



HAL
open science

MÉTHODOLOGIES ÉLECTROCHIMIQUES POUR LA CARACTÉRISATION THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DE RECONNAISSANCE BIOMOLÉCULAIRE : APPLICATION AU SYSTÈME APTAMÈRE/MOLÉCULE CHIRALE

Lylian Challier

► **To cite this version:**

Lylian Challier. MÉTHODOLOGIES ÉLECTROCHIMIQUES POUR LA CARACTÉRISATION THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DE RECONNAISSANCE BIOMOLÉCULAIRE : APPLICATION AU SYSTÈME APTAMÈRE/MOLÉCULE CHIRALE. Chimie analytique. Université Paris Diderot-Paris VII, 2013. Français. NNT : . tel-01187558

HAL Id: tel-01187558

<https://theses.hal.science/tel-01187558v1>

Submitted on 27 Aug 2015

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.

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (PARIS VII)

ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE ANALYTIQUE DE PARIS CENTRE (ED388)

Par **Lylia** CHALLIER

Afin d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS VII

Spécialité : ÉLECTROCHIMIE

MÉTHODOLOGIES ÉLECTROCHIMIQUES POUR LA CARACTÉRISATION THERMODYNAMIQUE ET CINÉTIQUE DE RECONNAISSANCE BIOMOLÉCULAIRE : APPLICATION AU SYSTÈME APTAMÈRE/MOLÉCULE CHIRALE

Soutenue le 25 septembre 2013 devant la Commission d'Examen :

M. Stéphane ARBAULT	CR CNRS, Bordeaux	Rapporteur
M. Christophe LEGER	DR CNRS, Marseille	Rapporteur
M. Philippe DUMAS	DR CNRS, Strasbourg	Examineur
M. Eric PEYRIN	Pr UJF, Grenoble	Examineur
M. Emmanuel MAISONHAUTE	Pr UPMC, Paris	Examineur
M. Benoît LIMOGES	DR CNRS, Paris	Examineur
M. Vincent NOËL	MCF UPD, Paris	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse Vincent Noël pour la confiance qu'il m'a accordée, pour son inépuisable dynamisme teinté d'optimisme et de créativité, sa disponibilité sans conditions, son sens de la communication et sa pédagogie. Je me suis ainsi sans cesse senti progresser, tant dans mes démarches scientifiques que dans ma façon de communiquer mes résultats.

Je désire ensuite remercier vivement François Mavré, pour son encadrement et l'intérêt qu'il a accordé à mon travail. Son sens de l'observation et son esprit d'analyse ont été de véritables atouts qui m'ont aidé quotidiennement à mieux conduire mes expériences.

Ce travail a également été accompli sous l'œil rigoureux de Benoît Limoges, que je souhaite remercier sincèrement pour le temps qu'il m'a consacré en partageant ses interrogations et ses interprétations quant à mon travail.

Je tiens à remercier Claire Fave, Julie Moreau, Bernd Schöllhorn et Noémie Laloui à qui je dois les synthèses des analogues structuraux de la *L*-Tyrosinamide. Pour m'avoir aidé à utiliser ces molécules et à développer l'aspect biocapteur, je tiens à remercier plus précisément Julie Moreau et Rebecca Miranda-Castro avec qui j'ai eu plaisir à collaborer.

Je remercie également Damien Marchal pour avoir partagé son savoir-faire pour la fabrication des électrodes sérigraphiées, et pour la mise à disposition de beaucoup de matériel qui m'ont permis d'avancer expérimentalement sans la moindre restriction technique.

Je souhaite remercier Pierre Labbé et Liliane Guérente, partenaire de l'ANR *ecstasy*, pour m'avoir accueilli au laboratoire I2BM de l'UJF de Grenoble pour la campagne de mesure en microbalance à quartz. Je suis sorti de cette expérience convaincu par les performances de cet outil.

Je souhaite remercier également les autres membres de l'ANR *ecstasy* pour toutes les informations complémentaires qu'ils m'ont fournies au cours de nos réunions et qui m'ont aidé à cerner clairement le contexte de mon travail : Eric Peyrin et Corinne Ravelet du Département de Pharmacochimie Moléculaire de l'UJF de Grenoble, Eric Defrancq et Nicolas Spinelli du Département de Chimie Moléculaire de l'UJF de Grenoble, ainsi que Jean-Jacques Toulmé du laboratoire Régulation Naturelle et Artificielle de l'UVS de Bordeaux.

Enfin, je tiens à remercier Messieurs Stéphane Arbault et Christophe Léger qui ont accepté de rapporter ce document, ainsi que Messieurs Philippe Dumas, Eric Peyrin, Emmanuel Maisonhaute et Benoît Limoges qui ont accepté d'examiner ce travail.

Table des matières

Liste des abréviations et acronymes	5
Introduction générale.....	7
Chapitre I : Etat de l'art	8
I-1- La chiralité.....	8
a. Définition.....	8
b. Chiralité et biologie	9
i. Les acides aminés	9
ii. Cas des médicaments.....	10
iii. La reconnaissance énantiosélective	10
I-2- les récepteurs énantiosélectifs	13
a. Les sélecteurs énantiosélectifs.....	13
b. Les indicateurs énantiosélectifs	14
c. Les récepteurs énantiosélectifs.....	15
i. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs).....	15
ii. Anticorps	16
iii. Approche combinatoire.....	17
I-3- Récepteurs chiraux à base d'acides nucléiques : les aptamères	19
a. Sélection	19
b. Généralité sur les acides nucléiques : composition et structure	21
c. Interactions entre bases.....	22
d. Conformations du squelette Phosphate-Ribose	24
e. Interactions guanines-phosphate.....	25
f. Pseudo nœuds.....	25
g. Rôle des ions.....	26
h. L'hypothèse du monde ARN.....	27
i. Processus de reconnaissance aptamère-cible.....	27
I-4- Méthodes de caractérisation d'une reconnaissance aptamère/cible et détermination d' <i>e.e</i> ... 29	
a. Méthode séparative hétérogène sans marquage : la chromatographie	29
b. Méthode séparative homogène avec ou sans marquage : l'électrophorèse capillaire	29
c. Méthode de détection homogène avec marquage.....	30
i. Polarisation de fluorescence	30

ii.	Dosage par modulation de fluorescence à base d'aptamère.....	31
d.	Méthode de détection homogène sans marquage.....	31
i.	Titration calorimétrique isotherme.....	31
ii.	Dichroïsme circulaire.....	32
iii.	Résonance Magnétique Nucléaire	33
I-5-	Biocapteurs à base d'aptamère : l'aptacapteur.....	33
a.	Aptacapteurs avec marquage.....	34
i.	L'aptacapteur électrochimique	34
ii.	L'aptacapteur à fluorescence	35
b.	Aptacapteurs sans marquage.....	36
i.	Résonance Plasmonique de Surface.....	36
ii.	Microbalance à Quartz	36
I-6-	Conclusion.....	37
Chapitre II : Mesure d'excès énantiomérique par électrochimie en utilisant l'énantiosélectivité des aptamères		38
II-1-	le modèle <i>L-Tym/D-Apta₄₉</i>	38
a.	Principe de la méthode	38
b.	Choix de la cible.....	38
c.	Dispositif expérimental	39
d.	Détection électrochimique de la <i>L-Tyrosinamide</i>	39
e.	Discrimination <i>L-Tym/[L-Tym.D-Apta₄₉]</i> :.....	41
f.	Spécificité	44
g.	Enantiosélectivité	46
II-2-	Compétition	47
a.	Marquage de la <i>L-Tym</i> par des marqueurs redox	48
i.	Marquage sur l'amine	49
ii.	Marquage sur le phénol	51
b.	Dosage compétitif en phase homogène	54
c.	Utilisation en milieu biologique	56
d.	Détermination d'excès énantiomérique	59
II-3-	Conclusion.....	60
Chapitre III : Méthodologie de détermination des constantes cinétiques de reconnaissance.....		61
III-1-	Etat de l'art.....	61
a.	Technique en flux	61

b.	Techniques de relaxation	63
c.	Technique de flash photolyse.....	64
d.	Electrophorèse capillaire cinétique (KCE)	65
e.	Titration calorimétrique isotherme (<i>KinITC</i>)	66
f.	Bilan.....	67
g.	Méthodologie électrochimique.....	67
III-2-	Electrochimie stationnaire en microvolume.....	71
a.	Présentation	71
b.	Influence de la taille de l'électrode de travail.....	72
c.	Caractérisation du régime hydrodynamique	73
d.	Influence de la distance.....	74
e.	Injection <i>in situ</i> de réactifs	75
III-3-	Détermination de paramètres cinétiques.....	76
a.	Mesure cinétique d'une réaction bimoléculaire	76
b.	Mesure cinétique d'une reconnaissance moléculaire aptamère/cible.....	79
i.	Temps de mélange	79
ii.	Identification du régime de catalyse	80
iii.	Oxydation irréversible de la <i>L-Tym</i>	81
c.	Injection d'aptamère	82
d.	Détermination du K_d	83
e.	Détermination du k_{on}	85
III-3-	Conclusion.....	88
Chapitre IV : Influence de la longueur de l'aptamère sur le processus de reconnaissance.....		89
IV-1-	Structure secondaire de l'aptamère anti- <i>L-Tym</i>	89
a.	Hypothèse de départ : le G-quartet	89
b.	Appariement <i>Watson-Crick</i>	90
c.	Détermination des K_d des brins réduits.....	95
a.	Détermination des k_{on} des brins réduits.....	96
b.	Discussion	97
i.	Recherche de conformation	98
ii.	Processus de reconnaissance induite.....	99
IV-2-	Microbalance à quartz électrochimique avec dissipation (eQCM-D).....	99
a.	Considération expérimentale	99
b.	Détermination de la concentration surfacique en aptamère	100

c. Détermination des K_d pour différentes stratégies de greffage	101
i. Greffage du côté 3'	102
ii. Greffage du côté 5'	103
IV-3- Conclusion.....	104
Conclusion générale et perspectives.....	106
Matériels et Méthodes.....	107
Références bibliographiques.....	114
ANNEXES.....	128

Liste des abréviations et acronymes

AA	Acide Ascorbique
ADN	Acide DesoxyriboNucléique
ACE	Electrophorèse Capillaire d’Affinité
AFM	Microscope à Force Atomique
AMP	Adénosine MonoPhosphate
ARN	Acide RinoNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
AU	Acide Urique
BSA	Sérum Albumine Bovine
CAS	Chrome Azurol S
<i>D</i> -Aléa ₄₉	Séquence Aléaloire d’Aptamère en série <i>D</i>
<i>D</i> -Apta _x	Séquence d’Aptamère anti L-Tyrosinamide de x nucléotides en série <i>D</i>
DC	Dichroïsme Circulaire
<i>D</i> -PolyA ₄₉	Séquence de Poly-Adénosine de 49 nucléotides en série <i>D</i>
EDT	Electrode à Disque Tournant
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
e.e	Excès Enantiomérique
ELISA	Dosage d’Immunoabsorption par Enzyme liée
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
FcMeOH	FerrocèneMéthanol
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine
IDA	Test par Déplacement d’Indicateur
IDH	Isocitrate Deshydrogénase
Ig	ImmunoGlobuline
ITC	Titration Calorimétrique Isotherme
L-Tym	<i>L</i> -Tyrosinamide
D-Tym	<i>D</i> -Tyrosinamide
KCE	Electrophorèse Capillaire Cinétique
K _d	Constante thermodynamique de dissociation
KinITC	Titration Calorimétrique Isotherme Cinétique
k _{obs}	Constante Cinétique Observée
k _{on} /k _{off}	Constante cinétique aller et retour
MCH	MerCaptoHexanol
MIPs	Polymères à Empreintes Moléculaires
MTPA	α-Méthoxy-α-Trifluorométhylphénylacétique
NECEEM	Electrophorèse Capillaire Hors Equilibre de Mélanges en Equilibre
NPE	nitrophenylethyl
nt	Nucléotide
[Os ^{III/II} (bpy) ₃] ^{3+/2+}	Osmium (III/II), tris(2,2’-bipyridine-N, N’)
PAP	4-aminophénol

PAPB	Acide <i>p</i> -aminophenylboronique
PAPG	4-aminophenyl- β - <i>D</i> -galactopyranoside
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
P-Jump	Saut de Pression
ppKCE	Electrophorèse Capillaire « <i>Plug-Plug</i> »
PQI	4-quinone-imine
E-QCMD	Microbalance à Quartz Electrochimique avec Dissipation
RBP4	Retinol Binding Protein 4
RCPG	Récepteurs Couplés aux Protéines G
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RT-PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase avec Transcriptase Inverse
SELEX	Systematic Evolution of Ligand by EXponential enrichment
SVF	Sérum de Veau Fétal
SweepKCE	Electrophorèse Capillaire Cinétique avec Balayage
TB	Tige Boucle
T-Jump	Saut de Température
T _m	Température de fusion des acides nucléiques
VIH-I	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type I

Introduction générale

Dans les années 90, plusieurs groupes de recherche ont développé une méthode de chimie combinatoire pour la sélection *in vitro* de simples brins d'acides nucléiques, nommés aptamères, capables de se lier spécifiquement à une molécule d'intérêt. Cette nouvelle approche fut alors perçue comme disposant d'un fort potentiel analytique et thérapeutique. En effet, ces récepteurs artificiels possèdent de nombreux atouts : ils sont très stables dans le temps simplifiant leur stockage et leur utilisation en routine. Ils sont faciles à produire par voie chimique avec une grande reproductibilité et sont aisément fonctionnalisables par des sondes ou des fonctions d'attache. Enfin, ils peuvent être très sélectifs et même énantiosélectifs avec des affinités pouvant atteindre le nanomolaire.

Pour la détection d'une reconnaissance bimoléculaire homogène ou hétérogène entre un aptamère et sa cible, différentes techniques sont communément utilisées : la fluorescence, la RMN, la titration calorimétrique isotherme, la microbalance à quartz ou encore l'électrochimie. Cette dernière est largement représentée dans le champ des biocapteurs, mais très peu d'exemples d'une détection directe ou indirecte en condition homogène ont à ce jour été rapportés.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse dans laquelle ont été mises au point de nouvelles méthodologies électrochimiques pour l'étude de la reconnaissance homogène entre un aptamère et sa cible en utilisant comme modèle moléculaire la *L*-Tyrosinamide et son aptamère de 49 nucléotides. Ces méthodes discriminent la forme libre de la cible de la forme complexée à l'aptamère grâce à la différence de vitesse de diffusion qui existe entre ces deux états, la première diffusant plus rapidement que la deuxième.

Ainsi, l'exposé de ce travail est structuré en quatre parties :

- Le chapitre I présente le contexte scientifique de la thèse en s'intéressant dans un premier temps aux concepts d'interaction bimoléculaire énantiosélectifs, à leur origine et aux moyens actuels de les étudier.
- Le chapitre II décrit la mise au point d'une stratégie analytique permettant la quantification précise d'excès énantiomérique entre la *L*-Tyrosinamide et son aptamère.
- Le chapitre III décrit une méthodologie électrochimique stationnaire en microvolume permettant la détermination des paramètres cinétiques (constantes d'association et de dissociation) et thermodynamique (K_d) de la complexation entre la cible modèle et son aptamère.
- Le chapitre IV est dédié à l'optimisation de la séquence d'aptamère anti-*L*-Tyrosinamide.

Chapitre I : Etat de l'art

Ce chapitre a pour objectif d'apporter un certain nombre d'informations générales sur les systèmes étudiés afin de contextualiser les différents développements de ce travail de thèse et de justifier les choix adoptés. Ainsi, la première partie de ce chapitre retrace brièvement les contours du concept de chiralité pour illustrer son importance dans l'activité biologique et souligner l'intérêt majeur du développement de systèmes capable de doser des excès énantiomériques. La deuxième partie présente les différents types de récepteurs énantiosélectifs intégrés dans les dispositifs analytiques actuels. Enfin, les parties 3 et 4 de ce chapitre ont respectivement pour objectifs de justifier le choix des aptamères comme récepteur énantiosélectif et de réaliser un état de l'art sur leurs utilisations en chimie analytique.

I-1- La chiralité

a. Définition

Par définition, la chiralité désigne l'asymétrie qui peut exister entre un objet et son image dans un miroir. En chimie, une molécule est dite chirale lorsqu'elle ne possède aucun axe de symétrie intrinsèque. Cette molécule présente alors un carbone asymétrique, et peut exister sous deux formes non superposables, désignées comme énantiomères.

Deux énantiomères ont donc les mêmes propriétés physiques (masse molaire, taille, polarité...). Ils peuvent néanmoins être différenciés par leur capacité à faire dévier le plan de polarisation d'une lumière polarisée. Ainsi, une molécule qui dévient la polarisation de la lumière vers la gauche sera dite « lévogyre » (noté (-)), tandis qu'une molécule qui dévient la polarisation vers la droite sera dite « dextrogyre », (noté (+)). Ces phénomènes de polarisation de la lumière, et plus précisément l'effet magnéto-optique, ont été décrits par J.B Biot et A. Fresnel¹ au début du XIX^{ème} siècle.

Grâce à cette méthode, la notion de chiralité moléculaire a été introduite par Louis Pasteur en 1848. A partir de cristaux d'acide tartrique qui coexistaient sous deux formes non superposables et qu'il triait alors à la main (Fig 1.a), Pasteur prépara des solutions d'acide tartrique à partir de ces sélections de cristaux. Il observa alors un effet de rotation du plan de polarisation de la lumière, dans un sens opposé pour les deux échantillons. La déviation du plan de polarisation par les solutions étant déjà considérée comme liée à la structure de la molécule, il en conclut que l'acide tartrique pouvait exister sous deux formes dissymétriques inverses l'une de l'autre².

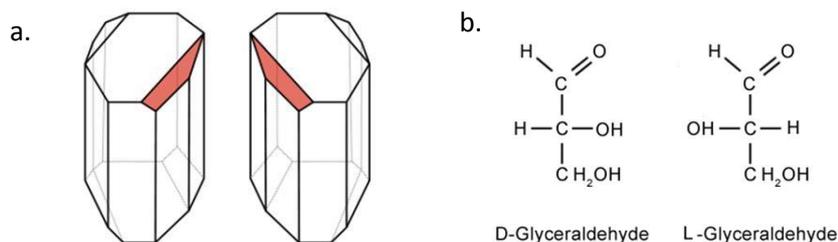


Fig 1 : a. Cristaux d'acide tartrique triés par Pasteur, b. D-(+)-glycéraldéhyde L-(-)-glycéraldéhyde

Puis, au début du XX^{ème} siècle, M. Fischer et M. Rosanoff furent les premiers à proposer un système de nomenclature, qui permettait de rendre compte de la chiralité des molécules, sans avoir à les dessiner en trois dimensions. Ainsi, ils ont désigné arbitrairement le (+)-glycéraldéhyde en *D*-(+)-glycéraldéhyde, car dans la représentation de Fischer, le groupe OH porté par le carbone asymétrique est à droite (*D=dexter*). L'énantiomère fut désigné *L*-(-)-glycéraldéhyde (*L=laevus*, Fig 1.b). Il n'y a donc aucun lien entre la mesure physique du pouvoir rotatoire et la nomenclature *D/L*. En 1949, J.M. Bijvoet³ confirmera expérimentalement que la configuration assignée arbitrairement à la nomenclature était juste.

Bien que R. Cahn, C. Ingold et V. Prelog⁴ aient proposé en 1966 le système de nomenclature *R*(*Rectus*) / *S* (*Sinister*) qui permet de déterminer sans ambiguïté la configuration absolue de n'importe quelle molécule, la nomenclature *D/L* reste la nomenclature de référence pour la description des constituants élémentaires du vivant.

b. Chiralité et biologie

La chiralité est omniprésente dans le monde du vivant. Deux classes de molécules chirales sont des constituants essentiels de la biologie : les sucres (utilisés pour la synthèse d'ADN), et les acides aminés (utilisés dans la synthèse de protéines, Fig 2). Ces deux classes de molécules ne sont présentes que sous la forme d'un seul énantiomère dans un organisme : les sucres sont exclusivement (*D*) tandis que les acides aminés sont principalement de type (*L*).

i. Les acides aminés

Les 20 acides aminés de type (*L*) distribués chez tous les êtres vivants constituent la base de la synthèse des protéines. Celles-ci sont issues de la traduction des ARN messagers (eux même copiés de l'ADN par le processus de transcription) et ont des rôles mécaniques (ex : cytosquelette), enzymatiques (ex : cycle de Krebs), de récepteur (ex : RCPG), de messenger (ex : hormone), de transport (ex : lipoprotéine). Ces acides aminés (*L*) abondent donc dans l'organisme et ont deux origines : l'une est endogène, l'autre est exogène (désignés comme acides aminés essentiels).

Cette spécificité énantiomérique de la biologie est une énigme pour la biochimie. Depuis longtemps, l'idée a été émise que l'explication pourrait se trouver dans l'espace. En effet, un précurseur des acides aminés, la glycine, a été découvert par spectroscopie dans un nuage stellaire⁵, et dans plusieurs météorites, des acides aminés ont également été découverts⁶ (environ 70, dont 8 composent les protéines). Certains présentent un excès énantiomérique (*e.e*) de type (*L*) et ce déséquilibre énantiomérique peut être expliqué par l'action des rayons X sous un champ magnétique⁷, conditions très répandues dans l'univers. En 2013, d'autres acides aminés ont encore été retrouvés dans des chondrites de l'Antarctique présentant un *e.e* de type (*L*)⁸. Une étude isotopique suggère même une synthèse chimique extraterrestre. Ainsi, l'hypothèse suivant laquelle la vie se serait développée dans un contexte majoritairement lévogyre apporté par des météorites expliquerait la spécificité énantiomérique du vivant (pour plus de détails⁹).

Néanmoins, des traces d'acides aminés de type (*D*) sont retrouvées dans l'organisme. Ils sont produits à l'aide d'isomérases, enzymes qui catalysent des réactions de type $A \rightarrow B$, où *A* et *B* sont des énantiomères. Par exemple, la *D*-sérine est synthétisée dans les astrocytes à partir de la *L*-sérine par la sérine-racémase^{10,11} et joue un rôle important de neuromodulateur. Le *D*-aspartate et la *D*-alanine ont également été retrouvés dans des cerveaux de rat, respectivement dans les cellules prolactines et certaines cellules de la glande pituitaire¹², qui ont des rôles endocriniens. Ces acides aminés (*D*) sont donc synthétisés localement et ont des effets métaboliques très précis.

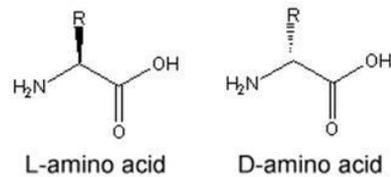


Fig 2 : (*L*)-acide aminé vs (*D*)-acide aminé
R représente la chaîne latérale de l'acide aminé

ii. Cas des médicaments

Il n'existe cependant pas de règle universelle capable de prédire l'activité biologique de deux énantiomères. C'est une problématique majeure rencontrée dans le domaine pharmaceutique, où par exemple deux énantiomères d'un médicament peuvent avoir des effets similaires, où l'un peut être thérapeutique et l'autre toxique (ex : thalidomide), ou les deux énantiomères sont tous deux thérapeutiques, mais pour des pathologies différentes (ex : (*L*)-Thyroxine traite l'hypothyroïdie, tandis que la (*D*)-Thyroxine traite l'hypercholestérolémie). La détermination *d.e.e* d'une formulation après synthèse est donc particulièrement importante.

iii. La reconnaissance énantiosélective

Pour qu'une molécule ait une activité biologique, elle doit interagir avec un récepteur, puis cette reconnaissance induira une transduction moléculaire qui se traduira par un effet physiologique. Aussi bien dans le cadre des effets induits par les acides aminés (*D*) que dans le cas de médicaments, il existe une discrimination d'origine biologique entre les énantiomères. Cette discrimination ne se fait qu'à l'étape qui initie la réponse, c'est-à-dire au moment de la reconnaissance entre le ligand chiral et le récepteur. Les premières observations expérimentales faites en ce sens datent du XIX^{ème} siècle. Pasteur remarqua en 1858 que la moisissure *Penicillium glaucum* métabolisait le (+)-tartrate plus rapidement que le (-)-tartrate. En 1886, A. Piutti remarqua quant à lui, que la (+)-asparagine avait un goût sucré, tandis que l'énantiomère était insipide. Pasteur conclura alors que « le système nerveux pourrait être lui-même dissymétrique »¹³. Ces observations allaient alors dans le sens de l'énantiosélectivité des récepteurs.

L'énantiosélectivité désigne la capacité d'un récepteur à interagir majoritairement avec un énantiomère. Cela implique que l'autre énantiomère peut interagir aussi avec ce récepteur, mais

avec une moins bonne affinité. Lorsqu'un récepteur n'interagit pas avec l'autre énantiomère, il est qualifié d'énantiospécifique.

Conceptuellement, une avancée significative pour expliquer l'énantiosélectivité biologique a été présentée en 1930 par L. Easson et E. Stedman¹⁴. Les interactions entre un ligand chiral et son récepteur sont associées aux groupes fonctionnels du ligand complémentaire de ceux du récepteur. Easson et Stedman ont postulé que les différences d'activités résultent d'une différence d'interaction des deux énantiomères avec le récepteur au niveau du site de reconnaissance. L'énantiomère le « plus actif » interagit au minimum avec trois sites distincts du récepteur, tandis que la forme la « moins active » interagit avec un minimum de deux sites (fig 3.a)

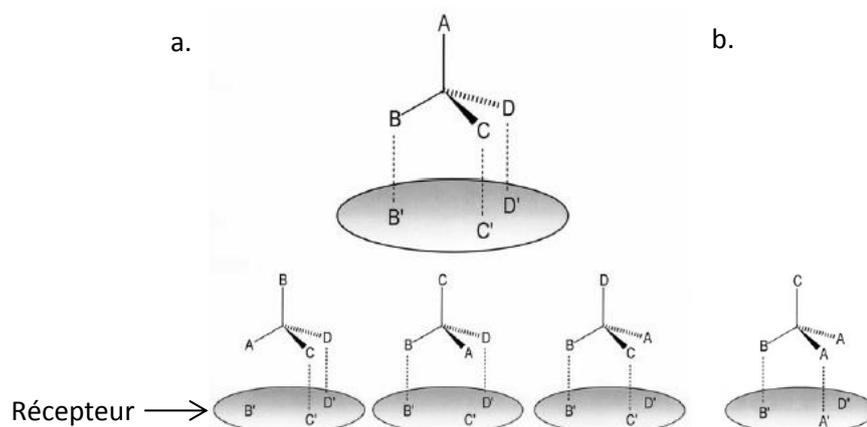


Fig 3 : Modèle d'Easson et Stedman pour une interaction entre un ligand chiral et son récepteur biologique. a. Le stéréoisomère le plus actif (en haut) interagit avec 3 sites du récepteur, tandis que les autres stéréoisomères n'interagissent qu'avec 2 sites. b. Interaction moléculaire entre un récepteur et un analogue non chiral¹⁵.

Remarquons qu'un analogue structural non chiral pourrait interagir avec deux sites de reconnaissance au moins et peut avoir la même activité biologique que l'énantiomère le moins actif¹⁶ (Fig 3.b).

A. Ogston^{17,18}, qui semblait ignorer le modèle de Easson et Stedman, proposa dès 1948 un modèle d'attachement en trois points pour expliquer la stéréosélectivité enzymatique pour la transformation du citrate, molécule *prochirale*, en aminomalonate¹⁹. Le concept d'Easson et Stedman pour la discrimination stéréosélective était alors étendu au concept de *prochiralité* (fig 4).

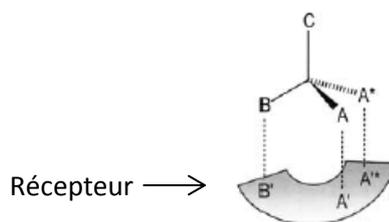


Fig 4 : Interaction en 3 points entre une molécule *prochirale* et son récepteur¹⁵.

Ici, dans la molécule C_{AA^*BC} , les groupes A et A* sont chimiquement équivalents, la molécule n'est pas chirale. Néanmoins, d'un point de vue stérique, ces groupes sont dit énantiotopiques: si le site A'* du récepteur est le site catalytique, seul A* subira la transformation chimique.

Dans les années 1990, V. Sokolov et N. Zefirov²⁰ ont développé le modèle d'Ogston, en proposant d'examiner la stéréosélectivité sous un angle dynamique plutôt que statique. Dans ce modèle, un ligand *prochiral* interagit en deux points seulement avec le récepteur, et l'énantiosélectivité dépend de l'orientation des sites énantiotopiques vis-à-vis du site actif de l'enzyme (Fig 5).

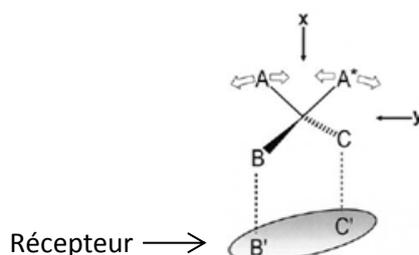


Fig 5 : le modèle du « rocking tetrahedron » développé par Sokolov et Zefirov
Le substrat C_{AA^*BC} interagit en deux points de contact avec l'enzyme ($B \cdots B'$ et $C \cdots C'$)¹⁵

Dans ce modèle, les groupes A et A* occupent des espaces identiques qui se recouvrent, et l'énantiosélectivité dépend du sens des interactions avec le site actif. Si les interactions se font dans le sens X de la figure 5, il n'y aura pas de sélectivité compte tenu de la flexibilité des groupes A et A*. Si les interactions se font dans le sens Y, le processus catalytique sera sélectif d'un groupe énantiotopique, voire spécifique.

Cette idée d'une reconnaissance moléculaire dynamique a été reprise par T. Booth^{21,22}, grâce à des études de séparation d'acide α -alkylcarboxylique sur des phases chirales stationnaires. Dans son modèle, il décrit un mécanisme de reconnaissance piloté par un changement de conformation du récepteur en trois étapes :

- Formation d'un *pro*complexe où le ligand et le récepteur sont en contact ;
- Ajustement des conformations qui optimisent la stabilité du complexe ;
- Formation de nouvelles interactions.

In fine, ce mécanisme aboutit à une reconnaissance chirale et décrit un processus d'ajustement induit (*Induced Fit Process*). D'après les auteurs, il est généralisable à toutes les classes de récepteurs chiraux.

Enfin, A. Mesecar et D. Koshland²³ ont montré en 2000 que le modèle d'interactions en trois points n'était pas valide dans le cas d'une enzyme, l'isocitrate deshydrogénase (IDH). En examinant les structures cristallographiques de l'enzyme, les auteurs ont mis en évidence que sans Mg^{2+} , l'isomère (L) se liait au site actif, tandis qu'en présence de Mg^{2+} , l'isomère (D) de l'isocitrate se retrouvait dans le site actif. Les auteurs montrent également que les deux isomères partagent trois sites d'interaction, et que c'est un quatrième qui permet d'expliquer l'énantiosélectivité observée.

Ces observations soulignent l'importance de la structuration du récepteur. Et dans le cas de molécules biologiques complexes comme les protéines ou les acides nucléiques, le pH, la force

ionique, la nature des ions, la température et les concentrations sont autant de paramètres pouvant influencer la structure de ces macromolécules naturelles et donc leur énantiosélectivité.

La poursuite des investigations fondamentales concernant les relations chiralité/activités biologiques comme la nécessité de contrôler les *e.e* dans les industries agroalimentaires et pharmaceutiques demande la mise au point de systèmes analytiques énantiosélectifs. Pour cela, deux méthodes sont utilisées : la séparation sur des phases stationnaires chirales et la détection en phase homogène. La première étape pour le développement de ces méthodes est le « *design* » d'un récepteur énantiosélectif.

I-2- les récepteurs énantiosélectifs

Différentes stratégies pour la détection ou la séparation d'énantiomères ont déjà été décrites dans la littérature. Il paraît important de distinguer dès à présent les sélecteurs, les indicateurs et les récepteurs énantiosélectifs. Les premiers servent à séparer des énantiomères, ils discriminent les molécules chirales suivant leurs carbones asymétriques. Les indicateurs sont des molécules qui interagissent spécifiquement avec une classe de molécules chirales (acides aminés ou binol par exemple). Enfin, les récepteurs sont sélectionnés pour reconnaître spécifiquement une molécule, et dans certains cas, un énantiomère de cette molécule.

a. Les sélecteurs énantiosélectifs

Les sélecteurs chiraux, autrement appelés sélecteurs conventionnels, sont utilisés dans les méthodes séparatives analytiques ou préparatives. Ils permettent de déterminer des *e.e* mais ne sont pas spécifiques d'une molécule ou d'une classe de molécules. Ils peuvent être classés suivant leur structure chimique et le type d'interactions mises en jeu lors des interactions avec les énantiomères. Ainsi, on distingue cinq familles de sélecteurs (Fig 6).

