various chiral selectors, such as cyclodextrins,<sup>16</sup> macrocyclic antibiotics,<sup>17</sup> micelles,<sup>18</sup> or crown ethers.<sup>19</sup> The aim of this paper is to examine the feasibility of using an anti-arginine RNA aptamer chiral additive in CE for the target chiral resolution. A truncated sequence (53 bases) of an anti-L-arginine RNA aptamer<sup>20</sup> containing the essential target binding region was used in the present work (Figure 1).

- (4) Ito, Y.; Fujita, S.; Kawazoe, N.; Imanishi, Y. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3510.
- (5) Potyrailo, R. A.; Conrad, R. C.; Ellington, A. D.; Hieftje G. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3419.
- (6) Famulok, M. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2005**, *7*, 137.
- (7) Davis, K. A.; Abrams, B.; Lin, Y.; Jayasena S. D. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 702.
- (8) German, I. D.; Buchanan, D.; Kennedy, R. T. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4540.
- (9) Berezovski, M.; Nutiu, R.; Li, Y.; Krylov, S. N. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1382.
- (10) Romig, T. S.; Bell, C.; Drolet D. W. *J. Chromatogr., B* **1999**, *731*, 275.
- (11) Deng, Q.; German, I.; Buchanan, D.; Kennedy, R. T. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5415.
- (12) Ravelet, C.; Boukdedid, R.; Ravel, A.; Grosset, C.; Villet, A.; Fize, J.; Peyrin, E. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1076*, 62.
- (13) Brumbt, A.; Ravelet, C.; Grosset, C.; Ravel, A.; Villet, A.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1993.
- (14) Michaud, M.; Jourdan, E.; Ravelet, C.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1015.
- (15) Michaud, M.; Jourdan, E.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8672.
- (16) Perrin, C.; Vargas, M. G.; Vander Heyden, Y.; Maftouh, M.; Massart, D. L. *J. Chromatogr., A* **2000**, *883*, 249.
- (17) Tesarova, E.; Bosakova, Z.; Zuskova, I. *J. Chromatogr., A* **2000**, *879*, 147.
- (18) Lu, X.; Chen, Y. *J. Chromatogr., A* **2002**, *955*, 133.
- (19) Schultz, C. L.; Moini, M. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1508.
- (20) Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.

\* Corresponding author. E-mail: eric.peyryn@ujf-grenoble.fr.

(1) Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505.  
(2) Ellington, A. D.; Szostak, J. *Nature* **1990**, *346*, 818.  
(3) Robertson, D. L.; Joyce, G. F. *Nature* **1990**, *344*, 467.



**Figure 1.** (a) Computer-generated nonpseudoknotted secondary structure of the truncated sequence (53 bases) of the anti-arginine RNA aptamer used in this study. (b) Refined pseudoknotted secondary structure as proposed from chemical modification analysis.<sup>20</sup>

The aptamer–target association has high affinity, characterized by a dissociation constant  $K_d$  of 330 nM at 25 °C. In addition, this aptamer is known to be very strongly enantioselective.<sup>20</sup> It was shown via chemical modification analysis that the RNA aptamer forms a sophisticated secondary structure containing a compact pseudoknotted arrangement which is involved in the target binding.<sup>20</sup> As shown in Figure 1, the shortest hairpin and a single-stranded region of the junction are associated via Watson–Crick base pairing, forming a pseudoknot structure characterized by two short stems and constrained loops. An L-RNA aptamer, that is, the mirror image of the “natural” D-RNA aptamer, was used as a biostable, target-specific chiral additive, and the separation of arginine enantiomers was carried out using the partial filling mode. The effects of the capillary temperature (15–60 °C) on the enantiomeric separation were assessed. The influence of the target sample load (0.1–1 mg/mL) as well as aptamer plug length on the target CE apparent retention factor, efficiency, and band shape were also analyzed for the high-temperature range (50–60 °C). Furthermore, additional thermal melting UV experiments were performed to identify the possible different RNA conformations present over the CE temperature range.

## EXPERIMENTAL AND METHODS

**Chemicals.** D- and L-Arginine enantiomers were obtained from Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). NaOH, Tris–HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, and mesityl oxide were supplied by Sigma Aldrich. Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge. L-RNA oligonucleotide was synthesized and HPLC-purified by CureVac (Tubingen, Germany). All solutions were filtered prior use through 0.20- $\mu$ m pore-size membranes.

**Capillary Electrophoresis Experiments.** *Apparatus.* A CE Agilent capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector (DAD) and Agilent Chemstation software was used throughout. A 50- $\mu$ m-i.d. and 363- $\mu$ m-o.d. uncoated, fused-silica capillary with extended light path (total and effective lengths of 64.5 and 56 cm, respectively) was used (Agilent).

*Reagents.* The buffer for background electrolyte (running buffer: 25 mM Tris–HCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) was daily prepared and degassed using an ultrasonic bath. The experiments were performed in the presence of KCl and MgCl<sub>2</sub> in order to operate under conditions similar to those used for the

in vitro selection of the anti-arginine RNA aptamer.<sup>20</sup> The solutions of racemate or single enantiomers (0.1–1 mg/mL) were prepared in the buffer. The 380  $\mu$ M L-RNA aptamer stock solution was prepared in the buffer and stored at –20 °C. The working aptamer solutions were obtained by dilution of the filtered stock solution with the buffer to a final concentration of 80  $\mu$ M. Prior to the first utilization, the aptamer was renaturated by heating at 90 °C for 10 min in the buffer and left to stand at room temperature for 30 min. When not in use, the working aptamer solution was stored at 4 °C.

*Electrophoretic Procedures.* The capillary was conditioned at the beginning of the day with the following sequence: (i) 20-min rinse with water; (ii) 5-min rinse with sodium hydroxide, 1 M; (iii) 5-min wait; and (iv) 15-min rinse with the running buffer at 1000 mbar. Between runs, the capillary was conditioned with the running buffer for 5 min at 1000 mbar. All experiments were carried out in cationic mode (anode at the inlet and cathode at the outlet). The CE conditions for the arginine enantiomer separation were as follows: detection wavelength, 195 nm; applied voltage, 15 kV; capillary cassette temperature from 15 to 60 °C. Before sample injection, the capillary was partially filled with the chiral selector using the 80  $\mu$ M aptamer plug applied at 50 mbar for 500 s, unless otherwise stated. Injection of the arginine solutions (racemate and single enantiomers in each case) were performed hydrodynamically at 50 mbar for 4 s in triplicate. To assess if the aptamer solution inside the capillary reached the desired temperature, the 500-s aptamer plug was introduced in the capillary 0, 5, 10, or 15 min before the sample injection at 55 °C, for a voltage of 15 kV. Identical electrophoretic data (electrophoretic mobility and peak shape parameters) were observed whatever the preinjection incubation time of the aptamer plug in the capillary. This indicated that the residence time of the RNA aptamer in the capillary during the partial filling procedure was sufficient for the RNA aptamer to adopt its adequate temperature-dependent conformations.

**Calculation of the Electrophoretic Parameters.** In the partial-filling mode, the observed mobility ( $\mu_{\text{obs}}$ ) of the solute in the presence of a separation plug depends on the mobility of the analyte in the separation zone as well as its migration in the buffer zone out of the separation plug. Assuming negligible chiral selector diffusion, the effective chiral selector plug length can be determined as follows,<sup>21</sup>

(21) Amini, A.; Pettersson, C.; Westerlund, D. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 950.

$$PL_{\text{eff}} = \left[ \frac{v_s}{v_s - v_{\text{PL}}} \right] \left[ PL_{\text{app}} + v_{\text{PL}}t - \left( \frac{lv_{\text{PL}}}{v_s} \right) \right] \quad (1)$$

where  $PL_{\text{app}}$  is the applied plug length,  $t$  is the migration time of the solute,  $v_s$  is the velocity of the solute in the buffer,  $v_{\text{PL}}$  is the velocity of the separation plug, and  $l$  is the effective length of the capillary. Due to the unusual behavior of D-arginine over the low and intermediate temperature range (see results and discussion section), the electrophoretic data were determined only for the experiments performed over the 50–60 °C temperature range. Under these temperature conditions, the electroosmotic flows measured using mesityl oxide as noninteracting electroosmotic flow marker were similar within and out of the separation plug (<5% difference). As the aptamer chiral selector and arginine enantiomers migrated in the same direction, the effective plug length was longer than the applied plug length, and  $PL_{\text{eff}}$  changed in accordance with the migration time of each enantiomer. For a 500-s applied plug and over the 50–60 °C temperature range, this  $PL_{\text{eff}}$  value was between about 42 and 44 cm for L-arginine and between about 43 and 47 cm for D-arginine. Taking into account the  $PL_{\text{eff}}$  values, the  $\mu_{\text{obs}}$  parameter can be expressed by the following relation,<sup>22</sup>

$$\mu_{\text{obs}} = X\mu_{\text{PL}} + (1 - X)\mu_{\text{B}} + \mu_{\text{eo}} \quad (2)$$

where  $X$  is the ratio between the effective plug length and the effective length of the capillary,  $\mu_{\text{B}}$  is the effective mobility of the solute in the absence of the separation plug,  $\mu_{\text{PL}}$  is the effective mobility of the solute within the separation plug, and  $\mu_{\text{eo}}$  is the electroosmotic mobility. No correction for difference in viscosity (measured by the hydrodynamic method) between the selector zone and the neat buffer was necessary for the 50–60 °C temperatures. As a result, the CE retention factor ( $k_{\text{CE}}$ ) within the separation plug can be determined as follows,<sup>23,24</sup>

$$k_{\text{CE}} = K[\text{Apt}] = \frac{(\mu_{\text{PL}} - \mu_{\text{B}})}{(\mu_{\text{comp}} - \mu_{\text{PL}})} \quad (3)$$

where  $K$  is the association constant between the solute and the aptamer,  $[\text{Apt}]$  is the aptamer concentration in the separation zone, and  $\mu_{\text{comp}}$  is the effective mobility of the solute–aptamer complex. The effective mobility of the complex cannot be easily obtained experimentally; however, it is assumed that the charge-to-mass ratio of the analyte–chiral selector complex is close to that of the free aptamer because arginine is a low-molecular-mass species bearing only one net positive charge, whereas RNA is much heavier and highly negatively charged. Thus, the  $k_{\text{CE}}$  value was estimated using the RNA effective mobility as an approximated value of  $\mu_{\text{comp}}$ . Here, it is also important to note that the CE retention factor has to be considered as an “apparent” CE retention factor because the migration time was measured at the apex of

distorted peaks, under nonlinear conditions (see below). This allows only qualitative interpretations.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Separation of the Arginine Enantiomers Using the Anti-Arginine L-RNA Aptamer as Chiral Additive in Capillary Electrophoresis.** *The Mirror Image Strategy To Design a Biostable Aptamer Chiral Additive.* To use the anti-arginine aptamer as a target-specific chiral additive in routine capillary electrophoresis, it was of interest to design an RNA molecule intrinsically resistant to the classical cleaving RNases. A very interesting strategy involving the mirror image approach has been successfully developed to design biostable nucleic acid ligands<sup>25</sup> and has been recently applied to create RNA CSPs for HPLC enantiomeric separations.<sup>12,13</sup> In the present study, the same working L-RNA–aptamer sample (80  $\mu\text{M}$ ) was used for several CE enantiomeric separation experiments (see below) and stored at 4 °C when not used. It provided reproducible electropherograms during about 1 month, indicating that its chiral discrimination properties were not altered over that time. These results confirm the usefulness of such a mirror image approach to the design of a biostable RNA aptamer chiral selector for routine use.

*Use of the CE Partial-Filling Mode.* The enantiomeric separation of arginine was performed using the partial-filling mode to improve the UV detection sensitivity.<sup>26,27</sup> In this technique, the running buffer is partially filled in the capillary containing the UV-absorbing components (here, the chiral selector), and the remaining portion is filled with the neat running buffer without such components. The experiments have to be performed under the conditions under which the UV-absorbing components do not migrate toward the detection end of the capillary or migrate at a velocity slower than the analytes. Thus, the analyte can be detected in the running buffer without the interference of the UV-absorbing components. In the current study, the arginine enantiomers were positively charged, and the aptameric chiral selector was negatively charged. As a result, the RNA species migrated more slowly than the sample using an uncoated fused-silica capillary in cationic mode. The sample migrated through the aptamer zone when voltage was applied, allowing the separation of enantiomers in relation to their respective interaction with the chiral selector; a stronger interaction between the solute and the chiral selector resulted in a lower mobility of the solute toward the cathodic end of the capillary. An additional advantage is that the chiral selector was hydrodynamically introduced into the capillary; therefore, the aptamer working solution was not electrolyzed and could be reused several times (see above). Finally, the partial-filling mode allows reducing the consumption of the chiral selector. In the present study, less than 60 pmol of aptamer was used per run.

*The Temperature Effects on the Chiral Separation.* The CE experiments were first performed for a voltage of 15 kV and an aptamer plug of 500 s. The sample was injected at an enantiomer concentration of 0.1 mg/mL, which corresponded to the lowest concentration allowing the target detection (see below). The analyses were performed over a wide temperature range (15–60

(22) Amini, A.; Merclin, N.; Bastami, S.; Westerlund, D. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 180.

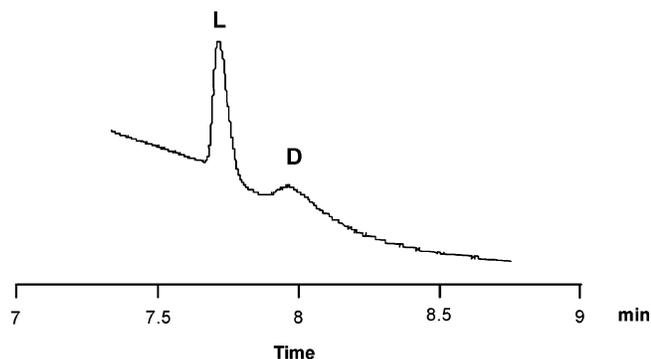
(23) Khaledi, M. G.; Smith, S. C.; Strasters, J. K. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1820.

(24) Ahmed, A.; Ibrahim, H.; Pastore, F.; Lloyd, D. K. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3270.

(25) Klusmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furste, J. P. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112.

(26) Valtcheva, L.; Mohammad, J.; Pettersson, G.; Hjerten, S. J. *Chromatogr.* **1993**, *638*, 263.

(27) Tanaka, Y.; Terabe, S. J. *Chromatogr., A* **1995**, *694*, 277.



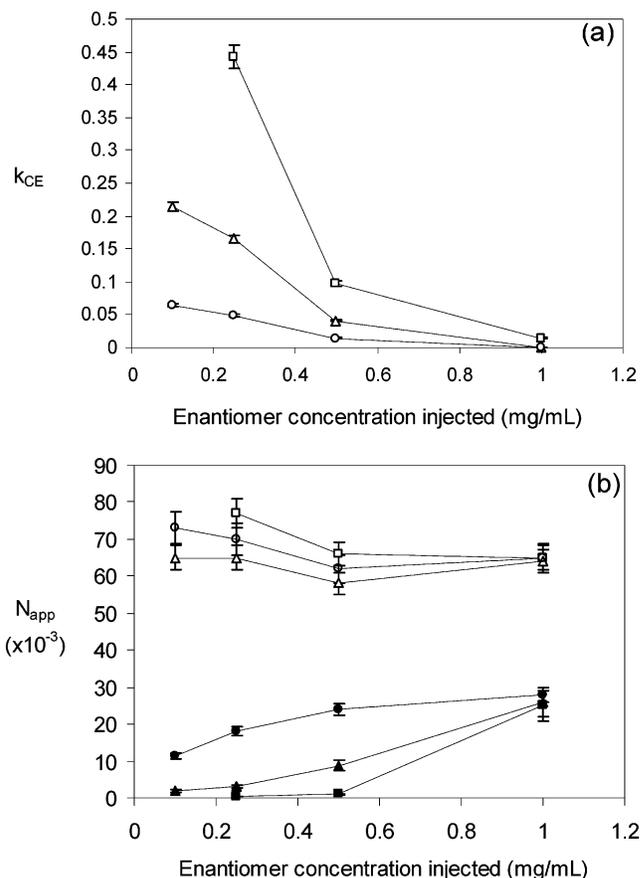
**Figure 2.** Enantiomeric separation of arginine for a capillary temperature of 60 °C, an enantiomer concentration of 0.1 mg/mL, and a 500-s aptamer plug. Running buffer: 25 mM Tris–HCl, 25 mM KCl, 10 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 7.0. Capillary: 50- $\mu$ m-i.d., uncoated, fused-silica capillary with extended light path (total and effective lengths of 64.5 and 56 cm, respectively). Separation zone: 80  $\mu$ M anti-D-arginine L-RNA aptamer applied at 50 mbar. Applied voltage: 15 kV. Sample injection: 50 mbar for 4s. Detection wavelength: 195 nm.

**Table 1. Electrophoretic Parameters Obtained for the Target Enantiomer at a Concentration of 0.1 Mg/ML and for a 500-s Aptamer Plug<sup>a</sup>**

	temp	
	55 °C	60 °C
PL <sub>eff</sub> (cm)	44.9	44.1
$\mu_B$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$3.05 \times 10^{-4}$	$3.17 \times 10^{-4}$
$\mu_{PL}$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$2.23 \times 10^{-4}$	$2.87 \times 10^{-4}$
$\mu_{comp}$ (cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	$-1.58 \times 10^{-4}$	$-1.91 \times 10^{-4}$
$k_{CE}^b$	0.22	0.06

<sup>a</sup> CE conditions. Running buffer: 25 mM Tris–HCl, 25 mM KCl, 10 mM Mg<sup>2+</sup>, pH 7.0. Capillary: 50- $\mu$ m-i.d., uncoated, fused-silica capillary with extended light path (total and effective lengths of 64.5 and 56 cm, respectively). Separation zone: 80  $\mu$ M anti-D-arginine L-RNA aptamer applied at 50 mbar. Applied voltage: 15 kV. Sample injection: 50 mbar for 4s. <sup>b</sup> See Experimental Section for details on the calculation of the CE retention factor. Standard deviation <0.01.