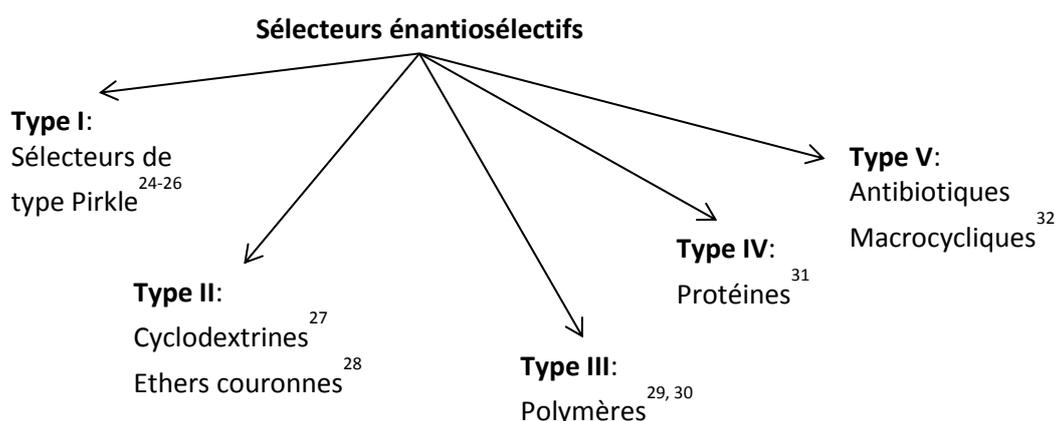


Fig 6 : Différentes classes de sélecteurs énantiosélectifs.

Ils sont très largement couplés à des méthodes séparatives, à en juger par le grand nombre de phases stationnaires chirales disponibles sur le marché (plus de 100). Néanmoins, ces sélecteurs souffrent encore de leur manque de spécificité. De nombreuses mises au point sont nécessaires. Par

exemple, la mesure d'*e.e* nécessite une calibration avec des molécules énantiomériquement pures³³, ce qui n'est pas toujours réalisable.

Une alternative pour ces mesures d'*e.e* est l'utilisation d'indicateur chiraux.

b. Les indicateurs énantiosélectifs

L'utilisation des indicateurs chiraux est basée sur la chimie supramoléculaire *via* la formation de complexes molécule-hôte. E. Anslyn³⁴ a largement développé cette approche dans le cadre de la mesure rapide d'*e.e* d'acides aminés, notamment avec la technique d'*Indicator Displacement Assay (IDA)*, où le transducteur de la reconnaissance hôte-molécule est un fluorophore. En 2008, un de ses articles présentait l'utilisation d'une molécule hôte à deux centres chiraux capable de complexer un ion cuivre. Cet ion cuivre peut également interagir avec un indicateur colorimétrique, le Chrome Azurol S (CAS) pour former un complexe. Lorsque des acides aminés sont introduits dans une solution avec ce complexe, ils vont prendre la place de l'indicateur coloré ce qui va provoquer un changement des propriétés d'absorption de l'indicateur : il est bleu lorsqu'il est complexé et jaune lorsqu'il est libre (fig 7). L'idée centrale est que les séries (*D*) et (*L*) n'ont pas la même affinité pour l'indicateur. Cette propriété de changement de couleur permet, à l'œil nu, d'estimer la pureté énantiomérique d'une solution.

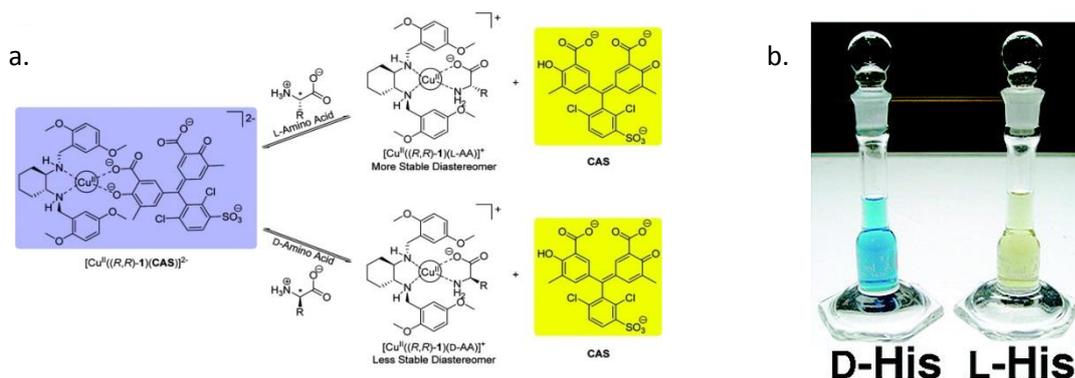


Fig 7 : a. Test par déplacement d'indicateur pour des acides aminés, basé sur le déplacement du Chrome Azurol S (CAS) d'un complexe à base de cuivre : le CAS est bleu lorsqu'il interagit avec le cuivre et jaune après déplacement, b. Illustration de l'énantiosélectivité de cette méthode avec l'Histidine : seule la forme (*L*) interagit avec le complexe pour libérer le CAS³⁴.

Les courbes de calibrations obtenues en dosage spectrométrique ont cependant de larges incertitudes (~10 %), ce qui limite le seuil de détection. Dans un autre article, E. Anslyn montre qu'il est possible d'adapter cette méthode à l'usage de plaque à 96 puits pour la mesure rapide *e.e*³⁵, avec une limite de détection à quelques pourcents.

Une autre méthode, cette fois basée sur l'utilisation d'un indicateur électrochimique, a été proposée par J. Tucker³⁶ en 2010. Dans cette approche, les auteurs ont utilisé un indicateur à base de ferrocène dont l'interaction avec une cible chirale modifie son potentiel standard apparent (Fig 8). Néanmoins, cette méthode est restreinte à la famille des binols.

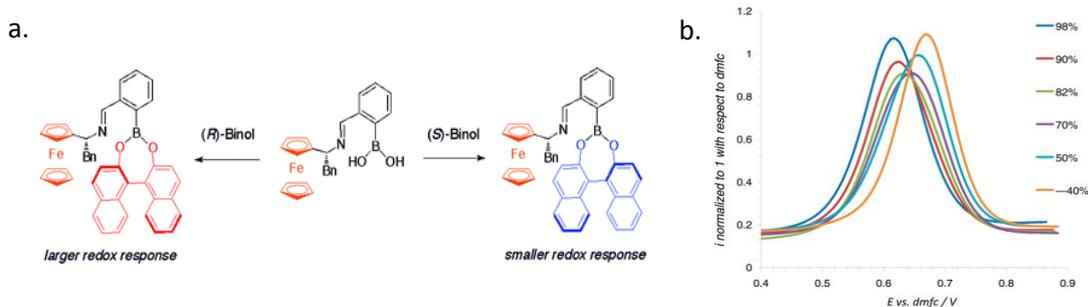


Fig 8 : a. Complexes formés entre l'indicateur électrochimique et les (R) et (S)- binols³⁶;
 b. Voltammogrammes à vagues carrées obtenus pour différents % d'*e.e* en (S)-binol: plus cet excès agmente, plus le E_0^{app} de la sonde est décalé vers des potentiels anodiques³⁶.

Ces indicateurs chiraux représentent une alternative très intéressante à la détermination d'*e.e* basée sur des méthodes séparatives. Mais les limites de détections sont encore élevées, de l'ordre de quelques pourcents, et les mauvaises constantes d'affinités nécessitent l'utilisation de concentrations en analytes élevées.

Ces techniques ne sont donc pas adaptées pour la mesure de traces d'énantiomères. Un moyen d'abaisser les seuils de détection et la quantité d'analyte nécessaire est d'utiliser un récepteur spécifique d'une cible.

c. Les récepteurs énantiosélectifs

Trois stratégies distinctes ont déjà été explorées afin de proposer des récepteurs avec une bonne énantiosélectivité et une bonne affinité : la formation de polymères à empreintes moléculaires (*Molecular Imprinted Polymers, MIPs*), les anticorps et l'approche combinatoire.

i. Polymères à empreintes moléculaires (MIPs)

L'impression moléculaire est un procédé par lequel des monomères fonctionnels sélectionnés s'auto-assemblent autour d'une molécule patron et polymérisent en présence d'un agent de polymérisation/réticulation^{37,38,39}. Une fois la molécule patron extraite du polymère obtenu, il en résulte une cavité complémentaire en forme et en fonctionnalité. Elle interagit avec les molécules identiques ou de structures proches de celle de la molécule patron (Fig 9)

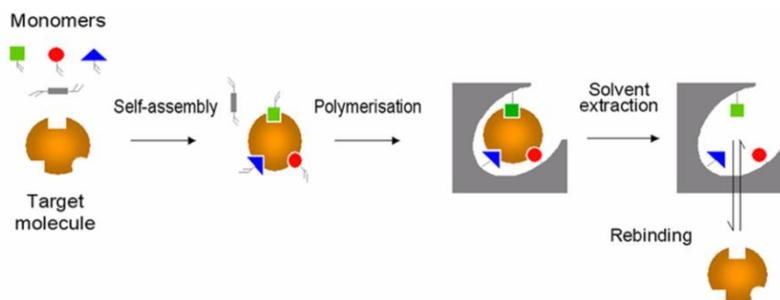


Fig 9 : Principe général de la préparation de MIPs³⁹.

Le polymère à empreintes moléculaires « garde en mémoire » la forme et les groupements fonctionnels de la molécule patron. Lorsque le polymère est fabriqué contre une molécule chirale, il sera potentiellement énantiosélectif.

Les MIPs ont en général une très grande affinité pour leur cible, comparable à celle des anticorps pour leurs antigènes. Pour cette raison, ils ont été surnommés « *antibodies mimic* »⁴⁰.

Ils peuvent être utilisés comme matrice d'affinité en séparation ou comme élément de reconnaissance dans des capteurs. Ainsi, les MIPs ont permis de séparer par chromatographie des énantiomères de dérivés d'acides aminés⁴¹, de peptides⁴², de β -bloquants⁴³, d'anti-inflammatoires non stéroïdiens⁴⁴ et d'antibiotiques⁴⁵.

Néanmoins, l'utilisation des MIPs dans les techniques séparatives présentent des inconvénients dus à une grande disparité des sites énantiosélectifs et non-spécifiques situés à la surface du polymère. Ceci entraîne donc une efficacité contestable⁴⁶. La synthèse de MIP nécessite également une grande quantité de molécules empreintes, ce qui peut être problématique pour les molécules d'intérêt difficile à synthétiser ou disponibles en quantité limitée. Enfin, les conditions de polymérisation peuvent être incompatibles avec la stabilité d'une biomolécule par exemple.

ii. Anticorps

Les anticorps sont des protéines produites par le système immunitaire destinées à interagir avec des molécules du *non-soi*, c'est-à-dire dirigées contre des ligands inconnus de l'organisme. Ces séquences reconnues par les anticorps sont appelées épitopes ou encore déterminants antigéniques.

Les anticorps utilisés en chimie analytique sont plus précisément des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines (IgG) constitués de deux chaînes lourdes **H** et deux chaînes légères **L**, reliées entre elles par des ponts disulfures (lien S-S covalent entre deux cystéines). Ces chaînes peptidiques forment une structure en Y et sont constituées de trois motifs constants **C** (caractéristiques de l'espèce dont est issu l'anticorps) et d'un domaine variable **V**, impliqué dans la reconnaissance de l'épitope (Fig 10).

Les anticorps sont obtenus par immunostimulation chez les rongeurs (classiquement, souris, lapin et rat). L'épitope d'intérêt est mélangé à l'adjuvant complet de Freund (émulsion d'eau, d'huiles, d'émulsifiant et de bactéries mortes) qui est injecté par voie intrapéritonéale (dans le péritoine, membrane séreuse qui tapisse l'abdomen). La réaction immunitaire va alors provoquer la production d'ascite, c'est-à-dire un épanchement intra-abdominal, dans lequel sont contenues les cellules immunitaires productrices d'anticorps dirigées contre l'épitope désiré. Le plus souvent, cette méthode permet d'obtenir des anticorps polyclonaux, c'est-à-dire synthétisés par des cellules immunitaires différentes. Ces anticorps polyclonaux n'ont pas les mêmes sites de fixation sur l'antigène et ont des affinités différentes. Après la production d'ascite, s'ensuit donc une procédure de purification, destinée à isoler des anticorps monoclonaux. Ces procédures sont très lourdes en termes de temps et d'investissement.

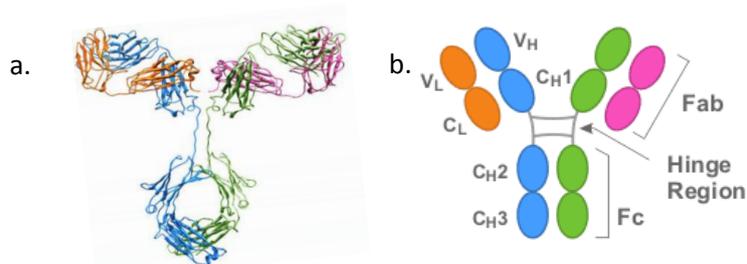


Fig 10 : a. IgG, les sections vertes et bleues correspondent aux chaînes lourdes (H), les sections roses et oranges correspondent aux chaînes légères (L). b. V = variable ; C = constant, H = Heavy ; L = light ; Fc = fragments cristallisables ; Fab = Fragment antigen Binding

Cette classe de récepteur reste néanmoins très utilisée en chimie analytique, car ces objets ont de très bonnes affinités pour leur antigène ($K_d \sim \text{nM}$).

Il est donc tout à fait possible d'immuniser des animaux contre une molécule chirale, et d'obtenir des anticorps monoclonaux énantiosélectifs. C'est ce qu'a montré Karl Landsteiner⁴⁷ en 1917. Depuis, les anticorps énantiosélectifs ont été décrits pour des acides aminés⁴⁸⁻⁵⁰, des médicaments^{51,52} ou encore des acides α -hydroxylés⁵³.

La production d'anticorps n'est cependant pas sans limite. En effet, il reste difficile d'immuniser des rongeurs avec des toxines qui ne sont pas tolérées par son organisme. De plus, les petites molécules sont faiblement immunogènes, il peut donc être très difficile d'obtenir des anticorps correspondants. Enfin, lorsqu'un stock d'anticorps est épuisé, toute une campagne d'immunisation doit être programmée. Le stock suivant d'anticorps n'est pas assuré d'être à la même concentration, ni d'avoir la même affinité pour sa cible que le précédent.

iii. Approche combinatoire

La chimie combinatoire est une approche moléculaire et statistique qui repose sur la mise au point de méthodes de synthèse à haut débit (création d'une banque de molécules) et de criblage de vastes mélanges de molécules construites par combinaison d'unités de base. Cette approche a pour objectif de pouvoir déterminer, parmi N molécules, laquelle (ou lesquelles) aura (ou auront) les propriétés désirées.

Dans le cadre de la discrimination chirale, différentes stratégies ont vu le jour afin de cribler des banques de récepteurs chiraux de faible masse moléculaire (à l'opposé des anticorps).

Lors de l'élaboration d'une stratégie combinatoire, il est tout d'abord nécessaire de considérer la disponibilité et la nature des unités synthétiques (synthons) qui interviendront dans la synthèse de la bibliothèque. Sur le plan chimique, la formation des nouvelles liaisons entre chaque synthon doit conduire à une structure stable dans les conditions de synthèses et lors des tests.

Une fois cette banque disponible, il est nécessaire d'y rechercher les candidats qui possèdent les propriétés désirées. Pour cela, trois stratégies sont possibles^{54,55}.

La première est dite réciproque et a été introduite par W. Pirkle⁵⁶. Un énantiomère de la cible est fixé sur un support chromatographique, cette phase stationnaire servant alors à passer en revue une banque de composés racémiques. Celui ayant eu la meilleure affinité pour la cible chirale immobilisée est ensuite préparé sous une forme énantiomériquement pure et fixé sur un support chromatographique. La phase stationnaire, ainsi obtenue, permet une très bonne séparation des énantiomères⁵⁷. Cette approche a notamment permis à K. Lewandoski de séparer des dérivés d'acides aminés à partir d'une banque de dihydropyrimidines⁵⁸ de plus de 140 candidats.

Une deuxième approche consiste à greffer sur une colonne chromatographique une bibliothèque de récepteurs chiraux énantiomériquement purs plutôt qu'un énantiomère de la cible. Les propriétés énantiosélectives de cette colonne sont testées par injection de composés racémiques. Lorsqu'une séparation est observée, plusieurs colonnes sont préparées à partir de la même bibliothèque, mais cette fois chaque colonne contiendra une moins grande diversité de récepteurs. En répétant cette démarche, les colonnes sont préparées successivement avec des bibliothèques de plus en plus réduites, ce qui conduit à isoler le récepteur énantiosélectif optimal. Dans cette approche, le nombre de colonnes nécessaires est inférieur au nombre de récepteurs chiraux présents dans la banque initiale. Ainsi M. Chiari⁵⁹ a pu séparer des dérivés d'acides aminés grâce à une banque de 8000 cyclopeptides.

Enfin, M. Weingarten⁵⁵ a développé une approche combinatoire originale non séparative pour la détection énantiosélective de dérivés d'acides aminés. Dans ce cas, une bibliothèque de récepteurs chiraux potentiels a été synthétisée à partir de 3 types de synthons, ce qui a permis de synthétiser 60 candidats. Chaque candidat a été greffé sur une bille de polystyrène. Parallèlement, des énantiomères de dérivés d'acides aminés ont été marqués par un chromophore bleu ou rouge (associé respectivement aux dérivés d'acide aminé de type *L* et *D*). Lorsque les billes fonctionnalisées sont en présence d'un mélange racémique de cibles marquées, elles peuvent être observées au microscope optique, trois cas se présentent alors :

- La bille est restée incolore : le récepteur n'est pas spécifique de la cible ;
- La bille est marron : les deux énantiomères ont été reconnus par le récepteur ;
- La bille est rouge ou bleue : le récepteur est bien énantiosélectif voire énantiospécifique.

Ainsi, Weingarten et ses collaborateurs ont pu identifier des récepteurs chiraux de dérivés d'acides aminés. La chimie combinatoire est donc un outil performant qui permet de découvrir de nouveaux récepteurs chiraux à faibles masses moléculaires pour la chimie analytique ou la chimie préparative.

I-3- Récepteurs chiraux à base d'acides nucléiques : les aptamères

a. Sélection

Sur la base des modèles développés pour expliquer la reconnaissance énantiospécifique de substrats enzymatiques, il apparaît que les polymères biologiques sont capables de modifier leur arrangement dans l'espace afin de s'adapter à la forme et aux fonctionnalités chimiques de leur cible. C'est un avantage devant les récepteurs synthétiques.

L'approche statistique que propose la chimie combinatoire permet quant à elle de sélectionner parmi une large banque de candidats, celui (ou ceux) qui présentent la (ou les) meilleure(s) affinité(s). Ainsi, une bibliothèque de polymères biologiques pourrait être passée en revue afin d'en isoler le ou les meilleurs candidat(s) pour la reconnaissance moléculaire voulue. Dans ce cas, les synthons utilisés sont bifonctionnels, et sont des nucléotides (de type ribose ou désoxyribose) ou des acides aminés. Dans ce travail ne sera détaillée que l'utilisation de nucléotides.

Ces approches ont été développées dans les années 90 avec les acides nucléiques, par trois groupes indépendants⁶⁰⁻⁶². A. Ellington et J. Szostak⁶¹ ont alors nommé ces objets "aptamère", néologisme du mot latin *aptus* (approprié à, se lie à) et du grec *meros* (unité de base d'un polymère), désignant ainsi un polymère spécifique d'une cible. C. Tuerk et L. Gold⁶⁰ ont quant à eux nommé la procédure de sélection *SELEX* (Evolution Systematique de Ligands par Enrichissement Exponentiel), dont le principe est exposé figure 11.

La première étape pour définir une séquence d'aptamère dirigée contre une cible d'intérêt par chimie combinatoire est de constituer la banque d'acides nucléiques. Les brins d'ADN ou d'ARN de séquences aléatoires sont composés de séquences complémentaires d'amorce de PCR aux extrémités 5' et 3' afin d'initier la phase d'amplification après la sélection. Entre ces séquences, un nombre aléatoire de nucléotides constitue la banque en elle-même. Comme il n'existe que quatre nucléotides naturels, pour n nucléotides disposés aléatoirement dans la séquence, 4^n molécules différentes coexisteront dans la bibliothèque. Les aptamères décrits dans la littérature ont des tailles variables de 20 à 80 nucléotides.

La seconde étape consiste à séparer les aptamères de la banque en fonction de leur affinité pour la cible. Pour cela, les aptamères sont incubés avec la cible. C'est alors que l'étape la plus critique intervient : la séparation entre les complexes aptamère/cible et les aptamères restés libres.

Initialement, Tuerk et Gold⁶⁰ séparaient les aptamères libres et complexés en utilisant une technique de filtration sur membrane de nitrocellulose. Ellington et Szostak, quant à eux, utilisèrent une séparation par chromatographie d'affinité, où la cible est immobilisée sur une surface. D'autres techniques de séparation ont par la suite été développées, comme la cytométrie de flux⁶³, l'électrophorèse capillaire⁶⁴, la résonance plasmonique de surface⁶⁵, ou encore l'AFM⁶⁶⁻⁶⁸.

Les aptamères sélectionnés sont ensuite élués et amplifiés par la technique de *Réaction en Chaîne par Polymérase* (PCR) pour générer une nouvelle banque d'oligonucléotides, enrichie en séquences

potentiellement capables de se lier spécifiquement à la cible. Des mutations, susceptibles d'améliorer ou de détériorer l'affinité sont généralement introduites à cette étape. Le cycle de séparation est alors à nouveau engagé, jusqu'à ce qu'une séquence spécifique se détache.

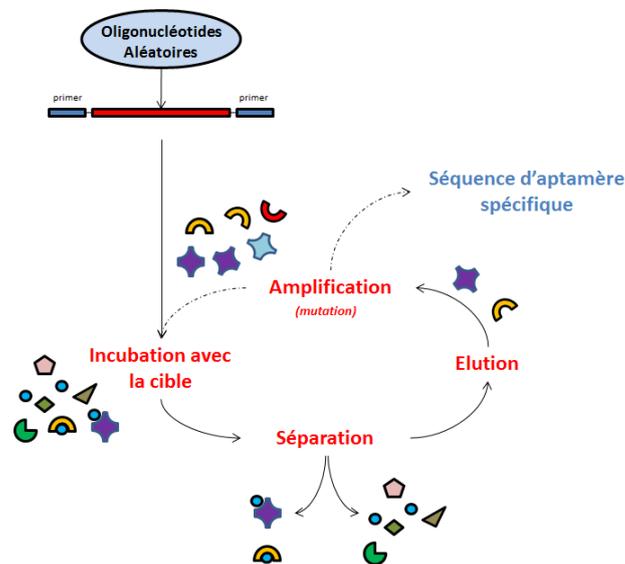


Fig 11 : Schéma général de la procédure *SELEX*.

La banque est constituée de milliers de séquences différentes qui sont sélectionnées par des méthodes séparatives, jusqu'à isoler une séquence consensus.

Cette méthodologie d'isolement de récepteur a permis de déterminer des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN capables de reconnaître des ions Zn^{2+} ⁶⁹ et K^+ ⁷⁰, des protéines⁷¹⁻⁷³, des peptides⁷⁴, des acides aminés^{75,76} et dérivés^{77,78}, des nucléotides^{79,80} ou encore des médicaments⁸¹ et des insecticides⁸².

Lorsque la cible utilisée pour la sélection des aptamères est chirale, le *SELEX* peut permettre de sélectionner des oligonucléotides avec une forte énantiosélectivité. Cette propriété a permis de proposer des phases stationnaires à base d'aptamère en série ADN pour la séparation énantiosélective d'oligopeptides⁸³, de nucléotides et de dérivés d'acides aminés⁸⁴. Des aptamères en série ARN ont également été utilisés pour séparer les énantiomères de l'histidine⁸⁵, du tryptophane⁸⁶ et de l'arginine⁸⁷. Dans ce dernier cas, M. Famulok⁸⁸ a montré que l'énantiomère de l'aptamère (*L*-RNA, dont la chiralité est due au ribose) était capable de reconnaître l'énantiomère de la cible, la *D*-arginine.

Cette méthodologie *SELEX* est donc très performante, puisqu'elle permet de sélectionner des aptamères spécifiques énantiosélectifs. C'est une alternative très intéressante puisqu'une fois la séquence déterminée, les aptamères peuvent être synthétisés à la demande, contrairement aux anticorps qui nécessitent une nouvelle campagne d'immunisation.

Cependant, dans le cas de séparation sur support, la cible est immobilisée par l'intermédiaire d'un bras espaceur. Les aptamères sont donc contraints à ne pas interagir avec une partie de la molécule cible. De plus, dans le cas de la sélection par chromatographie d'affinité, il est préalablement

nécessaire de faire une première sélection négative, pour éliminer les séquences se liant de manière non spécifique au support. Bien que les aptamères puissent avoir une affinité de l'ordre du nanomolaire, ils restent globalement moins affins que les anticorps. Cette technologie reste donc à optimiser.

b. Généralité sur les acides nucléiques : composition et structure

Pour bien comprendre l'origine des propriétés de reconnaissance des aptamères vis-à-vis de leur cible, il faut s'intéresser à la nature chimique des acides nucléiques, qui leur permet une très grande richesse de conformation. Associés aux nombreuses fonctionnalités pouvant interagir entre elles ou avec d'autres molécules, les acides nucléiques peuvent alors adopter des structures tridimensionnelles potentiellement complémentaires en forme et en fonctionnalité d'une autre molécule.

Les ADN et les ARN sont des polymères biologiques qui résultent de l'association de nucléotides. Les nucléotides sont au nombre de cinq, et sont constitués d'un groupement phosphate, d'un pentose et d'une base azotée (Fig 12). L'enchaînement de ces bases azotées constitue la structure primaire de l'ADN.

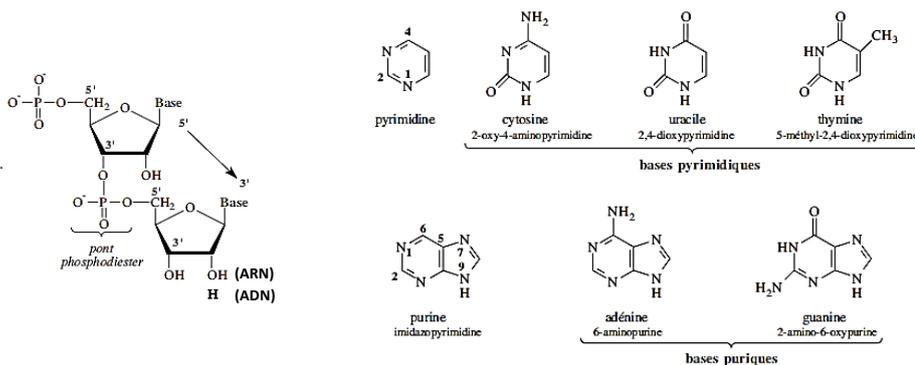


Fig 12 : Représentation schématique des nucléotides constituant les acides nucléiques.

Les brins d'ADN sont faits d'adénine (A), de guanine (G), de cytosine (C) et de thymine (T), tandis que dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Les bases (A) et (G) sont puriques, (C), (T) et (U) sont pyrimidiques. Ces nucléotides sont liés par une liaison phosphodiester entre le phosphate en 5' du ribose et le groupe 3'-OH du nucléotide adjacent. En terme de nomenclature, on distingue les extrémités d'un brin d'ADN par le numéro du carbone du ribose qui n'est pas lié à une base. On parle donc des extrémités 5' et 3'.

Une particularité de l'ARN est que le ribose possède un groupement hydroxyle en 2'. Sur le plan chimique, cette fonction alcool rend l'ARN sensible à l'hydrolyse alcaline. La présence des deux oxygènes en position *cis* sur les positions 2' et 3' permet la cyclisation du phosphate, qui provoque la rupture de la chaîne nucléotidique (fig 13). L'ARN a donc une stabilité chimique moins bonne que l'ADN.

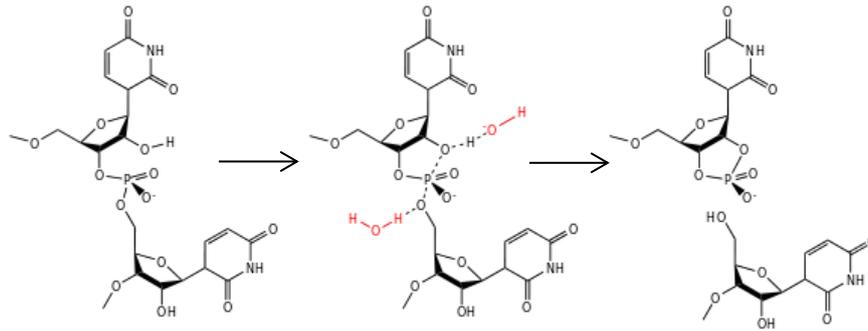


Fig 13 : Hydrolyse alcaline de l'ARN conduisant à la rupture du brin.

De plus, l'amplification par PCR de brins d'ARN nécessite que ces brins soient d'abord transcrits en ADN: c'est une RT-PCR (*Reverse Transcriptase-PCR*), qui constitue donc une étape supplémentaire de traitement dans une procédure déjà lourde.

c. Interactions entre bases

L'ADN fut décrit par J. Watson et F. Crick⁸⁹ sous la forme d'un double brin. C'est effectivement dans cette configuration qu'il se retrouve dans le noyau cellulaire. Cet assemblage est un dimère de brins dont les séquences sont complémentaires : l'adénine s'apparie avec la thymine via deux liaisons hydrogène, la cytosine et la guanine s'apparient, quant à elles, avec trois liaisons hydrogène (Fig 14). Plus l'appariement entre deux brins contient de liens guanine-cytosine, plus le lien entre les brins est fort.

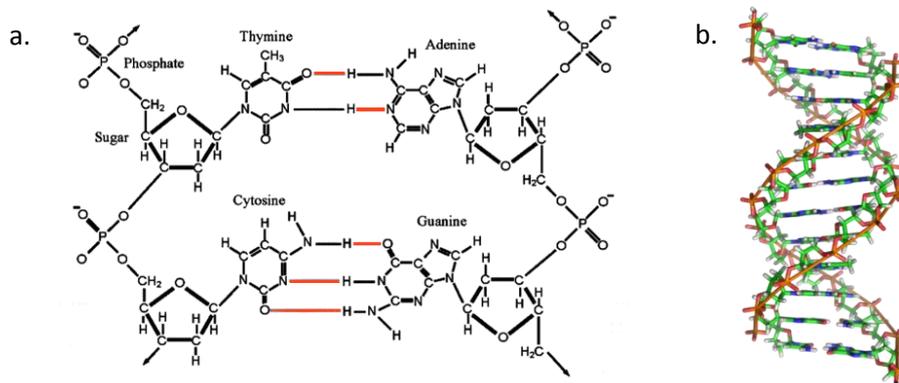


Fig 14 : a. Appariement de bases dans un double brin d'ADN.
b. Les deux brins complémentaires sont antiparallèles (5'-3' vs 3'-5').

Il est également possible que l'adénine interagisse avec une cytosine, et la guanine avec une thymine. On parle alors d'appariement de type *Wobble* (bancale), plutôt que d'appariement de type *Watson-Crick*.

Dans le cas de simples brins d'acides nucléiques comme les aptamères, des appariements de bases peuvent se faire au sein de ce brin unique. Le repliement conduit à la formation d'une structure en tige-boucle (Fig 15). La stabilité de la zone de complémentarité dépend de sa longueur, de la

proportion d'appariement de bases (*AT*) et (*GC*) et de la présence d'éventuels mésappariements ou d'appariements *Wobble*. La nature de la boucle est également très importante : la longueur optimale est comprise entre 5 et 8 nucléotides. Certaines boucles de quatre bases échappent à cette règle : ce sont les *tétraboucles*^{90, 91}.

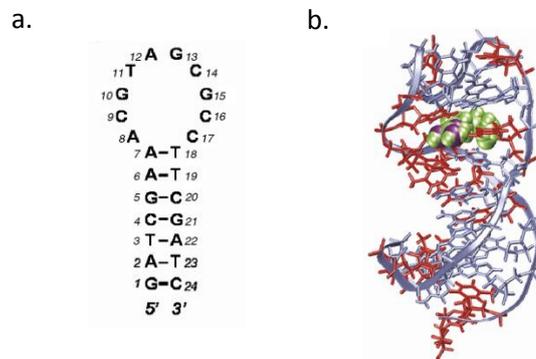


Fig 15 : a. Structure en tige prédite par le logiciel *mfold*, b. repliement de l'aptamère autour de sa cible, *L-arm* (PDB 1OLD)⁹²

Il existe aussi l'appariement de type Hoogsteen⁹³. Ce type d'interaction (fig 16) implique une base pyrimidique et une face d'une base purique différente de la face Watson-Crick : ce sont les positions N-7 et le groupement *oxo* ou *amino* en position 6 (respectivement pour la guanine et l'adénine) qui sont impliqués.

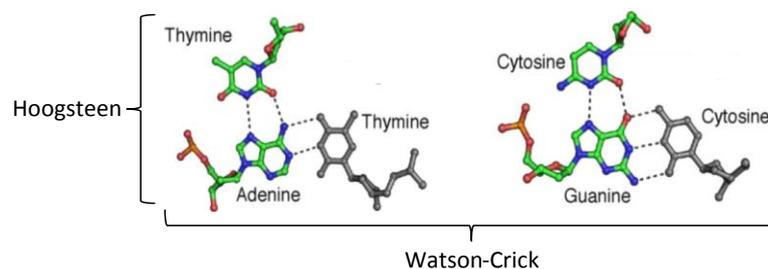


Fig 16 : Représentation des interactions Watson Crick vs Hoogsteen⁹⁴

Ce type d'appariement permet à un troisième brin d'interagir avec une double hélice déjà formée⁹⁵ pour former des triplex. Les appariements d'*Hoogsteen* sont notamment rencontrés dans la structure secondaire des ARN de transfert, et stabilisent leurs structures.

Ces appariements se rencontrent également dans une structure tertiaire de plus en plus étudiée : le quadruplexe de guanine ou *G-quartet*. Dans ces quadruplexes, quatre guanines sont alignées dans un plan grâce à des liaisons hydrogènes impliquant les faces *Watson-Crick* avec celles de types *Hoogsteen* de la guanine voisine. Il en résulte une tétrade (G-G-G-G) (Fig 17). Ces quartets de guanine sont stables par *stacking* des orbitales π de bases azotées, et grâce à un ion K^+ intercalé entre deux plans de guanines.

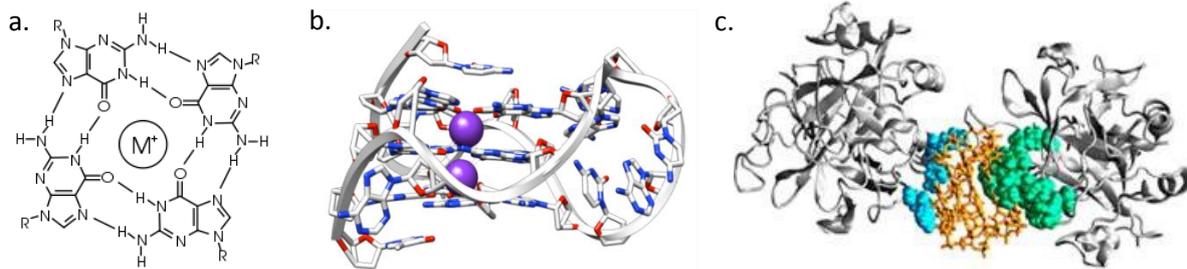


Fig 17 : a. G-quartet vu du dessus, M^+ = ion monovalent,
 b. Modélisation d'un G quartet à 2 plans de guanine, en violet un monocation,
 c. L'aptamère anti Thrombine est un G-quartet (en jaune) et lie deux thrombines par l'intermédiaire de zone d'interaction (en vert et bleu)⁷¹.

Bien que cela ne soit pas intuitif, les interactions de type π -stacking entre bases azotées adjacentes sont au moins aussi importantes que les interactions complémentaires de type Watson-Crick. En effet plusieurs études^{96,97} ont déjà montré que ce π -stacking contribuait à plus de 50 % dans l'énergie libre de stabilisation d'appariement de brins d'ADN. Les bases azotées étant aromatiques, elles ont un caractère hydrophobe. De ce fait, les bases minimisent leur exposition au solvant grâce à ce type d'interaction.

Dans le cadre d'interactions entre oligonucléotides et petites molécules, des appariements de type *Pseudo Base Pairing* ont également été décrits^{98,99}. Il s'agit dans ce cas d'interaction hydrogène avec les bases azotées (faces Watson-crick ou Hoogsteen) ou le ribose avec des sites donneur ou accepteur de proton du ligand⁹⁹.

d. Conformations du squelette Phosphate-Ribose

Les liaisons phosphodiester entre chaque nucléotide sont acides avec un $pK_a \sim 1,5$. A pH neutre, le groupe phosphate est donc un monoanion. En conséquence, les charges négatives se repoussent, et dans un duplex d'ADN, elles fournissent une force opposée aux interactions entre bases azotées qui maintiennent la structure secondaire en double hélice. En solution, ces charges négatives peuvent être compensées par des cations monovalents ou divalents. Ces ions contrebalancent alors les effets de répulsions électrostatiques entre phosphate et stabilisent le complexe d'ADN. Si ce squelette n'était pas chargé négativement, il serait plus difficile de déshybrider un duplex d'ADN ou d'ARN. Il faudrait donc fournir plus d'énergie pour qu'une enzyme duplique l'ADN ou le transcrive, par exemple. Cette forme anionique des acides nucléiques permet donc de faciliter les processus biologiques.

En plus de ces effets de charge, le squelette phosphate-ribose permet aux acides nucléiques un grand degré de liberté *via* les possibilités de rotations autour de simples liaisons. Plus exactement, trois types de liaisons sont impliqués dans ce phénomène (Fig 18):

- La liaison osidique qui maintient la base azotée au ribose (rotation χ) ;
- Les liaisons au sein du ribose (rotation ν_x dans le pentose, γ, ϵ en interactions avec les phosphates);

- Les liaisons qui lient le phosphate aux oxygènes, et les oxygènes aux riboses (rotations α, β, ζ).

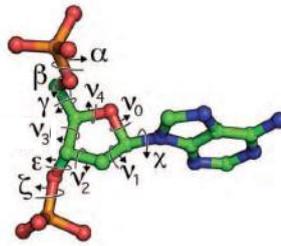


Fig 18 : Angles de torsions possibles au sein d'un nucléotide⁹⁴.
Les angles α, β, ζ sont relatifs au squelette phosphate, les rotations ν_x et χ sont relatives au ribose

Les torsions de ces liaisons permettent notamment de minimiser la répulsion des charges négatives des phosphates au sein d'un même brin ou dans un duplex.

e. Interactions guanines-phosphate

En 1986, G. Lancelot et C. Hélène¹⁰⁰ ont étudié par RMN les interactions entre l'ADN ou l'ARN avec l'anion phosphate. Ils ont ainsi montré que la guanine pouvait interagir *via* deux liaisons hydrogène avec le PO_4^- . Ils ont également déterminé que le ribose de l'ARN pouvait interagir de la même manière, tandis que le désoxyribose ne formait qu'une seule liaison (Fig 19).

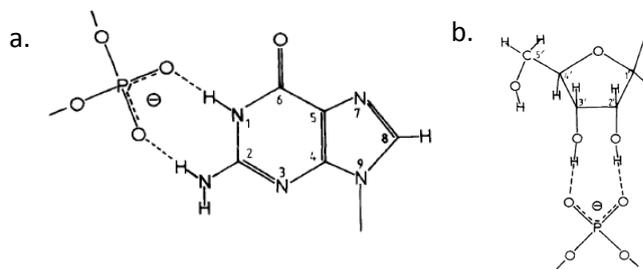


Fig 19 : a. Interactions Guanine - phosphate par 2 liaisons hydrogène
b. Interaction ribose-phosphate¹⁰⁰.

L'interaction guanine-phosphate a déjà été observée par RMN dans la formation du complexe aptamère/*L*-argininamide⁷⁷. Dans ce cas, les auteurs ont également identifié des appariements de type *Watson-Crick* et *Hoogsteen*.

f. Pseudo nœuds

Enfin, une autre structure observée dans la structuration des acides nucléiques est le pseudonœud. Cette structure se forme à partir d'une structure en tige boucle, lorsque des nucléotides de la boucle s'apparient avec une autre région de l'acide nucléique située à l'extérieur de la tige¹⁰¹ (Fig 20). Le terme de pseudonœud a été introduit car l'enlacement n'est pas un nœud au sens strict, mais en "tirant" sur les extrémités d'un pseudonœud, la structure se défait.

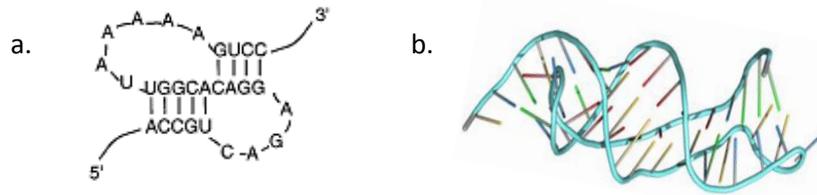


Fig 20 : Représentation Schématique en 2D (à gauche) d'un aptamère anti-biotine¹⁰² et en 3D (à droite, *PDB YMO1*) d'un pseudonoeud.

Un aptamère en série ARN en forme de pseudonœud a été identifié contre l'enzyme *Reverse Transcriptase* (transcriptase inverse) du VIH-1¹⁰³ et un aptamère anti-biotine présente également cette structure¹⁰².

g. Rôle des ions

Les acides nucléiques sont des polyanions dont les charges sont compensées en solution par la présence de cations mono et divalents¹⁰⁴. Comparés aux cations monovalents (K^+ , Na^+), les cations divalents (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) ont une plus forte affinité pour les acides nucléiques^{105,106}. Tous ces ions interviennent dans la formation des structures secondaires des acides nucléiques, mais ce sont surtout les ions divalents qui stabilisent thermodynamiquement les structures tertiaires des acides nucléiques, c'est-à-dire qui maintiennent entre elles les différentes structures secondaires coexistant dans le repliement d'un simple brin d'acide nucléique.

Les interactions entre acides nucléiques et ions peuvent être divisées en deux catégories : les interactions *Outer sphere*, où une molécule d'eau fait partie de la sphère d'hydratation du cation qui intervient dans les interactions ion-acide nucléique, et les interactions *Inner Sphere*, directement entre l'ion et l'acide nucléique (Fig 21).

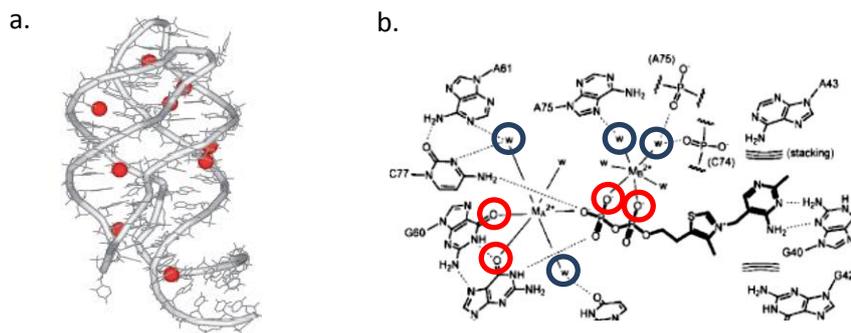


Fig 21 : a. Structure du Riboswitch à guanine¹⁰⁷, en rouge les ions Mg^{2+}
 b. Interactions *inner* (cercles rouges) et *outersphere* (cercles bleus) impliquant un ion Mg^{2+} pour la reconnaissance du TPP pour son riboswitch¹⁰⁸.

Dans le cas des aptamères et des riborégulateurs, ou riboswitch, qui sont des segments structurés dans la partie 5'-UTR (*i.e.* non codante) d'ARN messagers pouvant fixer spécifiquement un ligand, le Mg^{2+} joue souvent un rôle majeur¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Parmi les structures d'aptamère déjà déterminées, les tiges boucles et les G-quartet sont largement représentés. Les ligands interagissent avec ces structures au niveau des parties non hybridées et la complexité des repliements est à attribuer aux ions.

h. L'hypothèse du monde ARN

L'hypothèse du monde ARN est une hypothèse suivant laquelle l'acide ribonucléique serait le précurseur de toutes les macromolécules biologiques, et postule donc que l'ARN était la principale source de vie avant la première cellule à ADN. Cette théorie a été énoncée pour la première fois en ces termes par Walter Gilbert en 1986. Néanmoins, J. Watson et F. Crick suggéraient déjà en 1968 qu'il pourrait exister une relation stéréochimique entre (anti)codon et acides aminés. Ce scénario a largement été repris depuis, jusqu'à suggérer qu'une fraction du code génétique est héritée d'interactions entre ARN et acides aminés apparus aux origines de la vie¹¹⁰.

La sélection de séquences d'aptamères contre des acides aminés comprenant parfois le codon ou l'anticodon de ces acides aminés⁹ montre qu'une sélection *in vitro* des millions d'années après la fin de cet hypothétique monde ARN peut aboutir à l'identification de triplets de nucléotides complémentaires d'acides aminés qui font partie du code génétique (Fig 22). Cette observation a mené Michael Yarus à publier en 2000 un article au titre très explicite : « *RNA-ligand chemistry : a testable source for the genetic code* »¹¹¹.

Un autre exemple en faveur de la sélection naturelle de séquences d'ARN dirigées contre de petites molécules biologiques est la sélection d'un aptamère anti-ATP. Celui-ci présente un motif similaire à une séquence d'ARN viral qui reconnaît ce même ligand.

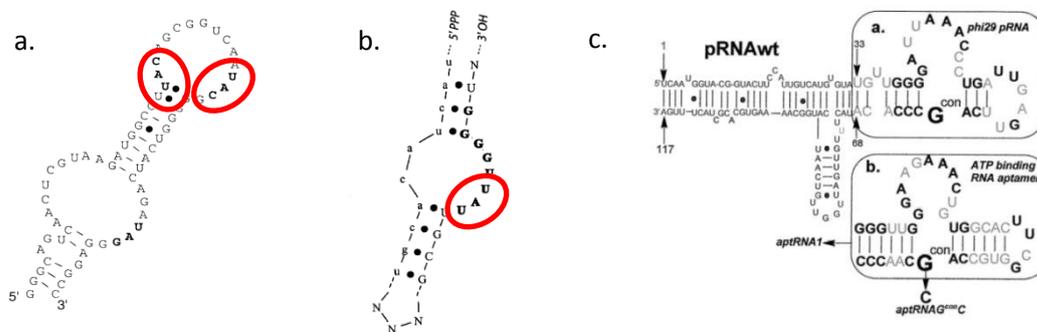


Fig 22 : a. Aptamère d'ARN anti-L-Tyrosine⁷⁶, b. Aptamère d'ARN anti-L-Isoleucine⁷⁵, dans les cercles rouge les codons respectifs
c. Comparaison des séquences d'ARN virales anti-ATP (en haut) et d'un aptamère sélectionné contre l'ATP¹¹³ (en bas)

i. Processus de reconnaissance aptamère-cible

Toutes les interactions décrites ici sont susceptibles de coexister au sein d'un brin : ces interactions se font et se défont, entraînant l'aptamère à perpétuellement passer d'une forme métastable à une autre. En solution, un aptamère est donc une molécule dynamique qui peut coexister dans différentes conformations. La diversité des fonctions chimiques susceptibles d'interagir avec un ligand associé à la diversité des formes tridimensionnelles que peut adopter un aptamère permet de

sélectionner des séquences originales par le SELEX, spécifiques voire énantiosélectives d'un ligand (Fig 23).

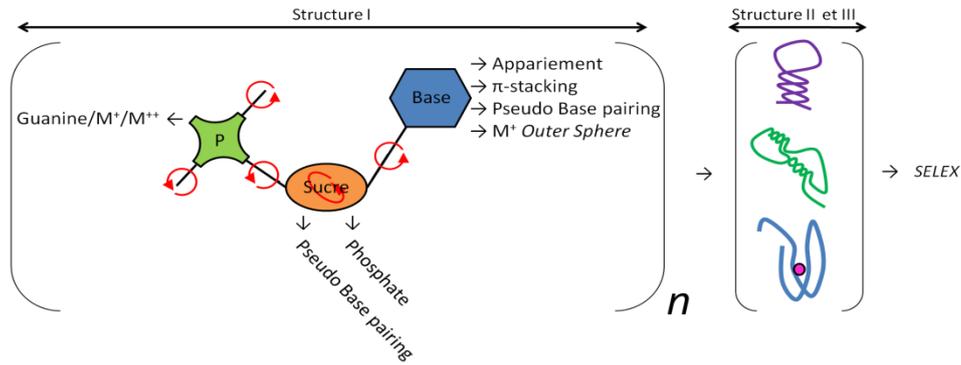


Fig 23 : Schéma récapitulatif des interactions possibles dans un aptamère et entre un aptamère et sa cible.

Beaucoup d'études sur les interactions aptamère-ligand ont été publiées, et un certain nombre d'entre elles s'est également intéressé à la cinétique de reconnaissance. Du fait de la taille de ces molécules et de la complexité du repliement, le temps caractéristique de la réaction bimoléculaire de reconnaissance peut atteindre plusieurs secondes. Deux modèles principaux sont utilisés pour décrire la cinétique du processus de reconnaissance (Fig 24) : le processus d'ajustement induit et la recherche de conformation.

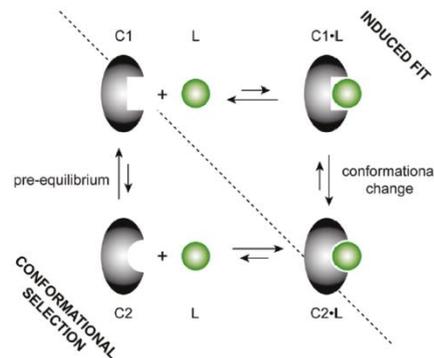


Fig 24 : Deux modèles pour la reconnaissance moléculaire: recherche de conformation et processus d'ajustement induit¹¹⁰.

Dans tous les cas, le processus est divisé en deux étapes élémentaires. Pour le modèle de recherche de conformation, l'étape impliquant une structuration *ad-hoc* de l'aptamère précède la complexation. Dans le cas du processus d'ajustement induit, l'ajustement de la conformation est postérieur à la complexation.

Pour discriminer sélectivement deux énantiomères, la littérature suggère soit de les séparer, soit d'en détecter l'un des deux, ce qui permet la mesure d'e.e. Pour ce faire, les aptamères constituent une classe de récepteurs énantiosélectifs très intéressante du fait de leur bonne affinité, leur excellente énantiosélectivité et de leur faible coût de production. Ils sont en outre aisément fonctionnalisables. L'ensemble de ces avantages confère aux aptamères une très forte potentialité pour leur intégration dans des dispositifs analytiques.

I-4- Méthodes de caractérisation d'une reconnaissance aptamère/cible et détermination d'*e.e*

a. Méthode séparative hétérogène sans marquage : la chromatographie

La chromatographie d'affinité à base d'aptamère utilise une phase stationnaire sur laquelle est greffée de façon covalente un aptamère. Lorsqu'une solution racémique de ligand traverse la colonne, l'énantiomère ayant le plus d'affinité est retenu, tandis que l'autre est élué. La molécule ayant la meilleure affinité est ensuite récupérée en utilisant une phase mobile défavorable à la reconnaissance. Cette approche permet donc potentiellement de déterminer des *e.e*.

L. McGown et son équipe ont été les premiers à utiliser des aptamères afin de séparer des acides aminés (*D*-tryptophane et *D*-tyrosine) et des énantiomères d'acides aminés¹¹⁴. La technique utilisée alors était l'électrochromatographie d'affinité (combinaison de la chromatographie liquide et de l'électrophorèse capillaire).

Généralement, la détermination d'excès énantiomérique par chromatographie liquide utilise des phases stationnaires énantiosélectives et un détecteur comme la spectroscopie UV ou de fluorescence. Des phases stationnaires non-énantiosélectives ont également été utilisées en combinant le dichroïsme circulaire comme détecteur¹¹⁵. En 2012, F. Sanchez et *al.*¹¹⁶ ont proposé de combiner ces deux approches, en utilisant une phase stationnaire énantiosélective (colonne α 1-glycoprotéine (AGP) protéine très stable de la famille des sélecteurs énantiosélectifs) et le dichroïsme circulaire comme détecteur. Grâce à cette combinaison, un excès énantiomérique de 1,5 % a pu être mesuré pour la Trimeprazine (médicament antihistaminique). Cette technique reste limitée par les performances du dichroïsme circulaire, moins bonnes que celle de la spectroscopie de fluorescence ou UV.

b. Méthode séparative homogène avec ou sans marquage : l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative basée sur la migration différentielle des solutés sous l'influence d'un champ électrique, et conduit à une discrimination suivant le rapport taille/charge des molécules. La séparation s'effectue dans des tubes de faible diamètre (25 à 75 μ m), aux bornes desquelles sont appliqués de forts voltages. La détection des molécules séparées utilise le plus souvent la spectroscopie de fluorescence. Un ligand naturellement fluorescent n'aura donc pas besoin d'être marqué. Cette technique présente l'avantage d'utiliser de très faibles volumes d'échantillons (quelques nanolitres).

Le mouvement d'un soluté chargé au travers du capillaire est la somme de deux phénomènes: l'électrophorèse (mouvement des molécules chargées vers l'électrode de polarité inverse) et l'électro-osmose (mouvement d'électrolyte lié à la charge interne du capillaire et du potentiel appliqué). Celui-ci dépend de la puissance du champ, du pH, de l'électrolyte, de la force ionique, de sa viscosité et des caractéristiques de surface du capillaire. Ces différents paramètres permettent d'optimiser la séparation.

La mobilité électrophorétique d'une molécule est proportionnelle à sa charge et inversement proportionnelle aux forces de friction qu'elle subit. Lorsque des molécules ont des charges différentes ou subissent des frictions différentes, elles se séparent durant la migration. Dans le cas de la formation d'un complexe de reconnaissance, les propriétés du ligand libre et lié seront donc différentes. Une fois complexé, le ligand acquiert en plus les propriétés de friction et de charge de son récepteur. Dans ce cas, on parle d'électrophorèse capillaire d'affinité (ACE)¹¹⁷.

Cette méthode est donc pertinente pour l'étude d'interactions entre un aptamère et une petite molécule, attendu qu'un oligonucleotide est un polyanion de grande masse moléculaire. Cette technique a notamment permis le développement d'une méthodologie par compétition pour la détermination de traces d'énantiomère de la D-arginine¹¹⁸. Ainsi, il a été possible de détecter jusqu'à 0.01 % de D-arginine dans un large excès de L-arginine.

c. Méthode de détection homogène avec marquage

i. Polarisation de fluorescence

Parmi les méthodes de transduction permettant d'étudier la reconnaissance entre un aptamère et une cible en conditions homogènes, la polarisation de fluorescence est une technique performante, dans laquelle la fluorescence induite par un fluorophore change en fonction de l'interaction entre une cible et son aptamère.

L'interaction entre un fluorophore et la lumière implique une interaction entre le champ électrique associé à l'onde électromagnétique et le dipôle de transition de la molécule. Si on excite un échantillon avec de la lumière polarisée linéairement, on remarque que la fluorescence est, dans certains cas, également polarisée. Le degré de polarisation de la fluorescence est quantifié par une grandeur appelée anisotropie de fluorescence notée r . Cette mesure indique le degré de liberté d'une molécule fluorescente, vu comme la facilité avec laquelle cette molécule fluorescente tourne sur elle-même. Si, au cours d'une réaction de reconnaissance, la molécule marquée est amenée à changer ses degrés de liberté, alors le changement de polarisation de fluorescence traduira la complexation moléculaire.

Cette technique fut introduite pour la première fois pour les aptamères par J. Cryz-Aguado et G. Penner en 2008³³ en étudiant le complexe formé par l'Ochratoxine A et son aptamère. Dans cette étude, la cible était alors en compétition avec un court brin d'ADN complémentaire de l'aptamère marqué par un fluorophore. Cette stratégie compétitive est inévitable dans les cas où la sonde n'est pas intrinsèquement fluorescente ou lorsque le récepteur ne se reconfigure pas assez pour induire une variation de l'anisotropie.

En 2009, J. Ruta et E. Peyrin rapportait l'utilisation de cette technique, en marquant directement l'aptamère par un fluorophore¹¹⁹. Dans cette approche, l'aptamère anti (L)-Tyrosinamide a été modifié à une extrémité par une fluorescéine. Lors de la reconnaissance, le changement de

conformation de l'aptamère induit une augmentation de l'anisotropie de fluorescence (Fig 25), grâce à laquelle il peut être déduit la constante de dissociation du système qui confirmait celle déjà déterminée par ITC¹²⁰. Cette méthodologie a également été appliquée avec succès pour la (L)-argininamide.

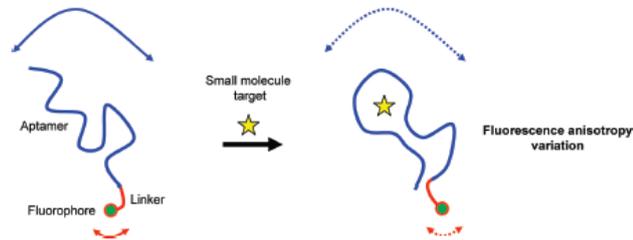


Fig 25 : Représentation schématique de la polarisation de fluorescence non compétitive. Les doubles flèches représentent les mouvements locaux et globaux contribuant à la variation d'anisotropie de fluorescence¹¹⁹.

ii. Dosage par modulation de fluorescence à base d'aptamère

Une autre stratégie, basée sur la fluorescence plutôt que sur la polarisation de fluorescence a également été décrite : les *Aptabeacon*. C'est une technique de dosage homogène qui repose sur la double modification des aptamères à leurs extrémités 5' et 3' par un fluorophore et un inhibiteur de fluorescence^{121,122}. La reconnaissance entre un aptamère et sa cible provoquera une réorganisation de l'aptamère, susceptible d'éloigner ou de rapprocher l'inhibiteur de la source de fluorescence, si bien que la présence de la cible en solution provoque un changement de fluorescence de l'aptamère. Cette stratégie repose sur un changement de conformation, mais dans le cas où la conformation de l'aptamère ne change pas suite à la reconnaissance, un dosage de type compétitif avec un troisième partenaire portant l'inhibiteur peut être utilisé¹²³.

d. Méthode de détection homogène sans marquage

i. Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ITC) mesure directement la chaleur émise lors de l'association entre un ligand et son récepteur. C'est une méthode de choix pour obtenir des informations thermodynamiques précises (ΔH , ΔS , K_d et la stœchiométrie).

Dans une expérience d'ITC, le ligand est titré dans une solution de récepteur sous agitation (ou inversement). L'expérience est réalisée à température constante. Après chaque ajout de ligand, la chaleur libérée ou absorbée au cours de la réaction (*i.e.* la variation d'enthalpie) est déterminée par la puissance calorifique fournie par l'appareil à la cellule de réaction pour maintenir une petite différence de température constante avec une cellule de référence. Il est donc nécessaire d'intégrer cette puissance calorifique pour obtenir la variation d'enthalpie. Quand le récepteur est saturé par le ligand, on ne mesure plus que la chaleur de dilution du ligand.

L'ITC a notamment été utilisée pour déterminer les paramètres thermodynamiques de la reconnaissance entre la L-Tyrosinamide (L-Tym) et son aptamère de 49 nucléotides¹²⁰ (Fig 26).

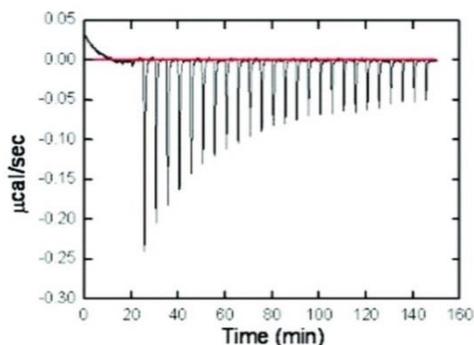


Fig 26 : Profil d'ITC obtenu pour le couple L-Tyrosinamide/Aptamère en tampon Tris base 20 mM¹²⁰, [NaCl]=150 mM, [MgCl₂]=1.5 mM, pH 7.6, à 25°C.

Les pics négatifs obtenus sur la figure 26 correspondent à la chaleur émise lors de la reconnaissance aptamère/cible. Ces pics sont intégrés pour obtenir la quantité de chaleur dégagée à chaque ajout de L-Tyrosinamide en solution. C'est en réalisant des expériences à différentes températures qu'il est possible de déterminer les paramètres thermodynamiques et stœchiométriques de la reconnaissance.

ii. Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire (*DC*) est une propriété physique propre aux molécules chirales. Cette propriété se traduit par l'absorption spécifique de faisceaux lumineux polarisés circulaires droits ou gauches. En conséquence, c'est une propriété exploitable pour l'étude des protéines ou acides nucléiques, faits de monomères chiraux. De plus, la structure secondaire de ces polymères peut faire apparaître des formes en hélices, qui présenteront alors des bandes de dichroïsme circulaire caractéristiques, à des longueurs d'ondes différentes. Cette technique est donc pertinente pour l'étude structurale d'aptamères, comme pour la détermination d'*e.e.*

Dans le cas d'étude sur la structuration de l'aptamère, le rôle des ions et de leur concentration¹²⁴, de la température¹²⁵ ou encore la simple présence du ligand¹²⁶ peuvent modifier le repliement de l'olignucléotide, et ainsi modifier l'intensité ou la position des pics mesurés. Bien que ces informations soient insuffisantes pour modéliser le complexe, c'est une technique idéale pour explorer les conditions optimales de reconnaissance entre un aptamère et une cible. Le plus souvent, cet outil est utilisé en complément d'autres méthodes comme la RMN¹²⁷ ou l'ITC^{120, 128, 129}.

Pour la détermination d'*e.e.*, le dichroïsme circulaire est le plus souvent associé à une chromatographie d'affinité : il sert de détecteur en sortie de colonne, ce qui permet d'identifier les énantiomères.

iii. Résonance Magnétique Nucléaire

Les aptamères sont des molécules extrêmement complexes de par le nombre d'interactions intramoléculaires imposées par la séquence primaire, les ions et d'éventuels ligands. De ce fait, leurs repliements sont difficilement accessibles, si ce n'est par les méthodes de cristallographie ou de RMN. Cette dernière approche a permis de résoudre de nombreuses structures aptamères/cibles, et même d'identifier les bases clés pour la reconnaissance et la structuration du complexe¹³⁰⁻¹³².

La RMN permet également de déterminer des *e.e*. Bien que cette technique ne donne pas accès directement à la configuration absolue d'un centre chiral, elle permet de déduire cette propriété à l'aide d'un agent chiral. En effet, deux énantiomères ont le même spectre RMN. En revanche, ce n'est pas le cas de deux stéréoisomères. Ainsi, en couplant la cible avec un agent chiral, il est possible de remonter à l'*e.e* à partir de la signature RMN du diastéréoisomère correspondant. L'utilisation d'un agent chiral (énantiomériquement pur) interagissant de façon non énantiosélectif permet donc de distinguer deux énantiomères par RMN.

Le premier exemple d'utilisation d'agent chiral en RMN date de 1969 par Harry S. Mosher¹³³, qui donnera son nom à l'acide α -méthoxy- α -trifluorométhylphénylacétique (MTPA, ou acide de Mosher). Cet acide à un carbone assymétrique réagit avec les fonctions alcools ou amines pour former un ester ou une amide. Leur configuration absolue est ensuite déterminée par analyse des spectres RMN. Cette stratégie permet de détecter jusqu'à 1 % d'*e.e*¹³⁴.

Un autre agent de discrimination chirale utilisable en RMN est l'alcool de Pirkle¹³⁵, qui forme des composés diastéréoisomériques de courte durée de vie.

I-5- Biocapteurs à base d'aptamère : l'aptacapteur

Une application analytique prometteuse pour les aptamères est le biocapteur, et parfois appelé aptacapteur. Un aptacapteur est fait d'une interface sur laquelle est immobilisée l'aptamère, et lorsque le ligand est mis en présence de cette surface modifiée, il y a reconnaissance moléculaire (Fig 27). La difficulté est de trouver une façon de détecter la formation du complexe. Pour y parvenir, plusieurs stratégies ont déjà été explorées, avec ou sans marquage.