°C). Whereas the L-arginine peak was clearly observed, the target enantiomer could not be detected in the separation window for the 15°C–50°C temperature range. The D-arginine peak was visualized only when the capillary temperature increased to very high temperatures (55–60 °C). A representative electropherogram is presented in Figure 2 for the 60 °C capillary temperature. The data indicate that D-arginine displayed more affinity for the L-RNA aptamer than L-arginine did. This is consistent with the principle of chiral inversion.<sup>12,13</sup> Because the target enantiomer cannot be detected over the low-to-moderate temperature range, this means that D-arginine formed a very stable complex with the chiral selector. Such an observation is in agreement with the very high enantioselective properties previously observed at ambient temperature by Famulok and co-workers.<sup>20</sup> As the temperature further increased to 55–60 °C, a decrease in the apparent CE retention factor for the target enantiomer was observed. The electrophoretic parameters obtained for D-arginine for these two temperatures are reported in Table 1. L-Arginine did not significantly interact with the aptamer chiral selector within the separation zone ( $k_{CE}$  was negligible), indicating that the L-arginine–aptamer association is of very weak magnitude. The reduction of the D-arginine retention factor with the increasing temperature (Table 1) was very likely related to a decrease in the overall



**Figure 3.** (a) Effects of the sample load on the target apparent CE retention factor at various capillary temperature (50 °C, square; 55 °C, triangle; 60 °C, circle). (b) Effects of the sample load on the half-height efficiency for D-arginine (filled symbols) and L-arginine (open symbols) at various capillary temperatures (50 °C, square; 55 °C, triangle; 60 °C, circle). Other CE conditions are given in Figure 2.

target–aptamer complex stability. A diminution/change of the binding capacity (number of available binding sites) of the aptamer could also be involved in the decrease in the apparent  $k_{CE}$  of the target enantiomer (see below).

For the 55–60 °C temperature range, the half-height efficiency for L-arginine was  $\sim 70\,000$ , and the asymmetry factor was around 2.0. Similar efficiency performances were obtained when arginine was injected in the absence of the aptamer separation zone, indicating that band-broadening effects at the aptamer plug–leading buffer interface<sup>28</sup> were negligible. On the other hand, D-arginine was characterized by a lower apparent efficiency and a stronger peak tailing, especially at 55 °C ( $N_{app} \approx 2000$  and  $A_s \approx 8.5$  at 55 °C;  $N_{app} \approx 11\,000$  and  $A_s \approx 2.3$  at 60 °C). Because L-arginine did not interact significantly with the chiral selector, the poor efficiency performances for the target enantiomer appear, therefore, to be dependent on its binding to the aptamer-specific sites, consistent with slow target desorption kinetics and concentration overload of aptamer binding sites (nonlinear effects).<sup>29–32</sup>

*Effects of Sample Load and Aptamer Plug Length on the Target Electrophoretic Behavior.* The study of the retention, efficiency,

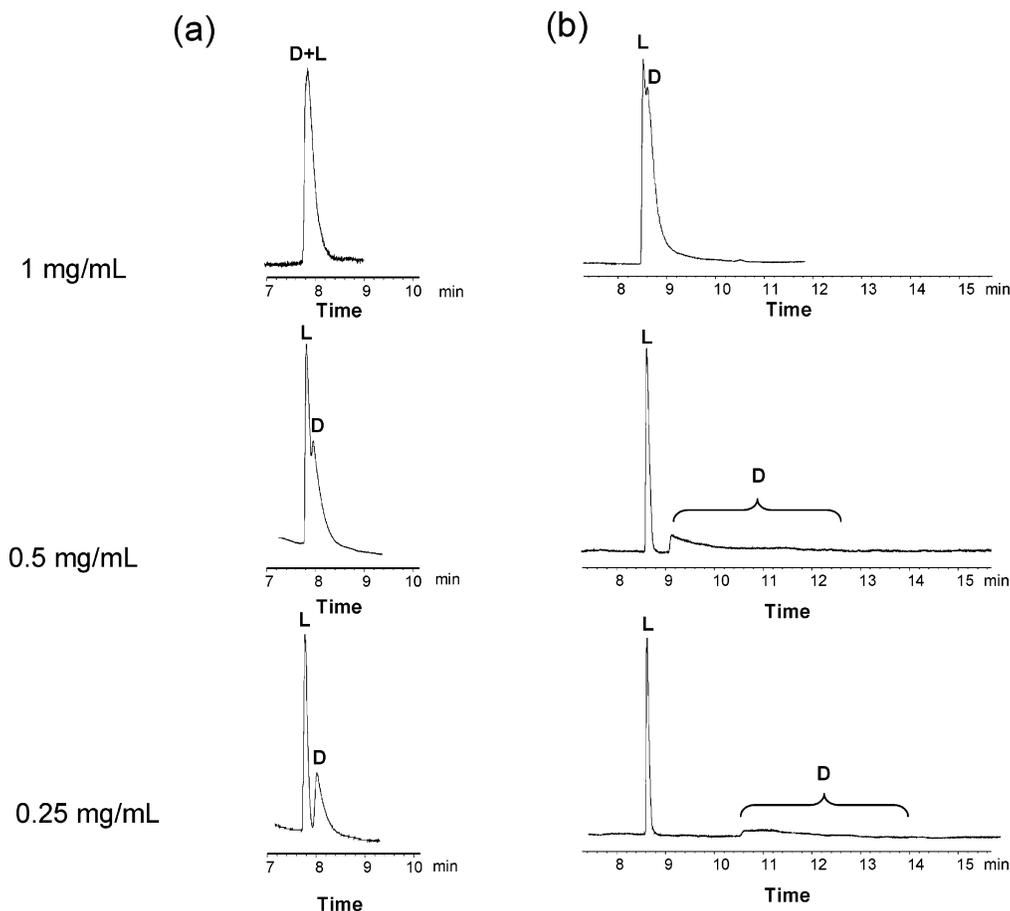
(28) Nelson, W. M.; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 3265.

(29) Tanaka, Y.; Terabe, S. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *48*, 103.

(30) Hedeland, M.; Isaksson, R.; Petterson, C. *J. Chromatogr., A* **1998**, *807*, 297.

(31) Amini, A.; Westerlund, D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1425.

(32) Vespalec, R.; Sustacek, V.; Bocek, P. *J. Chromatogr.* **1993**, *638*, 255.



**Figure 4.** Enantiomeric separation of arginine at various sample loads (0.25–1 mg/mL) for a 500-s aptamer plug. (a) Capillary temperature of 60 °C. (b) Capillary temperature of 50 °C. Normalized profiles. Other CE conditions are given in Figure 2.

and peak shape dependence on the sample load is a useful approach to obtain valuable information about the importance of the nonlinear and kinetic effects.<sup>33–39</sup> Therefore, to gain insight into the origins of the poor target efficiency, additional electrophoretic experiments were performed at higher sample loads (0.25–1 mg/mL), in identical operating conditions.

The apparent  $k_{CE}$  values for the target enantiomer were first plotted against the sample concentration. This was established for the 50–60 °C temperatures, i.e., where the data were available for all the loading range (the target band was not detected over the 15–45 °C temperature range at a concentration of 0.25 mg/mL). These data are shown in Figure 3a. As mentioned previously for the lower sample concentration, the L-arginine CE retention factor was negligible over this temperature range. As shown in Figure 3a, a decrease in the apparent CE retention factor was observed when the sample concentration increased from 0.25 to 1 mg/mL. A stronger variation was observed when the temperature decreased (Figure 3a). Representative electropherograms are presented in Figure 4 for the 50 and 60 °C capillary

temperatures. At 50 °C, the baseline enantiomeric separation was achieved at 0.25 and 0.5 mg/mL, whereas only a partial resolution was obtained for the higher sample concentration. When the temperature increased to 60 °C, the chiral resolution could not be observed at a sample load of 1 mg/mL. Furthermore, Figure 3a shows that the apparent  $k_{CE}$  values decreased over all of the loading range (0.1–1 mg/mL) for the 55–60 °C temperatures. Such observation indicates that nonlinear conditions were effective over the entire sample size range examined in this study.

The variation of the enantiomer half-height efficiency with increasing sample load is shown in Figure 3b. Whatever the capillary temperature, the apparent efficiency for the nontarget enantiomer decreased slightly, if any, when the sample concentration increased. In contrast, the target apparent efficiency became progressively higher when the sample load increased, as shown in Figure 3b. These effects were particularly marked at 50 °C: the target enantiomer  $N_{app}$  values varied from ~300 to ~25 000 when the sample concentration increased from 0.25 to 1 mg/mL. “Pure” nonlinear effects (thermodynamic origin) are typically responsible for peaks increasingly right-angle-triangle in shape with increasing bandwidth (decreasing efficiency).<sup>35,38</sup> On the other hand, a sample mass-dependent increase in the half-height efficiency has been previously reported for solute interaction with chromatographic surfaces containing a small number of strong adsorption energy/slow mass transfer kinetics sites and a larger number of sites characterized by weaker adsorption energy/faster

(33) Sellergren, B.; Shea, K. J. *J. Chromatogr., A* **1995**, *690*, 29.

(34) McCalley, D. V. *J. Chromatogr., A* **1998**, *793*, 31.

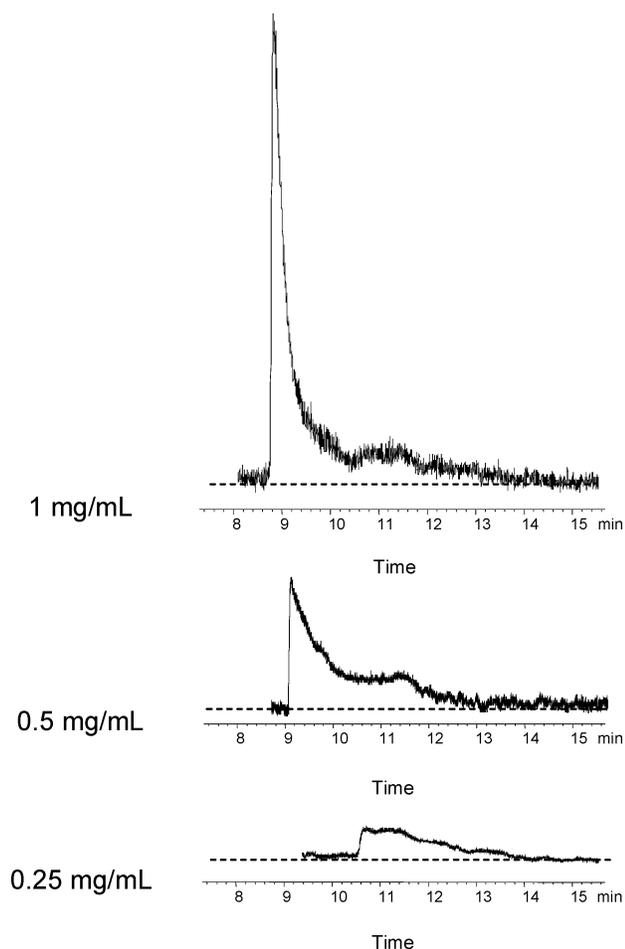
(35) Buckenmaier, S. M. C.; McCalley, D. V.; Euerby, M. R. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4672.

(36) McCalley, D. V. *J. Chromatogr., A* **2000**, *902*, 311.

(37) Baggiani, C.; Baravalle, P.; Anfossi, L. Tozzi, C. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *542*, 125.

(38) Smith, K. W.; Davis, J. M. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5969.

(39) Wade, J. L.; Bergold, A. F.; Carr, P. W. *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1286.



**Figure 5.** Evolution of the shape of the band profiles of D-arginine as a function of the sample load (0.25–1 mg/mL) for a capillary temperature of 50 °C and a 500-s aptamer plug. Other CE conditions are given in Figure 2.

kinetics.<sup>34–37</sup> Therefore, the apparent improvement in the target efficiency with the sample load over the 50–60 °C temperature range suggests that heterogeneous kinetic effects were also of importance in the target behavior. Such a phenomenon can be clearly evidenced through the careful examination of the target peak profiles obtained under the 0.25–1 mg/mL sample concentration conditions. The most striking feature of the band profiles was obtained for the 50 °C temperature, that is, where both the apparent CE retention factor and  $N_{app}$  variations with the increasing sample concentration were particularly marked (Figure 3). The corresponding target band profiles are presented in Figure 5. At 0.25 mg/mL, the peak profile was characterized by a small plateau followed by a tailing. When the sample load further increased to 0.5 mg/mL, a shoulder on the rear front of the peak profile can be clearly visualized. This could even be considered as a second partially separated band. The same shoulder phenomenon was obviously retrieved when the sample concentration was increased to 1 mg/mL, at an identical apparent migration time (Figure 4b). This observation corroborates the expectation that the target enantiomer was bound to different aptamer sites, with distinct desorption kinetics.<sup>40–42</sup> If slow desorption kinetics occurs for a small number of strong binding sites, low efficiency was

expected at a low sample load. As the sample load increased, a solute fraction was predicted to progressively saturate high energy sites, and then the additional part of the solute interacted with aptamer sites of lower energy, with faster kinetics.<sup>34,35,39</sup> As a result, the latter solute fraction appeared in the narrower first part of the band, whereas the former solute fraction caused the presence of the shoulder at the end of the bands. Such a narrow first part of the target band can, thus, explain the improvement of the apparent efficiency, measured by the half-height method, as the sample load increased. Furthermore, the marked sample mass-dependent decrease in the apparent CE retention factor that occurred at 50 °C (Figure 3a) is consistent with the saturation of the stronger sites.<sup>35,37</sup>

Such explanation was further confirmed by additional experiments performed using a lower aptamer plug (400-s injection time). As an example, Figure 6 presents the chiral resolution as well as the target band profile obtained for a sample concentration of 0.5 mg/mL at a temperature of 50 °C. The racemate was partially resolved (Figure 6a), in contrast with the baseline resolution reported at a higher aptamer plug (see Figure 4b for comparison). This was dependent on the strong decrease in the target apparent CE retention factor (0.03 versus 0.10 for the higher plug), whereas the apparent half-height efficiency strongly increased from ~1000 (for the 500-s plug) to ~18 000 (for the 400-s plug). A shoulder phenomenon was also observed (Figure 6b), but the high-energy sites were expected to be more easily filled by the target sample so that a greater proportion of the solute eluted in the band first part and accounted for the apparent enhancement of the target efficiency.

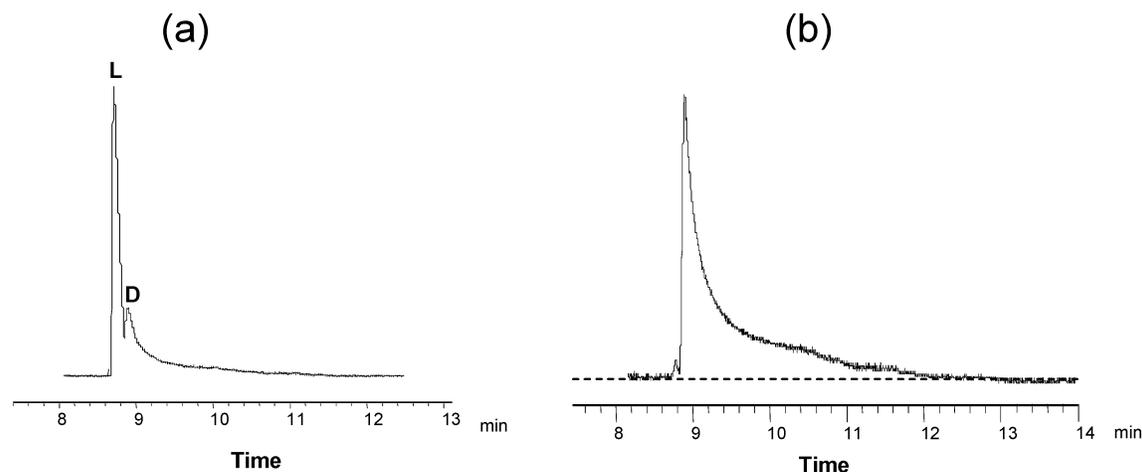
The variation of the target efficiency and peak profile with the temperature increasing at a given sample load can be, thus, interpreted through the two phenomena identified above, that is, the heterogeneous kinetics and the concentration overload of aptamer binding sites. Over the lower sample size range, dramatic changes in the target  $N_{app}$  and peak profile were observed (Figures 3b and 4). The desorption kinetics of the target from the high-energy binding sites of the aptamer were expected to become faster when the temperature increased. As a result, the relative contribution of these sites was predicted to be diminished at high enough temperatures,<sup>36</sup> and then the peak distortion was reduced. As an additional phenomenon, the temperature increase could govern a modification of the aptamer saturation capacities or the type of sites, allowing possible changes in the nonlinear effects. On the other hand, similar half-height efficiencies were obtained for all the capillary temperatures at a sample load of 1 mg/mL (Figure 3b). This is consistent with high overload effects, which were assumed to overwhelm the kinetic contribution.

**RNA Conformations as a Plausible Source of the Binding Site Heterogeneity.** RNA molecules can form complex secondary and tertiary structures that are intimately linked with their functions. RNAs form regular helical secondary structures from canonical base pairing, and additional noncanonical and tertiary interactions can give RNA the three-dimensional fold. It is well-established that the temperature increase causes the disruption of tertiary interactions as well as secondary structure: within a

(41) Moaddel, R.; Jozwiak, K.; Whittington, K.; Wainer, I. W. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 895.

(42) Jozwiak, K.; Haginaka, J.; Moaddel, R.; Wainer, I. W. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 4618.

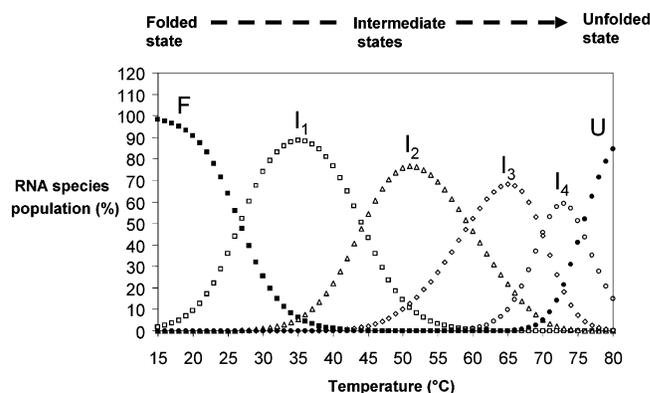
(40) Gritti, F.; Guiochon, G. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1047*, 33.



**Figure 6.** (a) Enantiomeric separation of arginine for a capillary temperature of 50 °C, an enantiomer concentration of 0.5 mg/mL, and a 400-s aptamer plug. (b) Band profile of D-arginine under the same conditions. Other CE conditions are given in Figure 2.

classical hierarchical model, the native folded RNA (F) forms intermediate states (I) followed in a second step by the formation of the completely unfolded RNA (U).<sup>43,44</sup> Thus, various RNA conformations with different tertiary/secondary interactions are commonly identified and differently populated at a given temperature.<sup>43,44</sup> Furthermore, it is generally accepted that the fully folded tertiary structure of RNA (F) is of crucial importance for the ligand binding and recognition,<sup>43,44</sup> the ligand affinity for the RNA molecule being reduced or abolished as the tertiary structural elements are destructed.<sup>45,46</sup>

To identify the different RNA aptamer conformations under the 15–60 °C temperature range, thermal melting experiments were performed by UV spectroscopy at 260 nm. Thermal denaturation experiments monitored the heat-induced unfolding of RNA structural domains by observing the absorbance changes as a function of temperature.<sup>43</sup> As the temperature increases, the ratio of molecules in the native versus denatured states decreases. Since the native and the single-stranded states have different absorptivities, the change in absorbance with temperature effectively monitors the transition. Details of experimentations as well as complete thermodynamic analysis are provided in the Supporting Information. From the melting data, unfolding pathways with five individual transitions were identified as the simplest models over the 15–80 °C. Six conformers were then defined via the five-transition model, from the expected native folded conformer (F) to fully unfolded structure (U), with four intermediate states (I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>, and I<sub>4</sub>). The relative species populations in relation to the temperature are reported in Figure 7. Over the temperature range of the electrophoretic experiments (15–60 °C), it appeared that four different conformers were preponderant, including the folded structure (F) as well as three intermediates states (the I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, and I<sub>3</sub> species). The thermodynamic analysis based on the unfolding enthalpy variations revealed that the formation of the F, I<sub>1</sub>, and possibly I<sub>2</sub> conformers contained tertiary elements, whereas the I<sub>3</sub> species did not engage any tertiary contacts (see



**Figure 7.** Fractional species population of the thermal unfolding of the anti-arginine L-RNA aptamer derived from the analysis of the melting UV profile (see Supporting Information for details).