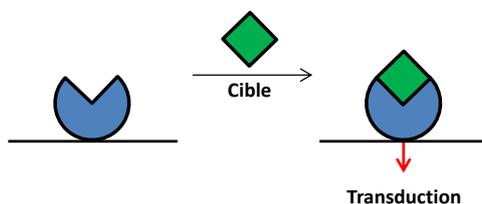
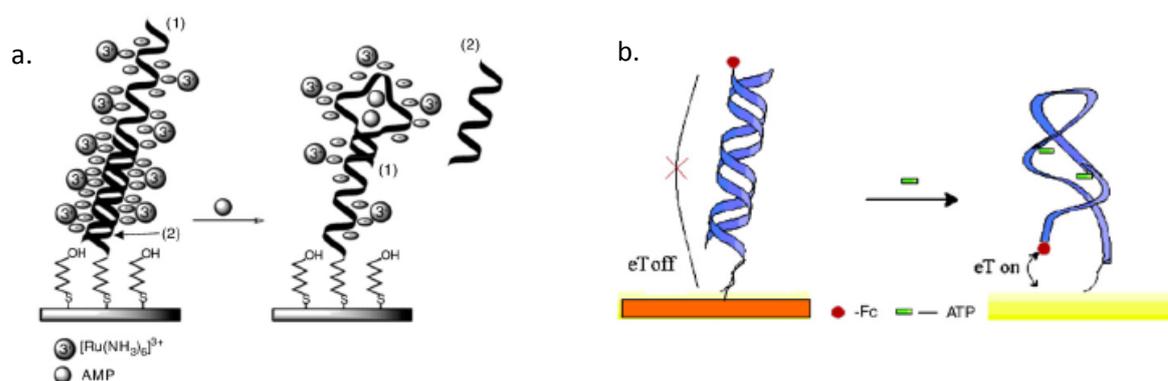


Fig 27 : Représentation schématique du fonctionnement d'un aptacapteur

a. Aptacpteurs avec marquage

i. L'aptacpteur électrochimique

L'électrochimie dispose de nombreux avantages : c'est un moyen de détection simple d'utilisation, sensible, à un coût de fonctionnement peu élevé, facilement transportable et compatible avec des analyses de fluides biologiques. Pour la transduction électrochimique, deux stratégies se distinguent nettement¹³⁶ dans la littérature. La première repose sur l'utilisation de trois partenaires pour la détection. Le plus souvent cette approche utilise le brin complémentaire de l'aptamère, si bien que le ligand est en compétition avec ce brin. Une stratégie intéressante ne nécessitant aucun marquage a été rapportée en 2007¹³⁷, via l'utilisation de $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ associée à la chronocoulométrie. Cette combinaison avait déjà été utilisée par M. Tarlov¹³⁸ pour déterminer la concentration surfacique d'ADN greffé à la surface d'une électrode. Le principe de cet aptacpteur dirigé contre l'adénosine monophosphate (AMP) est schématisé figure 28.a. Dans ce cas, l'aptamère anti-AMP est greffé en surface avec une courte séquence complémentaire, qui permet un écrantage des charges par le ruthénium. La quantité de ruthénium est alors dosée par électrochimie. La reconnaissance moléculaire entre la cible et l'aptamère provoque la dissociation du brin complémentaire et un changement significatif du nombre de ruthéniums en surface. La chronocoulométrie permet alors de faire la différence de quantité de charges en surface avant et après la reconnaissance et de détecter une reconnaissance à 10^{-7} M de cible en solution. Cette approche est toutefois délicate à étendre car en règle générale, l'affinité dépend de la nature et de la quantité d'ions du tampon. Ici, ceux-ci sont en très faible quantité pour garantir que seuls les ions Ru^{2+} sont associés aux aptamères.



Un autre exemple, qui cette fois nécessite un marquage avec une sonde rédox sur l'aptamère, est un capteur à ATP¹³⁹ (Fig 28.b). Dans ce cas, l'aptamère marqué est greffé sur une surface et hybridé avec un brin complémentaire. La structure en double hélice éloigne la fonction redox de l'électrode, empêchant tout échange électronique. Lorsque la cible est en solution, la reconnaissance moléculaire entraîne la dissociation du duplex et l'aptamère adopte alors une conformation tertiaire qui rapproche le centre rédox de la surface et autorise les échanges d'électrons avec l'électrode. On

parle dans ce cas d'un aptacapteur de type « signal on », puisque la présence de la cible augmente le signal électrochimique. Cet aptacapteur permet des détections d'ATP de l'ordre du nM en solution.

La deuxième stratégie pour traduire une reconnaissance moléculaire à la surface d'une électrode repose sur le changement de repliement de l'aptamère qui, en fonction de la présence du ligand, permet à une sonde électrochimique d'échanger des électrons avec l'électrode. K. Plaxco a largement contribué au développement de cette catégorie d'aptacapteur¹⁴⁰⁻¹⁴². La figure 29 représente deux types de capteur à changement de configuration : l'un sert à détecter la cocaïne et est de type « signal on », l'autre sert à détecter la thrombine et est de type « signal off ». Ces aptacapteurs ont des seuils de sensibilité au μM et au nM respectivement. L'aptacapteur à cocaïne est même 200 fois plus sensible que le test de Scott habituellement utilisé.

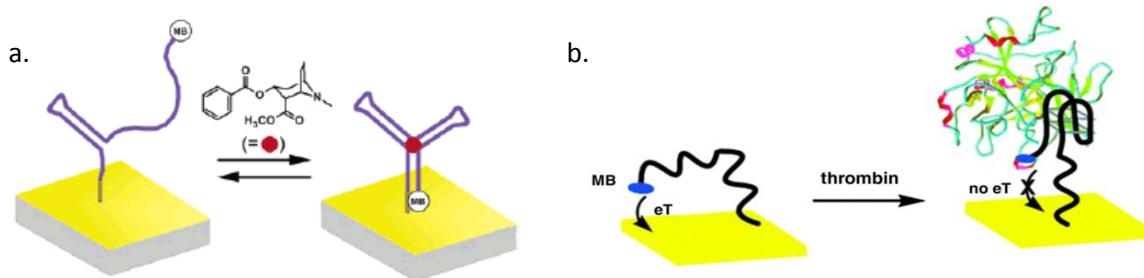


Fig 29 : Représentation schématique des aptacapteurs à a. cocaïne¹⁴⁰ et b. thrombine développés par Plaxco¹⁴¹.

Pour la conception de ses capteurs, K. Plaxco utilise le bleu de méthylène comme marqueur électrochimique, qui présente l'avantage d'être électroactif à des potentiels cathodiques. Cette propriété est très intéressante dans le cadre de tests d'échantillons d'origine biologique riches en protéines et en métabolites organiques susceptibles d'être oxydés à l'électrode. Ainsi, l'aptacapteur à cocaïne¹⁴⁰ est capable de détecter 500 μM de cible dans de la salive ou du sérum de veau fœtal à 50%.

Certains aptacapteurs électrochimiques ont un fort potentiel pour des applications en diagnostics cliniques¹⁴³ notamment pour la détection de thrombine¹⁴⁴, d'IgE¹⁴⁵ et d'interféron γ ¹⁴⁶. Cette méthode de transduction n'est cependant pas la seule : on distingue également l'utilisation de la fluorescence (notamment pour la détection de la thrombine^{147,148}), avec des seuils de détection similaires à l'électrochimie de l'ordre du nM.

ii. L'aptacapteur à fluorescence

Dans ce type d'aptacapteur, l'interaction entre une cible et son aptamère se traduit par une émission de fluorescence. Le premier aptacapteur à fluorescence a été utilisé pour la détection de la *L*-adénosine par immobilisation d'un aptamère ARN biotinylé spécifique de la cible à la surface d'une fibre optique fonctionnalisée par la streptavidine¹⁴⁹. Ce capteur a permis de mesurer les constantes d'interaction entre la *L*-adénosine marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et son

aptamère ($k_a = 2200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_d = 0,01 \text{ s}^{-1}$). Ainsi, le dosage compétitif entre la *L*-adénosine et la *L*-adénosine-FITC permet d'atteindre un seuil de détection de l'ordre du μM .

Un autre « *design* » de capteur fluorescent pour la détection directe de la thrombine utilise la polarisation de fluorescence¹⁵⁰. Dans cette approche, c'est l'aptamère fixé sur une lame de verre qui est marqué par le FITC. L'anisotropie de fluorescence est utilisée pour détecter la fixation du ligand. En effet, de cette reconnaissance résulte une augmentation de la taille de la couche qui conduit à une modification de la vitesse de diffusion rotationnelle et donc de l'anisotropie de fluorescence. Cette essai est rapide (<10 min) et sensible (limite de détection à 5 nM).

b. Aptacapteurs sans marquage

i. Résonance Plasmonique de Surface

La résonance plasmon de surface (*RPS*) est une technique permettant de détecter la liaison d'un ligand sur son récepteur immobilisé à la surface d'une couche métallique, en général de l'or. Le système de détection est basé sur un changement d'indice de réfraction quand le ligand se lie à son récepteur. Le plasmon de surface est une oscillation d'un quantum de densité d'électron très délocalisé à l'interface entre un métal et un diélectrique. La résultante de ces oscillations est une onde électromagnétique évanescence qui se propage à l'interface. La fréquence de cette onde dépend de l'indice optique du diélectrique, c'est-à-dire de la quantité de matière présente à l'interface. En pratique, pour un angle incident et une longueur d'onde définie, l'illumination d'une surface métallique va créer une onde évanescence qui entre en résonance avec l'onde électromagnétique du plasmon de surface. En conséquence, l'absorption de cette énergie photonique réduira l'intensité du rayon lumineux réfléchi. Lorsqu'une espèce biologique vient interagir à l'interface métal-diélectrique, l'énergie nécessaire pour exciter les plasmons de surface change également. Pour une longueur d'onde fixe, l'angle incident change, ou inversement. Enfin, à angle incident et longueur d'onde fixe, l'intensité lumineuse changera. Ces trois principes sont respectivement exploités par les dispositifs Biacore, les spectrophotomètres à réflexion et l'imagerie SPR.

Cette technologie a été utilisée pour le développement d'aptacapteurs pour la détection de la protéine RBP4¹⁵¹ (marqueur du diabète de type 2) et du virus H5N1 (virus de la grippe aviaire)¹⁵².

ii. Microbalance à Quartz

La microbalance à quartz est une autre technique hétérogène ne nécessitant pas de marquage d'un des éléments de reconnaissance. Le principe est basé sur la perturbation des conditions aux limites d'un résonateur : le quartz. Ce matériau possède des propriétés piézoélectriques qui lui permettent de vibrer lorsqu'il est soumis à un champ électrique alternatif, et de générer ainsi une onde acoustique. La fréquence de vibration du quartz dépend de son épaisseur, et le dépôt à la surface d'un quartz d'une couche organique peut être considéré comme une extension du quartz (modèle de Sauerbrey). Toute modification en surface, comme une reconnaissance moléculaire, est donc

susceptible de faire varier l'épaisseur de cette couche organique et donc la fréquence de résonance du quartz. En analysant les variations de fréquence de résonance en fonction de la quantité de cible en présence, il est possible d'établir des courbes de calibrations et donc d'effectuer des dosages. Cette technique a permis le développement d'un aptacapteur pour la détection d'IgE¹⁵³.

I-6- Conclusion

De nombreux efforts sont consacrés à la mise au point de systèmes permettant la détermination d'*e.e.*

L'utilisation des aptamères a fait ses preuves en permettant de mesurer un *e.e.* de 0,01 %¹¹⁸ par électrophorèse capillaire d'affinité. Par ailleurs, de nombreux systèmes de détection hétérogènes à base d'aptamères ont été développés. Cependant, il est notoire que l'affinité des récepteurs subit une forte diminution une fois immobilisé. Au regard des constantes d'affinité des aptamères dirigés vers des molécules de faible poids moléculaire, *i.e.* dans la gamme du μM , il semble donc plus raisonnable de privilégier une approche homogène.

Alors que l'électrochimie dispose d'avantages reconnus, il n'existe qu'un seul exemple de son utilisation en configuration homogène qui présente de surcroît une sensibilité (insuffisante) de l'ordre du pourcent³⁶.

L'objectif de ce travail est donc en premier lieu de combiner les avantages de l'électrochimie à ceux des aptamères pour la réalisation de systèmes de mesure d'*e.e.* en phase homogène.

Chapitre II : Mesure d'excès énantiomérique par électrochimie en utilisant l'énantiosélectivité des aptamères

II-1- le modèle *L-Tym/D-Apta*₄₉

Dans ce chapitre est exposée la mise au point d'un nouveau principe de détection électrochimique d'une reconnaissance chirale en phase homogène d'une cible par son aptamère. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Anal. Chem.* en 2012 intitulée « Simple and Highly Enantioselective Electrochemical Aptamer-Based Binding Assay for Trace Detection of Chiral Compounds »¹⁵⁴.

a. Principe de la méthode

Dans ce travail, la présence d'une cible chirale en solution est détectée par électrochimie. En présence de son aptamère, un équilibre s'établit entre la forme libre et liée de la cible. Du fait de la grande dimension de l'aptamère devant celle de la cible, le complexe ligand/récepteur diffusera moins vite que le ligand seul (Fig 30). Ainsi, les courants mesurés dépendront des quantités de cible libres et liées.

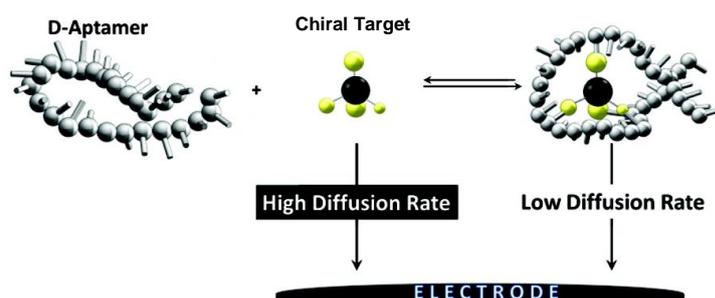


Fig 30 : Principe général de détection homogène d'une reconnaissance Aptamère/Cible par électrochimie

Cette stratégie a l'avantage de reposer sur un principe de détection indépendant d'une reconfiguration de l'aptamère lors de la reconnaissance moléculaire.

b. Choix de la cible

Pour valider ce principe de détection, l'aptamère sélectionné contre la *L-Tyrosinamide* (*L-Tym*, fig 32.a) a été utilisé car ce système a deux avantages. Le premier est une affinité de l'ordre du μM ^{118, 119} qui permet déjà d'envisager une moindre consommation en réactif, et le second est que l'aptamère en série (*D*) présente une très bonne énantiosélectivité¹¹⁸. Les conditions de reconnaissance optimales ont été déterminées en tampon tris 5 mM à pH 7,4, NaCl à 50 mM et MgCl₂ à 10 mM. C'est avec ce tampon que toutes les expériences ont été réalisées. La séquence de 49 nucléotides anti-*L-Tym* sera désignée *D-Apta*₄₉ (5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGA TGTGGTGTGTGAGTGC GG TGCC-3'). Le protocole de titrage des solutions d'aptamère est détaillé dans la partie matériels et méthode (cf. p108).

Tous les voltammogrammes ont été réalisés avec une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹.

c. Dispositif expérimental

Les mesures électrochimiques ont été réalisées à l'aide de cellules électrochimiques miniaturisées à usage unique obtenues par sérigraphie au laboratoire. Ces cellules à trois électrodes réunissent sur une petite surface plane une pseudo-électrode de référence Ag/AgCl, une contre électrode et une électrode de travail de $0,07 \text{ cm}^2$ en carbone (Fig 31). Ces électrodes sont successivement déposées à l'aide d'encre d'argent et de carbone et séchées à 120°C pendant 15 min (cf matériels et méthodes p109). L'encre de carbone est constituée d'un mélange de polymère et de fragments micrométriques de carbone qui réticulent durant le séchage. Au terme de cette fabrication, un espace de travail de $0,2 \text{ cm}^2$ regroupant ces trois électrodes est délimité en utilisant une couche diélectrique hydrophobe.

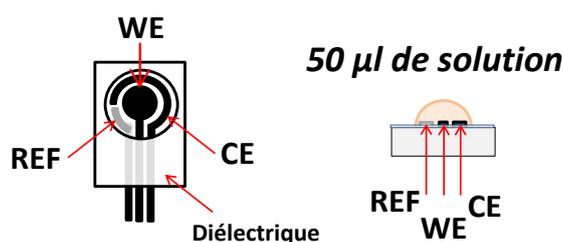


Fig 31 : Dispositif expérimental d'électrodes sérigraphiées : **WE** : Electrode de Travail, $S = 0,07 \text{ cm}^2$, **CE** : Contre Electrode, **REF** : électrode de Référence.

L'utilisation de ces électrodes présente 3 avantages :

- Le matériel est jetable, il n'y a donc pas besoin de régénérer l'électrode de travail par polissage;
- Du fait de l'inclusion de carbone dans une matrice polymère, le courant capacitif mesuré est faible ;
- La taille réduite de ce système à trois électrodes entouré d'une matrice hydrophobe restreint la surface occupée par le solvant ce qui permet de travailler dans des microvolumes ($\sim 50 \mu\text{l}$) et donc d'être peu consommateur en matériel biologique.

d. Détection électrochimique de la L-Tyrosinamide

L'électroactivité de la fonction phénol de la L-Tym (Fig 32.a) a été utilisée dans un premier temps pour le suivi de la reconnaissance.

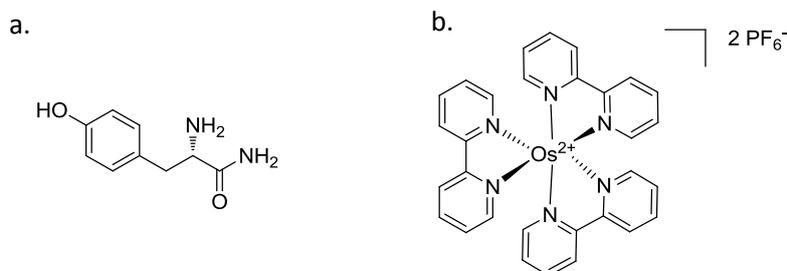


Fig 32 : a. L-Tyrosinamide (L-Tym) ; b. $[\text{Os}^{\text{II}}(\text{bpy})_3]^{2+}$

La figure 33.a présente le comportement électrochimique de la *L*-Tym en solution. L'oxydation du phénol débute vers $E = 0.48 \text{ V vs Ag/AgCl}$ selon un processus d'oxydation irréversible. Cette réaction produit des radicaux cations phénoxyls, qui en milieu aqueux se déprotonnent très rapidement pour donner des espèces extrêmement réactives pouvant dimériser, voire polymériser. Ce processus est généralement à l'origine d'une passivation de l'électrode, caractérisée ici par un décalage anodique du pic d'oxydation de la *L*-Tym et une diminution du courant en fonction du nombre de balayages successifs.

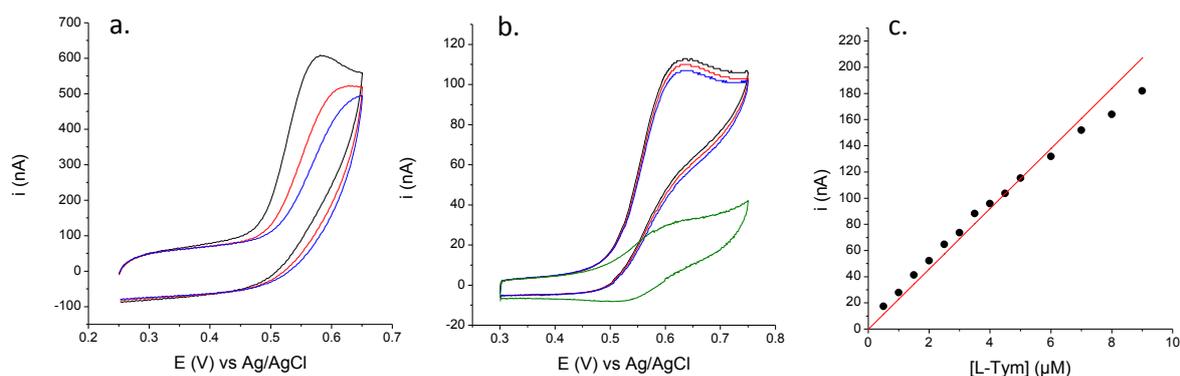
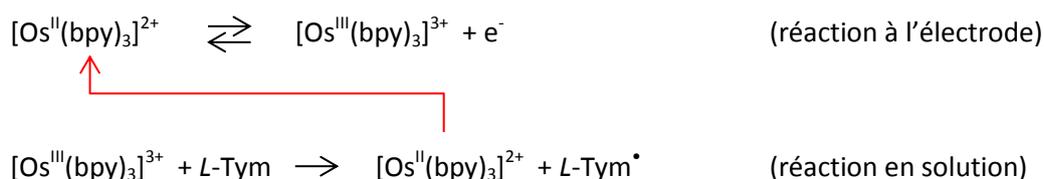


Fig 33 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym à $20 \mu\text{M}$; b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym à $5 \mu\text{M}$ en présence d' $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$; cycle 1 ; cycle 10 ; cycle 20 ; $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ seul. $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante. c. Variation de l'intensité de pic en fonction de la concentration en *L*-Tym

Ce problème de passivation, à l'origine d'une mauvaise reproductibilité des mesures, peut être évité via l'oxydation catalytique du phénol¹⁵⁵ par l'intermédiaire d'un complexe d'osmium (Fig 32.b) jouant alors le rôle de médiateur redox ($[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$, $E^\circ = 0,58 \text{ V vs Ag/AgCl}$), selon le schéma réactionnel suivant :



Comme l'illustre la figure 33.b, un courant de pic catalytique très bien défini peut ainsi être obtenu ($E = 0,62 \text{ V vs Ag/AgCl}$) avec une bonne reproductibilité. Les intensités de pic de catalyse (i_p) sont linéaires en fonction de la concentration en *L*-Tym dans une gamme de $0,5$ à $9 \mu\text{M}$, en présence de $1 \mu\text{M}$ d' $[\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+}$ (fig 33.c). La forme du pic et la linéarité des courants de pic avec la concentration en *L*-Tym sont des éléments indiquant que la catalyse est rapide et que le phénomène est contrôlé par la diffusion de la *L*-Tym vers l'électrode. Il s'agit d'un régime dit de « catalyse totale », exclusivement limité par la vitesse de transport de la molécule catalysée dont l'intensité de pic (i_p^0) peut être décrite par l'équation suivante (Annexe I p129):

$$i_p^0 = 0,609nFSC_T^0 \sqrt{D_T} \sqrt{\frac{Fv}{RT}} = \alpha C_T^0 \quad (1)$$

Avec n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction catalytique, F la constante de Faraday, S la surface de l'électrode (cm^2), D_T le coefficient de diffusion de la L -Tym ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), et C_T^0 la concentration initiale en L -Tym ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

e. Discrimination L -Tym/[L -Tym. D -Apta₄₉] :

Afin de pouvoir observer la complexation de la cible avec l'aptamère, celle-ci doit engendrer une variation spécifique du signal électrochimique dans le régime de catalyse utilisé.

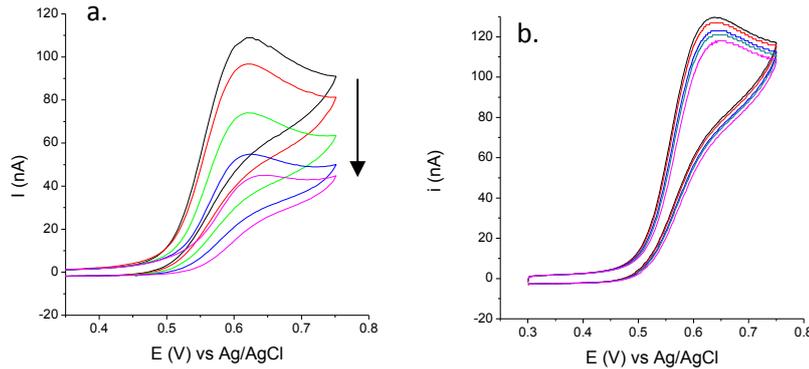


Fig 34 : a. Voltammogrammes d'une solution de L -Tym $5 \mu\text{M}$, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$, $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
 b. Voltammogrammes d'une solution de L -Tym $5 \mu\text{M}$, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à $1 \mu\text{M}$, $[D\text{-Aléa}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
 $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, température ambiante.

Comme présenté sur la figure 34.a, lorsque des quantités croissantes de D -Apta₄₉ sont introduites dans une solution de L -Tym à $5 \mu\text{M}$ (cf matériels et méthodes p110), une diminution de l'intensité de pic de catalyse est observée. Cette chute est spécifique de la séquence d'aptamère utilisée, puisque lorsque l'aptamère est une séquence aléatoire (D -Aléa₄₉) le signal catalytique ne décroît pas.

Les variations de signaux observées (fig 34.a) proviennent d'un abaissement du coefficient de diffusion de la cible lorsqu'elle se lie à l'aptamère. Compte tenu de la taille de l'aptamère devant celle de la L -Tym et de la forme inchangée des pics de catalyse sur toute la gamme de D -Apta₄₉, il est raisonnable de faire l'hypothèse que le régime de catalyse ne change pas lorsque l'aptamère est complexé à la cible. C'est donc la différence de coefficient de diffusion qui est à l'origine de cette chute du signal. Pour de fortes concentrations en aptamère, toutes les L -Tym peuvent être considérées comme liées à l'aptamère et l'équation (1) s'écrit alors :

$$i_p^\infty = 0,609nFSC_T^0 \sqrt{D_{AT}} \sqrt{\frac{Fv}{RT}} = \beta C_T^0 \quad (2)$$

Où i_p^∞ représente l'intensité du pic de catalyse mesuré pour une concentration très grande en aptamère devant celle en L -Tym, et D_{AT} est le coefficient de diffusion du complexe L -Tym/ D -Apta₄₉.

Lorsque le D -Apta₄₉ est introduit dans une solution de L -Tym, il s'établit un équilibre caractérisé par une constante de dissociation K_d . Ainsi, en considérant une stoechiométrie 1:1 :



Lorsque cet équilibre est atteint, le courant mesuré est donc une combinaison linéaire des courants relatifs aux formes libre et liée de la *L*-Tym. D'après (1) et (2):

$$i_p = \alpha C_T + \beta C_{AT} \quad (4)$$

$$\text{Avec } C_T + C_{AT} = C_T^0$$

Où C_T est la concentration en *L*-Tym libre et C_{AT} est la concentration en complexe *L*-Tym/*D*-Apta₄₉. En normalisant par l'intensité du courant de pic de catalyse de départ (i_p^0), c'est-à-dire sans aptamère en solution, on obtient :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = \frac{C_T}{C_T^0} + \frac{\beta C_{AT}}{\alpha C_T^0} \quad (5)$$

En définissant la fraction de *L*-Tym libre en solution:

$$\chi_L = \frac{C_T}{C_T^0} = \frac{C_T^0 - C_{AT}}{C_T^0} \quad (6)$$

L'équation (5) se réécrit de la façon suivante :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = \chi_L + (1 - \chi_L) \frac{i_p^\infty}{i_p^0} \quad (7)$$

L'équation (7) est alors générale pour la description d'une variation de courant due à une modification de vitesse de diffusion d'une sonde électrochimique en solution.

Pour que l'équation (7) soit valide, il faut s'assurer que le temps d'observation expérimental soit plus court que la dynamique de l'équilibre. Dans le cas de la voltammétrie cyclique et dans les conditions expérimentales choisies (*i.e.* $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$), le temps caractéristique est défini par $\tau = \frac{RT}{Fv} = 0,5 \text{ s}$, ce qui représente la période d'observation. Dans la littérature, les cinétiques de dissociation pour des couples cibles/aptamères ont déjà été mesurées¹⁵⁶, et sont de l'ordre de $10^{-2}/10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Ces valeurs signifient que 63 % de la population de complexe s'est dissocié entre 100 et 1000 s. La fenêtre d'observation étant 200 à 2000 fois plus faible, il en est déduit que l'équilibre sondé peut être considéré comme statique pendant la mesure, c'est-à-dire qu'aucune formation ou dissociation du complexe ne s'opère pendant la mesure électrochimique. Ainsi, l'expérience peut être schématisée par la figure 35.a.

Les variations de courant à l'équilibre, après chaque ajout d'aptamère, peuvent être utilisées pour déterminer la constante d'équilibre du processus de reconnaissance. Sur la figure 35.b est

représentée la variation de l'intensité de courant normalisée, en fonction de la concentration en aptamère (points noirs).

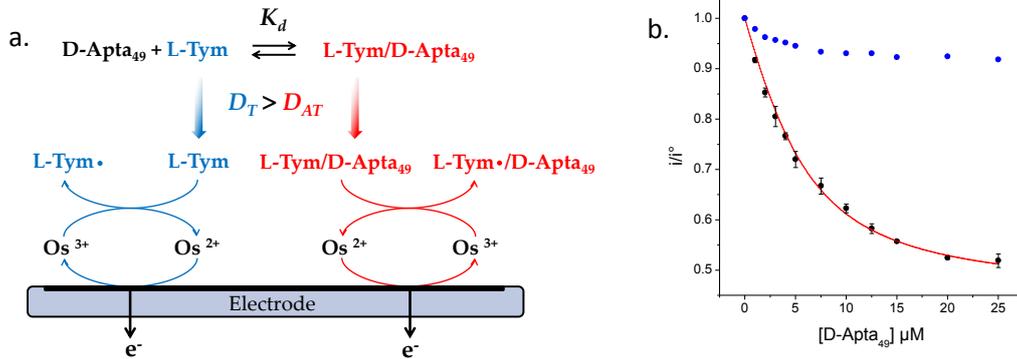


Fig 35 : a. Représentation schématique du processus de détection de la L-Tym en présence de D-Apta₄₉
 b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([aptamère])$ pour des ajouts de D-Apta₄₉ (n = 3) et D-Aléa₄₉

D'après l'équation (3), la constante de dissociation s'exprime de la manière suivante:

$$K_d = \frac{C_T \cdot C_A}{C_{AT}} = \frac{(C_T^0 - x)(C_A^0 - x)}{x} \Leftrightarrow x^2 - x(K_d + C_T^0 + C_A^0) + C_T^0 C_A^0 = 0 \quad (8)$$

$$\Delta = (K_d + C_T^0 + C_A^0)^2 - 4C_T^0 C_A^0$$

Où C_A^0 est la concentration totale en aptamère, et x l'avancement de réaction. Le polynôme (8) présente 2 solutions mais une seule est physiquement acceptable :

$$x = C_{AT} = \frac{K_d + C_T^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2} \quad (9)$$

L'équation (7) se réécrit alors :

$$\frac{i_p}{i_p^\circ} = 1 - \frac{K_d + C_T^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2C_T^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^\circ}\right) \quad (10)$$

Grâce à cette équation, il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats représentés figure 35.b, et d'en extraire le K_d ainsi que i_p^∞ / i_p° . La valeur de $K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ obtenue est en très bon accord avec celles déterminées par d'autres techniques comme la polarisation de fluorescence ($1,7-2,2 \mu\text{M}$)¹¹⁸ et l'ITC ($1,8-3,2 \mu\text{M}$)¹¹⁹.

Du rapport $i_p^\infty / i_p^\circ = 0,45 \pm 0,01$, il est possible d'exprimer le rapport des coefficients de diffusion $D_{AT} / D_T = 0,2$ (équation (1) et (2)). Dans la littérature¹⁵⁷, les coefficients de diffusion d'acides aminés ont été évalués entre 3 et $10 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Une étude sur la diffusion de simples brins d'ADN rapporte que le coefficient de diffusion varie linéairement avec le nombre de nucléotides¹⁵⁸. Sur la base de ces résultats, un aptamère de 49 nucléotides aurait un $D_{49nt} = 0,9 \times 10^{-6} \pm 0,1 \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. D'après ces études, le rapport des coefficients de diffusion de ces espèces doit être entre 0,1 et 0,3, et le

rapport i_p^∞/i_p^0 entre 0,32 et 0,55, à température ambiante. Les résultats présentés ici sont donc en accord avec ces données.

f. Spécificité

Afin d'examiner la spécificité de l'aptamère pour sa cible, les mêmes expériences ont été réalisées avec des analogues structuraux de la *L*-Tym : la *L*-Tyrosine (*L*-Tyr) qui possède une fonction acide à la place de l'amide, le paracétamol, et le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide qui n'est pas chiral mais qui conserve la fonction amide (Fig 36).

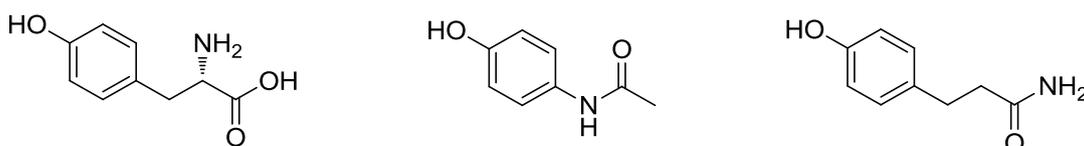


Fig 36 : de gauche à droite : *L*-tyrosine, Paracétamol et 3-(4-hydroxyphényl)propanamide.

Ces trois molécules présentent une fonction phénol pouvant être oxydée catalytiquement par le complexe d'osmium (III). Le même protocole expérimental de détermination du K_d a pu être appliqué (Fig 37).