Supporting Information). A folding enthalpy ranging from –122 to –170 kcal/mol was attributed to the establishment of the tertiary contacts. Such very high van't Hoff enthalpy for tertiary folding suggests that strong noncanonical contacts, including hydrogen bond formation or base stacking,<sup>44</sup> were involved in the formation of the two (and possibly three) low-temperature conformers, stabilizing the sophisticated pseudoknotted secondary structure of the RNA molecule (Figure 1b).

For the low-temperature range (15–35 °C), the F and I<sub>1</sub> conformer populations predominated. Because the folded state represented 98% of the RNA species at 15 °C, this indicates that the F conformer population exhibited high binding (and then chiral discrimination) properties, as expected for a fully folded structure.<sup>43,44</sup> When the temperature increased, the F state population decrease was associated with the increase in the I<sub>1</sub> population, which constituted 88% of the RNA aptamer total population at 35 °C. This demonstrates that the I<sub>1</sub> partially folded conformer also possessed intrinsically high enantioselective properties.

Over the temperature range of practical interest (50–60 °C), the I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, and I<sub>3</sub> conformers represented the totality of the RNA aptamer species (Figure 7). At 50 °C, 14% of I<sub>1</sub>, 76% of I<sub>2</sub>, and 10% of I<sub>3</sub> can be retrieved. Considering that the loss of tertiary contacts is associated with the alteration of the target affinity for the

(43) Brion, P.; Westhof, E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 113.

(44) Draper, D. E. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 145.

(45) Jucker, F. M.; Philips, R. M.; McCallum, S. A.; Pardi, A. *Biochemistry* **2003**, *42*, 2560.

(46) Wickiser, J. K.; Cheah, M. T.; Breaker, R. R.; Crothers, D. M. *Biochemistry* **2005**, *44*, 13404.

aptamer,<sup>45,46</sup> it is plausible to relate at least in part the binding site heterogeneity to the presence of these three aptamer conformations. When the temperature further increased, the I<sub>1</sub> conformer represented a very low proportion of the RNA species (3% at 55 °C and 0.6% at 60 °C), whereas the I<sub>2</sub> and I<sub>3</sub> species were abundantly populated (Figure 7). As a consequence, it can be reasonably proposed that both the changes in the relative populations of the conformers and the faster mass transfer kinetics produced the improvement of the target band shape obtained for the lower sample loads (Figures 3b and 4). More detailed studies need to be performed to confirm these expectations, including, notably, measurements of target binding isotherms at the various temperatures.

## CONCLUSION

In summary, we have described the use of a RNA aptamer as a target-specific chiral additive in partial-filling capillary electrophoresis. High chiral resolving capability is reported over the low or moderate temperature range, the target enantiomer being not detected in the separation window. The practical chiral resolution is achieved only at high enough temperatures (50–60 °C). Furthermore, it appears that binding site heterogeneity, slow mass transfer kinetics, and nonlinear effects govern the target enantiomer behavior. It is suggested that the three RNA conformations, identified by additional thermal unfolding experiments over the 50–60 °C temperature range, could be responsible, at least in part, for the heterogeneous distribution of the target binding sites of the aptamer chiral selector.

From a practical point of view, slow mass transfer kinetics as well as binding site heterogeneity constitute drawbacks for enantiomeric separation and render such high-affinity RNA aptamer of lower interest relative to the most popular chiral selectors used in CE (cyclodextrins, antibiotic macrocyclics, crown-ethers, etc.); however, some solutions can be envisaged to improve the efficiency performances of this kind of aptamer chiral selector. For example, because the binding pocket of the anti-arginine aptamer has been clearly identified,<sup>20</sup> the RNA sequence could be modified at critical, precise locations to obtain more valuable binding/kinetic properties for chiral separation applications. In addition, the background electrolyte composition (nature and concentration of salts, pH, organic solvent, etc.) is very likely an important factor for modulating the strength of the target–aptamer association<sup>12</sup> and the rate constants. Concomitantly, it would seem of interest to work over a precise temperature range, where one of the aptamer conformers strongly predominates, to reduce (or eliminate) the possible harmful influence of multiple RNA states on the target efficiency and peak shape.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Supporting Information as noted in text is available. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review January 6, 2006. Accepted February 2, 2006.

AC060033I

## Supporting information

### Study of the Arginine Enantiomeric Separation using an anti-arginine RNA Aptamer as Chiral Additive in Partial-Filling Capillary Electrophoresis

Josephine Ruta, Corinne Ravelet, Catherine Grosset, Jennifer Fize, Anne Ravel, Annick Villet, Eric Peyrin\*  
Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier,  
UFR de Pharmacie de Grenoble, Avenue de Verdun, 38240 Meylan, France  
\* Corresponding author: Email: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr

### Identification of the different RNA conformations by UV thermal denaturation analysis

#### 1. Experimental and methods

##### UV thermal denaturation experiments

The RNA melts were collected on a Perkin-Elmer lambda-40 UV/vis spectrophotometer (Courtaboeuf, France) equipped with a PTP1 Peltier temperature programmer (Perkin-Elmer). RNA was prepared by diluting a part of the working RNA aptamer solution (see text) to 1 mL with the buffer used as background electrolyte (final concentration 1  $\mu$ M). The RNA sample was heated to 90°C for 10 min, slow-cooled and allowed to equilibrate at 15°C for 15 min. Capped cells were used and absorbance was recorded as a function of the temperature at 260 nm. The heating rate was 0.5°C/min. All melts were done from low (15°C) to high temperature (80°C). A buffer baseline was obtained under the same conditions as for melting the RNA samples. The unfolding of RNA was estimated to be reversible as the melting profiles obtained for the RNA samples which were melted, cooled to 15°C and remelted were indistinguishable from the initial melt.<sup>1</sup>

##### Melting data analysis

The buffer baseline was subtracted from the raw absorbance versus temperature curves for each RNA sample. After normalization, the melting curves were smoothed using the PeakFit software (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Germany). The melting profile was generated by taking the first derivative of absorbance with respect to temperature (dA/dT) and plotted against temperature. The melting curves can be represented by fractional combinations of a minimum number of Gaussian shaped transitions fitted under the experimental curves.<sup>2,3</sup> Least-squares fitting of transitions to the experimental curves was

accomplished using the PeakFit software. As previously described,<sup>3</sup> the minimum number of denaturation steps (see results and discussion section) was identified from the break in the root mean square error when plotted against the number of transitions. The melting temperatures  $T_m$  were determined at the peak maximum of the differential melting curves. Assuming a van't Hoff two-state melting transition, the full-widths at half-maximum of the Gaussian distributions yield transition enthalpy  $\Delta H_{vH}$  from:<sup>4</sup>

$$\Delta H_{vH} = \frac{\zeta}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)} \quad (1)$$

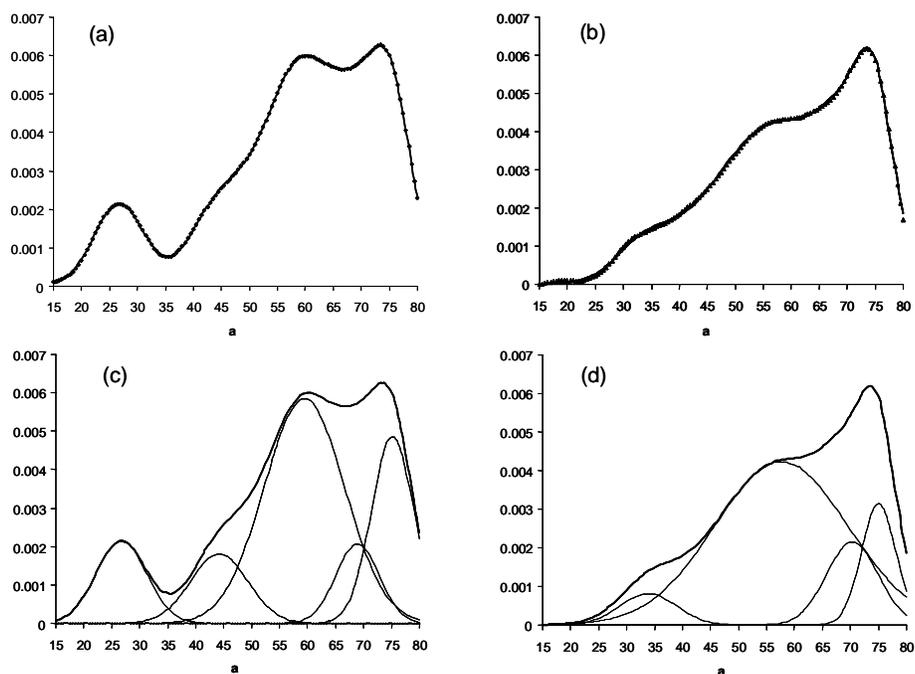
where  $\zeta$  is equal to -7.00 cal/mol K for an unimolecular melting transition<sup>4</sup> and  $T_1$  and  $T_2$  are the temperatures at half-maximum of the first derivative curves. The equilibrium constant  $K$  characterizing the optical melting transition is thus described as follows:

$$K = \exp \frac{\Delta H_{vH} \left( \frac{1}{T_m} - \frac{1}{T} \right)}{R} \quad (2)$$

From the  $K$  values determined for each transition over the temperature range, the fractional species populations were then derived (see Figure 7 in the text).

## 2. The RNA unfolding transitions

Thermal melting experiments were performed at 260 nm in order to identify the RNA aptamer unfolding transitions. These analyses were carried out in presence of  $Mg^{2+}$  as used for the in vitro selection of the anti-arginine RNA aptamer.<sup>5</sup> Divalent cations such as  $Mg^{2+}$  are known to be of particular interest for inducing and stabilizing RNA tertiary structural motifs.<sup>6,7</sup> It appears that tertiary structures are very sensitive to magnesium ions concentration while the secondary structures are not or only slightly affected by  $Mg^{2+}$  concentration.<sup>6,8</sup> So, the UV absorbance monitoring as a function of temperature for different  $Mg^{2+}$  concentrations is a widely used approach to distinguish secondary elements from tertiary folds.<sup>6,9</sup> Therefore, the optical profiles were acquired in presence of  $Mg^{2+}$  concentrations of 2.1 mM and 10 mM. The  $dA/dT$  versus  $T$  plots obtained are presented in Figure 1S a-b.



**Figure 1S.** First derivative of the absorbance monitored at 260 nm with respect to temperature ( $dA/dT$ ) for the truncated sequence of the anti-arginine RNA aptamer. **(a)** 10 mM  $Mg^{2+}$  **(b)** 2.1 mM  $Mg^{2+}$ . The composite fits are superimposed on the experimental data. The individual transitions of the composite fits are shown in **(c)** for 10 mM  $Mg^{2+}$  and **(d)** for 2.1 mM  $Mg^{2+}$

The thermal unfolding of complex RNA molecules can be modeled thermodynamically as a series of coupled equilibria corresponding to sequential unfolding transitions.<sup>3,10,11</sup> From the least-squares fitting of transitions to the experimental curves (see experimental section), unfolding pathways with four (at 2.1 mM  $Mg^{2+}$ ) or five (at 10 mM  $Mg^{2+}$ ) individual transitions were identified as the simplest models (Figure 1S c-d). The melting temperatures as well as the van't Hoff transition enthalpies were determined for each unfolding step using Eqs (1) and (2) and are reported in Table 1S.

**Table IS:** RNA aptamer melting temperatures ( $T_m$ ) and van't Hoff enthalpies ( $\Delta H_{vH}$ ) determined from the optical profiles at two different  $Mg^{2+}$  concentrations.

	$T_m$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H_{vH}$ (kcal/mol)	$\Delta H_{vHT}$ (kcal/mol)
<b>10 mM <math>Mg^{2+}</math></b>			
Trans 1	$26.7 \pm 0.03$	$59.1 \pm 0.3$	$348.9 \pm 23.5$
Trans 2	$44.2 \pm 0.3$	$58.4 \pm 1.8$	
Trans 3	$59.4 \pm 0.4$	$45.8 \pm 2.9$	
Trans 4	$69.9 \pm 0.9$	$185.6 \pm 18.5$ (4+5)	
Trans 5	$75.6 \pm 0.4$		
<b>2.1 mM <math>Mg^{2+}</math></b>			
Trans 1	$33.9 \pm 0.2$	$55.6 \pm 2.6$	$275.0 \pm 34.1$
Trans 2	$57.6 \pm 0.6$	$27.2 \pm 1.2$	
Trans 3	$70.3 \pm 2.4$	$192.2 \pm 30.3$ (3+4)	
Trans 4	$75.1 \pm 0.2$		

For a pseudoknotted element, the close juxtaposition of the pseudoknot loops and stems might promote the formation of tertiary interactions that stabilize the RNA much more than expected from the known secondary structure.<sup>8</sup> Using the individual nearest neighbor and hydrogen bonding (INN-HB) rules,<sup>12-14</sup> the non-pseudoknotted structure of the anti-arginine RNA aptamer (see Figure 1a in the text) was predicted to denature with a total enthalpy of 180 kcal/mol. In addition, the short pseudoknot stem (see Figure 1b in the text) was expected to unfold with a van't Hoff enthalpy of 23 kcal/mol.<sup>14</sup> So, the total enthalpy ( $\Delta H_{pred}$ ) due to the unfolding of the pseudoknotted secondary structure was predicted to be 203 kcal/mol. For the 10 mM  $Mg^{2+}$  concentration, the total van't Hoff enthalpy  $\Delta H_{vHT}$  calculated from the analysis of the UV melting curve was found to be about  $349 \pm 24$  kcal/mol (Table IS). Thus, an unfolding enthalpy ranging from 122 kcal/mol to 170 kcal/mol can be attributed to the disruption of tertiary interactions. Six conformers were defined via the five transition model, from the expected native folded conformer (F) to fully unfolded structure (U) with four intermediate states ( $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$ , and  $I_4$ ). Within a classical hierarchical approach to the RNA unfolding, the set of tertiary interactions first unfold into secondary structures which then denature in a series of additional steps. In many cases, melting experiments can reveal at least

two well-separated transitions;<sup>15-17</sup> the first one is attributed to the melting of tertiary structure while the other one is regarded as reflecting the disruption of secondary structures at higher temperatures. So, the lowest temperature transition found at  $\sim 27^\circ\text{C}$  for the 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  experiments is expected to correspond to the disruption of tertiary contacts. However, as the van't Hoff enthalpy of the first transition contributed to only  $\sim 60$  kcal/mol, additional loss of tertiary interactions should occur at the following unfolding step, i. e. the  $\text{I}_1 \rightarrow \text{I}_2$  transition. Such an observation is in accordance with previous works reporting that the loss of tertiary interactions could occur at different intermediate states, following a multistep tertiary unfolding.<sup>18-20</sup> The two lowest temperature transitions ( $\text{F} \rightarrow \text{I}_1 \rightarrow \text{I}_2$ ) returned van't Hoff enthalpy ( $118 \pm 2$  kcal/mol) which accounted, within uncertainty, for nearly all of the estimated loss of tertiary interactions (122-170 kcal/mol). It could be possible that the formation of the  $\text{I}_2$  species involved also tertiary interactions since the unfolding enthalpy of the third transition ( $46 \pm 3$  kcal/mol) was in the range of the remaining tertiary unfolding enthalpy ( $28 \pm 26$  kcal/mol). Then, the two high temperature transitions ( $\text{I}_3 \rightarrow \text{I}_4 \rightarrow \text{U}$ ) could be attributed to the unfolding of secondary structures. Moreover, the sum of  $\Delta H_{\text{vH}}$  ( $186 \pm 19$  kcal/mol) was in the same order of magnitude than the enthalpy predicted for the secondary unfolding ( $\Delta H_{\text{pred}} = 203$  kcal/mol).

The analysis of the UV melting curves performed in presence of a lower  $\text{Mg}^{2+}$  concentration (2.1 mM) showed that only four transitions occurred over the temperature range (Figure *IS d*) so that five populations were identified. As can be seen in Figure *IS*, the last major peak found in the differential melting curve displayed identical shape, amplitude and maximum for the two magnesium concentrations. The melting temperatures of the two transitions identified by the UV profile analysis remained unaffected by the change in the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration (Table *IS*). In addition, the sum of the unfolding enthalpies for these two unfolding steps was similar to the enthalpy assignable to the secondary structure unfolding ( $192 \pm 30$  kcal/mol *versus* 203 kcal/mol), as reported for the 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  experiments. These data demonstrate clearly that the two high temperature transitions were essentially insensitive to the magnesium concentration and further indicate that they corresponded to the unfolding of RNA secondary structure elements. On the other hand, as shown in Figure *IS b*, the first transition ( $\text{F} \rightarrow \text{I}_1$ ) found at 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$  was no longer detected at a lower  $\text{Mg}^{2+}$  concentration. This was consistent with previous works showing that the full native tertiary structure of many RNAs could be formed only at high enough  $\text{Mg}^{2+}$  concentrations.<sup>15,18,21,22</sup> Furthermore, the melting

temperature of the second transition observed at 10 mM  $Mg^{2+}$  was greatly shifted (Figure *IS*) to a lower  $T_m$  value (by 10°C, see Table *IS*) upon reduction of the  $Mg^{2+}$  concentration, indicating that the  $I_1$  conformer was strongly destabilized by the decrease in the  $Mg^{2+}$  concentration. Similar behaviors have been reported for the melting of RNA tertiary structures.<sup>15,17</sup> This finding clearly corroborates the expectation that tertiary contacts were involved in the formation of the  $I_1$  species. Moreover, the  $\Delta H_{vH}$  value for the first transition obtained at 2.1 mM  $Mg^{2+}$  ( $56 \pm 3$  kcal/mol) accounted for the estimated loss of tertiary interactions (unfolding enthalpy ranging from 38 to 106 kcal/mol). The melting temperature for the  $I_2 \rightarrow I_3$  transition was more weakly affected upon reduction of the  $Mg^{2+}$  (Table *IS*). However, as reported above for the 10 mM  $Mg^{2+}$  experiments, a loss of some tertiary contacts cannot be excluded since the sum of  $\Delta H_{vH}$  for the two lowest temperature transitions observed at 2.1 mM ( $83 \pm 4$  kcal/mol) was also in the range of the estimated enthalpy assignable to the tertiary unfolding.

## References

- 1) Theimer, C. A.; Wang, Y.; Hoffman, D. W.; Krisch, H. M.; Giedroc, D. P. *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 545.
- 2) Harris, D. A.; Tinsley, R. A.; Walter, N. G. *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 389.
- 3) Volker, J.; Blake, R. D.; Delcourt, S. G.; Breslauer, K. J. *Biopolymers* **1999**, *50*, 303.
- 4) Marky, L. A.; Breslauer, K. J. *Biopolymers* **1987**, *26*, 1601.
- 5) Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.
- 6) Brion, P. Westhof, E. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1997**, *26*, 113.
- 7) Draper, D.E.; Grilley, D.; Soto, A. M. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221.
- 8) Draper, D. E. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 145.
- 9) Onoa, B.; Tinoco, I. Jr. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 374.
- 10) Theimer, C. A.; Giedroc, D. P. *J. Mol. Biol.* **1999**, *289*, 1283.
- 11) Laing, L. G. Draper, D. E. *J. Mol. Biol.* **1994**, *237*, 560.
- 12) Hofacker I. L. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3429.
- 13) Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 3406.
- 14) Mathews, H.; Sabina, J.; Zuker, M.; Turner, D. H. *J. Mol. Biol.* **1999**, *288*, 911.

- 15) Brion, P.; Michel, F.; Schroeder, R.; Westhof, E. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2494.
- 16) Tanner, M. A.; Cech, T. R. *RNA*, **1996**, *2*, 74.
- 17) Banerjee, A. R.; Jaeger, J. A.; Turner, D. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 153.
- 18) Gluick, T. C.; Draper, D. E. *J. Mol. Biol.* **1994**, *241*, 246.
- 19) Baird, N. J.; Westhof, E.; Qin, H.; Jacob, J.; Pan, T.; Sosnick, T. R. *J. Mol. Biol.* in press.
- 20) Wilkinson, K. A.; Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4659.
- 21) Rangan, P.; Masquida, B.; Westhof, E.; Woodson, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 1574.
- 22) Laggerbauer, B.; Murphy, F. L.; Cech, T. R. *EMBO J.* **1994**, *13*, 2669.
- 23) Klostermeier, T.; Millar, D. P. *Biochemistry* **2000**, *39*, 12970.



Les propriétés de résolution chirale d'un aptamère L-ARN anti-D-arginine ont été étudiées par électrophorèse capillaire en mode de remplissage partiel. L'arginine en série D semble former un complexe très stable avec son aptamère dans la gamme de température comprise entre 15 et 50°C puisque cet énantiomère cible n'est pas détecté (en accord avec les résultats de Famulok et son équipe [21]). En revanche, à des températures plus élevées (50 - 60°C), la séparation des énantiomères peut être observée. L'injection de la D-arginine seule dans le capillaire partiellement rempli a révélé la présence de deux bandes de solutés partiellement séparées. Cette observation a suggéré que l'énantiomère cible interagit avec des sites différents de l'aptamère possédant des cinétiques de désorptions différentes. Une étude réalisée par spectrophotométrie UV a confirmé la présence de six conformères différents de l'aptamère, dans la gamme de température étudiée (15°C - 80°C), permettant d'expliquer les propriétés de discrimination chirale observées pour cet aptamère en fonction de la température. Les résultats obtenus ont donc montré qu'une hétérogénéité des sites de fixation, de faibles cinétiques de désorption et des effets de surcharge de l'aptamère gouvernent le comportement de la D-arginine.

Compte tenu des capacités exceptionnelles de fixation de cet aptamère pour sa molécule cible, à des températures faibles et modérées (températures entre 15 et 50 °C), nous avons envisagé son utilisation dans un essai énantiosélectif par compétition en électrophorèse capillaire d'affinité pour la détection de l'énantiomère cible à l'état de trace en présence d'un large excès de l'autre énantiomère.



## *Publications N°4 et 5*

**Utilisation d'un aptamère pour le développement d'un essai énantiométrique par compétition permettant la détection rapide d'une impureté énantiomérique**



Le drame causé par la prescription du thalidomide chez des femmes enceintes a permis une meilleure compréhension de l'action stéréosélective des médicaments. Il est, aujourd'hui, bien connu que deux énantiomères d'une même molécule peuvent posséder des activités pharmacologiques différentes. En effet, dans quelques cas, même une impureté énantiomérique mineure peut causer des effets secondaires sévères. Ainsi, cette observation a amené une demande accrue pour des méthodes permettant de détecter rapidement la présence d'une impureté énantiomérique. Les méthodes couramment utilisées pour la détermination d'une impureté énantiomérique incluant la polarimétrie, la spectroscopie RMN et la chromatographie, permettent en général la détection d'impureté énantiomérique à 0,1% (99,8% ee). Des méthodes plus sensibles sont donc requises. L'utilisation de sélecteurs chiraux capable de fixer spécifiquement l'un des deux énantiomères pourrait améliorer la sensibilité des techniques utilisées. L'utilisation d'anticorps hautement énantiosélectifs pour le développement d'immunoessais [30] a permis la détection d'une impureté énantiomérique à un niveau très faible (99,998% ee). Bien que donnant d'excellents résultats, les immunoessais sur phase solide souffrent de quelques inconvénients liés à l'immobilisation sur un support. En effet, les conditions d'immobilisation doivent être mises au point afin que celles-ci soient stables et reproductibles. De plus, le protocole des immunoessais est relativement long puisque des étapes de lavage et rinçage sont nécessaires. En considérant ces limitations, les essais par ECA semblent être une alternative intéressante. En effet, l'ECA consomme moins d'échantillon et de solvant, les étapes de lavage et rinçage sont éliminées, la séparation a lieu en solution sans utilisation de support solide et le processus est automatisé.

En tenant compte des nombreux avantages de cette technique et de l'affinité exceptionnelle de l'aptamère L-ARN anti-D-arginine précédemment étudié, un essai énantiosélectif par compétition en ECA a été conduit pour la première fois au laboratoire. Afin de réaliser cet essai, un dérivé de la D-arginine marqué par un groupement dansyl, utilisé comme compétiteur de l'énantiomère cible, a été synthétisé au sein de l'équipe de Chimie Bio-organique du DPM. Le détail de cette synthèse est présenté en partie expérimentale additive.



# Aptamer-Based Enantioselective Competitive Binding Assay for the Trace Enantiomer Detection

Josephine Ruta, Corinne Ravelet, Isabelle Baussanne, Jean-Luc Décout, and Eric Peyrin\*

Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, ICMG FR 2607, Université Joseph Fourier, UFR de Pharmacie de Grenoble, 5, Avenue de Verdun, 38240 Meylan, France

The development of highly enantioselective assays and sensors has received much attention for the determination of enantiomeric impurities at a low level. For chiral compounds, the efficient monitoring of the in selection procedure has allowed the isolation of nucleic acid aptamers which are able to strongly discriminate the target enantiomers. In this paper, we demonstrated for the first time that an aptamer can be successfully used to design a highly enantioselective tool for the trace enantiomer detection. The aptamer-based stereoselective assay was developed using an affinity capillary electrophoresis-based competitive, homogeneous format and an on-capillary mixing approach. Detection of as low as 0.01% of the minor enantiomer in a nonracemic mixture can be achieved, in a short analysis time (<5 min).

As a consequence of the chiral nature of living systems, metabolic and regulatory processes mediated by biological systems are sensitive to stereochemistry, and different responses can be observed when comparing the activities of enantiomers. Drug enantiomers often differ in their pharmacological and toxicological activity, resulting in stereoselective clinical responses. In some cases, even minor enantiomeric impurities can cause severe toxic side effects.<sup>1</sup> In addition, it is now well-established that D-amino acids, found at a low level in higher order organisms in the form of free amino acids, peptides, and proteins, can play a preponderant role in biochemistry and physiology. Notably, D-serine functions as an important neuromodulator, D-aspartate is implied in developmental and endocrine functions, and D-arginine plays a role in the urea cycle.<sup>2</sup> The detection of D-amino acids is also of importance to estimate the chronological age in forensic sciences, assess food quality, or analyze materials of extraterrestrial origin.<sup>3–5</sup> Therefore, it appears of great interest to design efficient analytical methodologies which are able to detect traces of one enantiomer in the presence of a high excess of the other enantiomer, and the development of assays and sensors, based

on highly enantioselective synthetic molecular receptors or antibodies, has received much attention for the determination of low enantiomeric impurities.<sup>6–8</sup>

Nucleic acid aptamers are single-stranded oligonucleotides with binding properties originating from in vitro selection experiments (SELEX methodology). They are able to bind the target molecules with a very high affinity, equal or sometimes even superior to those of antibodies, and their use as affinity reagents in bioanalytical techniques constitutes an interesting alternative to immunoassays and immunosensors.<sup>9–12</sup> For chiral compounds, the efficient monitoring of the SELEX methodology has allowed the isolation of aptamers which are able to strongly discriminate the target enantiomers. Extreme enantioselectivities have been reported for various compounds including oligopeptides, amino acids and derivatives, nucleosides, or drugs.<sup>13–17</sup>

Due to these binding features, aptamers appear to be excellent potential elements for the development of new highly stereoselective assays and sensors, dedicated to the trace enantiomer detection. In this paper, we describe for the first time an aptamer-based enantioselective assay which allows the detection of the minor enantiomer in a nonracemic mixture at a very low level. The analytical methodology was established using affinity capillary electrophoresis (ACE) through a competitive binding format and an on-capillary mixing approach.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Synthesis of the Dansyl-Labeled D-Arginine.** Briefly, the synthesis of the labeled D-amino acid was accomplished in six steps: (i) reaction of dansyl chloride with 2-aminoethanol, (ii) alkylation of the hydroxyl function introduced with 2,2'-dichloro-

\* To whom correspondence should be addressed. Phone: 33 476 041033. Fax: 33 476 041007. E-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr.

- (1) Kean, W. F.; Lock, C. J. L.; Howard-Lock, H. E. *Lancet* **1991**, *338*, 1565.
- (2) Fuchs, S. A.; Berger, R.; Klomp, L. W. J.; de Koning, T. J. *Mol. Genet. Metab.* **2005**, *85*, 168.
- (3) Yekkala, R.; Meers, C.; Schepdael, A. V.; Hoogmartens, J.; Lambrichts, I.; Willems, G. *Forensic Sci. Int.* **2006**, *159*, S89.
- (4) Marchelli, R.; Dossena, A.; Palla, G. *Trends Food Sci. Technol.* **1996**, *7*, 113.
- (5) Cronin, J. R.; Pizzarello, S. *Science* **1997**, *275*, 951.

- (6) Tsourkas, A.; Hofstetter, O.; Hofstetter, H.; Weissleder, R.; Josephson, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 2395.
- (7) Deore, B.; Chen, Z.; Nagaoka, T. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 3989.
- (8) Zhao, J.; Davidson, M. G.; Mahon, M. F.; Kociok-Kohn, G.; James, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16179.
- (9) Stojanovic, M. N.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9678.
- (10) Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3194.
- (11) Yoshida, W.; Sode, K.; Ikebukuro, K. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3296.
- (12) Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2424.
- (13) Klussmann, S.; Nolte, A.; Bald, R.; Erdmann, V. A.; Furst, J. P. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1112.
- (14) Michaud, M.; Jourdan, E.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8672.
- (15) Majerfeld, I.; Puthenvedu, D.; Yarus, M. *J. Mol. Evol.* **2005**, *61*, 226.
- (16) Shoji, A.; Kuwahara, M.; Ozaki, H.; Sawai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1456.
- (17) Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1029.

diethylether for obtaining the chloro derivative in which (iii) the chlorine atom was substituted for an iodine atom, (iv) reaction of the iodo derivative obtained with the amino group of a D-arginine derivative carrying protected guanidine and carboxylic acid functions (2,2,4,6,7-pentamethylbenzofuran-5-sulfonamide, Pbf, and allyloxycarbonyl groups, respectively), (v) deprotection of the carboxylic acid function under basic conditions and (vi) removal of the Pbf group in TFA (14% yield for the six steps). Details on the synthesis and characterization of the label can be found in the Supporting Information.

**Capillary Electrophoresis Experiments.** The D- AND L-arginine enantiomers, Tris-HCl, KCl, and MgCl<sub>2</sub> were supplied by Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge. Electrophoretic experiments were carried out on a CE Agilent capillary electrophoresis system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. The running buffer (25 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) was prepared daily and degassed using an ultrasonic bath. The solutions of single enantiomers or nonracemic mixtures (sample) and labeled D-arginine were prepared daily in the buffer. The truncated 53-mer L-RNA oligonucleotide (5'-CAUGAUAAACCGAUGCUGGGCGAUUUCUGAAGUAGGGGAAGAGUUGUCAUG-3') was synthesized and HPLC-purified by CureVac (Tubingen, Germany). A 380 μM L-RNA aptamer stock solution was prepared in the buffer and stored at -20 °C. All solutions were filtered prior use through 0.20 μm pore size membranes. The working aptamer solutions were obtained by dilution of the filtered stock solution with the buffer to the final concentration (100 μM). Prior to the first utilization, the aptamer was renatured by heating at 90 °C for 10 min and left to stand at room temperature for 30 min. When not in use, the working aptamer solutions were stored at 4 °C. Under these storage conditions, the working solutions were stable during more than 1 month due to the mirror image strategy.

The coated PVA capillary (Agilent, 50 μm i.d. with extended light path (total length, 64.5 cm) was conditioned at the beginning of the day using the following sequence: (i) 10 min of water and (ii) 15 min of running buffer at 1000 mbar. A "short-end" injection method was developed (effective length, 8.5 cm; negative polarity, cathode at the inlet and anode at the outlet, applied voltage, -25 kV; temperature, 12 °C; UV detection at 250 nm). The species solutions were injected hydrodynamically (-50 mbar) as follows: 20 s aptamer (100 μM) plug (~24 nL), 32 s sample plug (~41 nL), 4 s label (400 μM) plug (~5 nL). Between runs, the capillary was conditioned with the running buffer for 5 min at 1000 mbar. The working aptamer solutions were put on ice between each electrophoretic run in order to maintain the L-RNA oligonucleotide in its fully folded tertiary structure.<sup>18</sup>

The injected solution volume (see above) was determined from the time required for a given species, introduced in the capillary under the constant pressure of -50 mbar, to reach the detector window. The presence of D- or L-arginine enantiomers at different concentrations in the running buffer did not affect significantly the injected sample volume, even for the samples containing

L-arginine at 2 mM and 20 mM concentrations (less than 5% of difference).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design of the CE-Based Competitive Binding Assay.** A truncated 53-mer RNA aptamer, previously identified by a SELEX procedure directed against L-arginine,<sup>17</sup> was used as a model enantioselective aptamer. The aptamer-target association displays high affinity and stereospecificity, characterized by a dissociation constant  $K_d$  of 330 nM, a slow dissociation rate due to the selection procedure based on a heat denaturation/renaturation step, and an enantioselectivity of ~12 000.<sup>17</sup> As previously reported,<sup>13,18,19</sup> the L-RNA aptamer, i.e., the mirror image of the "natural" D-RNA aptamer, was used as a biostable receptor. In accordance with the principle of chiral inversion, the mirror image of the "natural" aptamer is expected to recognize with the same affinity and specificity the mirror image of the target, i.e., D-arginine.<sup>13</sup> Moreover, previous partial-filling CE experiments have shown that, over a low-moderate temperature range, D-arginine formed with this L-RNA aptamer a very stable complex, while the L-arginine-aptamer association was negligible.<sup>18</sup>

As an alternative to the classical solid-phase techniques, ACE-based assays represent a powerful technology for the detection and quantification of analytes. For example, ACE immunoassays offer several clear advantages over the commonly used immunoassays: they consume less sample and reagents, eliminate washing steps, are compatible with automation and online analysis, do not require antibody or analyte immobilization on a solid support, avoid nonspecific binding of antibody or analyte to the surface, and present a wide analyte applicability.<sup>20</sup>

Taking into account all these attractive background features, an ACE-based assay was designed using the anti-D-arginine L-RNA aptamer as a target-specific receptor. A number of recent works have focused on the use of aptamer-based ACE for the quantification of various proteins such as thrombin, IgE, or HIV type 1 reverse transcriptase.<sup>21-23</sup> These electrophoretic experiments involved, in most cases, a direct (noncompetitive) format where the aptamer was labeled and mixed with the target sample during a sufficient incubation time to allow equilibrium between the interacting species. The electrophoretic separation of the mixture produced typically two distinct peaks corresponding to the free labeled aptamer and the labeled complex, allowing the quantification of the protein. In the present work, as arginine is a low molecular mass species bearing only one net positive charge while RNA is much heavier and highly negatively charged, the charge-to-mass ratio of the analyte-aptamer complex is close to that of the free aptamer.<sup>18</sup> So, a direct ACE assay based on the separation of the free aptamer from the complex cannot be easily achieved so that a competitive binding format was developed. Furthermore, an on-capillary mixing approach was carried out, where the reaction and the separation occurred simultaneously in the same capillary by introducing solutions of sample and reagents in the

(18) Ruta, J.; Ravelet, C.; Grosset, C.; Fize, J.; Ravel, A.; Villet, A.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3032.

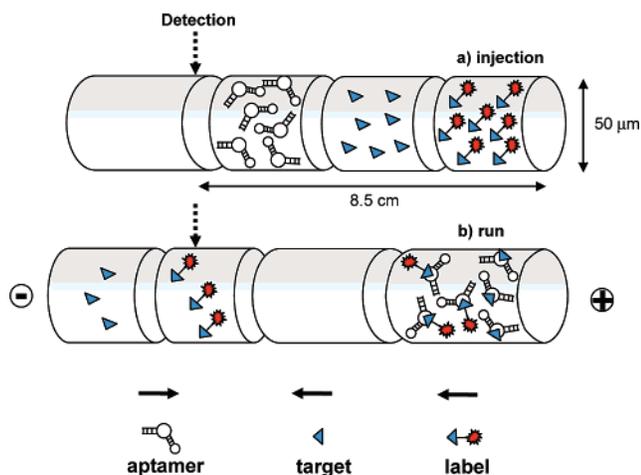
(19) Brumbt, A.; Ravelet, C.; Grosset, C.; Ravel, A.; Villet, A.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1993.

(20) Heegaard, N. H. H.; Kennedy, R. T. *J. Chromatogr., B* **2002**, *768*, 93.

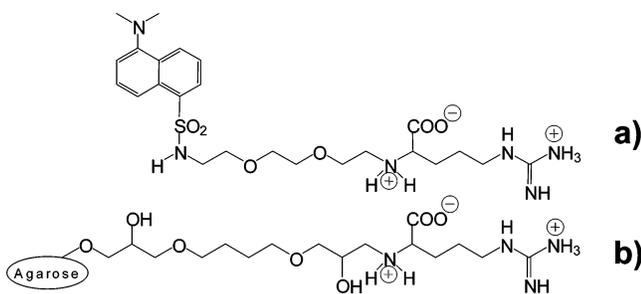
(21) Pavski, V.; Le, X. C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6070.