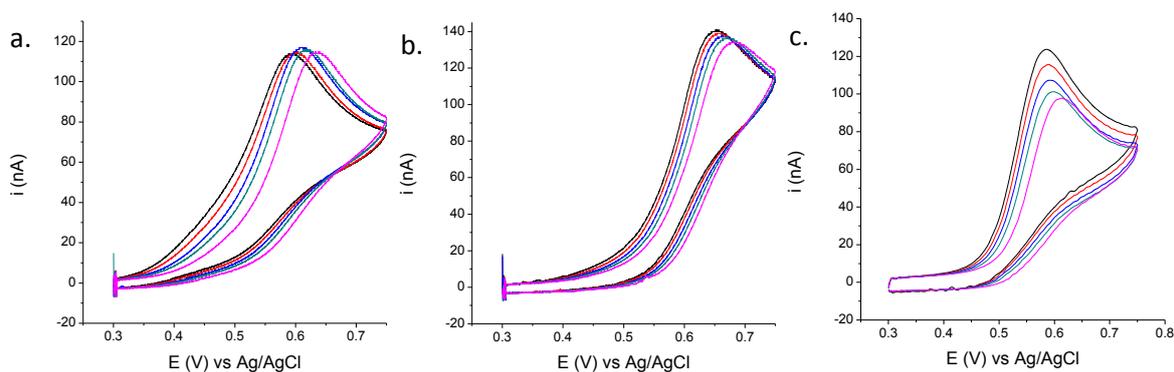


Fig 37 : Voltammogrammes de solutions d'analogues à 5 μ M, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μ M, $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$
a. *L*-Tyrosine, b. Paracétamol, c. 3-(4-hydroxyphényl)propanamide, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

D'après les résultats présentés figure 38.a, on remarque que la légère diminution de courant de catalyse observée pour la *L*-Tyrosine et le paracétamol lors de l'ajout d'aptamère sont du même ordre de grandeur que celles observées pour la *L*-Tym en présence du brin *D*-Aléa₄₉.

Ces légères chutes de courant pourraient être dues à des interactions non spécifiques. Afin de s'en assurer, les mêmes expériences ont été réalisées en présence d'un excès d'ADN de 49 adénosines à 100 μ M (*D*-Poly-A₄₉). Un témoin avec ajout de tampon sans aptamère est également nécessaire, afin de définir la ligne de base de ces expériences (Fig 38.b).

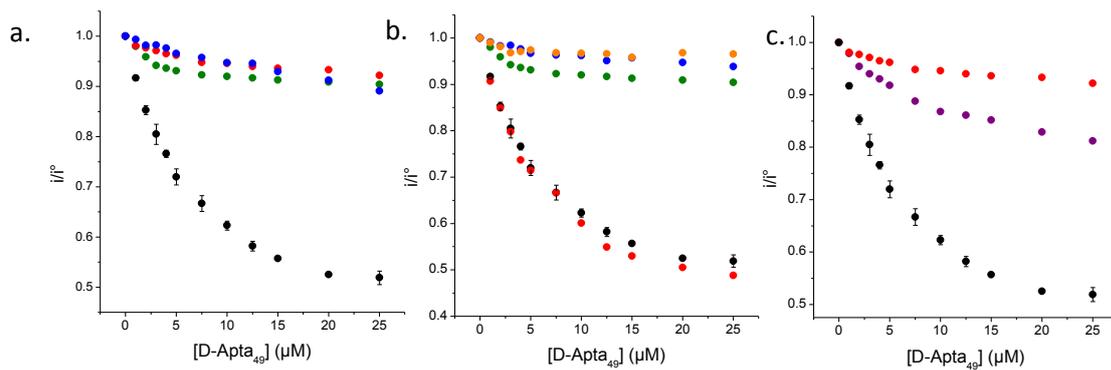


Fig 38 : a. Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), la *L-Tyrosine*, le paracétamol et le brin *D-Aléa₄₉* ;
 b. Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), *L-Tym en présence de 100 μM de D-PolyA₄₉*,
 la *L-Tyrosine*, *L-Tyrosine en présence de 100 μM de L-PolyA*, et la *L-Tym sans ajout d'aptamère*.
 c. Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D-Apta_{49}])$ pour la *L-Tym* ($n = 3$), le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide et le brin *D-Aléa₄₉* ;

D'une part, la présence de 100 μM de *D-Poly-A₄₉* ne modifie pas les variations de courant observées pour la reconnaissance de la *L-Tym* (Fig 38.b), ce qui confirme la spécificité de la séquence de l'aptamère vis-à-vis de cette molécule.

D'autre part, la variation de signal obtenue pour la *L-Tyr* en présence de *D-Poly-A₄₉* suit la variation mesurée pour un simple ajout de tampon (Fig 38.b). D'après les différences entre les résultats en vert et bleu sur la figure 38.b, il y a donc bien des interactions non spécifiques entre les analogues et l'ADN introduit en solution. La *L-Tyrosine* et le Paracétamol ne sont donc pas reconnus par l'aptamère anti-*L-Tym*.

La variation de courant en fonction de la concentration en aptamère obtenue pour le 3-(4-hydroxyphényl)propanamide (Fig 38.c) montre quant à elle une chute de signal atteignant 20 % pour 25 μM d'aptamère. Dans ce cas, il semble donc que la molécule soit reconnue, mais avec une affinité moins grande que pour la *L-Tym*. De ce fait, pour 25 μM d'aptamère, seule une faible proportion de cible a été complexée, si bien qu'il est difficile d'extraire une valeur de K_d sur la base de ces résultats expérimentaux.

L'aptamère anti *L-Tym* ayant été sélectionné à des fins thérapeutiques comme inhibiteur de topoisomérase, il était intéressant de tester le potentiel de reconnaissance de cet aptamère contre une *L-Tyr* contenue dans un peptide. En effet, la sélection de l'aptamère a été faite contre la *L-Tyrosinamide* et non la *L-Tyrosine* afin de mimer une liaison peptidique (R-CO-NH-R'). Un peptide de 7 acides aminés ($NH_2-Tyr-Ala-Gln-Pro-Gln-Pro-Phe-COOH$) avec une tyrosine *N*-terminale a donc été testé. Bien que ce peptide ait une masse molaire de 957 g.mol⁻¹, il reste de plus faible dimension devant l'aptamère (15262 g.mol⁻¹), si bien qu'il devrait rester possible de discriminer la forme libre du peptide de la forme complexée à l'aptamère.

Expérimentalement, ce peptide est très bien détecté en utilisant la catalyse du phénol de la *L-Tyr* (Fig.39). Néanmoins, l'addition d'aptamère ne provoque pas de variation très significative du courant de catalyse.

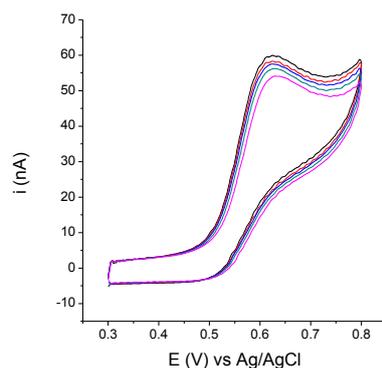


Fig 39 : Voltammogrammes d'une solution de peptide à 5 μM , $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μM , $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Ces résultats montrent la grande spécificité de l'aptamère pour sa cible, et des sites d'interaction peuvent être proposés : l'absence de l'amine et de l'amide faisant perdre l'affinité, ces fonctions interagissent avec l'aptamère par liaisons hydrogène. La perte d'affinité par la substitution de l'amide par la chaîne peptidique pourrait être expliquée par un encombrement stérique empêchant la bonne conformation d'être adoptée.

g. Enantiosélectivité

Dans le but de tester l'énantiosélectivité du *D-Apta*₄₉, des expériences de reconnaissance avec la *D-Tym* ont été réalisées. Sur la Figure 40, l'ajout de *D-apta*₄₉ en solution ne provoque pas de diminution très significative du courant d'oxydation de la *D-Tym*, indiquant que la réactivité croisée du *D-apta*₄₉ vis-à-vis de la *D-Tym* est négligeable.

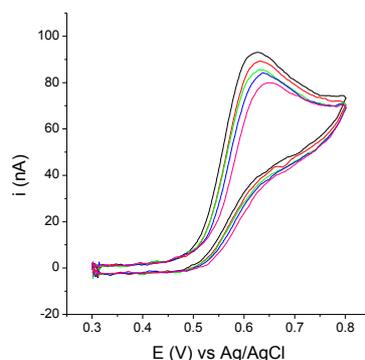


Fig 40 : voltammogrammes d'une solution de *D-Tym* à 5 μM , $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+}$ à 1 μM , $[\text{D-Apta}_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20 \mu\text{M}$, $\nu = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

L'ADN étant également une molécule chirale via le ribose, l'énantiomère du *D-Apta*₄₉, le *L-Apta*₄₉, a été utilisé pour reconnaître la *D-Tym*. Comme indiqué sur la figure 41.a, lorsque la quantité de *L-Apta*₄₉ croît en solution, l'intensité du courant diminue, conformément à la contribution croissante de la forme liée de la *D-Tym* dans la réaction électrocatalytique.

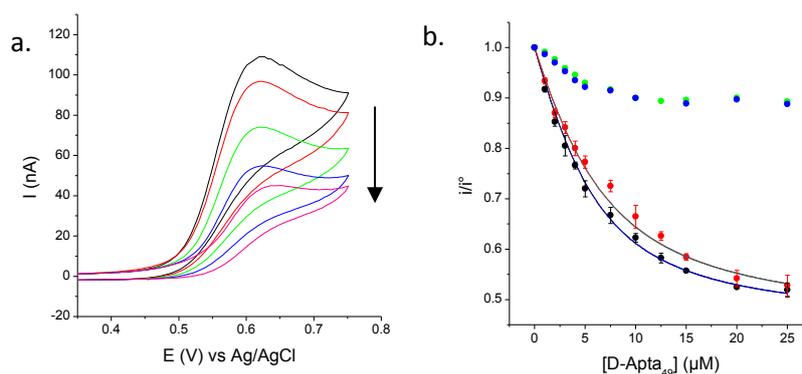


Fig 41 : a. Voltammogrammes d'une solution de *D*-Tym 5 μM, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} à 1 μM, [L-Apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

b. Représentation graphique $i/i^\circ=f([D\text{-apta}_{49}])$ pour le couple *L*-Tyrm/*D*-apta ($n=3$), *D*-Tyrm/*L*-Apta ($n=3$), *L*-Tyrm/*L*-Apta et *D*-Tyrm/*D*-Apta

L'ajustement de ces résultats expérimentaux (Fig 41.b) nous permet d'extraire une valeur de $K_d = 3,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty/i_p^0 = 0,44 \pm 0,01$. Ces valeurs sont très proches de celles déterminées pour le couple image dans un miroir c'est-à-dire la *L*-Tym vis-à-vis du *D*-Apta₄₉ ($K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$, $i_p^\infty/i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$).

Compte tenu de la sensibilité de cette méthodologie électrochimique, de la spécificité et de l'énantiosélectivité de l'aptamère pour *L*-Tym, il est envisageable d'utiliser ce système modèle afin d'étendre cette méthodologie à des cibles non électroactives et, *in fine*, d'évaluer la performance de la technique pour la mesure *d.e.e*. Pour se faire, une méthode de détection électrochimique par compétition a été développée, nécessitant la synthèse d'analogues de la cible modifiée par une sonde électrochimique.

II-2- Compétition

Les stratégies de dosage reposant sur une réaction compétitive en présence d'une molécule marquée ont été largement utilisées en médecine pour le dosage de nombreuses molécules d'intérêt biologique. Ces techniques sont basées sur la détection d'une cible modifiée par un radioélément ou un fluorophore, mais peu d'études décrivent l'utilisation de marqueurs électrochimiques¹⁵⁹. Les techniques compétitives consistent à déplacer une cible marquée de son récepteur par ajout de cible non marquée en solution (Fig 42).

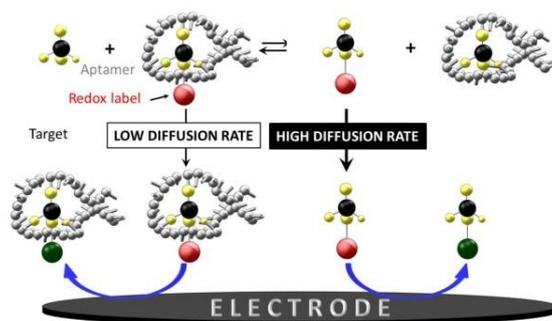


Fig 42 : Principe général d'un dosage compétitif par électrochimie¹⁵⁴.

Le dosage compétitif peut alors être décrit par les deux réactions de complexations bimoléculaires suivantes :



Avec $K_d = (C_T \cdot C_A)/C_{AT}$ (12a)

$K_d^* = (C_{T^*} \cdot C_A)/C_{AT^*}$ (12b)

Où K_d^* représente la constante de dissociation de la cible marquée, C_{T^*} la concentration en cible marquée et C_{AT^*} la concentration en complexe cible marquée/ $D\text{-Apta}_{49}$.

Sur la base de la loi d'action de masse, il est possible de trouver une solution analytique de C_{AT^*} (Annexe II p136), qui dépend des concentrations C_A , C_T et C_{T^*} ainsi que de K_d et K_d^* .

Le dosage compétitif envisagé ici restant basé sur une différence de coefficient de diffusion entre les cibles libres et complexées, il est alors possible d'exprimer le courant normalisé à partir de (7):

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{C_{AT^*}}{C_{T^*}^0} \cdot \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (13)$$

L'équation (13) est générale pour la description d'un dosage compétitif électrochimique basé sur la différence de mobilité entre la sonde libre et complexée à l'aptamère.

a. Marquage de la $L\text{-Tym}$ par des marqueurs redox

Le *design* des cibles modifiées pour un bio-essai compétitif électrochimique a été guidé par des considérations propres à la méthodologie de transduction utilisée :

- 1- le choix de la sonde électrochimique ne doit pas modifier la solubilité de la sonde.
Deux sondes ont été étudiées: le méthylviologène dicationique réductible à potentiel cathodique et un ferrocène neutre, oxydable à des potentiels anodiques;
- 2- l'affinité de l'aptamère pour la cible d'intérêt et la sonde devant être comparable, une approche par screening basée sur une variation systématique de la fonction d'attache et de la longueur du lien entre la sonde rédox et la $L\text{-Tym}$ a été entreprise afin d'optimiser la reconnaissance de la sonde;

3- Le choix du site de fonctionnalisation de la *L*-Tym par le marqueur rédox : trois positions de marquage ont été identifiées (fig 43):



Fig 43 : Sites de marquage de la *L*-Tym par un marqueur rédox

Seules les positions (a) et (b) ont été étudiées, la position (c) étant la moins réactive. Le groupe amine est à priori le site de fonctionnalisation le plus prometteur, puisque le groupe de recherche ayant isolé l'aptamère a immobilisé la *L*-Tym par cette fonction sur une résine de sépharose⁷⁸ pour la procédure *SELEX* (Fig 44).

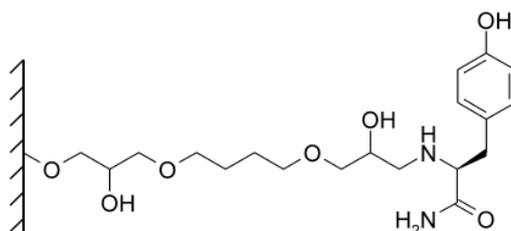


Fig 44 : *L*-Tym greffée sur sépharose⁷⁸

L'amine primaire a donc été transformée en amide via un couplage peptidique ou en amine secondaire via une addition nucléophile. La fonctionnalisation sur le site (a) via la fonction phénol en produisant un dérivé éther a également été étudiée.

L'ensemble des synthèses (annexe III p138) ayant été réalisées par Claire Fave, Bernd Schöllhorn, Julie Moreau et Noémie Laloui, elles ne seront pas détaillées ici¹⁶⁰.

i. Marquage sur l'amine

Deux dérivés ferrocényls de la *L*-Tym ont été synthétisés, l'un avec un lien amine entre l'amine de la *L*-Tym et le ferrocène, l'autre avec un lien amide (fig 45.a et b). Dans les deux cas, la distance séparant la *L*-Tym et la sonde rédox est du même ordre de grandeur, mais la nature du lien (amide vs amine) peut influencer la solubilité et/ou le potentiel standard du ferrocène.

Trois dérivés marqués sur la fonction amine par un méthylviologène dicationique avec des liens de différentes longueurs (1, 5 et 10 carbones) entre la fonction amine et la partie bipyridine ont été synthétisés (fig 45.c). La taille variable de ce lien a été choisie afin de nuancer la gêne stérique et l'influence des deux charges positives du viologène.



Fig 45 : a. *L-Tym* modifiée par un ferrocène via un lien amine : *L-Fc-amine-Tym*
 b. *L-Tym* modifiée par un ferrocène via un lien amide : *L-Fc-amide-Tym*
 c. *L-Tym* modifiée sur l'amine par le méthylviologène, $n = 1, 5, 10$: *L-MV_n-Tym*

Les *L-Tym* modifiées par un groupement ferrocenyl ont d'abord été caractérisées par voltammétrie cyclique (Fig 46.a) : ces deux molécules présentent des vagues monoélectroniques réversibles à 0,15 V vs Ag/AgCl pour le lien amine et 0,37 V vs Ag/AgCl pour le lien amide. Cette différence de potentiel standard apparent est due à l'effet inductif attracteur de l'oxygène de la fonction amide, qui rend l'oxydation plus difficile. Le courant d'oxydation mesuré au-delà de 0,45 V (vs Ag/AgCl) correspond à l'oxydation irréversible du phénol. Ces deux voltammogrammes illustrent le rôle crucial de la fonction d'accroche de la sonde sur son potentiel standard apparent.

Pour les molécules marquées par le méthylviologène, un voltammogramme typique des viologènes est observé, avec deux vagues réversibles (Fig 46.b), correspondant aux réductions successives du dication à $E_1^{0'} = -0,60$ V vs Ag/AgCl et du monocation à $E_2^{0'} = -1,00$ V vs Ag/AgCl. La longueur des chaînes entre le viologène et la *L-Tym* ne changent que faiblement ces valeurs de potentiel.

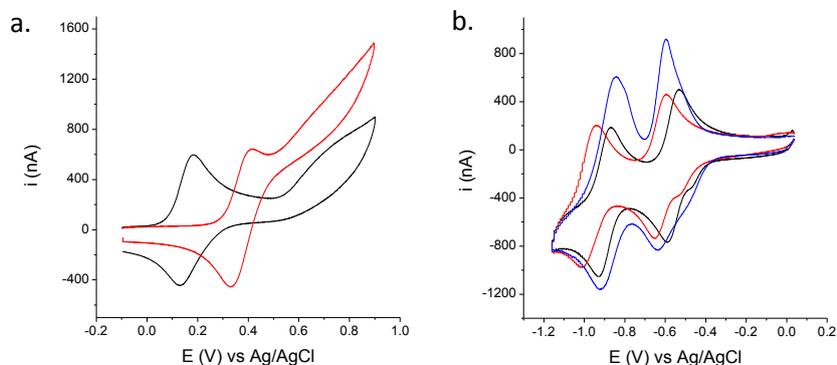


Fig 46 : a. Voltammogrammes de *L-Fc-Amine-Tym* et *L-Fc-amide-Tym* à 50 μM
 b. Voltammogrammes de *L-MV-C₁-Tym*, *L-MV-C₅-Tym* et *L-MV-C₁₀-Tym* à 50 μM
 $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

Afin de mesurer l'affinité du *D-Apta*₄₉ vis-à-vis de ces molécules de synthèse, des tests de reconnaissance reprenant le protocole de détection directe de *L-Tym* ont été réalisés. Cependant, aucune extinction du signal n'a pu être mise en évidence en présence d'aptamère, indiquant une perte de reconnaissance. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats : soit les sondes redox gênent la reconnaissance par effet stérique, soit la conversion d'une amine primaire en amine secondaire ou en fonction amide affecte considérablement la reconnaissance.

La synthèse d'une *L-Tym* modifiée sur l'amine par une chaîne alkyle de quatre carbones a alors été réalisée (Fig 47.a). Cette expérience permet d'évaluer le rôle du bras qui sépare la *L-Tym* de la sonde

électrochimique dans la perte de reconnaissance des traceurs marqués via l'amine, en s'affranchissant de l'encombrement stérique des sondes redox.

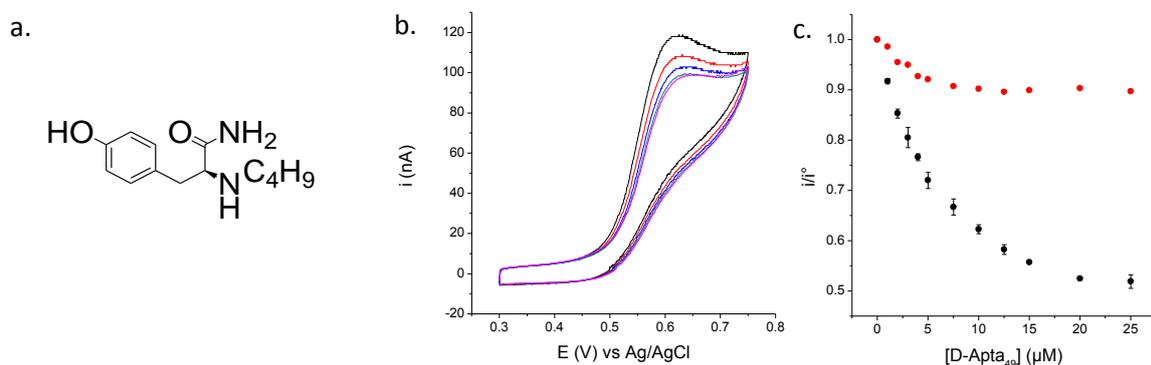


Fig 47 : a. *L*-C₄H₉-amine-Tym

b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-C₄H₉-amine-Tym 5 μM, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} à 1 μM, [D-Apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM, $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

c. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-apta}_{49}])$ pour le couple *L*-Tyrm/*D*-Apta₄₉ ($n = 3$), de *L*-C₄H₉-amine-Tym /*D*-Apta₄₉

Cette molécule n'ayant pas été modifiée sur le phénol, celui-ci reste oxydable par catalyse. Un test de reconnaissance a pu être réalisé dans les mêmes conditions expérimentales que pour la *L*-Tym (*i.e.* 5 μM de cible, [Os^{III/II}(bpy)₃]^{3+/2+} = 1 μM). Cependant, l'oxydation catalytique du phénol ne varie pas de façon significative avec la concentration en aptamère (Fig 47.b et c), signifiant que la stratégie de fonctionnalisation utilisée n'est pas adéquate pour la reconnaissance, suggérant que la fonction amine primaire de la *L*-Tym est indispensable à la reconnaissance par l'aptamère.

ii. Marquage sur le phénol

Les synthèses de *L*-Tym modifiées via la fonction phénol (site (a)) ont été réalisées (Fig 48). Pour cette catégorie de sonde, le pentaméthylferrocène a été envisagé en raison de son potentiel standard distinct ($E^{0'} = 0,15 \text{ V}$) de celui du ferrocène ($E^{0'} = 0,45 \text{ V}$). Cette différence pourrait être d'une grande importance pour des tests de détection multiplexés, où à des potentiels distincts pourraient être détectés des molécules différentes.

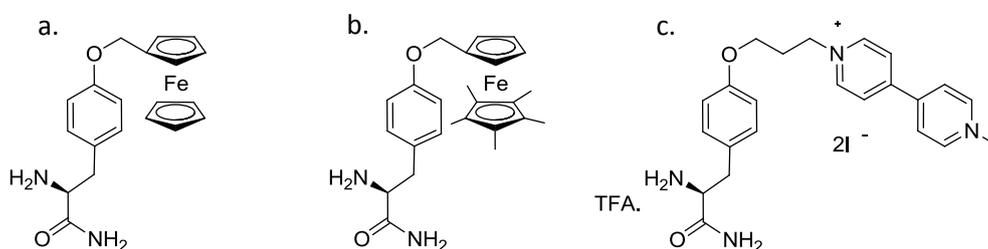


Fig 48 : a. *L*-Tym modifiée via le phénol par un ferrocène : *L*-Tym-Fc

b. *L*-Tym modifiée via le phénol par un pentaméthylferrocène : *L*-Tym-ptFc

c. *L*-Tym modifiée via le phénol par un viologène : *L*-Tym-MV

L'étude électrochimique en solution de ces molécules montre que les sondes redox greffées se comportent classiquement avec des vagues d'oxydation et de réduction bien définies (fig 49).

La molécule de *L*-Tym modifiée par le ferrocène présente un $E^{0'} = 0,18$ V tandis que la *L*-Tym-penta-Fc a un $E^{0'} = 0,05$ V. Ce décalage dans les potentiels standards s'explique par l'effet inductif donneur des groupes méthyls. La *L*-Tym modifiée par le methylviologène présente un $E_1^{0'} = -0,70$ V et $E_2^{0'} = -1,00$ V vs Ag/AgCl.

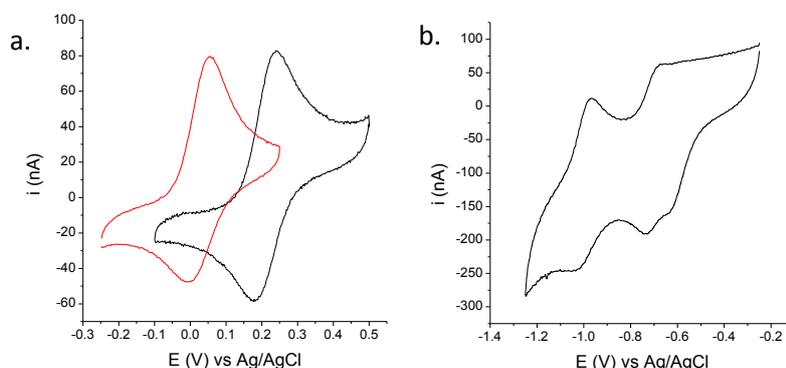


Fig 49 : a. Voltammogrammes de *L*-Fc-Tym, *L*-penta-Fc-Tym à 5 µM, $\nu = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

b. Voltammogrammes de *L*-MV-Tym à 2 µM, $\nu = 100$ mV.s⁻¹, température ambiante.

Pour mesurer l'affinité de ces sondes vis-à-vis de l'aptamère, une solution de *L*-Tym marquée a été étudiée par voltammétrie cyclique en présence de concentrations croissantes en aptamère. Pour la sonde *L*-Tym marquée par le pentaméthylferrocène, aucune baisse d'intensité des pics d'oxydation et de réduction de la sonde redox n'a pu être observée. Cette molécule n'est donc pas reconnue par l'aptamère.

A l'opposé, lorsqu'une solution de 5 µM *L*-Tym marquée au ferrocène (*L*-Tym-Fc) est mise en présence de concentrations croissantes en aptamère, une diminution progressive des pics d'oxydation et de réduction du marqueur ferrocène est observée (Fig 50.a). Cette chute de signal est spécifique de la séquence d'aptamère, puisque pour la même expérience réalisée en présence d'une séquence aléatoire, aucune diminution significative du courant faradique n'est observée (Fig 50.b). Cette molécule est donc bien reconnue par l'aptamère.

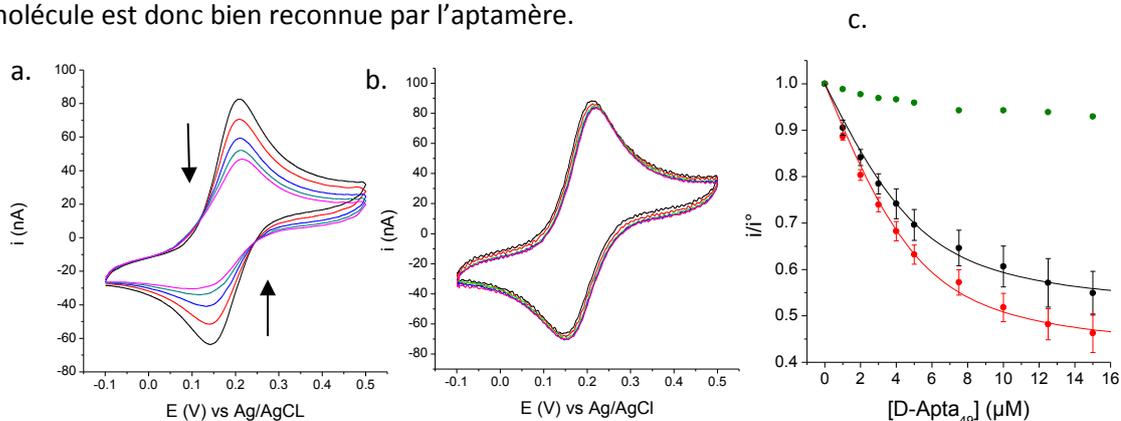


Fig 50 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc 5 µM, $[D-Apta_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20$ µM, $\nu = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc 5 µM, $[L-Aléa_{49}] = 0, 2, 5, 10, 20$ µM, $\nu = 50$ mV.s⁻¹, température ambiante.

c. Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D-Apta_{49}])$ pour le pic d'oxydation ($n = 3$), de réduction ($n = 3$) et dans le cas du *D*-Aléa₄₉.

L'expression du courant de pic est différente de celle présentée dans le cas de l'oxydation catalytique de la fonction phénol, puisqu'il s'agit ici d'une réaction redox monoélectronique réversible (Annexe I p129). Le courant de pic anodique ou cathodique a alors l'expression suivante :

$$i_p = 0,446FSC_{T^*}^0\sqrt{D_{T^*}}\sqrt{\frac{Fv}{RT}} \quad (14)$$

Où $C_{T^*}^0$ et D_{T^*} sont respectivement la concentration et le coefficient de diffusion de la *L*-Tym marquée.

L'équation (7) peut être réétablie sur la base de l'équation (14) et utilisée pour ajuster les résultats expérimentaux (Fig 50.c). Ainsi, des valeurs de $K_d^{ox} = 1,3 \pm 0,3 \mu\text{M}$ avec $(i_p^\infty/i_p^0)_{ox} = 0,50 \pm 0,02$ et $K_d^{red} = 1,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ avec $(i_p^\infty/i_p^0)_{red} = 0,41 \pm 0,02$ ont pu être déterminées en utilisant respectivement les pics d'oxydation et de réduction. Les valeurs i_p^∞/i_p^0 restent comprises entre 0,32 et 0,55. Ces résultats démontrent que la forme oxydée de la *L*-Tym-Fc est plus facilement détectable que la forme réduite, en raison de sa vitesse de diffusion plus grande.

Des expériences similaires ont été menées avec la *L*-Tym modifiée par le méthylviologène *via* le phénol (Fig 48.c). Sur la Fig 51.a, une diminution des pics de réduction et d'oxydation est bien observée lors de l'ajout de *D*-apta₄₉, comparée aux voltammogrammes obtenus avec le *D*-Aléa₄₉ (Fig 51.b). Cette molécule est reconnue par l'aptamère. Néanmoins, la ligne de base étant difficilement répétable d'une expérience à l'autre, le relevé des intensités de pic est délicat et peut conduire à des résultats difficilement quantitatifs.

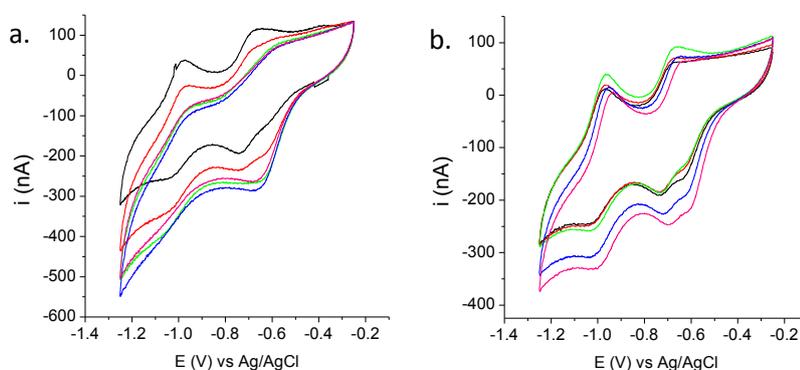


Fig 51 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-MV 2 μM , [*D*-apta₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM , $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.
b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-MV 2 μM , [*D*-Aléa₄₉] = 0, 2, 5, 10, 20 μM , $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.

C'est en utilisant la voltammétrie à vague carrée qu'il a été possible d'estimer une valeur de K_d (Fig 52). Dans cette méthode, la variation de potentiel en fonction du temps consiste en une progression par palier avec deux impulsions carrées de même amplitude, de même durée et de signes opposés. Le courant différentiel est calculé en retranchant les deux courants successifs mesurés à la fin de chaque impulsion. Le principal avantage de cette technique est qu'elle permet de varier le potentiel à des vitesses beaucoup plus élevée qu'en voltammétrie cyclique, et d'améliorer la sensibilité par une augmentation du rapport courant faradique/courant capacitif.