(22) German, I.; Buchanan, D.; Kennedy, R. T. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4540.

(23) Huang, C.; Cao, Z.; Chang, H.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6973.



**Figure 1.** Principle of the CE-based competitive binding assay using the on-capillary mixing of the different species. Arrows indicate the migration direction of the interacting species when the electric field is applied.



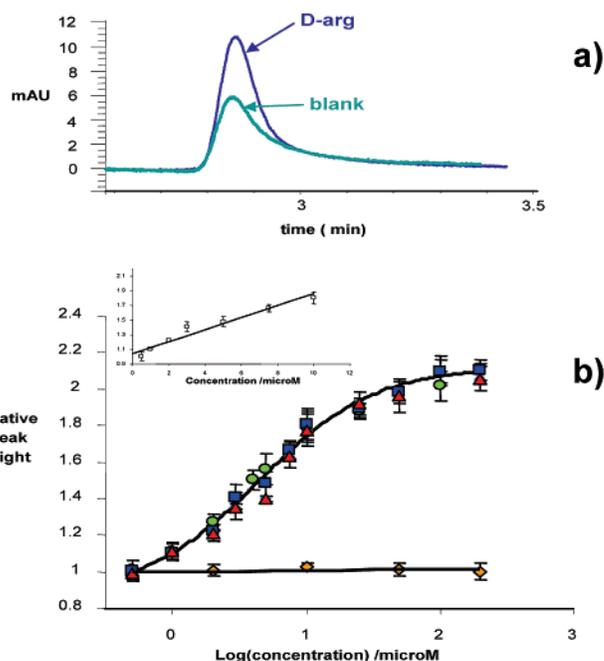
**Figure 2.** Structures of (a) dansyl-labeled D-arginine used in the CE-based competitive binding assay and (b) immobilized arginine, obtained by derivatization of epoxy activated agarose, used as target in the SELEX methodology.

form of individual zones (plugs).<sup>24</sup> The general scheme used is illustrated in Figure 1.

The electrophoretic experiments were conducted using a polyvinyl alcohol (PVA)-coated capillary (i.d., 50  $\mu\text{m}$ ). This coating shields the silanol groups of the fused silica and eliminates the electroosmotic flow (EOF). The capillary was first prefilled with the background electrolyte, and three different plugs were introduced hydrodynamically using the “short-end” injection method: (i) a plug containing a known amount of the L-RNA aptamer, (ii) a sample plug containing an unknown amount of target (D-arginine), and (iii) a plug containing a known amount of the labeled target (referred as label).

For use as label, D-arginine was tagged with a dansyl group (Figure 2a, see the Supporting Information). The linker, its attachment position, and the chemistry used for the labeling were chosen in order to mimic the structure of the immobilized arginine (obtained by derivatization of epoxy activated agarose) that was used as target in the SELEX methodology (see Figure 2b).<sup>17</sup> This allowed avoiding possible alteration of the binding properties of the labeled target. More, the label remained positively charged under the running buffer conditions used.

When the electric field was applied, both the target and the label moved toward the cathodic end, while the negatively charged aptamer migrated in the opposite direction (Figure 1). The target



**Figure 3.** (a) Typical electropherograms showing the free label peaks obtained for blank (no enantiomer in the sample plug) and 10  $\mu\text{M}$  D-arginine in the sample plug. (b) Standard curves obtained for D- (square) and L- (diamond) arginine enantiomers over the 0.5–200  $\mu\text{M}$  concentration range. The target curve was fitted by Table curve 2D (SPSS Science Software GmbH, Erkrath, Germany) to the data plot using a sigmoidal equation. Additional standard curves obtained for the D-enantiomer in the presence of 2 (circle) and 20 mM (triangle) L-enantiomer are presented. Inset: assay response at low concentrations of D-arginine (0–10  $\mu\text{M}$ ) in the sample plug. Error bars represent standard deviations ( $n = 5$ ).

was first in contact with the aptamer zone, causing the formation of the D-arginine–aptamer complex. The slow complex dissociation kinetics<sup>17,18</sup> allowed separation of free from complexed target. The unbound D-arginine migrated toward the cathode, while the target–aptamer complex and the free aptamer moved at a close mobility toward the anodic end. Then, labeled D-arginine passed through the aptamer zone and bound to the free aptamer binding sites. As evoked above for the target, the unbound fraction of label was separated from the label–aptamer complex zone. The free labeled D-arginine band, moving toward the cathodic end, was detected at the UV detector window (Figure 1).

D-Arginine was injected as a sample plug over a 0.5–200  $\mu\text{M}$  concentration range. Figure 3a shows a representative example of electropherograms obtained for a blank (sample plug without D-arginine) and a sample plug containing 10  $\mu\text{M}$  of D-arginine. The effect of the D-arginine concentration on the assay response is presented in Figure 3b. The curves were constructed by plotting the relative peak height (ratio of free label peak height for the sample to the free label peak height for the blank) versus the solute concentration, as reported previously.<sup>25</sup> The label free fraction was enhanced with the sample target concentration increasing, as a consequence of the fewer aptamer binding sites available. The calibration curve presents a sigmoidal shape typical for competitive assays. At low D-arginine concentrations, the assay response increased linearly as the target concentration varied from

(24) Haes, A. J.; Giordano, B. C.; Collins, G. E. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3758.

(25) Yang, W. C.; Yeung, E. S.; Schmerr, M. J. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1751.

0 to 10  $\mu\text{M}$  (see the inset in Figure 3b; linear interpolation:  $y = 0.083x + 1.038$  with a regression coefficient  $R = 0.98$ ). The detection limit of D-arginine was calculated to be 1.5  $\mu\text{M}$  through the statistical analysis of the regression function.

**Stereoselectivity and Trace Enantiomer Detection.** The binding curve for L-arginine was subsequently determined using the same methodology, i.e., with a sample plug containing L-arginine. As can be seen in Figure 3b, no binding of the nontarget enantiomer to the aptamer was obtained over the 0.5–200  $\mu\text{M}$  concentration range. Furthermore, higher concentrations of L-arginine in the sample plug (2 and 20 mM) were analyzed and did not cause any significant response. This demonstrated that the cross-reactivity of the aptameric receptor with the opposite enantiomer was negligible.

The enantioselective properties of the anti-D-arginine L-RNA aptamer were accounted to analyze enantiomer mixtures of arginine. The D-arginine assay was performed in the presence of high L-arginine concentrations (2 and 20 mM) in the sample plug. As can be seen in Figure 3b, no significant changes were observed in the standard curves of the target enantiomer. Moreover, the statistical limits of detection for D-arginine were found to be equal to 1.5 and 1.2  $\mu\text{M}$  in presence of 2 and 20 mM of L-arginine, respectively. So, as little as 2  $\mu\text{M}$  of D-arginine in the presence of 20 mM of L-arginine can be detected. The assay allows the detection of 0.01% of the minor enantiomer in a nonracemic mixture, 1 order of magnitude lower than the 0.1–1% detection limits which are typically attainable with currently available stereoselective analysis methods using NMR or conventional separation techniques.<sup>26–28</sup> In addition, the present sensing system

compares very well with the very sensitive methods based on other target-specific bioaffinity systems (such as enantioselective immunosensors and immunoassays).<sup>6,29,30</sup>

## CONCLUSION

In conclusion, we have demonstrated that an aptamer can be successfully used to design a highly enantioselective tool for the trace enantiomer detection. To the best of our knowledge, this work reports the first example of an ACE-based assay dedicated to the enantioselective analysis. Such assay combines a number of attractive features including simplicity, flexibility, minute consumption of material (only some nanoliters, see the Experimental Section), and a homogeneous format. More, the on-capillary mixing approach does not require any incubation time and then allows very little time to conduct the assay relative to that needed by a preincubated method.<sup>19–22</sup> An analysis, including the plug introduction in the capillary and the detection of the free label peak, is completed in less than 5 min.

The present assay is potentially applicable to a laser-induced fluorescence detection system for improving sensitivity. In addition, for a high-throughput chiral analysis, parallel runs on a chip or capillary array electrophoresis are possible.<sup>31,32</sup> As aptamers are able to recognize virtually any target of interest with high affinity and specificity,<sup>33,34</sup> it can be anticipated that this type of CE-based enantioselective competitive binding assay could be adaptable, by modifying some experimental settings, to any chiral analyte that presents a charge-to-mass ratio different to that of aptamers.

## SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Details on the synthesis and characterization of the dansyl-labeled D-arginine. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ACKNOWLEDGMENT

We thank the CNRS and the Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche for financial support.

Received for review March 7, 2007. Accepted April 17, 2007.

AC070469D

(26) Navratilova, H. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 727.

(27) Altria, K. D. *J. Chromatogr., A* **1999**, *856*, 443.

(28) Gika, H.; Lämmerhofer, M.; Papadoyannis, I.; Lindner, W. *J. Chromatogr., B* **2004**, *800*, 193.

(29) Hofstetter, O.; Hofstetter, H.; Wilchek, M.; Schurig, V.; Green, B. S. *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 371.

(30) Dutta, P.; Tipple, C. A.; Lavrik, N. V.; Datskos, P. G.; Hofstetter, H.; Hofstetter, O.; Sepaniak, M. J. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2342.

(31) Paegel, B. M.; Emrich, C. A.; Wedemayer, G. J.; Scherer, J. R.; Mathies, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 574.

(32) Reetz, M. T.; Kühling, K. M.; Deege, A.; Hinrichs, H.; Belder, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3891.

(33) Sazani, P. L.; Larralde, R.; Szostak, J. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8370.

(34) Mann, D.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Strehlitz, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 1928.

En conclusion, nous avons développé, pour la première fois, un essai énantiosélectif simple, rapide, et flexible permettant la détection d'une impureté énantiomérique à 0,01% dans un mélange non racémique, ce qui est 10 fois plus faible que les limites de détection couramment atteintes avec des méthodes conventionnelles d'analyses stéréosélectives (0,1 - 1%). Cependant, cette limite de détection est 10 fois plus importante que celle obtenue par Hofstetter et ses collaborateurs [30] en utilisant un immunoessai sur support solide.

Afin de tenter d'améliorer cette limite de détection, un essai énantiosélectif similaire a été réalisé en incubant, avant injection dans le capillaire, l'aptamère en présence de son énantiomère cible non marqué. Cette méthode favorisant un contact direct entre l'aptamère et son énantiomère cible semble être une approche intéressante pour améliorer la limite de détection et le signal obtenu. Dans le but d'optimiser au maximum cette méthode, l'influence de la tension appliquée et de la longueur de la zone injectée contenant le mélange incubé aptamère-énantiomère cible sur la réponse de l'essai a été évaluée.



Josephine Ruta  
Corinne Ravelet  
Isabelle Baussane  
Jennifer Fize  
Jean-Luc Décout  
Eric Peyrin

Département de Pharmacochimie  
Moléculaire, Institut de Chimie  
Moléculaire de Grenoble,  
Université Grenoble I (Joseph  
Fourier), UFR de Pharmacie,  
Grenoble, France

## Short Communication

# Competitive affinity capillary electrophoresis assay based on a “hybrid” pre-incubation/on-capillary mixing format using an enantioselective aptamer as affinity ligand

In this paper, we describe an aptamer-based competitive affinity CE (ACE) assay involving (i) the pre-incubation of the target (D-arginine) and the specific ligand (anti-D-arginine-L-RNA aptamer) before (ii) the competition with the labeled target (dansylated D-arginine) through an on-capillary mixing strategy. The effects of some critical operating parameters such as the applied voltage and the sample-aptamer mixture plug length on the assay sensitivity were investigated. The ACE assay appeared particularly dependent on the plug length of the pre-incubated sample-aptamer solution. It was shown that this “hybrid” strategy significantly improved the assay sensitivity relative to that obtained with a “full” on-capillary mixing approach.

**Keywords:** Aptamer / CE / Competitive assay

Received: December 3, 2007; revised: February 15, 2008; accepted: February 15, 2008

DOI 10.1002/jssc.200700633

## 1 Introduction

Nucleic acid aptamers are single-stranded oligonucleotides with binding properties originating from *in vitro* selection experiments (systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) methodology). They are able to bind the target molecules with a very high affinity, equal or sometimes even superior to those of antibodies, and their use as affinity reagents in bioanalytical techniques constitutes an interesting alternative to immuno-assays and -sensors [1]. As an alternative to the classical solid-phase techniques, affinity CE (ACE)-based assays represent a powerful technology for the detection and quantification of analytes [2]. A number of recent works has notably focused on the use of aptamer-based ACE for the quantification of various proteins such as thrombin, immunoglobulin E or human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase [3]. Very recently, such ACE methodology has also been applied to the analysis of the interaction between cocaine and arginamide and their corresponding aptamers through the

electrochemiluminescence and electrochemical detection of the free target molecules [4].

It is well established that the efficient monitoring of the SELEX procedure has often allowed a very high specificity exemplified by the capability of the aptamer to bind the target stereospecifically. Various enantioselective DNA and RNA aptamers have been isolated against chiral compounds. They are commonly characterized by dissociation constants in the millimolar to submicromolar range and these binding affinities are frequently associated with extreme stereoselectivity. For example, enantioselectivity values ranging from about 100 to more than 10 000 have been reported for various small targets such as amino acids and derivatives, oligopeptides, nucleosides or drugs [5–10].

On the basis of these very interesting features, we have recently reported for the first time an ACE-based enantioselective assay using an anti-D-arginine L-RNA aptamer as target-specific receptor for the detection of the minor enantiomer (D-arginine) in a non-racemic mixture at a low level [11]. As arginine is a low molecular mass species bearing only one net positive charge while RNA is much heavier and highly negatively charged, a direct ACE assay based on the separation of the free aptamer from the complex cannot be easily achieved so that a competitive binding format has been developed. Furthermore, an on-capillary mixing approach was selected, where the reaction and the separation occurred simultaneously in the same capillary [11]. This involved the introduction into

**Correspondence:** Professor Eric Peyrin, Département de Pharmacochimie Moléculaire UMR 5063 CNRS, Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble FR 2607, Université Grenoble I (Joseph Fourier), UFR de Pharmacie, 38041 Grenoble cedex 9, France  
**E-mail:** eric.peyrin@ujf-grenoble.fr  
**Fax:** +33-4-766-35298

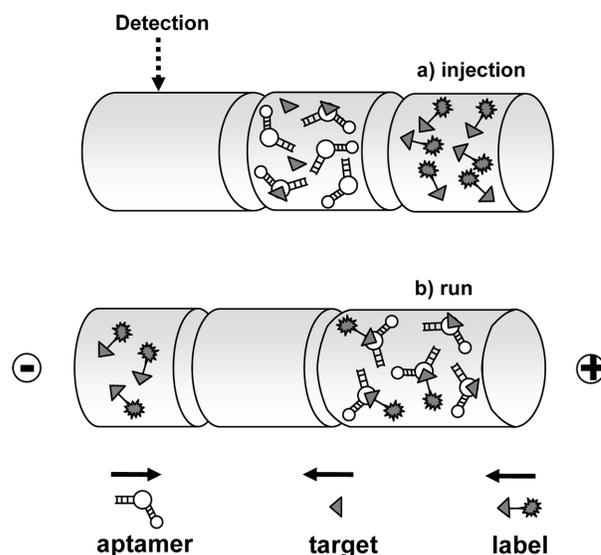
**Abbreviations:** ACE, affinity CE; RPH, relative peak height; SELEX, systematic evolution of ligands by exponential enrichment

the capillary of (i) a plug containing a known amount of the L-RNA aptamer, (ii) a sample plug containing D- and/or L-arginine and (iii) a plug containing a known amount of a labeled target. Using a polyvinyl alcohol-coated capillary, both the target and the label moved toward the cathodic end while the negatively charged aptamer migrated in the opposite direction when the electric field was applied, allowing reactions between the interacting species. Despite the simplicity and the rapidity of such “full” on-capillary mixing format where all the species reacted in the capillary during the separation, this methodology presented some limitations in terms of assay response and sensitivity. The maximal assay response obtained under optimal conditions, (expressed in relative peak height (RPH) *i.e.*, ratio of free label peak height for the sample to the free label peak height for the blank [12]), was found to be no more than  $\sim 2$  [11].

In this paper, we report an improved aptamer-based competitive ACE assay which involved (i) the pre-incubation of the target and aptamer species before (ii) the competition with the labelled target through an on-capillary mixing strategy. The effects of some critical operating parameters such as the applied voltage and the plug length of the pre-incubated sample-aptamer solution on the assay response and sensitivity were investigated and the optimal conditions were assessed.

## 2 Experimental

D- and L-arginine enantiomers, Tris-HCl, KCl, and MgCl<sub>2</sub> were supplied by Sigma Aldrich (Saint-Quentin, France). For use as label, D-arginine was tagged with a dansyl group. The linker, its attachment position and the chemistry used for the labeling were chosen in order to mimic the structure of the immobilized arginine that was used as target in the SELEX methodology. This allowed avoiding possible alteration of the binding properties of the labeled target. More, the label remained positively charged under the running buffer conditions used. The structure of the dansylated D-arginine and the details on the synthesis can be found elsewhere [11]. Water was obtained from an Elgastat option water purification system (Odil, Talant, France) fitted with a reverse osmosis cartridge. Electrophoretic experiments were carried out on a CE Agilent capillary electrophoresis system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector. The running buffer (25 mM Tris-HCl, 25 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) was daily prepared and degassed using an ultrasonic bath. The solutions of single enantiomers or non-racemic mixtures (sample) and labeled D-arginine were daily prepared in the buffer. The truncated 53-mer L-RNA oligonucleotide (5'-CAUGAUAAACCGAUGCUGGGCGAUUCCUGAAGUAGGGGAAGAGUUGUCAUG-3') was synthesized and HPLC-purified by CureVac (Tübingen,



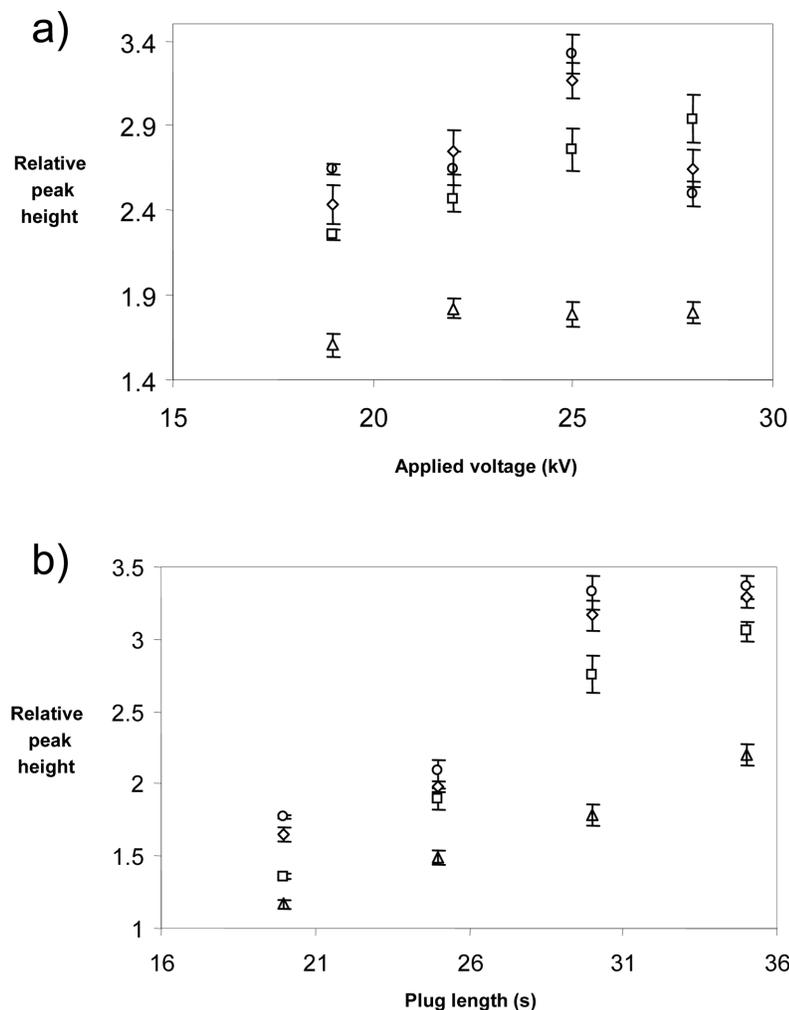
**Figure 1.** Principle of the aptamer-based competitive ACE format involving (i) a pre-incubation of the aptamer and the target and (ii) an on-capillary competition step. Arrows indicate the migration direction of the interacting species when the electric field is applied.

Germany). A 380  $\mu\text{M}$  L-RNA aptamer stock solution was prepared in the buffer and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . All solutions were filtered prior to use through 0.20  $\mu\text{m}$  pore size membranes. Prior to the first utilization, the aptamer was renaturated by heating at  $90^\circ\text{C}$  for 10 min and left to stand at room temperature for 30 min. Premixed aptamer-arginine samples (final concentration of aptamer fixed at 50  $\mu\text{M}$  whatever the arginine concentration) were allowed to incubate for a minimum of 1 h at  $4^\circ\text{C}$ .

The polyvinyl alcohol-coated capillary (Agilent, 50  $\mu\text{m}$  id with extended light path (total length: 64.5 cm) was conditioned at the beginning of the day using the following sequence: (i) 10 min water and (ii) 15 min running buffer at 1000 mbar. A “short-end” injection method was used (effective length: 8.5 cm; negative polarity: cathode at the inlet and anode at the outlet, temperature:  $12^\circ\text{C}$ ; UV detection at 250 nm), as previously described. The species solutions were injected hydrodynamically ( $-50$  mbar). Between runs, the capillary was conditioned with the running buffer for 5 min at 1000 mbar.

## 3 Results and discussion

The aptamer-based ACE assay described here was based on a “hybrid” format which combined (i) the pre-incubation of the aptamer-arginine samples before the capillary injection and (ii) an on-capillary mixing approach for the competition with the labeled target. The general scheme is presented in Fig. 1. When the voltage was applied, the



**Figure 2.** Effects of the applied voltage (a) and the aptamer-sample solution plug length (b) on the RPH for the D-arginine assay. Target concentration in the pre-mixed mixture: 5  $\mu$ M (triangle), 25  $\mu$ M (square), 100  $\mu$ M (diamond) and 200  $\mu$ M (circle). See text for the operating conditions. Error bars represent SDs ( $n = 3$ ).

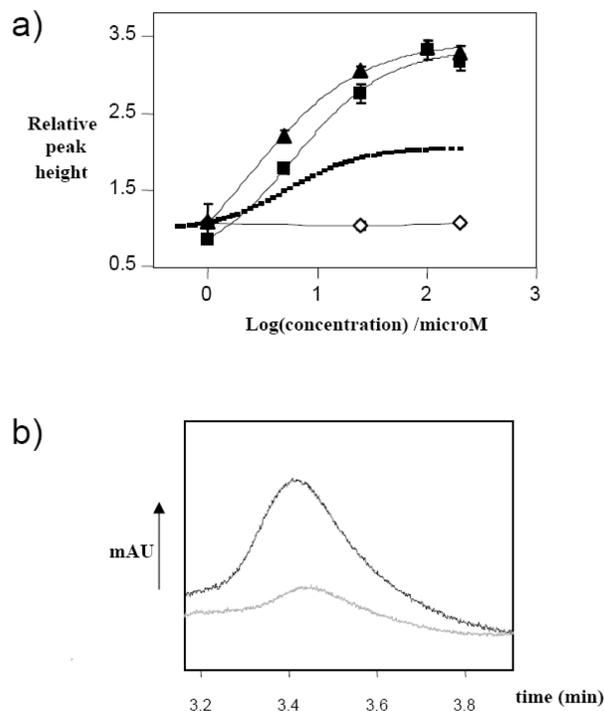
unbound D-arginine in the sample-aptamer plug migrated toward the cathode while the target-aptamer complex and the free aptamer moved toward the anodic end. Concomitantly, the labeled D-arginine zone passed through the sample-aptamer plug and bound to the unoccupied aptamer binding sites. The unbound fraction of label was then separated from the label-aptamer complex and can be detected at the UV detector window. As the pre-incubation approach allows the full complexation of the target by the specific receptor before the occurrence of the competition with the label, an enhancement in the assay sensitivity is expected relative to that previously reported using a “full” on-capillary mixing format.

In the first stage of this work, the effects of some operating parameters on the assay response for the target enantiomer (D-arginine) were investigated. The influence of the species velocity on the assay response was evaluated. Solution of the labeled target (200  $\mu$ M) was injected in the capillary as a short zone (8 s) directly after

a 30 s plug of the aptamer-sample mixture. The experiments were performed under different applied voltages, varying from  $-19$  to  $-28$  kV (negative polarity). The D-arginine concentration in the pre-incubated sample-aptamer mixture was varied from 1–200  $\mu$ M (1, 5, 25, 100, 200  $\mu$ M). Control experiments which corresponded to the absence of target in the sample-aptamer plug (blank) were also performed. The UV detection of the unbound fraction peak of the labeled target was monitored at a wavelength of 250 nm. For the fixed aptamer plug length, the increase in the applied voltage led to an enhancement of the peak height (or free fraction) of the label for the blank assay (data not shown). This was consistent with a reduction of the formation of the labeled D-arginine-aptamer complex during the electrophoretic analysis, due to the decrease in the contact time between the aptamer zone and the label plug. Such behavior reflects the kinetic nature of the on-capillary mixing technique. Whatever the target concentration in the aptamer-sample plug, a slight enhancement of the RPH,

*i.e.* the assay response, was observed when the applied voltage increased from -19 to -25 kV (except for the 1  $\mu\text{M}$  where no significant response was obtained, *i.e.* RPH was equal to  $\sim 1$ ). As an example, the RPH value for a D-arginine concentration of 25  $\mu\text{M}$  increased from  $2.26 \pm 0.03$  for a voltage of -19 kV to  $2.76 \pm 0.13$  for a voltage of -25 kV. Figure 2(a) shows the variation of the RPH value as a function of the applied voltage. Such behavior could be explained by the fact that an increase in the species velocity with the increasing applied voltage allows the label to pass faster through the aptamer-sample zone. This is expected to prevent a significant dissociation of the L-RNA-D-arginine complex before the competition step occurs. When the applied voltage further increased to -28 kV, the assay response was not modified or decreased in some cases. The optimal voltage of -25 kV was then chosen to subsequently evaluate the influence of the plug length of the pre-mixed aptamer-sample solution on the assay response. The plug length was varied from 20 to 35 s for an injection pressure of -50 mbar. For the blank assays, an increase in the plug length of the aptamer solution led to a decrease in the label free fraction (data not shown). This is consistent with the formation of a greater amount of the label-aptamer complex when the amount of injected aptamer was increased. As can be seen in Fig. 2(b), such behavior was associated with a strong enhancement of the assay response when the plug length of the aptamer/sample mixture increased from 20 to 30–35 s. As an example, the RPH value for a D-arginine concentration of 25  $\mu\text{M}$  varied from  $1.36 \pm 0.02$  for a plug length of 20 s to  $3.05 \pm 0.06$  for a plug length of 35 s. As the aptamer-sample zone increased (for a given applied voltage), the possibility for the free target to associate (or reassociate) with free aptamer binding sites during its migration inside the capillary is assumed to increase. This could explain the enhancement of the assay response with increasing plug length.

The calibration curves for D-arginine were then constructed under these optimal conditions and are shown in Fig. 3(a). As a comparison, the previously reported binding curve obtained using a “full” on-capillary mixing strategy [11] is also presented. The calibration curves presented a sigmoidal shape typical for competitive assays. As can be seen in Fig. 3(a), and as expected above, the assay sensitivity obtained with a pre-incubation step was significantly improved (by a factor of about two) relative to that retrieved with the “full” on-capillary mixing format. Typical electropherograms are presented in Fig. 3(b). The binding curve for L-arginine was also determined using the same methodology, *i.e.* with a sample plug containing L-arginine. No binding of the non-target enantiomer to the aptamer was obtained over the 1–200  $\mu\text{M}$  concentration range, demonstrating the high stereoselectivity of such an assay (Fig. 3(a)).



**Figure 3.** (a) Standard curves obtained for D- (square, triangle) and L- (diamond) arginine enantiomers over the 1–200  $\mu\text{M}$  concentration range. Conditions: applied voltage: -25 kV; plug length of the aptamer-sample solution: 30 s (square, diamond), 35 s (triangle). See text for other operating conditions. Error bars represent SDs ( $n = 3$ ). The target curve was fitted by Table curve 2-D (SPSS Science Software, Erkrath, Germany) to the data plot using a sigmoidal equation. The fitted standard curve previously obtained for D-arginine using the “full” on-capillary mixing approach [11] (experimental conditions: applied voltage: -25 kV; lengths of the three different plugs: 20 s aptamer (100  $\mu\text{M}$ ), 32 s sample plug, 4 s label (400  $\mu\text{M}$ ) plug for a hydrodynamic injection at -50 mbar) is presented as a comparison (dotted line). (b) Free label peaks obtained for blank (grey trace) and 100  $\mu\text{M}$  D-arginine in the aptamer-sample plug (black trace) using a 30 s plug length for the aptamer-sample solution.

## 4 Concluding remarks

In this paper, we have described an aptamer-based competitive ACE assay which combines both the pre-incubation of the aptamer-arginine samples and an on-capillary mixing approach for the competition with the labelled target. The effects of some operating parameters have been analyzed. It appears that the aptamer-sample plug length is of particular importance for the assay optimization. It is also demonstrated that this “hybrid” approach significantly improves the assay sensitivity relative to that obtained with a “full” on-capillary mixing format.

*The authors declared no conflict of interest.*

## 5 References

- [1] Tombelli, S., Minunni, M., Mascini, M., *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2424–2434.
- [2] Heegaard, N. H. H., Kennedy, R. T., *J. Chromatogr. B* 2002, 768, 93–103.
- [3] Ravelet, C., Grosset, C., Peyrin, E., *J. Chromatogr. A* 2006, 1117, 1–10.
- [4] Li, T., Li, B., Dong, S., *Chemistry* 2007, 13, 6718–6723.
- [5] Shoji, A., Kuwahara, M., Ozaki, H., Sawai, H., *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 1456–1464.
- [6] Michaud, M., Jourdan, E., Villet, A., Ravel, A. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8672–8679.
- [7] Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A., Furste, J. P., *Nat. Biotechnol.* 1996, 14, 1112–1115.
- [8] Majerfeld, I., Puthenvedu, D., Yarus, M., *J. Mol. Evol.* 2005, 61, 226–235.
- [9] Geiger, A., Burgstaller, P., von der Eltz, H., Roeder, A., Famulok, M., *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 1029–1036.
- [10] Michaud, M., Jourdan, E., Ravelet, C., Villet, A. *et al.*, *Anal. Chem.* 2004, 76, 1015–1020.
- [11] Ruta, J., Ravelet, C., Baussanne, I., Decout, J. L., Peyrin, E., *Anal. Chem.* 2007, 79, 4716–4719.
- [12] Yang, W. C., Yeung, E. S., Schmerr, M. J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1751–1759.



Cet essai compétitif par électrophorèse capillaire d'affinité impliquant une pré-incubation de l'aptamère en présence de son énantiomère cible avant compétition avec le dérivé dansylé dans le capillaire a permis une augmentation de la sensibilité de la méthode d'un facteur 2 par rapport à l'étude précédente. En revanche, la limite de détection de l'impureté énantiomérique n'a malheureusement pas été améliorée. Il apparaît clairement que la longueur de la zone injectée aptamère-énantiomère cible pré-incubée et la tension appliquée sont des paramètres importants pour optimiser la méthode. Cependant, le facteur limitant l'amélioration de la limite de détection semble être le mode de détection UV utilisé. Une détection par fluorescence induite par laser pourrait significativement améliorer la sensibilité de cet essai énantiosélectif.



## BIBLIOGRAPHIE

1. Majerfeld I., "RNA Affinity for Molecular L-Histidine; Genetic Code Origins", Journal of molecular Evolution, **2005**, 61, 226-235.
2. Deng Q., German I., Buchanan D. and Kennedy R. T., "Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase", Analytical Chemistry, **2001**, 73, (22), 5415-5421.
3. Jucker F. M., Phillips R. M., McCallum S. A. and Pardi A., "Role of a Heterogeneous Free State in the Formation of a Specific RNA-Theophylline Complex", Biochemistry, **2003**, 42, (9), 2560-2567.
4. Brion P. and Westhof E., "Hierarchy and dynamics of RNA folding", Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure **1997**, 26, (1), 113-137.
5. Draper D. E., "Strategies for RNA folding", Trends in Biochemical Sciences, **1996**, 21, (4), 145-149.
6. Fujita K. and Silver J., "Surprising Lability of Biotin-Streptavidin Bond During Transcription of Biotinylated DNA Bound to Paramagnetic Streptavidin Beads", BioTechniques, **1993**, 14, (4), 608-617.
7. Holmberg A., Blomstergren A., Lukacs O. N. M., Lundeberg J. and Uhlén M., "The biotin-streptavidin interaction can be reversibly broken using water at elevated temperatures", Electrophoresis, **2005**, 26, (3), 501-510.
8. Millot M. C., "Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors", Journal of Chromatography B, **2003**, 797, (1-2), 131-159.
9. Ravelet C., Boulkedid R., Ravel A., Grosset C., Villet A., Fize J. and Peyrin E., "A L-RNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds", Journal of Chromatography A, **2005**, 1076, (1-2), 62-70.
10. Jarrett H. W., "Development of N-hydroxysuccinimide ester silica, a novel support for high-performance affinity chromatography", Journal of Chromatography A, **1987**, 405, 179-189.
11. Huizenga D. E. and Szostak J. W., "A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP", Biochemistry, **1995**, 34, (2), 656-665.
12. Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (4), 1015-1020.

13. Williams K. P., Liu X.-H., Schumacher T. N. M., Lin H. Y., Ausiello D. A., Kim P. S. and Bartel D. P., "*Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin*", Proceedings of the National Academy of sciences, **1997**, 94, (21), 11285-11290.
14. Michaud M., Jourdan E., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "*A DNA aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC*", Journal of the American Chemical Society, **2003**, 125, 8672-8679.
15. Vianini E., Palumbo M. and Gatto B., "*In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide*", Bioorganic & Medicinal Chemistry, **2001**, 9, (10), 2543-2548.
16. Famulok M., "*Molecular recognition of aminoacids y RNA aptamers: an L-citrulline binding RNA Motif and its evolution into an L-arginine binder*", Journal of the American Chemical Society, **1994**, 116, 1698-1706.
17. Brumbt A., Ravelet C., Grosset C., Ravel A., Villet A. and Peyrin E., "*Chiral Stationary Phase Based on a Biostable L-RNA Aptamer*", Analytical Chemistry, **2005**, 77, (7), 1993-1998.
18. Mannironi C., Scerch C., Fruscoloni P. and Tocchini-Valentini G., "*Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: The evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif*", RNA, **2000**, 6, 520-527.
19. Ruta J., Grosset C., Ravelet C., Fize J., Villet A., Ravel A. and Peyrin E., "*Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine l-RNA aptamer microbore column*", Journal of Chromatography B, **2007**, 845, (2), 186-190.
20. Ruta J., Ravelet C., Désiré J., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Covalently bonded DNA aptamer chiral stationary phase for the chromatographic resolution of adenosine*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2008**, 390, (4), 1051-1057.
21. Geiger A., "*RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity*", Nucleic Acids Research, **1996**, 24, 1029-1036.
22. Valtcheva L., Mohammad J., Pettersson G. and Hjerten S., "*Chiral separation of [beta]-blockers by high-performance capillary electrophoresis based on non-immobilized cellulase as enantioselective protein*", Journal of Chromatography A, **1993**, 638, (2), 263-267.
23. Tanaka Y. and Terabe S., "*Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases*", Journal of Chromatography A, **1995**, 694, (1), 277-284.
24. Tanaka Y. and Terabe S., "*Recent advances in enantiomer separations by affinity capillary electrophoresis using proteins and peptides*", Journal of Biochemical and Biophysical Methods, **2001**, 48, (2), 103-116.
25. Hedeland M., Isaksson R. and Pettersson C., "*Cellobiohydrolase I as a chiral additive in capillary electrophoresis and liquid chromatography*", Journal of Chromatography A, **1998**, 807, (2), 297-305.

26. Amini A., Pettersson C. and Westerlund D., "Enantioresolution of disopyramide by capillary affinity electrokinetic chromatography with human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) as chiral selector applying a partial filling technique", Electrophoresis, **1997**, *18*, (6), 950-957.
27. Amini A., Merclin N., Bastami S. and Westerlund D., "Determination of association constants between enantiomers of orciprenaline and methyl-beta-cyclodextrin as chiral selector by capillary zone electrophoresis using a partial filling technique", Electrophoresis, **1999**, *20*, (1), 180-188.
28. Desiderio C., Polcaro C. M., Padiglioni P. and Fanali S., "Enantiomeric separation of acidic herbicides by capillary electrophoresis using vancomycin as chiral selector", Journal of Chromatography A, **1997**, *781*, (1-2), 503-513.
29. Vespalec R. and Bocek P., "Chiral Separations in Capillary Electrophoresis", Chemical Reviews, **2000**, *100*, (10), 3715-3754.
30. Hofstetter O., Hofstetter H., Wilchek M., Schurig V. and Green B. S., "An Immunochemical Approach for the Determination of Trace Amounts of Enantiomeric Impurities", Chemical Communications, **2000**, (17), 1581-1582.