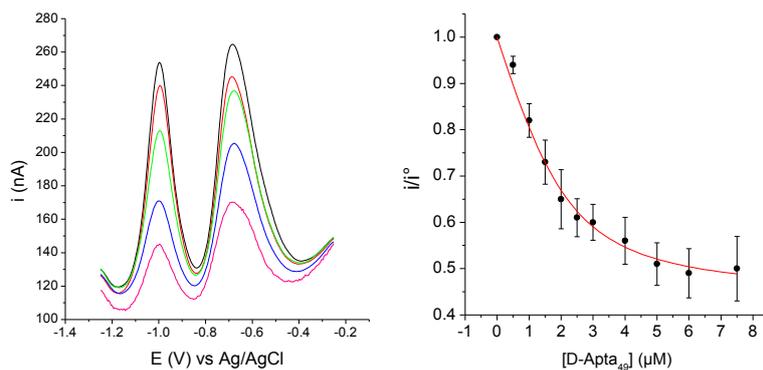


Fig 52 : a. Voltammétrie à vague carrée d'une solution de *L-Tym-MV* 2 μM , $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 1, 2, 4, 7,5 \mu\text{M}$, fréquence = 25 Hz, Amplitude = 20 mV, Marche = 5 mV, température ambiante.
b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-Apta}_{49}])$ pour le pic à $E = -1 \text{ V}$ ($n = 4$).

L'équation (7) peut être utilisée pour extraire par régressions non linéaires les valeurs de K_d et i_p^∞/i_p^0 . Le paramètre $i_p^\infty/i_p^0 = 0,43 \pm 0,03$ est proche de celui déterminé pour la *L-Tym* ($i_p^\infty/i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$), ainsi que pour la *L-Tym-Fc* ($i_p^\infty/i_p^0 = 0,41 \pm 0,02$). Comme pour la sonde marquée par le ferrocène, le $K_d = 0,58 \pm 0,15 \mu\text{M}$ est inférieur à celui de la *L-Tym*.

c. Dosage compétitif en phase homogène

Le développement d'un dosage compétitif électrochimique a été mis au point et validé en utilisant la *L-Tym-Fc*. Pour cela, une solution de sonde à 5 μM est préparée et caractérisée par voltammétrie cyclique. Puis, une quantité connue d'aptamère est ajoutée de telle sorte que les pics d'oxydation et de réduction de la sonde diminuent significativement conformément à la figure 50.c. Des quantités croissantes de cible sont ensuite introduites en solution. L'équilibre thermodynamique *L-Tym-Fc/D-Apta₄₉* est alors déplacé par compétition avec la cible, ce qui donne lieu à une réaugmentation du signal réversible du ferrocène (Fig 53.a).

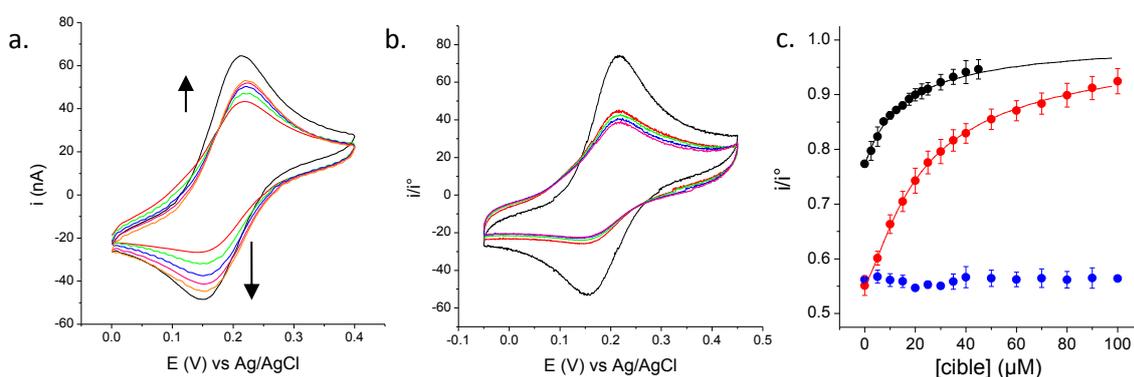


Fig 53 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de *L-Tym-Fc* 5 μM , *L-Tym-Fc* et *D-Apta₄₉*, puis en présence de 10, 25, 50 et 100 μM de *L-Tym*
b. Voltammétrie cyclique d'une solution de *L-Tym-Fc* 5 μM , *L-Tym-Fc* et *D-Apta₄₉*, puis en présence de 10, 50 et 100 μM de *D-Tym*
 $v = 50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, température ambiante.
c. Représentation graphique de la variation d'intensité du pic de réduction en fonction de la concentration en cible introduite, $i/i^\circ = f([\text{cible}])$, pour $[L\text{-Tym-Fc}] = 5 \mu\text{M}$ et $[D\text{-apta}_{49}] = 10 \mu\text{M}$ ($n=2$) ou 3 μM ($n = 2$). Témoin négatif réalisé pour $[D\text{-Tym}]$ ($n = 2$).

Une concentration en aptamère de 3 μM a d'abord été utilisée pour abaisser le signal de départ de 13 % (Fig 53.c, points noirs). L'expérience a ensuite été répétée avec une concentration plus forte en aptamère (10 μM) de manière à démarrer d'un signal encore plus faible (Fig 53.c, points rouges). Cette dernière expérience a également été réalisée en ajoutant de la *D*-Tym (Fig 53.b et c) en tant que témoin négatif.

A l'aide de l'équation (13), et sur la base du K_d et du paramètre i_p^∞/i_p^0 déterminés précédemment pour la *L*-Tym-Fc, il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats expérimentaux représentés figure 53.c et d'en extraire la constante de dissociation de l'aptamère pour sa cible originale (Annexe II p136). Pour les concentrations en aptamères de 3 et 10 μM , des $K_d = 2,8 \pm 0,4 \mu\text{M}$ et $K_d = 2,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$ ont été respectivement déterminés, en bon accord avec les résultats obtenus en détection directe de la *L*-Tym.

D'autres molécules analogues de la *L*-Tym ont également été testées : la *L*-Tym-MV (fig 48.c) et la *L*-Phénylalaninamide (Fig 55), non électroactive. Pour confirmer la spécificité de reconnaissance pour la molécule marquée par la sonde méthylviologène sur le phénol, un témoin a également été réalisé en utilisant la *L*-MVC₅-Tym (Fig 45.c).

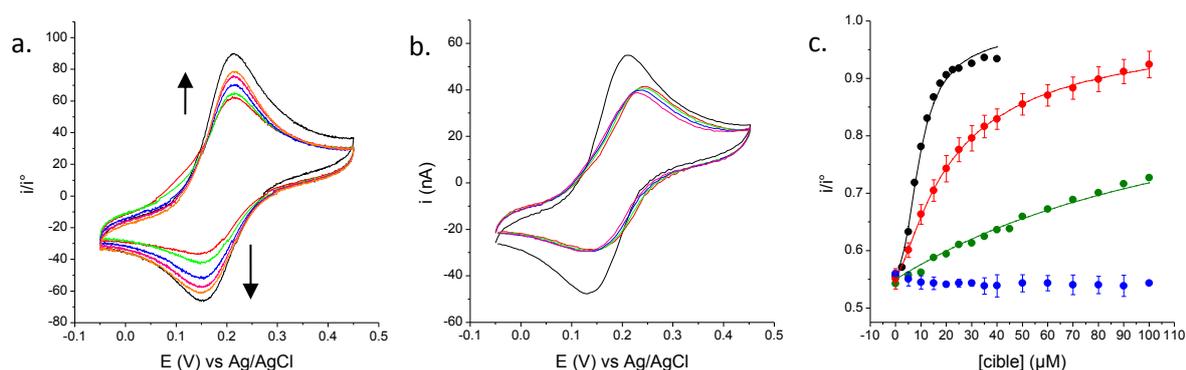


Fig 54 : a. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc à 5 μM , *L*-Tym-Fc/*D*-Apta₄₉, puis en présence de 5, 10, 15 et 40 μM de *L*-Tym-MV
 b. Voltammogrammes d'une solution de *L*-Tym-Fc à 5 μM , *L*-Tym-Fc/*D*-Apta₄₉, puis en présence de 10, 25 et 50 μM de *L*-MVC₅-Tym
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.
 c. Représentation graphique $i/i^0 = f([cible])$, pour [*L*-Tym-Fc] = 5 μM et [*D*-apta₄₉] = 10 μM en présence de *L*-Tym-MV, *L*-Tym (n=2), *L*-Phénylalaninamide et *D*-Tym (n = 2).

L'ajout de *L*-Tym-MV marquée sur le phénol déplace la *L*-Tym-Fc de l'aptamère comme en témoigne la remontée des pics d'oxydation et de réduction de la sonde Fig 54.a. La représentation graphique de cette évolution permet de déterminer un $K_d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$, valeur proche du $K_d = 0,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ déterminé plus directement en voltammétrie à vague carrée. A l'opposé, aucune variation de signal n'est observée suite à l'ajout de *L*-MVC₅-Tym (Fig 54.b), confirmant l'absence de reconnaissance dans le cas d'un marquage via l'amine de la *L*-Tym. Enfin, le test réalisé avec la *L*-Phénylalaninamide permet d'extraire un $K_d = 22 \pm 2 \mu\text{M}$, proche du $K_d = 25 \pm 1 \mu\text{M}$ déterminé par ITC¹²⁰.

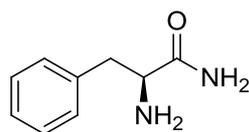


Fig 55 : L-Phénylalaninamide (L-Phen)

La différence d'affinité existante entre la *L*-Tym et la *L*-Phen ($K_d^{Phen} = 6,5. K_d^{Tym}$) souligne le rôle de l'atome d'oxygène dans l'interaction entre l'aptamère et la cible. De plus, puisqu'il n'y a pas de perte de reconnaissance lorsque l'hydrogène de la fonction hydroxyle est substitué, il semble que l'interaction n'engage pas le proton. Toutefois, il est également possible que l'interaction se produise seulement avec le cycle aromatique et que les différences d'affinité reflètent les variations de densité électronique sur le cycle aromatique. Ces hypothèses suggèrent, d'après le concept d'Ogston, que le troisième point de reconnaissance nécessaire à l'énantiosélectivité de l'aptamère pourrait ne pas être la fonction phénol, mais le cycle aromatique de la *L*-Tym par interactions de type π -stacking. Pour explorer cette hypothèse, l'énantiosélectivité vis-à-vis de la *D*-phénylalanine pourra être testée, ou la reconnaissance de la *L*-Alaninamide, qui ne présente pas de phényl, pourra être évaluée. Si cette dernière présente une affinité comparable à celle de la *L*-Phénylalaninamide, nous pourrions conclure que le cycle aromatique n'interagit pas avec l'aptamère.

La synthèse d'analogues électroactifs et les déterminations directes et indirectes de leur affinité pour l'aptamère auront permis de déterminer trois, voire quatre sites d'interactions entre le récepteur et la *L*-Tym : les fonctions amine et amide, l'oxygène du phénol et/ou le cycle aromatique (annexe III p138).

d. Utilisation en milieu biologique

La faisabilité de ces nouvelles méthodologies électrochimiques en milieu biologique a été testée en utilisant du Serum de Veau Fœtal (SVF). Ce milieu est constitué des éléments élémentaires retrouvés naturellement chez l'homme: protéines (créatinine, albumine), enzymes (transaminase, phosphatase alcaline, lactate deshydrogénase...), lipoprotéines, cholestérol, glucose, ions (Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ ...), acide urique, bilirubine... C'est donc un modèle complexe de départ pertinent. Cependant, les protéines contenues dans ce sérum étant également constituées de tyrosine et le complexe d'osmium catalysant l'oxydation de leur fonction phénol, le signal catalytique n'est pas spécifique de l'oxydation de la *L*-Tym. La détection directe n'étant pas possible, la détection par échange compétitif a été utilisée.

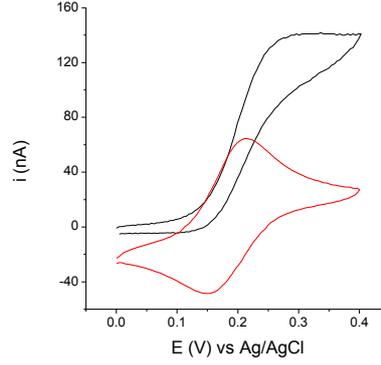


Fig 56 : Voltammogramme d'une solution de **L-Tym-Fc à 5 μ M** et **L-Tym-Fc à 5 μ M en SVF à 20%**.
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Dans les conditions expérimentales utilisées (i.e $[L\text{-Tym-Fc}] = 5 \mu\text{M}$ en SVF 20%), la réversibilité du marqueur ferrocène en voltamétrie cyclique disparaît au profit d'une vague irréversible augmentée, caractéristique de l'oxydation catalytique de molécules présentes dans le SVF par le ferricinium (Fig 56). Le ferrocène étant connu pour catalyser notamment l'oxydation de l'acide urique (AU) et de l'acide ascorbique (AA), constituants du SVF, ce résultat n'est finalement pas surprenant¹⁶¹. Ce régime catalytique stationnaire est exploitable en l'état, puisque le courant de plateau catalytique est directement proportionnel à la concentration en marqueurs redox à travers la relation suivante (Annexe I p129):

$$i_p = nFSC_{T^*} \sqrt{D_{T^*}} \sqrt{k_{T^*} C_{AU/AA}} \quad (15)$$

Où $C_{AU/AA}$ représente la concentration en molécules catalysées (supposées ici comme étant l'acide urique (AU) et l'acide ascorbique (AA)), D_{T^*} et k_{T^*} sont respectivement le coefficient de diffusion de la *L-Tym-Fc* et la constante cinétique d'oxydation catalytique.

Les mêmes hypothèses sur la conservation du régime de catalyse après ajout d'aptamère peuvent aussi être émises ici pour conduire aux expressions suivantes :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{K_d + C_{T^*}^0 + C_A^0 - \sqrt{\Delta}}{2C_{T^*}^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0} \right)$$

$$\text{Avec } i_p^0 = nFSC_{T^*}^0 \sqrt{C_{AU/AA}} \sqrt{D_{T^*} k_{T^*}} \quad (16)$$

$$i_p^\infty = nFSC_{T^*}^0 \sqrt{C_{AU/AA}} \sqrt{D_{AT^*} k_{AT^*}} \quad (17)$$

Où D_{AT^*} et k_{AT^*} sont respectivement le coefficient de diffusion et la constante cinétique d'oxydation catalytique relative au complexe *L-Tym-Fc/D-Apta*₄₉.

L'affinité de la *L-Tym-Fc* pour l'aptamère a été déterminée en SVF 20 % (Fig 57). Sur la Fig 57.a, les courants stationnaires de catalyse diminuent bien avec la quantité croissante d'aptamères ajoutée en solution. Cette chute est bien spécifique de la séquence d'acide nucléique utilisée, par comparaison avec le brin non spécifique *D-Aléa*₄₉ (Fig 57.b).

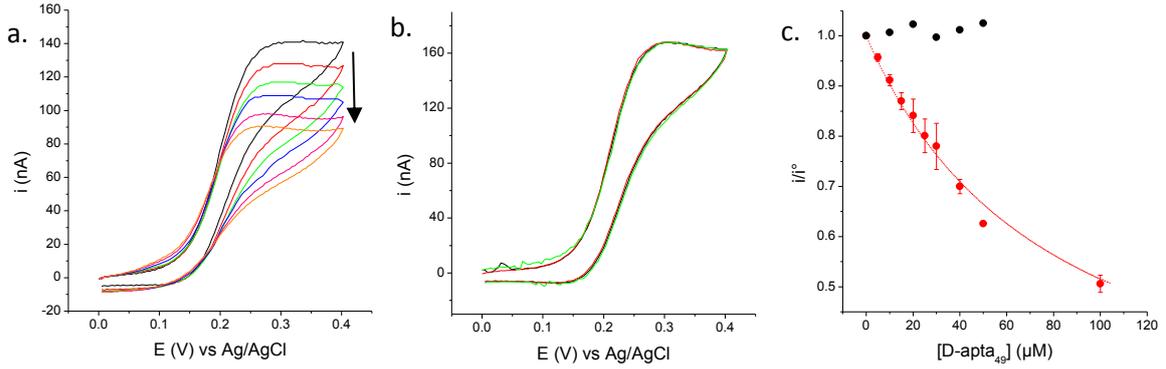


Fig 57 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM en SVF 20%**, $[D-Apta_{49}] = 10, 20, 30, 40, 50 \mu M$
 b. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM en SVF 20%**, $[D-Aléa_{49}] = 20, 50 \mu M$
 $v = 50 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.
 c. Représentation graphique de $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$, pour **L-Tym-Fc/D-Apta₄₉ (n=2)** et **L-Tym-Fc/D-Aléa₄₉**
 Résultats obtenus en milieu SVF 20%.

La représentation graphique $i/i^\circ = f([D-apt_{49}])$ sur la figure 57.c permet d'extraire un $K_d = 75 \pm 3 \mu M$, et une valeur du paramètre $i_p^\infty / i_p^0 = 0,13 \pm 0,02$. Cette valeur étant inférieure à $i_p^\infty / i_p^0 = 0,45$ déterminée sans SVF, il en est déduit une chute de réactivité catalytique de la fonction ferrocène lorsque la L-Tym-Fc est complexée à l'aptamère. En effet, pour un régime catalytique total stationnaire:

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \frac{\sqrt{D_{AT^*} k_{AT^*}}}{\sqrt{D_{T^*} k_{T^*}}} = \sqrt{\frac{k_{AT^*}}{k_{T^*}}} \cdot \left(\frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right)_{Diff} \quad (18)$$

Où $(i_p^\infty / i_p^0)_{Diff}$ représente le rapport des coefficients de diffusion lorsque la catalyse est limitée par la diffusion de la L-Tym sans SVF.

Des expériences de compétition ont ensuite été réalisées. Comme indiqué sur la Fig 58.a, après avoir fait chuter le signal de catalyse par introduction de l'aptamère, une augmentation de courant après l'ajout de L-Tym est observée (Fig 58.b).

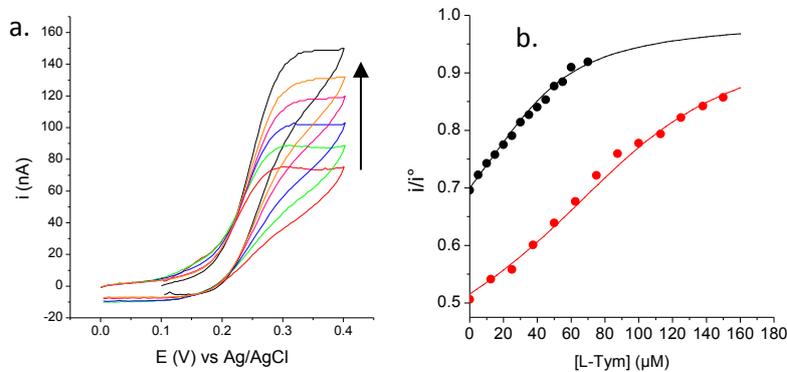


Fig 58 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de **L-Tym-Fc 5μM**, **L-Tym-Fc/D-Apta₄₉**, puis en présence de **25, 50, 100 et 125 μM** de L-Tym
 b. Représentation graphique $i/i^\circ = f([L-Tym])$ pour $[D-Apta_{49}] = 40 \mu M$ et $100 \mu M$
 Résultats obtenus en milieu SVF 20 %.

En utilisant l'équation (13), il est possible de faire un ajustement non linéaire des résultats expérimentaux représentés Fig 58.b.

Des $K_d = 9 \mu\text{M}$ et $K_d = 11 \mu\text{M}$ ont pu être déterminés pour des quantités respectives d'aptamère de 40 et 100 μM .

Compte tenu de la complexité du milieu utilisé dans ces expériences, il est très probable que l'aptamère, la sonde et la cible interagissent non spécifiquement avec les protéines, les lipides... contenus dans le SVF. Les pertes d'affinités mesurées dans ces conditions ne sont donc pas surprenantes.

e. Détermination d'excès énantiomérique

Pour évaluer la performance de détermination d'*e.e* du système, une expérience de détection de *L*-Tym en présence d'un excès de *D*-Tym a été réalisée en utilisant la Fig 53.c, servant de courbe standard de calibration. La *D*-Tym utilisée ayant été synthétisée au laboratoire, une solution concentrée à 5 mM final a d'abord été analysée seule.

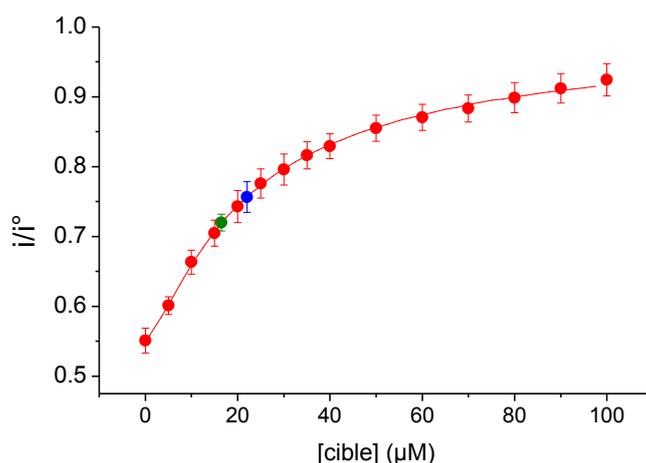


Fig 59 : Détermination de l'excès énantiomérique d'une solution de *D*-Tym à 5 mM et d'une solution de *D*-Tym à 5 mM/*L*-Tym à 5 μM

D'après la gamme étalon (Fig 59), une augmentation correspondant à $16,5 \pm 0,1 \mu\text{M}$ de *L*-Tym a été observée avec la solution de *D*-Tym. Deux interprétations sont possibles : soit la solution de *D*-Tym n'est pas énantiomériquement pure et un *e.e* peut être évalué à 0,33 %, soit il existe une reconnaissance *D*-Tym/*D*-Apta₄₉, exacerbée ici par la forte concentration de *D*-Tym utilisée, et un K_d peut être évaluée dans la gamme du mM. N'ayant pas de techniques séparatives à disposition, il n'a pas été possible d'estimer l'*e.e* de la *D*-Tym. Néanmoins, en ajoutant 5 μM de *L*-Tym à cette même solution de *D*-Tym, une augmentation de courant correspondant à $22 \pm 0,5 \mu\text{M}$ de *L*-Tym est obtenue. Ces résultats sont donc cohérents.

Ce résultat signifie qu'une impureté énantiomérique peut être détectée à 0,1 % dans un temps d'analyse très court (< 5 min). Ce résultat est très compétitif devant les performances atteintes en RMN notamment (*e.e* détectable à 1 %) ¹³⁴.

II-3- Conclusion

La combinaison de l'énantiosélectivité des aptamères et de l'électrochimie a permis de mettre au point une méthode de détection d'*e.e* très sensible, rapide et simple de mise en œuvre selon un principe d'échange compétitif. A terme, le développement de cibles en série (*L*) et (*D*) marquées par des groupes redox de E° différents permettra de réaliser la détection d'*e.e* au cours d'une seule mesure. De plus, les technologies actuelles de multiplexage permettent d'envisager le développement rapide de systèmes pour la détection d'*e.e* d'un grand nombre d'échantillons en parallèle.

Toutefois la sensibilité du système pourrait être améliorée. Deux axes peuvent être explorés : le premier concerne l'optimisation des processus de diffusion (en utilisant des réseaux de microélectrodes par exemple), le second concerne l'affinité de l'aptamère. Celle-ci peut en effet être optimisée, mais pour se faire, il est nécessaire d'acquérir des informations sur les relations entre séquence, structure et affinité de l'aptamère.

Dans cette perspective, les paramètres cinétiques du processus de reconnaissance biomoléculaire doivent être déterminés. C'est l'objet du chapitre suivant qui décrit la mise au point d'une méthodologie électrochimique dédiée à la détermination des constantes de vitesse d'association et de dissociation du complexe aptamère/cible¹⁶².

Chapitre III : Méthodologie de détermination des constantes cinétiques de reconnaissance

III-1- Etat de l'art

L'étude cinétique d'une réaction nécessite de suivre l'évolution d'un signal représentatif de la concentration de l'un des réactifs ou de l'un des produits en fonction du temps. Les méthodes cinétiques sont donc qualifiées essentiellement en fonction de la résolution temporelle qu'elles permettent d'atteindre, c'est-à-dire l'« âge » minimal observable d'une réaction. Parmi ces méthodes, on distingue principalement :

- Les méthodologies en flux basées sur un mélange extrêmement rapide ;
- Les techniques de relaxations basées sur la perturbation d'un système à l'équilibre par une variation brutale de température ou de pression ;
- Les techniques de flash photolyse basées sur l'activation photo induite d'un *pro*-réactif ;
- Les méthodes séparatives d'un état à l'équilibre vers un état hors-équilibre.

Pour les techniques en flux, basées sur un mélange extrêmement rapide des réactifs, la résolution temporelle dépend notamment des facteurs cinétiques suivants :

- Le temps d'injection des réactifs, τ_{inj} ;
- Le temps de mélange des réactifs, τ_{mix} ;
- Le temps mort du dispositif, c'est-à-dire le temps nécessaire aux réactifs pour atteindre le point d'observation τ_{min} ;
- La durée d'acquisition du signal τ_{aq} ;

D'une part, τ_{inj} , τ_{mix} et τ_{min} sont dépendants des techniques employées pour déclencher la réaction. D'autre part, τ_{aq} dépend de la méthode de transduction utilisée. Ces méthodes sont nombreuses, et dans le cas de l'étude des interactions entre un aptamère et une petite molécule, la cinétique du processus est le plus souvent suivie par spectroscopie de fluorescence ou par RMN.

La somme de ces fenêtres de temps est limitante pour l'analyse cinétique d'une réaction. Pour être capable de mesurer avec précision une cinétique de réaction, il est impératif que la constante de temps de la méthode soit inférieure au temps de demi-réaction ($t_{1/2}$), ou d'être capable de déconvoluer le temps de réponse global de l'appareillage du temps de réaction.

a. Technique en flux

Les techniques en flux sont, le plus souvent, couplées à une détection spectroscopique, et sont utilisées pour étudier des réactions sur des durées de quelques dizaines de microseconde à plusieurs centaines de secondes. De faibles volumes de réactifs sont rapidement poussés par des seringues

vers une chambre de mélange, où la réaction s'initie. Puis ce mélange homogène gagne la chambre d'observation. La solution fraîchement mélangée n'est alors âgée que du temps qu'il lui faut pour passer de la chambre de mélange à la chambre d'observation, typiquement quelques millisecondes, c'est le *temps-mort* (τ_{min}) du dispositif (Fig 60).

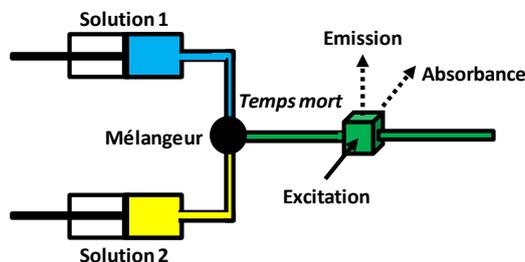


Fig 60 : Schéma générale d'un mélangeur rapide couplé à de la spectroscopie.

Les premiers dispositifs utilisant ces techniques en flux ont été décrits par B. Chance¹⁶³ en 1964. Dans ce cas, le flux de mélange était alors ininterrompu (*Continuous-Flow*) et plus la mesure était effectuée proche du mélangeur, plus l'évènement observé était précoce. Il n'y avait dans ce cas pas d'exigences sur l'échantillonnage de la mesure, permettant l'utilisation de techniques d'analyses comme la spectrométrie Raman^{164,165}, ou la diffusion des rayons X aux petits angles^{166,167}. Les performances du *Continuous flow* ont été améliorées par M. Shastry¹⁶⁸ en 1998 notamment en utilisant une caméra CCD (Coupled Charge Device, où le capteur est constitué de milliers de diodes photosensibles) et un mélangeur capillaire pour atteindre un temps de mélange de 15 μs et un temps mort de 45 μs . Ainsi, la solution est âgée de 60 μs lorsqu'elle arrive au détecteur. Il est alors impossible de mesurer un temps de réaction inférieur à cette limite. Les échantillons peuvent être analysés ici jusqu'à 1 ms après le mélange.

Une alternative, pour consommer moins de matière, est le *Stopped-flow*, où lorsque le flux a gagné la chambre d'observation, il est stoppé à l'aide d'une troisième seringue (*Stopping syringe*), ce qui permet d'explorer une fenêtre de temps réactionnel allant jusqu'à la minute¹⁶⁹. La réaction est alors suivie dans le temps en enregistrant les variations d'un signal optique (généralement d'absorption ou de fluorescence) ou de conductivité.

Les temps de mélange peuvent être réduits à la centaine de microseconde grâce à des mélangeurs turbulents de type *Berger*¹⁷⁰, utilisés notamment par le constructeur OLIS et BioLogic. Ce dernier propose également des dispositifs où $\tau_{\text{inj}} + \tau_{\text{mix}} + \tau_{\text{min}} < 0,6 \text{ ms}$. Ces dispositifs peuvent utiliser des volumes très faibles de l'ordre de la dizaine de microlitres dans la chambre de réaction, mais un minimum d'un millilitre est à prévoir pour remplir les seringues d'injection.

Dans le contexte d'une reconnaissance entre un aptamère et sa cible, cette technique a été utilisée par J. Wachtveitl¹⁷¹ pour étudier la dynamique conformationnelle de l'aptamère anti-tétracycline, ainsi que le confinement de la tétracycline dans l'aptamère. Cette molécule est intrinsèquement fluorescente, et cette propriété est exaltée lorsque la tétracycline interagit avec l'aptamère. Un suivi

de l'augmentation du signal de reconnaissance sera donc suffisant pour déterminer la cinétique de réaction.

Disposant de la structure cristallographique du complexe Aptamère/Cible, ils ont également pu muter précisément quelques bases impliquées dans le site de reconnaissance ou dans le maintien de la structure tertiaire. Ainsi, ils ont montré que deux nucléotides étaient indispensables à une première étape de complexation, et qu'un troisième nucléotide, qui n'interagit pas avec la cible, verrouillait structurellement le complexe (fig 61). Cet exemple illustre les possibilités offertes par la méthode *Stopped-flow* d'accéder aux grandeurs cinétiques du processus de reconnaissance et d'identifier les étapes élémentaires du mécanisme.

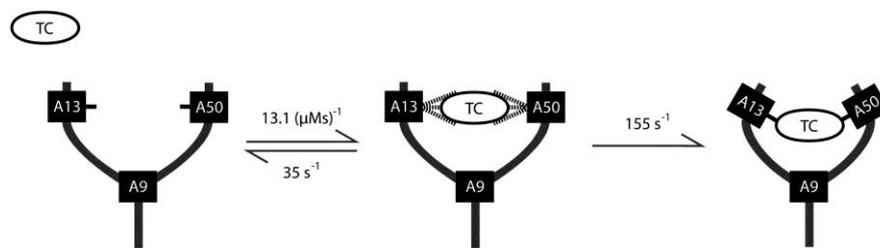


Fig 61 : Représentation schématique du processus de reconnaissance de la tetracycline par son aptamère¹⁷¹.

Dans les cas où aucun changement de fluorescence ou d'absorbance ne peut rendre compte de l'avancement d'une réaction, la technique de *Quenched-flow* constitue une alternative intéressante. Dans cette déclinaison du *Stopped-flow*, la première étape consiste toujours en un mélange rapide des réactifs. Pendant la deuxième étape, le transport du mélange, la réaction s'opère. Dans la dernière étape, la réaction est arrêtée par le mélange avec une troisième solution (le plus souvent un acide, mais également des chélateurs comme l'EDTA pour des réactions qui dépendent de la présence d'un métal). Typiquement, des réactions âgées de 2 à 150 ms peuvent être étudiées grâce à cette méthode. Des solutions plus âgées pourraient être obtenues en allongeant le circuit dans lequel circule la solution ou en diminuant le débit. Néanmoins, ces options contraignent à l'utilisation de plus de réactifs ou à un changement des conditions de mélange. Cette technique permet donc de stopper une réaction à des temps extrêmement courts ce qui peut donner accès à des intermédiaires de réactions¹⁷². Cette technique ne peut être que très difficilement appliquée à l'étude d'une réaction de reconnaissance bimoléculaire impliquant des biomolécules, car l'ajout d'acide ou de chélateur conduira le complexe à se dénaturer.

Lorsque la réaction ne peut pas être figée chimiquement, le *Quenched-freeze* peut être une solution. Dans ce système, la solution est gelée et permet une analyse par RMN ou RPE par exemple.

b. Techniques de relaxation

Dans le cas des réactions trop rapides pour être étudiées avec ces méthodes de mélange, des méthodes dites de perturbation peuvent être utilisées. Dans ces techniques, il est question de perturber un système déjà à l'équilibre en appliquant une variation brutale d'un paramètre influençant l'équilibre, typiquement l'augmentation de la température (*T-jump*) ou de la pression

(*Pressure jump*). La cinétique de retour à l'équilibre ou l'établissement d'un nouvel équilibre est alors suivie.

Dans le cas du *T-jump*, les sauts de température sont obtenus par effet Joule en faisant traverser un courant électrique à travers la solution. Classiquement, les sauts de température sont de l'ordre de 5°C en 1 à 2 μs . Les réactions de demi-vie plus courtes que la microseconde peuvent également être étudiées à l'aide de sauts de température induits par un laser en quelques nanosecondes^{173,174}. L'inconvénient de cette méthode est que la température n'est pas maintenue en solution. Il existe donc une limite supérieure au temps d'étude de la réaction, de l'ordre de la dizaine de secondes. Cette technique permet notamment l'étude cinétique de repliement de protéines¹⁷⁵.

En 1976, R. Clegg et B. Maxfield¹⁷⁶ ont décrit le premier appareil à saut de pression. Cet instrument permettait d'appliquer des variations de pression de 0,01 à 5 atm. La subite variation de pression imposée à un système à l'équilibre altère l'énergie libre de réaction, dans laquelle il y a une différence de volume entre les réactifs et les produits : pour une réaction de type $A + B \rightarrow AB$, si les réactifs $A + B$ ont un volume total V et le complexe AB un volume $V + \Delta V^\circ$, alors la réaction de complexation doit produire un travail $P\Delta V^\circ$ contre la pression extérieure pour se produire.

Bien que les perturbations induites par des sauts de pression soient plus faibles que celles induites par un saut de température, la répétition de la perturbation n'est pas restreinte comme dans le cas du saut de température, où il faut attendre un retour à la température ambiante.

Ce dispositif permet d'étudier des réactions de demi-vie $> 20 \mu\text{s}$, pendant plusieurs minutes. En 2002, D. Pearson¹⁷⁷ rapportent un dispositif de *Pressure-Jump* en microvolume (50 μl) permettant d'appliquer des variations de pression de 200 atm, en 80 μs . Cette méthodologie a été appliquée à l'étude des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand par spectroscopie de fluorescence. Le principe du *Pressure-jump* a également été adapté à de la diffusion des rayons X aux petits angles¹⁷⁸.

c. Technique de flash photolyse

La technique de flash-photolyse a été développée par R.G.W. Norrish et G. Porter^{179,180} au cours des années 1950, ce qui leur a valu le prix Nobel en 1967. Cette technologie était alors limitée aux réactions initiées par un pulse lumineux. L'applicabilité de cette méthode a ensuite été étendue à des méthodes dans lesquelles un réactif est emprisonné dans une cage moléculaire photosensible. A l'application d'un « flash », ces cages sont dégradées et libèrent le réactif dans un délai (temps de flash + temps de libération) de quelques ms à 200 ms. Ces techniques sont principalement utilisées pour l'étude de processus biologiques très rapides. Beaucoup de ligands photosensibles ont été mis au point pour interagir avec des nucléotides comme l'ATP¹⁸¹, des neuro-excitateurs tels que le L-glutamate¹⁸², ou encore pour chélater spécifiquement le calcium¹⁸³. Après photolyse, les réactifs sont relargués en solution et réagissent. Remarquons également qu'il est possible d'induire un changement brutal de pH par photolyse de *o*-nitrobenzaldéhyde¹⁸⁴.

Récemment, S. Pisch¹⁸⁵ rapporte l'utilisation d'une guanine modifiée par un groupe nitrophenylethyl (NPE) photosensible qui permet d'empêcher un ARN de 20 nucléotides de coexister sous deux structures tertiaires différentes. La photolyse de la fonction NPE débloquent la guanine fonctionnalisée, l'ARN peut alors adopter la structure tertiaire inaccessible, et la mesure des paramètres cinétiques gouvernant la conversion d'une structure à l'autre peut alors être effectuée par RMN.

Cette technique de flash photolyse est néanmoins limitée aux systèmes pour lesquels sont développés des cages moléculaires spécifiques ou aux molécules modifiables par une fonction photosensible qui bloque la reconnaissance. Beaucoup de développements sont donc nécessaires pour chaque nouveau système.

d. Electrophorèse capillaire cinétique (KCE)

Dans les méthodes d'électrophorèse capillaire cinétique, deux molécules interagissent entre elles dans un capillaire, pendant qu'elles sont séparées par électrophorèse. Les constantes cinétiques et thermodynamique sont déterminées en analysant les profils de propagation d'une des deux molécules.

Ces méthodes de KCE ont largement été développées par S. Krylov dès 2002, en décrivant la technique de NECEEM¹⁸⁶ (Non-equilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixture) et de Sweeping Capillary Electrophoresis¹⁸⁷ (SweepCE) notamment.

C'est en 2011 que S. Krylov a mis au point le *plug-plug KCE*¹⁸⁸ (ppKCE), représenté figure 62. Dans cette technique des quantités connues de récepteur et de cible sont séquentiellement injectées dans le capillaire à $t = 0$ s, le composant ayant la plus faible mobilité étant injecté en premier. Lorsque le champ électrophorétique est appliqué, la molécule migrant le plus vite va alors traverser la zone du capillaire où se trouve le récepteur : la cible « rattrape » le récepteur. Il se forme alors une certaine quantité de complexe cible/récepteur, qui dépend de la concentration des espèces, de la constante d'affinité et de la cinétique de reconnaissance. Lorsque les molécules de cible libres ont dépassé les récepteurs, le complexe cible/récepteur se trouve hors équilibre et se dissocie sous contrôle cinétique.

Un profil de propagation en fonction du temps est enregistré par un détecteur placé en bout de capillaire, et les valeurs des constantes d'associations et de dissociations peuvent être calculées à partir des intensités de pics et du temps de migration de l'espèce suivie.

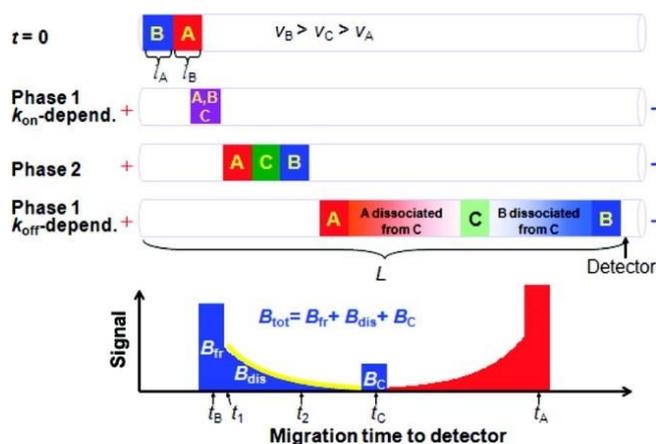


Fig 62 : Description schématique de la technique de plug-plug KCE¹⁸⁸

Cette technique a été utilisée pour étudier l'interaction entre la cocaïne et son aptamère, également capable de reconnaître la quinine¹⁸⁸. La détermination des constantes cinétiques pour des brins mutés de cet aptamère a montré que des mutations sur l'aptamère modifiaient le k_{off} mais pas le k_{on} , ce qui suggère que les énergies d'activation sont les mêmes, mais pas celle de dissociation.

La technique d'électrophorèse capillaire combine mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique. Ce dernier dépend notamment de la concentration et de la nature des ions du tampon utilisé, tout comme la reconnaissance aptamère/cible. Il est donc crucial de trouver le bon équilibre entre conditions optimales de séparation et de réaction.

e. Titration calorimétrique isotherme (KinITC)

En 2012, deux articles se sont proposés d'extraire des informations cinétiques à partir des signaux obtenus par ITC^{189,190}. L'idée est que les informations cinétiques sont comprises dans la forme de chaque pic mesuré.

Ainsi, D. Burnouf et P. Dumas ont décrit le « KinITC¹⁸⁹ », sur la base des travaux de J. Sturtevant¹⁹¹ et en utilisant un dispositif moderne très sensible (limite de détection à 0,1 μ W). D'un point de vue cinétique, cette méthode est limitée par le temps d'injection et le temps de mélange, mais également par le temps de réponse du calorimètre, τ_{ITC} . La mesure de τ_{ITC} a été calibrée, dans ce cas, à l'aide d'un procédé proche du *T-jump*, c'est-à-dire par impulsion électrique dans la cellule de mesure et par injection rapide de méthanol. Ainsi, un τ_{ITC} de 3,5 s a pu être déterminé pour un appareillage moderne, ce qui est 4 à 5 fois plus court que ce qui se fait avec des dispositifs plus anciens¹⁸⁹ (10-15 s). Néanmoins, en utilisant des méthodes standards de traitement du signal, ces facteurs influençant la mesure peuvent être pris en compte dans la procédure de simulation (KinITCdemo, <http://www-ibmc.u-strasbg.fr:8080/webMathematica/kinITCdemo/>).

Ainsi, cette nouvelle méthodologie a permis de déterminer les paramètres cinétiques et thermodynamiques de reconnaissance entre une reverse-transcriptase issue du VIH-1 et un inhibiteur, et entre un riboswitch et son ligand¹⁸⁹.

f. Bilan

Ce panel d'outils disponible pour l'analyse cinétique de réactions chimiques est très varié. Les principales caractéristiques de chaque méthode sont résumées dans le tableau 1.

	($t_{1/2}$) accessible	Avantages	Inconvénients
<i>Continuous Flow</i>	> 60 μ s	Temps mort	Consommation en réactifs; temps d'observation < s
<i>Stopped Flow</i>	> 600 μ s	Fenêtre de temps d'acquisition;	Préparation minimale d'un ml de réactifs
<i>Quenched Flow/Quenched Freeze</i>	> 1 ms	Techniques d'analyses plus nombreuses; Accès aux intermédiaires de réactions	Limite de détection
<i>T-Jump</i>	> 1 μ s	Pas de mélange; Temps mort	Temps d'observation < 1 s
<i>P-Jump</i>	> 80 μ s		"home made"
<i>Flash Photolyse</i>	> 1 ms	Réactifs à l'équilibre; Applicable <i>in vivo</i>	Nécessite une molécule cage
<i>KinITC</i>	> 3 s	Indépendant des propriétés physicochimiques des réactifs	Temps caractéristique de l'appareillage non négligeable
<i>KCE</i>	-	Indépendant de t_{mix} et t_{min}	Contraintes sur la charge des espèce et la force ionique

Tableau 1 : Résumé des performances des méthodologies cinétiques rapides

g. Méthodologie électrochimique

Malgré les avantages analytiques et pratiques que procure l'électrochimie, celle-ci a été rarement combinée à une technique de mélange rapide pour l'étude cinétique d'une réaction chimique. La majorité de ces travaux utilisent une électrode tournante plongée dans une solution de plusieurs millilitres, la rotation de l'électrode de travail permettant à la fois de mélanger rapidement les réactifs et de contrôler l'apport constant de matière à l'électrode.

L'électrode à disque tournante (*EDT*) a déjà été utilisée¹⁹²⁻¹⁹⁴ pour déterminer des grandeurs cinétiques de réaction par électrochimie. Cette approche dispose en effet de 2 avantages.

Premièrement, la rotation de l'électrode permet de travailler en régime stationnaire, la convection forcée fixant la taille de la couche de diffusion selon l'équation :

$$\delta = 1,61D^{\frac{1}{3}}\nu^{\frac{1}{6}}\omega^{-\frac{1}{2}} \quad (19)$$

Où δ est l'épaisseur de la couche de diffusion en cm, D est le coefficient de diffusion ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), ν est la viscosité cinématique du solvant ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) et ω la vitesse de rotation de l'électrode ($\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$).

La figure 63 présente la réponse électrochimique d'une solution de ferrocène méthanol (FcMeOH) avec et sans convection forcée.

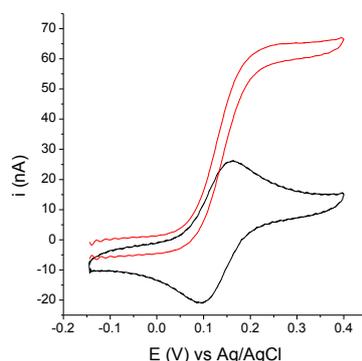


Fig 63 : Voltammogrammes d'une solution de FcMeOH à 5 µM et LiClO₄ = 100 mM, $\omega = 0$ et **2000 rpm**, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Sur cette figure, en absence de convection (en noir), pour $E \gg E^\circ$, le courant diminue du fait de l'augmentation de la taille de la couche de diffusion avec le temps (méthode non stationnaire). En présence de convection forcée (en rouge), le courant est constant pour $E \gg E^\circ$ et dépend de la vitesse de rotation. Pour une réaction électrochimique hétérogène limitée par le transport de matière, le courant s'écrit :

$$i_{stat} = \frac{nFSDC^0}{\delta} = 0.620nFSD^{\frac{2}{3}}\omega^{\frac{1}{2}}\nu^{-\frac{1}{6}}C^0 \quad (20)$$

Avec n le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday, S la surface de l'électrode (cm^2), D le coefficient de diffusion du FcMeOH ($\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$), C^0 la concentration initiale en FcMeOH.

Le deuxième avantage apporté par l'EDT est la possibilité de mélanger rapidement deux réactifs en solution grâce à la convection forcée induite par la rotation de l'électrode. Le temps de mélange t_{mix} d'une molécule injectée est alors contrôlé par les conditions hydrodynamiques du système.

La première étude utilisant ce type de dispositif a été rapportée en 1994¹⁹². Les auteurs ont étudié les paramètres cinétiques de l'oxydation du glucose catalysée par la Glucose Oxydase (GO_{ox}) en solution. La régénération du site actif de l'enzyme (via l' O_2 en solution) conduit à l'accumulation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . C'est la production de ce métabolite qui est suivie par électrochimie sur électrode tournante consécutivement à l'injection de glucose.

Cette technique de suivi d'une cinétique sur électrode tournante suite à l'injection d'une molécule en solution a été plus récemment exploitée pour suivre et caractériser la cinétique hétérogène d'enzymes immobilisées sur la surface même de l'électrode. Bien qu'il soit difficile avec cette méthode de connaître le nombre précis d'enzymes actives et donc de déterminer les constantes cinétiques de l'enzyme immobilisée, les variations relatives de courant au cours du temps permettent d'obtenir des informations sur la réactivité¹⁹³.

D'autres exemples de cinétiques enzymatiques hétérogènes ont également été explorées, notamment avec une peptidase en solution venant réagir à la surface d'une électrode pour hydrolyser un peptide accroché sur la surface et fonctionnalisé par un ferrocène¹⁹⁴. L'électrode tournante est alors employée afin de ne pas être limitée par la cinétique de transport de l'enzyme. Le clivage du peptide entraîne une baisse du signal du marqueur (Fc) en fonction du temps, donnant ainsi accès à la cinétique d'hydrolyse hétérogène.

Une alternative à l'électrode tournante consiste à utiliser un dispositif microfluidique couplé à une détection électrochimique. C'est ainsi que récemment, B. Zheng¹⁹⁵ a décrit un circuit microfluidique dans lequel sont injectées des microgouttes issues du mélange de deux réactifs à l'aide d'une jonction en T (Fig 64). Une fois introduites dans le circuit, ces microgouttes sont homogénéisées grâce à un canal sinueux¹⁹⁶, et des valves pneumatiques permettent de contrôler le temps mis par ces microgouttes pour atteindre le point d'observation situé en aval du microcanal. Ainsi, pour un flux maximal de $100 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, le temps mort du dispositif est de 50 ms. Ce dispositif a permis de confirmer les paramètres cinétiques de la décomposition de H_2O_2 par la catalase bovine.

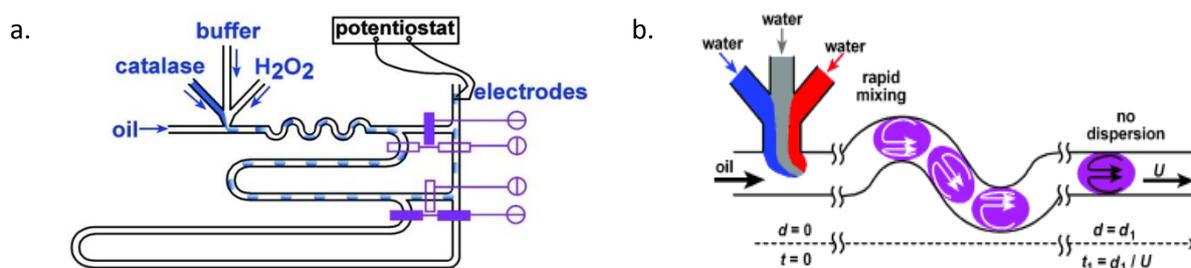


Fig 64 : a. Circuit microfluidique associé à une détection électrochimique¹⁹⁵
 b. Représentation du processus de mélange dans la goutte¹⁹⁶

La production continue de mélanges de réactifs en microgouttes rappelle la technique de flux continu. Mais dans le cas présenté ici, l'échantillonneur (c'est-à-dire l'électrode) ne peut pas être déplacé le long du circuit. L'âge d'une microgoutte est donc strictement déterminé par son temps de voyage. Bien qu'il soit contrôlé par les valves pneumatiques, certains « âges » ne sont pas accessibles, ce qui fait que les courbes cinétiques sont faites avec peu de points expérimentaux. Ce n'est donc pas un système idéal.

Le problème majeur des techniques utilisant l'EDT est qu'elles utilisent de grands volumes de solution, ce qui impose l'utilisation de grandes quantités de réactifs. Toutefois, les temps de mélange atteignables ($< 0,5 \text{ s}^{193}$) en utilisant une électrode tournante sont compatibles avec la majeure partie des cinétiques de réactions impliquant des biomolécules. La possibilité de réduire le volume de réaction est donc très intéressante.

Dans ce sens, W. Heineman^{197,198} a proposé un dispositif d'EDT appliqué sur microvolume ($50 \mu\text{l}$), pour la mise au point d'un immunodosage à base de billes magnétiques. Ces billes magnétiques sont fonctionnalisées par un anticorps anti-ovalbumine servant à concentrer les antigènes sur les billes.

Puis, une reconnaissance moléculaire en "sandwich" de type ELISA (Fig 65.a) est effectuée où l'anticorps secondaire est marqué par une enzyme, la β -galactosidase. Cette enzyme catalyse l'oxydation du 4-aminophényl- β -D-galactopyranoside (PAPG) en 4-aminophénol (PAP), oxydable à une électrode en 4-quinone-imine (PQI). Ces billes sont ensuite récupérées grâce à un aimant, concentrées dans un volume de 50 μ l et placées entre une électrode tournante et une lame de verre recouverte de parafilm. La micro-goutte est alors mise en rotation (Fig 65.b) et reste stable jusqu'à des vitesses de rotation de 3000 rpm.

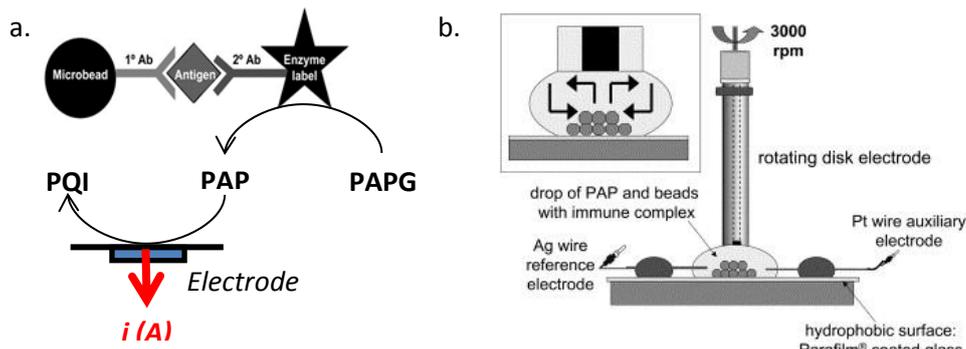


Fig 65 : a. Schéma du dispositif hétérogène de détection de l'antigène utilisé par W. Heinman¹⁹⁸
 b. Schéma du dispositif de EDT sur microvolume d'après W. Heinman¹⁹⁸

Cette étude montre alors que les courants stationnaires mesurés en voltammétrie cyclique pour l'oxydation du PAP en PQI sont dépendants de la racine carrée de la vitesse de rotation de l'électrode de 0,1 μ M à 0,1 mM. Ce résultat indique l'obtention d'un régime hydrodynamique laminaire. Ce travail montre également qu'il est possible, pendant que l'échantillon tourne, d'y injecter grâce à une pipette le substrat de l'enzyme. Lorsque l'électrode tournante est polarisée, le produit de la réaction enzymatique peut alors être détecté, et l'évolution du courant mesuré est représentative de la vitesse initiale de catalyse. La vitesse de catalyse enzymatique est directement liée à la concentration du marqueur enzymatique sur les billes. Ainsi les auteurs ont pu établir une courbe de calibration $V_{max} = f([\text{ovalbumine}])$ avec les mêmes limites de détection ($sub\mu$ M) qu'une méthode basée sur une détection par fluorescence¹⁹⁹.

Une alternative à l'EDT est d'obtenir un régime de convection autrement que par la rotation de l'électrode, c'est-à-dire en faisant tourner la solution. Cette approche a été proposée par M. Gratzl^{200,201} dès 1997. Le système consiste à déposer 20 μ l d'une solution sur un anneau d'or servant directement d'électrode de travail. La goutte est ensuite mise en rotation par l'application d'un jet de gaz tangentiel (Fig 66).

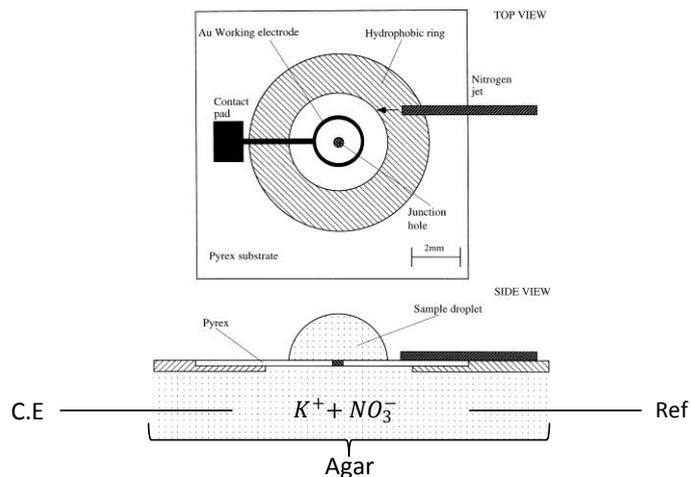


Fig 66 : Schéma du dispositif de EDT sur microvolume d'après M. Gratzl^{200,201}

Ce système permet d'atteindre des tailles de couche de diffusion comparables à celles obtenues avec une EDT. Ces gouttes sont stables grâce aux tensions de surface qui maintiennent la goutte sur son support. Cependant l'injection de gaz conduit à une évaporation accélérée de l'échantillon (5% du volume par minute), phénomène à prendre en compte dans les analyses. La méthode a été appliquée à la détection de métaux lourds par redissolution anodique²⁰⁰ mais jamais utilisée pour des études cinétiques.

Il serait donc intéressant de développer une méthode électrochimique combinant les avantages des approches d'Heineman et de Gratzl, c'est-à-dire en utilisant un système d'agitation mécanique (évaporation minimisée) autre que la rotation de l'électrode elle-même (amélioration du rapport signal sur bruit) et bien sûr la possibilité de travailler en microvolume.

III-2- Electrochimie stationnaire en microvolume

a. Présentation

Le dispositif que nous proposons est illustré figure 67. Un échantillon de 50 μl est pris en sandwich entre un ambout tournant et une mini-cellule électrochimique sérigraphiée, formée d'un montage à trois électrodes délimitées par une couche de diélectrique hydrophobe.

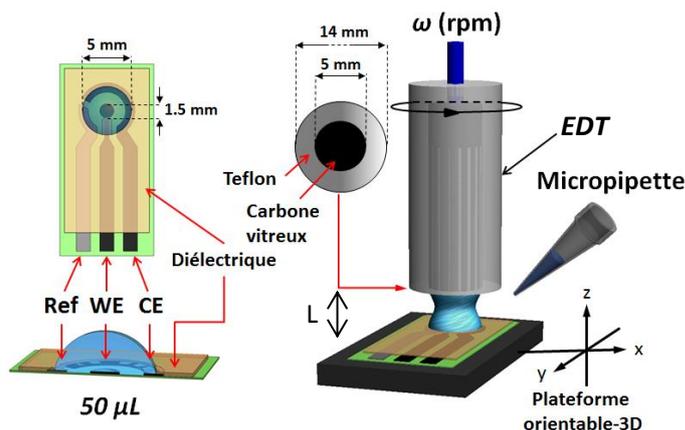


Fig 67 : Dispositif expérimental proposé.

Bien que l'embout tournant soit constitué d'une électrode de carbone vitreux scellée dans un manchon cylindrique en Teflon (hydrophobe), celui-ci n'est pas utilisé comme électrode de travail et ne sert qu'à agiter la solution via sa rotation. L'étalement de la goutte est limité par la couche de diélectrique hydrophobe sur la cellule électrochimique sérigraphiée et pas le Teflon entourant l'électrode de carbone vitreux, ce qui permet le maintien de la goutte de 50 µL en condition de rotation jusqu'à 3500 rpm.

Pour déterminer les performances de la technique de microgoutte tournante, un certain nombre de tests préliminaires ont été effectués.

b. Influence de la taille de l'électrode de travail

Dans un premier temps, ce dispositif a été caractérisé en étudiant 50 µL d'une solution à 50 µM de ferrocène-méthanol (*FcMeOH*). D'après la figure 68, un régime stationnaire est obtenu lorsque l'ambout est mis en rotation, générant ainsi en voltammétrie cyclique une vague sigmoïdale d'oxydation bien définie et reproductible, y compris pour des vitesses de rotation élevées.

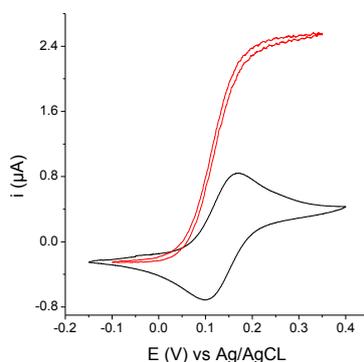


Fig 68 : Voltammogrammes d'une solution de *FcMeOH* à 50 µM et $\text{LiClO}_4 = 100 \text{ mM}$, $\omega = 0$ et **2000 rpm**, $v = 100 \text{ mV.s}^{-1}$, température ambiante.

Cependant, un décalage de la sigmoïde en fonction du nombre de cycles successifs est observé en voltammétrie cyclique, comme en témoigne la figure 69, où sont reportés le premier et le vingtième cycle.

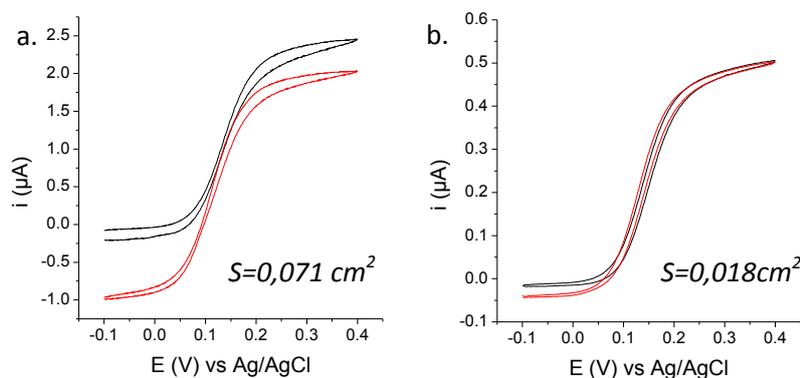


Fig 69 : Voltammogrammes d'une solution de FcMeOH à 50 μM et $\text{LiClO}_4 = 100 \text{ mM}$, $\omega = 2500 \text{ rpm}$, $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ cycle 1 et 20 dans le cas d'une électrode de travail de (a.) $0,071 \text{ cm}^2$ et (b.) $0,018 \text{ cm}^2$, température ambiante.

Ces premiers essais ont été réalisés en utilisant les mêmes électrodes sérigraphiées que dans le chapitre précédent, où la surface de l'électrode de travail est de $0,071 \text{ cm}^2$, donc relativement grande par rapport au volume de la goutte. L'oxydation du FcMeOH conduit à la formation de fericinium FcMeOH^+ , lequel diffuse ensuite en solution compte tenu des conditions hydrodynamiques forcées.

En travaillant dans un volume de $V = 50 \mu\text{l}$ avec une grande surface d'électrode, donc un grand rapport surface/volume, une quantité non négligeable de molécule FcMeOH est oxydée en FcMeOH^+ ce qui amène l'accumulation de ce dernier dans la goutte au cours des balayages répétés. Comme la contre électrode n'est pas isolée dans un compartiment indépendant, le FcMeOH^+ peut être régénéré par réduction à la contre électrode. Cette régénération n'est cependant pas aussi efficace que la production, ce qui induit une accumulation progressive de FcMeOH^+ . C'est la raison pour laquelle après plusieurs balayages, la sigmoïde se décale vers des courants cathodiques (Fig 69.a).

Un moyen de limiter le phénomène est de diminuer le ratio surface/volume. En réduisant la taille de l'électrode de travail par un facteur quatre ($S = 0,018 \text{ cm}^2$) le phénomène devient négligeable, puisque les voltammogrammes successifs sont quasiment superposables (Fig 69.b).

c. Caractérisation du régime hydrodynamique

Les caractéristiques du régime hydrodynamique ont été étudiées par voltammétrie cyclique avec une solution de FcMeOH à $50 \mu\text{M}$ (LiClO_4 à $0,1 \text{ M}$) soumise à différentes vitesses de rotation (Fig 70.a), dans trois configurations différentes :

- Une cellule électrochimique standard ($V = 5 \text{ ml}$) avec une EDT classique plongeant dans 5 ml de solution;
- Une mini-cellule électrochimique sérigraphiée avec une goutte tournante de $50 \mu\text{l}$ (montage de la figure 67);

- Une électrode de carbone vitreux mise en contact d'une goutte de 50 μl (même montage que la figure 67, mais l'embout tournant est de nouveau utilisé comme électrode de travail).

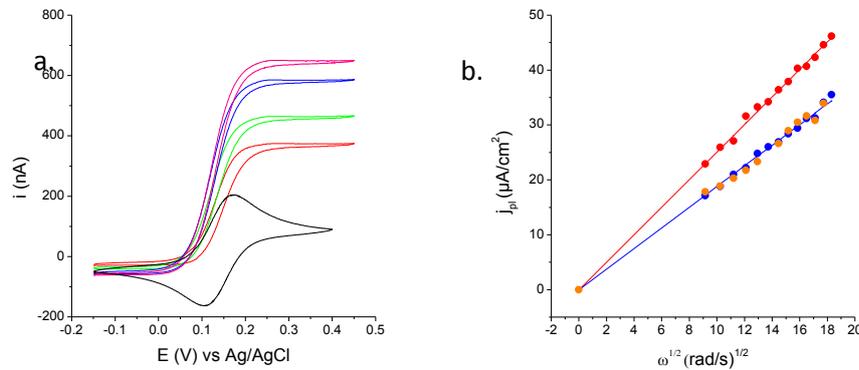


Fig 70 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM pour une électrode sérigraphiée à la base d'une goutte tournante de 50 μl , ω = 0, 1000, 1600, 2400 et 2800 rpm, température ambiante ;
 b. Représentation graphique des densités de courant de plateau en fonction de la racine carrée de la vitesse de rotation pour une EDT dans 5 ml de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM, une EDT au sommet d'une goutte de 50 μl , et une électrode sérigraphiée à la base d'une goutte tournante de 50 μl : pour V = 5 ml, pente = $8,1 \times 10^{-7} \text{ A}/\text{cm}^2/\text{rpm}^{1/2}$; r^2 = 0,9926; microvolume: pente = $6,1 \times 10^{-7} \text{ A}/\text{cm}^2/\text{rpm}^{1/2}$; r^2 = 0,9903.

Quelle que soit la configuration utilisée et pour des vitesses de rotation comprises entre 1000 et 2800 rpm, des voltammogrammes sigmoïdaux typiques de conditions hydrodynamiques sont obtenus (Fig 70.a). Les densités de courant (j_p) varient linéairement avec la racine carrée de la vitesse de rotation (Fig 70.b), ce qui est caractéristique d'un régime hydrodynamique laminaire. Néanmoins, la pente des droites associées aux résultats obtenus dans 50 μl est systématiquement inférieure de 25 % à celle obtenue avec un système d'EDT conventionnel dans un grand volume de solution. Le rapport de ces pentes indique que le régime hydrodynamique en microvolume correspond à 75 % de celui obtenu avec une EDT conventionnelle.