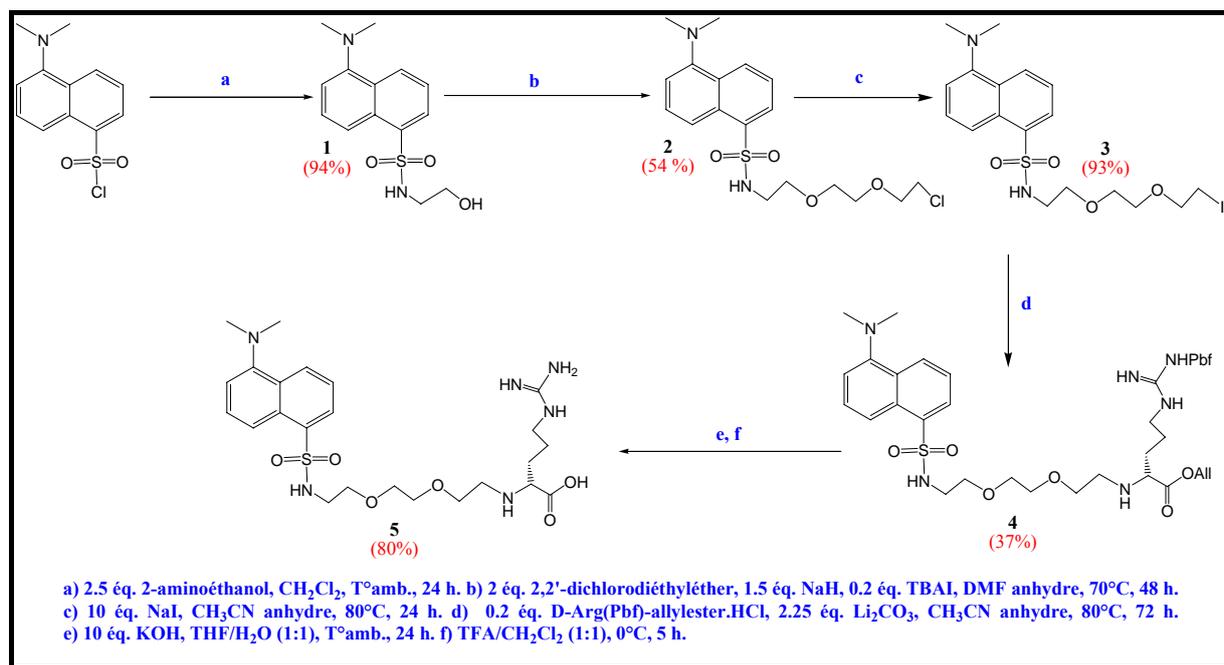
*Partie expérimentale  
additive*

**Synthèse du dérivé D-  
Arginine dansylé**

**A  
PTAMER**



## Synthèse et caractérisation de la molécule cible marquée :



## Généralités :

- **Chromatographie :**

Les **chromatographies sur colonne** ont été effectuées sur gel de silice Gerduran® Si 60 Merck. La purification du composé final très polaire a été réalisée par chromatographie sur cartouche de phase inverse C<sub>18</sub> Sep-Pak.

La **Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)** a été réalisée sur colonne en phase inverse semi-préparative (Macherey Nagel VP 250/10 Nucleosil 100-5 C18) avec une détection dans l'UV à 330 nm.

Les **chromatographies analytiques sur plaques** (ou chromatographies sur couches minces CCM) ont été réalisées avec des plaques de silice déposées sur feuille d'aluminium (Alugram® Sil G/UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel), des plaques d'alumine déposées sur feuille d'aluminium (Alugram® Alox N/UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel), et des plaques de phase inverse C<sub>18</sub> (feuilles d'aluminium Alugram RP-18W/UV<sub>254</sub> Macherey-Nagel). Les plaques sont révélées par fluorescence aux rayons UV à 254 nm et 365 nm.

- **Point de fusion**

Les **points de fusion** ont été mesurés en tube de capillaire sur un appareil Büchi 510.

- **Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)**

Les spectres ont été enregistrés sur un appareil Bruker Advance 400 (400 MHz pour le proton et 100 MHz pour le carbone) en utilisant comme standard interne le solvant résiduel.

Les abréviations ont la signification suivante :  $\delta$  : déplacement chimique en ppm ; J : constante de couplage en Hz ; s : singulet ; t : triplet ; q : quadruplet ; quin : quintuplet ; dd : doublet de doublet ; m : multiplet ; m br : massif large.

- **Spectrométrie de masse et analyses élémentaires**

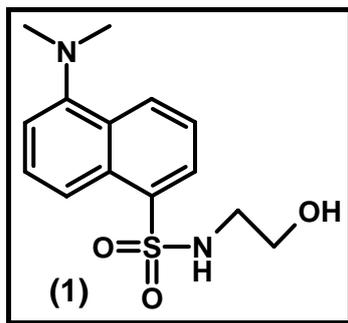
Les spectres de masse ont été enregistrés au Centre d'Etudes et de Recherche sur les Macromolécules Végétales (CERMAV) à Grenoble. Différentes techniques ont été utilisées : l'ionisation chimique par désorption (IC/D), et la technique d'ionisation par matrice (MALDI).

Les spectres de masse haute résolution (SMHR) ont été enregistrés par les techniques d'électrospray positive (ESI) et d'impact électrique (IE), au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest de l'Université de Rennes I, en utilisant un spectromètre MICROMASS ZABSPEC-TOF et un spectromètre VARIAN MAT311.

- **Solvants et réactifs**

Les réactifs de départ ainsi que les solvants sont des produits commerciaux utilisés sans purification lorsque ce n'est pas précisé.

Les manipulations sous conditions anhydres sont effectuées dans de la verrerie séchée, avec des solvants fraîchement distillés en présence de  $\text{CaH}_2$  et sous atmosphère d'argon.

**Dérivé dansylé (1) :**

Le chlorure de dansyle (3.4 g, 12.9 mmol) est dissous en présence de 2-aminoéthanol (2 mL, 3.20 mmol, 2.5 éq.). Le mélange est laissé sous agitation en présence du dichlorométhane (25 mL) pendant un jour à température ambiante. Après évaporation du solvant sous pression réduite, le mélange obtenu est dissous dans le dichlorométhane (50 mL) et la solution est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl), de l'eau (50 mL), et une solution saturée de NaCl (50 mL). La phase organique est ensuite séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le résidu obtenu est ensuite purifié sur un gel de silice en utilisant comme éluant du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol (98:2) pour donner le composé **1** sous forme de poudre jaune (3.58 g, 94%).

**F** : 75-76°C.

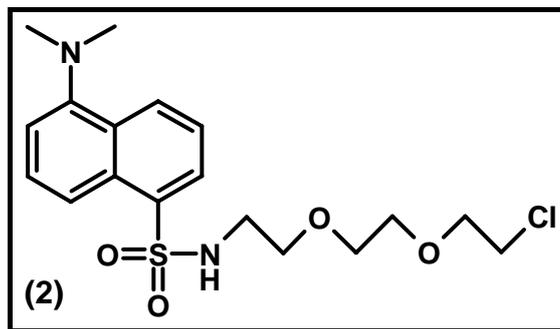
**Rf** : 0.34 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 2.45 (s, 1H, OH), 2.92 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> dansyl), 3.05 (q,  $J$  = 6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NH), 3.62 (t,  $J$  = 6Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 5.58 (t,  $J$  = 6Hz, 1H, NH), 7.21 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H, CH dansyl), 7.54 (dd,  $J$  = 7.2 et 8.4 Hz, 1H, CH dansyl), 7.58 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, CH dansyl), 8.26 (dd,  $J$  = 7.2 et 1.2 Hz, 1H, CH dansyl), 8.33 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H, CH dansyl), 8.58 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, CH dansyl).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 45.3 (CH<sub>2</sub>OH), 45.5 (2 CH<sub>3</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>N), 115.4, 118.9, 123.3, 128.5 et 129.6 (CH), 129.7 et 129.8 (C), 130.5 (CH), 134.5 et 151.7 (C).

**SM** (DCI) :  $m/z$  = 295 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 171 [M-SO<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH+H]<sup>+</sup>.

**SMHR** (IE) :  $m/z$  calculé = 294.1038  
 $m/z$  trouvé = 294.1035.

**Dérivé dansylé (2) :**

Le dérivé dansylé (1) (3.55 g, 12.1 mmol) est dissous en présence de NaH (60%, 18.1 mmol) dans du N,N-diméthylformamide anhydre (20 mL) sous argon. Après 20 min. d'agitation à température ambiante, l'iodure de tétrabutylammonium (891 mg, 2.41 mmol) et le 2,2'-dichloro-diéthyléther (2.83 mL, 24.1 mmol) sont ajoutés et le mélange est laissé sous agitation pendant 2 jours à 70°C. Après évaporation sous vide, le résidu obtenu est dissous dans du dichlorométhane (50 mL) et la solution est lavée successivement avec une solution aqueuse saturée en chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl), de l'eau (50 mL), et une solution saturée de NaCl (50 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le résidu obtenu est ensuite purifié sur gel d'alumine avec du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol (98:2) comme éluant pour donner le composé **2** sous forme d'huile jaune (2.59 g, 54%).

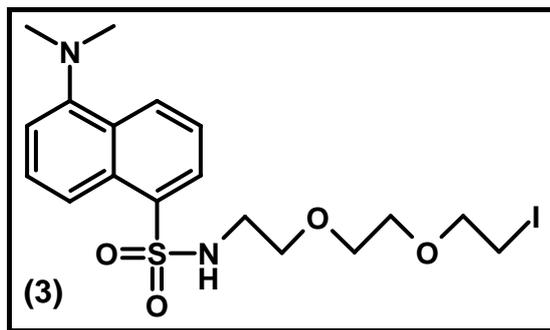
**Rf** : 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 2.87 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> dansyl), 3.48 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.53 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.58 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.62 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.73-3.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.18 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH), 7.49-7.58 (m, 2H, 2CH), 8.15 (dd, *J* = 7.2 et 1.2 Hz, 1H, CH), 8.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH), 8.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, CH).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 42.5 (CH<sub>2</sub>Cl), 45.4 (2CH<sub>3</sub>), 48.9 (CH<sub>2</sub>O), 52.5 (CH<sub>2</sub>O), 61.5 (CH<sub>2</sub>N), 70.6 et 71.2 (CH<sub>2</sub>O), 115.4, 119.4, 123.2, 128.3 et 129.2 (CH), 130.1 et 130.2 (C), 130.6 (CH), 134.5 et 158.9 (C).

**SM** (DCI) : *m/z* = 401 [M+H]<sup>+</sup>, *m/z* = 365 [M-Cl]<sup>+</sup>, *m/z* = 321 [M-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, *m/z* = 307 [M-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, *m/z* = 289, *m/z* = 170 [M-SO<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>, *m/z* = 154.

**SMHR** (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 401.1301  
*m/z* trouvé = 401.1299  
[M+Na]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 423.1121  
*m/z* trouvé = 423.1127  
[M+K]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 439.0860  
*m/z* trouvé = 439.0872.

**Dérivé dansylé (3) :**

De l'iodure de sodium (3.4 g, 23.2 mmol) est ajouté à une solution contenant le composé **2** (929 mg, 2.32 mmol) dissous dans de l'acétonitrile anhydre (10 mL) sous argon. Puis, le mélange réactionnel est chauffé à 80°C pendant 1 jour sous agitation. Après refroidissement, le mélange est filtré puis évaporé. Le résidu est ensuite dissous dans du dichlorométhane (10 mL) et la solution est lavée deux fois avec une solution aqueuse contenant 5% de thiosulfate de sodium (2 x 10 mL). Puis, la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le composé obtenu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice avec du dichlorométhane puis un mélange dichlorométhane/méthanol (99:1) comme éluant pour donner le composé **3** sous forme d'huile jaune (1.06 g, 93%).

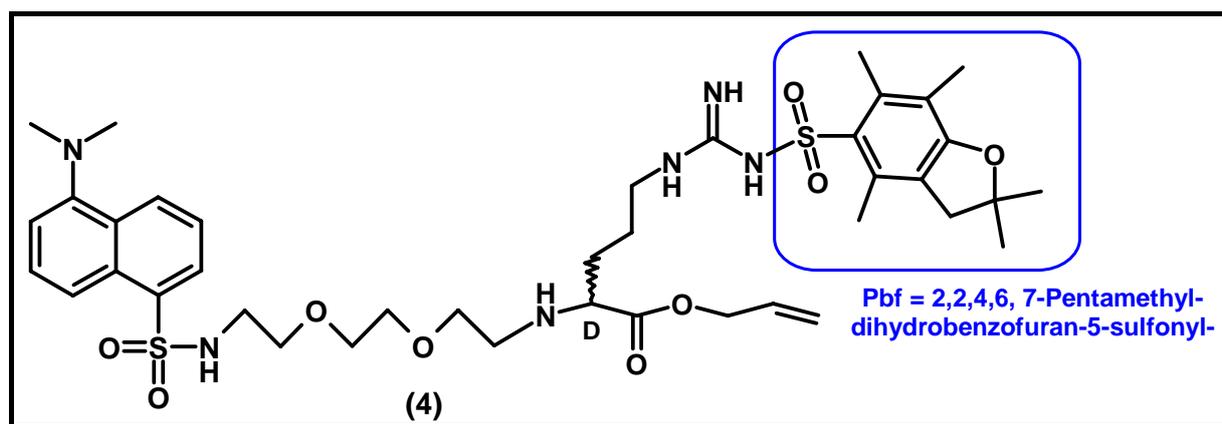
**Rf** : 0.41 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98:2).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 2.93 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> dansyl), 3.17 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.51 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.61 (t,  $J$  = 4.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.65 (dd,  $J$  = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (t,  $J$  = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.79 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.24 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, CH), 7.55-7.62 (m, 2H, 2CH), 8.19 (dd,  $J$  = 7.4 et 1.0 Hz, 1H, CH), 8.40 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, CH), 8.6 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, CH).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) :  $\delta$  = 2.0 (CH<sub>2</sub>I), 45.5 (2 CH<sub>3</sub>), 48.9 (CH<sub>2</sub>O), 52.4 (CH<sub>2</sub>O), 61.5 (CH<sub>2</sub>N), 70.1 et 71.7 (CH<sub>2</sub>O), 115.4, 119.4, 123.2, 128.2 et 129.3 (CH), 130.1 et 130.2 (C), 130.6 (CH), 134.5 et 152.6 (C).

**SM** (DCI) :  $m/z$  = 493 [M+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 367 [M-I+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 321 [M-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 307 [M-CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>I]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 289,  $m/z$  = 170 [M-SO<sub>2</sub>NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Cl]<sup>+</sup>,  $m/z$  = 155.

**SMHR** (ESI) : [M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calculé = 515.0477  
 $m/z$  trouvé = 515.0474

**Dérivé Dansyl-D-Arg(Pbf)allylester (4) :**

A une solution contenant le composé **3** (309 mg, 0.63 mmol) dissous dans de l'acétonitrile anhydre (3 mL) sous argon est ajouté du carbonate de lithium (165 mg, 2.23 mmol) puis l'acide aminé protégé D-Arg(Pbf)allylester.HCl (101 mg, 0.20 mmol). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 80°C pendant 3 jours. Après refroidissement, le mélange est filtré puis évaporé sous vide. Le résidu obtenu est ensuite dissous dans du dichlorométhane (10 mL) et la solution organique est lavée successivement à l'eau (2 x 10 mL), puis avec une solution saturée de NaCl (10 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le résidu obtenu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice en utilisant un gradient d'élution : à partir d'un mélange dichlorométhane/méthanol (99:1) à un mélange dichlorométhane/méthanol (91:9) afin d'obtenir le composé **2** sous forme d'huile jaune (61 mg, 37%).

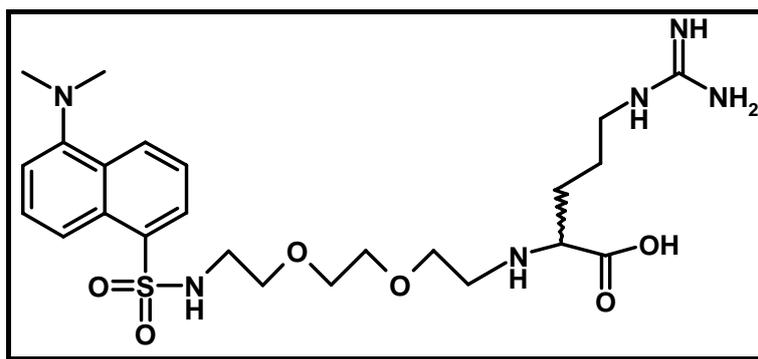
**Rf** : 0.42 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 95:5).

**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 1.46 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> Pbf), 1.52-1.80 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub> Arg), 2.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Pbf), 2.53 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Pbf), 2.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Pbf), 2.89 (s, 6H, 2CH<sub>3</sub> dansyl), 3.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Pbf), 3.10-3.30 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 3.42-3.60 (m, 6H, 3CH<sub>3</sub>), 3.62-3.78 (m, 3H, CH+CH<sub>2</sub>), 3.84 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.62 (t, *J* = 6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub> allyl), 5.20-5.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>=), 5.86-5.97 (m, 1H, CH=), 6.18-6.31 (m br, 3H, 3NH), 7.19 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, CH dansyl), 7.50-7.60 (m, 2H, 2CH dansyl), 8.11 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, CH dansyl), 8.35 (dd, *J* = 8.8 et 15 Hz, 1H, CH dansyl), 8.55 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, CH dansyl).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : δ = 12.5, 17.9, et 19.3 (3CH<sub>3</sub> Pbf), 25.7 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (2CH<sub>3</sub> Pbf), 40.8 et 43.3 (CH<sub>2</sub>), 45.4 (2CH<sub>3</sub> dansyl), 47.3, 49.2, 50.6, 52.4 et 52.9 (CH<sub>2</sub>), 60.5 (CH), 61.8, 65.5, et 70.1 (CH<sub>2</sub>), 86.3 (C), 115.4 (CH), 116.9 et 117.3 (C), 119.0 (CH<sub>2</sub>), 119.2 et 123.2 (CH), 124.5 (C), 128.3 et 129.2 (CH), 130.2 (C), 130.6 et 131.8 (CH), 132.3, 134.1, 138.3, 151.8, 156.2, 158.5 et 174.3 (C).

**SM** (DCI) : *m/z* = 831 [M+H]<sup>+</sup>.

**SMHR** (ESI) : [M+H]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 831.3785  
*m/z* trouvé = 831.3779  
[M+Na]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 853.3604  
*m/z* trouvé = 853.3604  
[M+K]<sup>+</sup> *m/z* calculé = 869.3344  
*m/z* trouvé = 869.3362.

**Dérivé Dansyl-D-Arg (5) :**

La fonction acide de l'acide aminé est déprotégée en premier en traitant le composé **4** (129.4 mg, 0.15 mmol) dissous dans THF/H<sub>2</sub>O (1:1, 4 mL) par de l'hydroxyde de potassium (KOH) (10 éq., 87.3 mg, 1.55 mmol). Après un jour d'agitation à température ambiante, 10 équivalents supplémentaires de KOH sont ajoutés et le mélange réactionnel est laissé sous agitation un jour supplémentaire. Puis, 20 mL de dichlorométhane sont additionnés à la solution et la phase organique est lavée 2 fois à l'eau, puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée.

Le résidu obtenu est ensuite dissous dans 4 mL d'une solution CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1:1, v/v), et laissé sous agitation pendant 5 heures à 0°C. Le mélange réactionnel est ensuite évaporé puis dissous dans l'eau et la solution aqueuse est lavé deux fois au dichlorométhane avant d'être concentrée sous pression réduite. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie à travers une petite colonne de phase inverse (cartouche C18-Sep-Pak) avec un gradient d'élution H<sub>2</sub>O/MeOH de 100:0 à 60:40. Les fractions contenant le produit sont concentrées sous pression réduite puis purifiées par CLHP. Un gradient d'élution est préparé en mélangeant de l'eau (A) et du méthanol (B). Le profil du gradient pour la purification du composé **5** est 90% A – 10% B (de 0 à 1 minute). Puis un gradient linéaire jusqu'au 100% de B est appliqué. Le composé **5** est élué à 55 minutes à un débit de 2 mL/min sous forme d'huile jaune avec un rendement de 80%.

**Rf** : 0.14 (H<sub>2</sub>O/EtOH/NH<sub>4</sub>OH, 10:85:5).

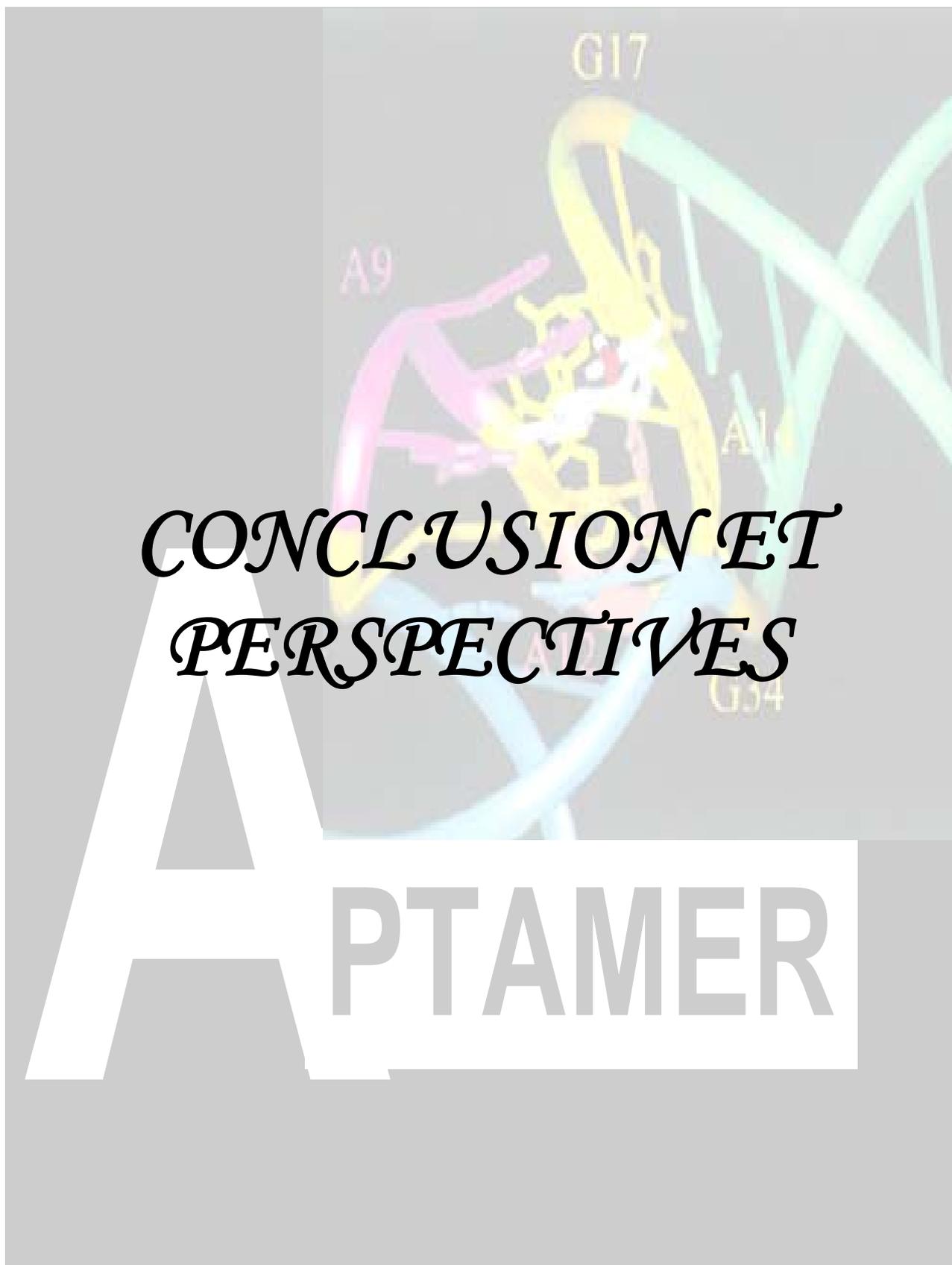
**RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 1.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.76 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.74 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub> dansyl), 2.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.06 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.32-3.56 (m, 11H, CH+5CH<sub>2</sub>), 7.28 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, CH), 7.56 (t,  $J$  = 8 Hz, 2H, 2CH), 8.05 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, CH), 8.12 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, CH), 8.38 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, CH).

**RMN <sup>13</sup>C** (100 MHz, D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 23.6, 26.8, et 40.5 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (2CH<sub>3</sub>), 46.2, 48.8, 51.7 et 58.7 (CH<sub>2</sub>), 61.9 (CH), 65.2 et 67.4 (CH<sub>2</sub>), 116.0, 119.4, 123.9 et 128.7 (CH), 129.0 et 129.4 (C), 130.0 et 130.3 (CH), 133.4, 151.0, 156.6 et 173.2 (C).

**SM** (MALDI) :  $m/z$  = 539.16 [M+H]<sup>+</sup>  
 $m/z$  = 561.15 [M+Na]<sup>+</sup>.

**SMHR** (ESI) : [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  calculé = 539.2652  
 $m/z$  trouvé = 539.2671  
[M+Na]<sup>+</sup>  $m/z$  calculé = 561.2471  
 $m/z$  trouvé = 561.2484  
[M+K]<sup>+</sup>  $m/z$  calculé = 578.6604  
 $m/z$  trouvé = 578.6610





*CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES*

**APTAMER**



En conclusion, durant cette thèse intitulée : « Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire », nous avons :

- Développé un nouveau mode d'immobilisation covalent des aptamères afin d'élargir les conditions d'utilisation de ces PSCs oligonucléotidiques et d'améliorer leur stabilité [1]. Cependant, le nombre de sites actifs de ces colonnes est similaire à celui obtenu par la stratégie d'immobilisation biotine-streptavidine [2] et est inférieur à celui calculé par Deng *et al* pour le même aptamère [3].

Il serait donc intéressant dans l'avenir d'optimiser cette stratégie d'immobilisation covalente afin d'augmenter l'efficacité du couplage de l'aptamère et donc les propriétés chromatographiques de ces colonnes.

- Étendu l'étude de ces nouveaux sélecteurs chiraux à une analyse par électrophorèse capillaire et développé un essai énantiosélectif, par compétition, permettant la détection d'une impureté énantiomérique à 0,01% en utilisant un oligonucléotide ARN anti-D-Arginine, en série L, comme modèle [4]. Les expériences additionnelles, réalisées en incubant l'aptamère en présence de son énantiomère cible, avant injection, ont montré une meilleure sensibilité de la méthode. Malheureusement, le seuil de détection de cet essai n'a pas été abaissé, le facteur limitant étant la détection UV utilisée [5].

De futurs travaux auront pour objectifs de continuer le développement d'apta-essais énantiosélectifs, par électrophorèse capillaire d'affinité en utilisant une détection par LIF, sur microplaque ou en milieu homogène par une détection par polarisation de fluorescence, afin d'étendre cette application à un diagnostic dans un mélange complexe. Dans le but d'abaisser davantage cette limite de détection, une perspective envisagée est d'utiliser un autre fluorophore (par exemple : la fluorescéine  $\epsilon = 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 488 nm,  $\Phi = 0.9$  vs  $\epsilon = 4000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  à 330-340 nm,  $\Phi = 0.1$  pour le chlorure de dansyle). La synthèse d'un dérivé de la D-arginine portant une fluorescéine à la place du groupement dansyle a été amorcée durant cette thèse.

- Enfin, un autre projet initié durant cette thèse est de sélectionner de nouvelles séquences oligonucléotidiques spécifiques d'un énantiomère d'une classe chimique bien définie.

Jusqu'à présent, nos études étaient dépendantes des séquences aptamères décrites dans la littérature. Un inconvénient des PSCs aptamères créées (excepté l'aptamère ARN anti-D-tyrosine provenant d'un pool dégénéré dérivé d'un aptamère anti-dopamine) est leur capacité à résoudre un seul mélange racémique du fait de leur spécificité très importante.

Afin de sélectionner des aptamères spécifiques d'une classe chimique, des collaborations ont été récemment amorcées avec l'équipe de Jean-Jacques Toulmé (Institut Européen de Chimie et Biologie U869 INSERM à Bordeaux). Nous sommes intéressés à la famille des amphétamines qui regroupe environ une vingtaine de substances psychotropes aux propriétés voisines. Ces composés chiraux peuvent être utilisés comme stupéfiants ou comme principes actifs de médicaments.

L'objectif de ce projet est de développer un aptamère spécifique d'une classe chimique qui sera ultérieurement employé en chromatographie liquide et/ou en électrophorèse capillaire pour la séparation énantiomérique de l'amphétamine et de ses dérivés.

- Une première étape consiste à immobiliser un dérivé de l'amphétamine, synthétisé par l'équipe de chimie bio-organique du DPM, sur des billes magnétiques fonctionnalisées par un groupement acide carboxylique. Cette étape a été réalisée durant cette thèse en utilisant un protocole similaire à celui mis en œuvre pour la stratégie d'immobilisation covalente des aptamères sur support chromatographique [1]. Ensuite, ces billes magnétiques modifiées ont été envoyées à l'institut Européen de Chimie et Biologie U869 INSERM à Bordeaux dans le but de sélectionner des aptamères capables de reconnaître différents dérivés amphétaminiques en utilisant la technologie « Toggle SELEX » favorisant la sélection d'oligonucléotides spécifiques pour diverses cibles.

- La dernière étape consistera à faire synthétiser les aptamères sélectionnés et à les tester comme PSCs covalentes en micro-CLHP ou comme sélecteurs chiraux en électrophorèse capillaire pour différents dérivés amphétaminiques.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Ruta J., Ravelet C., Désiré J., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Covalently bonded DNA aptamer chiral stationary phase for the chromatographic resolution of adenosine*", Analytical and Bioanalytical Chemistry, **2008**, 390, (4), 1051-1057.
2. Michaud M., Jourdan E., Ravelet C., Villet A., Ravel A., Grosset C. and Peyrin E., "*Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers*", Analytical Chemistry, **2004**, 76, (4), 1015-1020.
3. Deng Q., German I., Buchanan D. and Kennedy R. T., "*Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase*", Analytical Chemistry, **2001**, 73, (22), 5415-5421.
4. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Aptamer-Based Enantioselective Competitive Binding Assay for the Trace Enantiomer Detection*", Analytical Chemistry, **2007**, 79, (12), 4716-4719.
5. Ruta J., Ravelet C., Baussanne I., Fize J., Décout J.-L. and Peyrin E., "*Competitive ACE assay based on a « hybrid » pre-incubation/on-capillary mixing format using an enantioselective aptamer as affinity ligand*", Journal of Separation Science, **2008**, sous presse.



*Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire (EC).*

**Résumé :** La séparation d'énantiomères est d'un grand intérêt pour les industries pharmaceutiques, chimiques et agroalimentaires. Les aptamères sont utilisés au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) en tant que nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible prédéterminée. Il s'agit d'oligonucléotides, en série ADN et ARN, générés par la procédure SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), ayant la capacité à fixer leurs molécules cibles avec une affinité égale voir supérieure à celle des anticorps. Ce travail a pour objectif d'étudier les propriétés énantiosélectives des aptamères, en série ADN et ARN, par micro-CLHP et EC. Une phase stationnaire chirale aptamère L-ARN anti-D-histidine a été créée en utilisant une stratégie d'immobilisation biotine-streptavidine dans le but d'étudier les propriétés énantiosélectives de cet oligonucléotide récemment isolé. Une nouvelle stratégie d'immobilisation covalente de l'aptamère a été développée afin d'élargir les conditions d'utilisation et d'améliorer la stabilité de ces colonnes aptamères. L'utilisation de ces nouveaux sélecteurs chiraux a ensuite été étendue à une analyse par EC. La première étude a été réalisée sur un aptamère test L-ARN anti-D-arginine caractérisé par de très fortes affinité ( $K_d = 330$  nM) et énantiosélectivité ( $\alpha = 12000$ ). Ce travail a permis d'apprécier les caractéristiques exceptionnelles de cet aptamère et d'envisager son utilisation dans un essai énantiosélectif par compétition. Une impureté énantiomérique de 0,01% a ainsi été détectée. Un essai similaire, où un contact direct entre l'aptamère et son énantiomère cible est favorisé, a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode et pourrait permettre d'abaisser la limite de détection grâce à l'utilisation d'une détection par fluorescence.

**Mots clés :** résolution chirale, sélecteurs chiraux, aptamère, SELEX, CLHP, EC, énantiosélectivité, phase stationnaire chirale, stratégie d'immobilisation, essai énantiosélectif.

*Enantioselective DNA and RNA aptamers : chiral separation applications in micro-chromatography and capillary electrophoresis (CE).*

**Abstract :** The separation of enantiomers is of a great interest in the pharmaceutical, chemical and food fields. Aptamers have been used by the Department of Molecular Pharmacochimie (DPM) as new target-specific chiral selectors. These oligonucleotides, RNA or DNA, selected by SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), have the ability to bind their target molecules with an affinity equal (or superior) to that retrieved with the antibodies. The aim of this work is to study the enantioselective properties of RNA and DNA aptamers by micro-HPLC and CE. A chiral stationary phase L-RNA aptamer anti-D-histidine was designed using an immobilization strategy based on the biotin-streptavidin link. A novel covalent strategy for the immobilization of the aptamers was developed to enlarge the conditions of use and to improve the stability of these aptamers columns. The use of these new chiral selectors was then spread in an analysis by CE. The first study was accomplished using an L-RNA aptamer anti-D-arginine characterized by a very weak constant of dissociation ( $K_d = 330$  nM) and a very high enantioselectivity ( $\alpha = 12000$ ). This study allowed to appreciate the special characteristics of this aptamer and to extend its use in an enantioselective competitive assay. An enantiomeric impurity as low as 0,01% was achieved. A similar assay, where a direct contact between the aptamer and its enantiomer target is favoured, allowed to increase the method sensitivity and could allow to reduce the detection limit thanks to the use of a fluorescence detection.

**Keys words:** Chiral resolution, chiral selectors, aptamers, SELEX, HPLC, CE, enantioselectivity, chiral stationary phase, immobilization strategy, enantioselective assay.



*Aptamères énantiosélectifs en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire (EC).*

**Résumé :** La séparation d'énantiomères est d'un grand intérêt pour les industries pharmaceutiques, chimiques et agroalimentaires. Les aptamères sont utilisés au sein du Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) en tant que nouveaux sélecteurs chiraux spécifiques d'une cible prédéterminée. Il s'agit d'oligonucléotides, en série ADN et ARN, générés par la procédure SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), ayant la capacité à fixer leurs molécules cibles avec une affinité égale voir supérieure à celle des anticorps. Ce travail a pour objectif d'étudier les propriétés énantiosélectives des aptamères, en série ADN et ARN, par micro-CLHP et EC. Une phase stationnaire chirale aptamère L-ARN anti-D-histidine a été créée en utilisant une stratégie d'immobilisation biotine-streptavidine dans le but d'étudier les propriétés énantiosélectives de cet oligonucléotide récemment isolé. Une nouvelle stratégie d'immobilisation covalente de l'aptamère a été développée afin d'élargir les conditions d'utilisation et d'améliorer la stabilité de ces colonnes aptamères. L'utilisation de ces nouveaux sélecteurs chiraux a ensuite été étendue à une analyse par EC. La première étude a été réalisée sur un aptamère test L-ARN anti-D-arginine caractérisé par de très fortes affinité ( $K_d = 330$  nM) et énantiosélectivité ( $\alpha = 12000$ ). Ce travail a permis d'apprécier les caractéristiques exceptionnelles de cet aptamère et d'envisager son utilisation dans un essai énantiosélectif par compétition. Une impureté énantiomérique de 0,01% a ainsi été détectée. Un essai similaire, où un contact direct entre l'aptamère et son énantiomère cible est favorisé, a permis d'augmenter la sensibilité de la méthode et pourrait permettre d'abaisser la limite de détection grâce à l'utilisation d'une détection par fluorescence.

**Mots clés :** résolution chirale, sélecteurs chiraux, aptamère, SELEX, CLHP, EC, énantiosélectivité, phase stationnaire chirale, stratégie d'immobilisation, essai énantiosélectif.

*Enantioselective DNA and RNA aptamers : chiral separation applications in micro-chromatography and capillary electrophoresis (CE).*

**Abstract :** The separation of enantiomers is of a great interest in the pharmaceutical, chemical and food fields. Aptamers have been used by the Department of Molecular Pharmacochimie (DPM) as new target-specific chiral selectors. These oligonucleotides, RNA or DNA, selected by SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*), have the ability to bind their target molecules with an affinity equal (or superior) to that retrieved with the antibodies. The aim of this work is to study the enantioselective properties of RNA and DNA aptamers by micro-HPLC and CE. A chiral stationary phase L-RNA aptamer anti-D-histidine was designed using an immobilization strategy based on the biotin-streptavidin link. A novel covalent strategy for the immobilization of the aptamers was developed to enlarge the conditions of use and to improve the stability of these aptamers columns. The use of these new chiral selectors was then spread in an analysis by CE. The first study was accomplished using an L-RNA aptamer anti-D-arginine characterized by a very weak constant of dissociation ( $K_d = 330$  nM) and a very high enantioselectivity ( $\alpha = 12000$ ). This study allowed to appreciate the special characteristics of this aptamer and to extend its use in an enantioselective competitive assay. An enantiomeric impurity as low as 0,01% was achieved. A similar assay, where a direct contact between the aptamer and its enantiomer target is favoured, allowed to increase the method sensitivity and could allow to reduce the detection limit thanks to the use of a fluorescence detection.

**Keys words:** Chiral resolution, chiral selectors, aptamers, SELEX, HPLC, CE, enantioselectivity, chiral stationary phase, immobilization strategy, enantioselective assay.