Avec l'EDT en microvolume, les densités de courant 25 % plus faibles signifient que l'épaisseur de la couche de diffusion δ est 33 % plus importante. En l'absence d'un modèle théorique permettant de rationaliser cette variation, l'équation (19) a été modifiée empiriquement par un facteur correctif :

$$\delta_{corr} = 2,15 D_{FCOH}^{\frac{1}{3}} \nu^{\frac{1}{6}} \omega^{-\frac{1}{2}} \quad (21)$$

Ainsi, à partir des conditions expérimentales (*i.e* ω = 2500 rpm, $[\text{FcMeOH}]$ = 50 μM) et en considérant D_{FCOH} = $6,7 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, une épaisseur de couche de diffusion de 11,6 μm peut être calculée, au lieu des 8,7 μm obtenu pour une EDT classique.

d. Influence de la distance

La configuration du dispositif impose d'étudier l'influence de la distance L entre l'électrode sérigraphiée et l'ambout tournant (Fig 67). Ce paramètre peut en effet influencer sur le régime

hydrodynamique et donc sur l'épaisseur de la couche de diffusion (δ_{corr}). La viscosité du milieu, les interactions à l'interface électrode de travail/solution ou encore le volume utilisé (corrélé à la distance entre l'électrode de travail et l'embout tournant) sont autant de paramètres pouvant influencer l'efficacité de la convection. Afin d'étudier l'effet de la distance séparant l'électrode sérigraphiée et l'embout tournant, une vis micrométrique a été installée afin de contrôler finement cet écart. Pour 50 μl de solution, il est possible de faire varier la distance entre 2 et 3 mm à 2500 rpm, mais pour des distances plus faibles, il est nécessaire de réduire le volume de solution. Finalement, quelle que soit cette distance (Fig 71.a) ou le volume (Fig 71.b), aucune variation significative des voltammogrammes n'est observée. Ce résultat montre qu'un contrôle précis de la hauteur n'est pas nécessaire pour garantir une bonne reproductibilité.

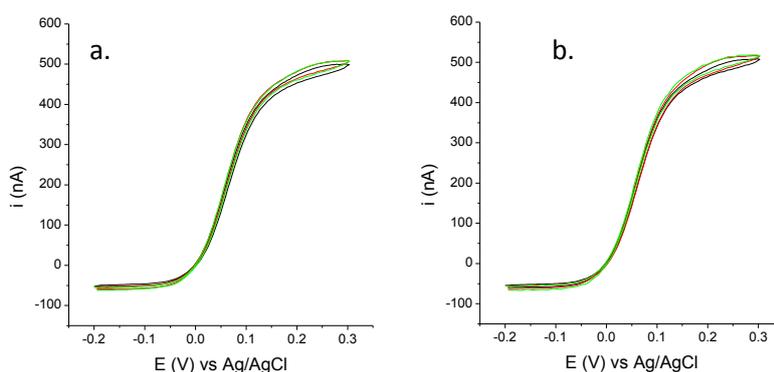


Fig 71 : a. Voltammétrie cyclique d'une solution de FcMeOH = 50 μM , LiClO_4 = 100 mM, ω = 2500 rpm, a. V = 50 μl , h = 3, 2,5, 2 mm
b. V = 50 μl et h = 3 mm, V = 25 μl et h = 2 mm, V = 15 μl et h = 1 mm, température ambiante.

e. Injection *in situ* de réactifs

Afin évaluer l'efficacité de mélange du dispositif suite à l'injection d'un réactif dans la goutte en rotation, nous avons suivi par électrochimie la cinétique de mélange d'un microlitre d'une solution de peroxyde d'hydrogène injectée manuellement dans une goutte de 49 μl en rotation, pendant que l'électrode de travail est polarisée à un potentiel cathodique pour réduire H_2O_2 . Comme cette réduction est facilitée sur électrode d'or²⁰², l'électrode de travail sérigraphiée a été modifiée d'une couche d'or poreuse par électroréduction d'un sel d'or (Fig 72.a). Cette électrode modifiée permet de réduire H_2O_2 à un potentiel de -0,6V vs Ag/AgCl. A ce potentiel, le dioxygène est également réduit, ce qui conduit à un courant cathodique stationnaire de départ non négligeable. Sur la figure 72.b, lorsqu'un microlitre d'une solution d' H_2O_2 est injecté dans 49 μl à ω = 2000 rpm, la densité de courant cathodique initiale croît exponentiellement jusqu'à atteindre une valeur maximale j_{max} . Ce comportement est typique d'un système perturbé qui relaxe exponentiellement avec le temps. Cette variation de densité de courant peut donc être ajustée grâce à l'équation (22) :

$$j = j_{max}[1 - \exp(-t/\tau)] \quad (22)$$

Où τ est le temps caractéristique de relaxation. D'après l'ajustement figure 71.b, $\tau = 1,25$ s.

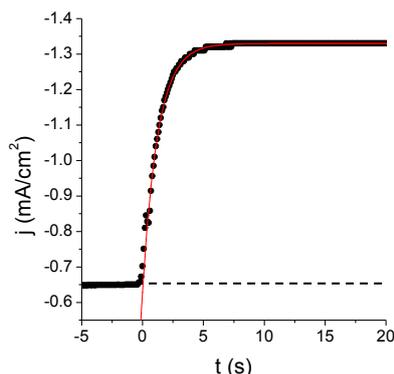
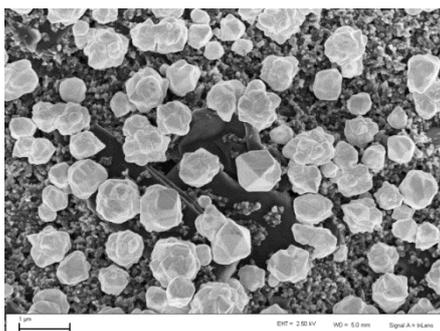


Fig 72 : a. Microstructure d'or observée au MEB sur électrode sérigraphiée modifiée après polarisation à $E = -500$ mV vs Ag/AgCl pendant 240 s en milieu HCl 0,1 M, HAuCl_4 4 g.L⁻¹ ; b. Variation du courant obtenu après l'injection de 1 μL de H_2O_2 dans 49 μL de H_2SO_4 à 0,1 M. Courant enregistré à partir d'une électrode de travail modifiée par des particules d'or, $E = -0.6$ V vs Ag/AgCl, $\omega = 2000$ rpm. En rouge l'ajustement pour $\tau = 1,25$ s

Les mêmes expériences ont été réalisées dans du PBS et dans du PBS contenant 0,1 % de BSA, et des constantes de relaxation similaires ont pu être déterminées, permettant de calculer une valeur moyenne de $\tau = 1,23 \pm 0,12$ s. Cette constante de temps caractérise le temps nécessaire pour homogénéiser le peroxyde d'hydrogène dans la goutte, laquelle est relativement indépendante de la composition du milieu.

Ce temps τ résulte d'une convolution des temps d'injection, de mélange, de transport à travers la couche de diffusion et d'acquisition. Toutefois, le temps de transport à travers la couche de diffusion est de l'ordre de quelques ms et le temps d'acquisition bien inférieur à la ms. Le temps d'injection d'un microlitre pouvant raisonnablement être évalué à moins d'une seconde, il semble que l'étape limitante soit le mélange du microlitre injecté dans les 50 μL en rotation.

III-3- Détermination de paramètres cinétiques

a. Mesure cinétique d'une réaction bimoléculaire

Afin de valider la méthodologie pour la caractérisation cinétique de réactions, nous avons dans un premier temps étudié la cinétique d'ordre deux d'une réaction chimique irréversible : la déprotection de l'ester pinacologique de l'acide *p*-aminophénylboronique (PAPB) par hydrolyse oxydative d' H_2O_2 conduisant à la formation en *p*-aminophénol (PAP) (Fig 73).

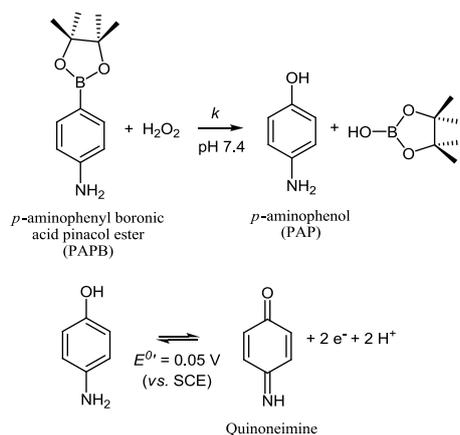


Fig 73 : Schéma réactionnel de la déprotection oxydative du PAPB en PAP détectable à une électrode

Cette déprotection a été récemment proposée pour quantifier électrochimiquement le glucose en présence de la glucose oxydase et de dioxygène²⁰³. La détection électrochimique de cette réaction est rendue possible grâce aux propriétés redox du PAP, oxydable de façon réversible à 0,05 V vs Ag/AgCl à pH 7,4. C'est ce qui est illustré figure 74, où le PAPB ne peut être oxydé de manière irréversible qu'à partir de 0,5 V. Cette oxydation irréversible conduit à une vague de réduction réversible vers 0 V, typique du couple PAP/quinoneimine.

Afin d'enregistrer la réaction de déprotection par ampérométrie à potentiel contrôlé, il est essentiel de bien choisir le potentiel appliqué afin d'éviter l'oxydation directe de PAPB à l'électrode.

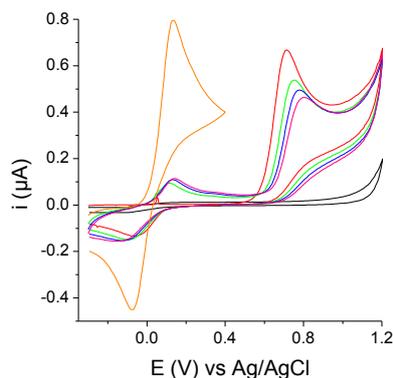


Fig 74 : Voltammogrammes en tampon phosphate pH 7,4 de 1 mM de PAPB (cycle 1, 2, 3 et 4), 1 mM de PAPB en présence de 2,5 mM de H₂O₂ en jaune. v = 50 mV/s, température ambiante.

Un potentiel de +0,3 V a donc été choisi. Afin de suivre électrochimiquement la cinétique de réaction bimoléculaire entre le PAPB et H₂O₂, une solution de PAPB est mise en rotation à la surface d'une électrode sérigraphiée polarisée à +0,3 V. Puis à t = 0 s, le peroxyde d'hydrogène est injecté dans la solution en rotation à l'aide d'une pipette.

La figure 75 montre les résultats obtenus en ampérométrie à la suite de l'introduction de différentes concentrations en H₂O₂ dans une microgoutte d'une solution de PAPB à 0,1 mM. Immédiatement après l'injection de H₂O₂ (0,2 à 10 mM), le PAP généré par déprotection oxydative engendre un courant d'oxydation du PAP en quinoneimine jusqu'à transformation totale du PAPB contenu dans la goutte.

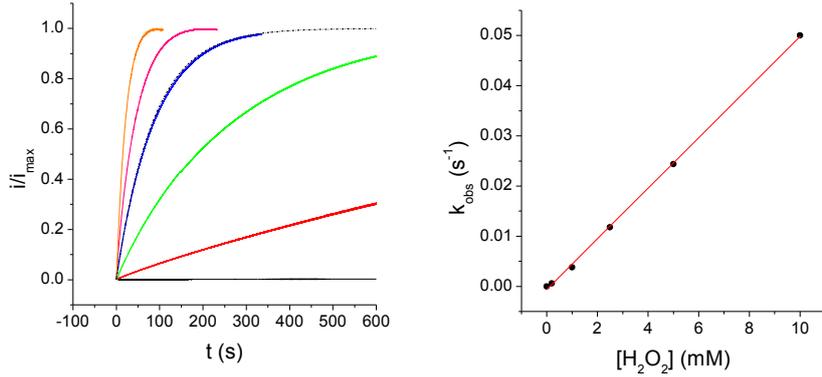


Fig 75 : a. Chronoampérommes normalisés enregistrés à 0,3 V vs Ag/AgCl après l'injection de H_2O_2 à 0, 0,2, 1, 2,5, 5 et 10 mM, $[PAPB] = 0,1$ mM, température ambiante. En noir l'ajustement à partir de l'équation (25) avec $k_{obs} = 0,012$ s⁻¹; b. Représentation graphique $k_{obs} = f([H_2O_2])$, en rouge l'ajustement linéaire : pente = $5,1$ M⁻¹.s⁻¹, $y_0 = 0,0006$ s⁻¹, $r^2 = 0,9994$

Tous ces ampérommes atteignent donc une densité de courant maximale correspondant à l'entière conversion de PAPB en PAP. Cette valeur maximale peut alors être utilisée pour normaliser les signaux. En considérant un temps de mélange à 1,2 s, on peut considérer que la réaction en solution est homogène durant toute la durée de la réaction.

En faisant l'hypothèse d'une cinétique de pseudo premier ordre, les résultats expérimentaux de la figure 75.a peuvent être analysés de la façon suivante :

En considérant une réaction d'ordre 2, la vitesse d'apparition du PAP est donnée par l'équation (23) :

$$\frac{dC_{PAP}}{dt} = -\frac{dC_{PAPB}}{dt} = k \cdot C_{PAPB} \cdot C_{H_2O_2} \quad (23)$$

Où k est la constante cinétique bimoléculaire en M⁻¹.s⁻¹. Lorsque le peroxyde d'hydrogène est en large excès, l'équation (23) peut être assimilée à un pseudo-premier ordre:

$$\frac{dC_{PAP}}{dt} = k_{obs} \cdot C_{PAPB} \quad (24)$$

$$\text{Où } k_{obs} = k \cdot C_{H_2O_2}^0$$

Après integration :

$$\frac{C_{PAP}}{C_{PAPB}^0} = 1 - \exp(-k_{obs}t) \quad (25)$$

Les courants mesurés étant proportionnels aux concentrations en PAP :

$$\frac{j}{j_{max}} = 1 - \exp(-k_{obs}t) \quad (26)$$

La représentation graphique de $k_{obs} = f([H_2O_2])$ (Fig 75.b) montre alors une très bonne relation de linéarité ($r^2=0,994$). De la pente, il est possible d'extraire la constante cinétique de deuxième ordre

$k = 5 \pm 0,1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette valeur est en bon accord avec celles rapportées dans la littérature pour la déprotection médiée d'esters d'acide arylboronique par H_2O_2 ($0,07 < k (\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}) < 2,2$)²⁰⁴⁻²⁰⁷.

b. Mesure cinétique d'une reconnaissance moléculaire aptamère/cible

Dans le chapitre précédent, l'électrochimie a permis de déterminer la constante thermodynamique de complexation entre l'aptamère de 49 nucléotides et la *L-Tym*. La discrimination entre les deux états (libre et lié) de la cible a été réalisée grâce à la différence de coefficient de diffusion. Cette approche est bien entendue envisageable dans les conditions hydrodynamiques puisque le courant stationnaire mesuré dépend du coefficient de diffusion des espèces en solution (cf équation (20)). Le principe de catalyse médiée d'oxydation de la fonction phénol de la *L-Tym* pour suivre la cinétique de formation du complexe aptamère/cible a donc été repris.

Dans un premier temps, des injections séquentielles de complexe d'osmium (II) et de *L-Tym* ont été réalisées sur une goutte de 50 μl tournant à 2500 rpm à potentiel imposé de +0,7 V vs Ag/AgCl, pour lequel l'oxydation de la *L-Tym* est catalysée par le complexe d'osmium (III) généré électrochimiquement.

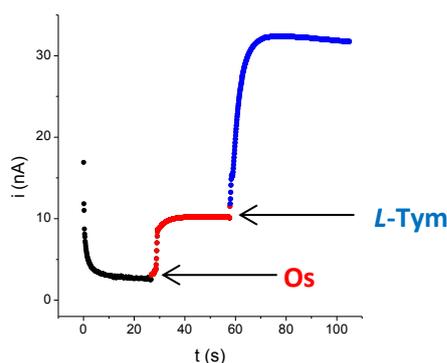


Fig 76 : Chronoampérogramme en EDT, $\omega = 2500 \text{ rpm}$, $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}$, injection de 1 μl à 50 μM d'Osmium et 1 μl à 250 μM de *L-Tym*, température ambiante.

La figure 76 représente l'ampérogramme enregistré pour une goutte de 48 μl d'une solution tampon dans laquelle est injectée d'abord 1 μl d'une solution de complexe d'osmium (II) à 50 μM puis 1 μl de *L-Tym* à 250 μM . Dès l'introduction du catalyseur, un courant stationnaire d'oxydation est rapidement obtenu. Lorsque la *L-Tym* est introduite, l'apparition d'un courant d'oxydation catalytique est observée avec une cinétique de croissance caractéristique de la cinétique de mélange.

i. Temps de mélange

L'injection de *L-Tym* dans une solution d'osmium conduit à un accroissement de l'intensité du courant avec le temps pour atteindre une valeur maximale i_{max} . La figure 77 a été obtenue en moyennant 10 expériences et en normalisant les valeurs de courant par i_{max} .

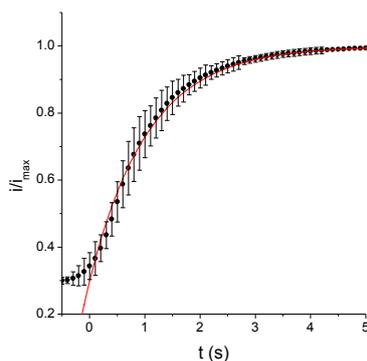


Fig 77: Chronoampérométrie obtenue après injection de *L*-Tym ($n = 10$), $E = 0,7$ V vs Ag/AgCl, $\omega = 2500$ rpm, température ambiante. La courbe rouge représente la fonction d'ajustement avec $\tau = 1,04$ s

D'après cette figure, la répétabilité de ces injections manuelles est plutôt bonne, avec une incertitude maximale de $\pm 10\%$ dans la zone d'accroissement du courant. Cette variation du courant peut être ajustée par une équation de la forme :

$$\frac{i}{i_{max}} = 1 - \left(\frac{i_{max} - i_{min}}{i_{max}}\right) \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (27)$$

Ainsi, une constante de temps $\tau_{EDT} = 1,04 \pm 0,01$ s peut être déduite. Cette valeur est proche de celle obtenue pour H_2O_2 et donc représentative de la cinétique de mélange.

ii. Identification du régime de catalyse

Il est important de s'assurer que le régime de catalyse est total pour des concentrations micromolaires en catalyseur et $5 \mu\text{M}$ de *L*-Tym dans les conditions hydrodynamiques employées. Pour cela, la méthode la plus directe est de vérifier la linéarité du courant en fonction de la concentration en *L*-Tym. Pour un régime de catalyse totale limitée par la diffusion de la molécule catalysée, le courant dépend de sa concentration, tandis qu'un régime de catalyse stationnaire entraîne une dépendance en fonction de la racine carrée de la concentration en substrat (Annexe I p 129). Sur la Figure 78 sont représentées les intensités de courant relevées pour des concentrations croissantes en *L*-Tym en présence de 1, 2 et $5 \mu\text{M}$ d'osmium à $\omega = 2500$ rpm.

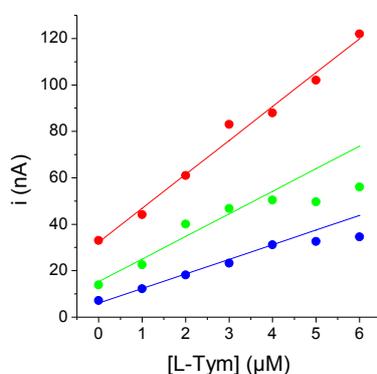


Fig 78 : $i = f([L\text{-Tym}])$ pour des concentrations en complexe d'Osmium (II) = 1, 2,5 et $5 \mu\text{M}$, $\omega = 2500$ rpm, $v = 100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Pour les concentrations en catalyseur inférieure à 5 μM , la linéarité n'est vérifiée qu'aux faibles concentrations en *L*-Tym puisqu'au-delà de 3-4 μM une déviation est observée, indiquant que le régime de catalyse n'est plus total. Une concentration en catalyseur de 5 μM a donc été sélectionnée pour la suite du travail.

Afin de pouvoir vérifier les résultats obtenus en voltammétrie cyclique dans le chapitre précédent et ceux obtenus dans des conditions hydrodynamiques, la mesure du K_d dans ces nouvelles conditions de catalyse a été réalisée. Sur la figure 79 sont représentées les variations de courant de catalyse en fonction de la concentration en aptamère pour des concentrations en osmium de 1 et 5 μM .

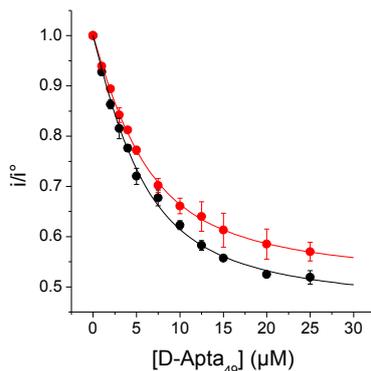


Fig 79 : $i/i^\circ = f([D-Apta_{49}])$ pour $[Os] = 1 \mu\text{M}$ et $[Os] = 5 \mu\text{M}$. Résultats obtenus sans rotation de la goutte.

Par régression non linéaire de l'équation (7) des résultats expérimentaux réalisés avec 5 μM de complexe d'osmium (II), un $K_d = 3,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty / i_p^0 = 0,50 \pm 0,01$ sont obtenus. Pour une concentration en catalyseur à 1 μM , un $K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ et une valeur de $i_p^\infty / i_p^0 = 0,45 \pm 0,01$ avaient été déterminées. La valeur de K_d est donc en bon accord avec celle obtenue à 1 μM de complexe d'osmium. En revanche, la valeur de i_p^∞ / i_p^0 est légèrement différente.

iii. Oxydation irréversible de la *L*-Tym

Il est important de noter que dès que le mélange de la *L*-Tym est terminé, l'intensité du courant de catalyse d'oxydation de la *L*-Tym diminue progressivement au cours du temps (Fig 80). Sachant que l'oxydation de la *L*-Tym est un processus irréversible, celle-ci ne peut pas être régénérée à la contre électrode. Il y a donc consommation de la *L*-Tym au cours de l'expérience.

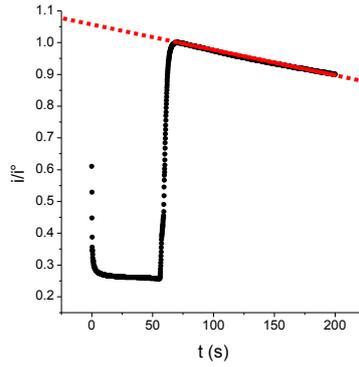


Fig 80 : Chronoampérogramme obtenu après injection de L-Tym, E = 0,7 V vs Ag/AgCl, $\omega = 2500$ rpm, température ambiante.
La courbe rouge représente la fonction d'ajustement avec $k_{cons} = 8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$

L'intensité de courant mesurée étant proportionnelle à la concentration en L-Tym, ces 2 grandeurs peuvent être reliées de la façon suivante:

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{i}{nFV} \quad (28a)$$

D'après (19) :

$$\frac{dC_T}{dt} = \frac{SD}{V\delta_{corr}} C_T^0 \quad (28b)$$

Où V est le volume de la goutte. A partir de l'équation de Levich et après intégration, on obtient :

$$C_T(t) = C_T^0 \exp\left[\left(-\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right) t\right] \quad (29)$$

Ou

$$\frac{i(t)}{i_0} = \frac{C_T(t)}{C_T^0} = \exp\left[\left(-\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right) t\right] \quad (30)$$

La consommation de la L-Tym peut être ajustée grâce à cette équation. Une valeur de $8,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ est déterminée pour le paramètre $\left(\frac{SD}{V\delta_{corr}}\right)$. Cette valeur (k_{cons}) peut être définie comme la constante relative à la vitesse de consommation de la L-Tym dans les conditions expérimentales utilisées.

c. Injection d'aptamère

Avec l'ajout d'aptamère dans la goutte en rotation (cf matériels et méthodes p 111), l'intensité du courant de catalyse devrait diminuer conformément au changement de coefficient de diffusion de la L-Tym lorsqu'elle est complexée par l'aptamère.

La figure 81.a a été obtenue selon la procédure suivante : 48 μL d'une solution tampon comprenant 5 μM de médiateur est mise en rotation ($\omega = 2500 \text{ rpm}$). Puis, 1 μL de *L-Tym* à 250 μM est injecté, de manière à ce que la concentration finale en *L-Tym* soit de 5 μM . Une fois que le courant de catalyse est stabilisé, 1 μL de *D-Apta*₄₉ est injecté pour atteindre une concentration final de 25 μM . L'intensité est ici normalisée par le courant atteint au moment de l'injection.

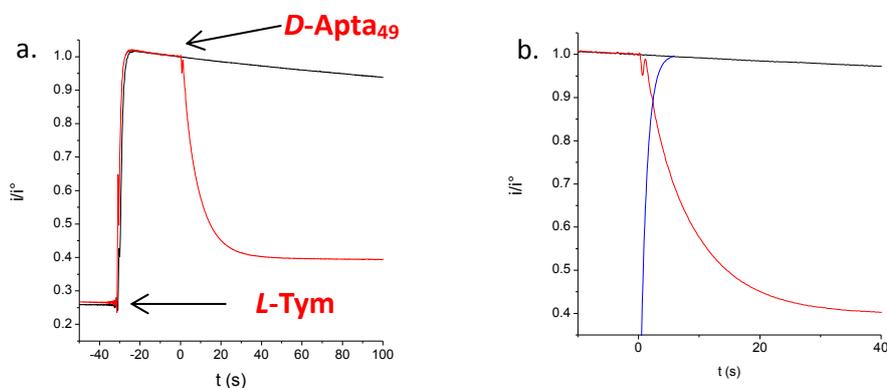


Fig 81 : a. Chronoampéromégramme obtenu après injection de *L-Tym* seule et de *L-Tym* puis de *D-Apta*₄₉, $E = 0,7 \text{ V}$ vs Ag/AgCl , température ambiante.

b. Agrandissement de (a), en bleu est représentée la cinétique de mélange.

Sur la figure 81.b est représenté un agrandissement de la figure 81.a, où est superposé en bleu la cinétique théorique du mélange du système. Cette cinétique apparait négligeable devant le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre de la réaction de complexation *L-Tym*/*D-apta*₄₉ ($\sim 40 \text{ s}$).

Une remarque est néanmoins nécessaire à ce stade: la consommation de la *L-Tym* étant dépendante du coefficient de diffusion de l'espèce consommée, cette consommation est différente pour la *L-Tym* libre et celle complexée à l'aptamère. Cela se vérifie assez bien sur la figure 81.a, où une fois l'équilibre de complexation atteint, la diminution du courant devient négligeable par rapport à celle observée sans aptamère. Comme cette consommation dépend des coefficients de diffusion de l'espèce catalysée ($k_{cons} = \left(\frac{SD}{V\delta}\right)$), le rapport des constantes de consommation pour la *L-Tym* libre et complexée ne peut être que comparable au rapport des coefficients de diffusion.

d. Détermination du K_d

L'ampéromégramme obtenu figure 82 apporte deux informations : la première est d'ordre cinétique et reliée à la constante d'association k_{on} à travers la décroissance du courant aux temps courts. La seconde est d'ordre thermodynamique, et reliée à la constante d'équilibre K_d atteinte au temps longs. Ainsi, K_d et k_{on} peuvent être déterminés à partir d'un seul ensemble de données, collectées pour différentes concentrations en aptamère. Le k_{off} peut alors être déduit de ces valeurs.

Sur la figure 82.a sont représentés les chronoampéromégrammes normalisés des expériences réalisées pour des concentrations croissantes en aptamère.

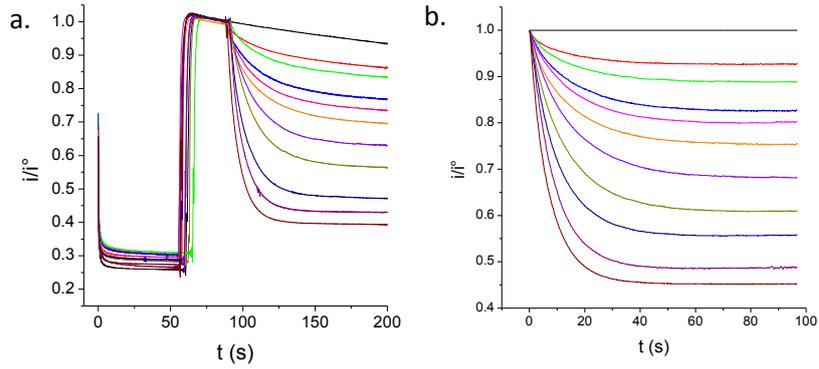


Fig 82: a. Chronoampérogrammes normalisés obtenus après injection de *L*-Tym puis de *D*-Apta₄₉ = **0, 1, 2, 3, 4, 5, 7.5, 10, 15, 20, 25** μM, E = 0,7 V vs Ag/AgCl, température ambiante.
b. Résultats expérimentaux normalisés et corrigés de la consommation (n = 2)

Les intensités du courant de catalyse sont convoluées au phénomène de consommation de la *L*-Tym. Il est néanmoins possible d'évaluer cette consommation pour chaque ajout d'aptamère et, en première approximation, de la corriger (Fig 82.b). En effet pour chaque ajout d'aptamère, il est possible d'évaluer k_{cons}^i , qui peut être considérée comme une combinaison linéaire des consommations relatives à la *L*-Tym libre et complexée. D'après (26) :

$$k_{cons}^i = \left(\frac{S}{V\delta_{corr}} \right) \cdot (\chi_T \cdot D_T + \chi_{AT} \cdot D_{AT}) \quad (31)$$

Dans le cas où l'aptamère n'est pas injecté, la valeur de $i(t)/i^0$ corrigée est égale à 1 et peut s'écrire :

$$\frac{i_p^{cor}(t)}{i_p^0} = \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} + \left(1 - \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} \right) \quad (32)$$

Pour l'ajout d'une concentration i en aptamère, le terme correctif à introduire est de moindre proportion puisque la consommation est fonction du coefficient de diffusion, plus faible lorsque la *L*-Tym est complexée. Le rapport des constantes de consommation k_{cons}^i/k_{cons}^0 peut servir à pondérer la correction à apporter à chacune des concentrations i en aptamère :

$$\frac{i_p^{cor}(t)}{i_p^0} = \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} + \left(1 - \frac{i_p^{exp}(t)}{i_p^0} \right) \cdot \frac{k_{cons}^i}{k_{cons}^0} \quad (33)$$

Où k_{cons}^0 est la constante de consommation sans aptamère en solution et k_{cons}^i la constante de consommation pour une concentration i en aptamère. L'évolution des courants ainsi corrigés en fonction du temps est représentée figure 82.b.

La figure 83 représente l'évolution des intensités de courant à l'équilibre normalisées et corrigées en fonction de la concentration en aptamère.

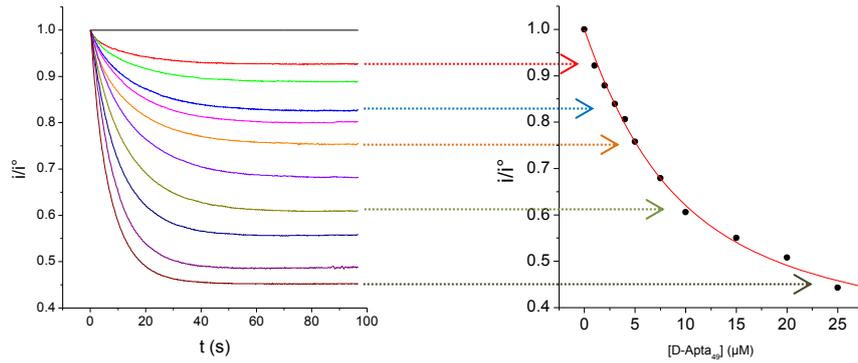


Fig 83 : Représentation graphique $i/i^\circ = f([\text{apta}])$ pour des ajouts de **D-Apta₄₉** ($n=2$)
 $K_d = 5,9 \pm 0,45 \mu\text{M}$, $i/i^\circ = 0,31 \pm 0,02$

L'équation (7) du chapitre I peut être utilisée pour ajuster les résultats de la figure 83. Ainsi, un $K_d = 5,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$ et la valeur $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ ont été déterminés.

Dans ce cas la valeur de K_d est presque deux fois supérieure à celle déterminée par voltammétrie cyclique. Cependant, le protocole est ici différent car chaque expérience correspond à un seul ajout d'aptamère en solution, tandis que dans le cas de la voltammétrie cyclique, l'expérience est menée par ajouts successifs d'aptamère. Nous n'avons cependant pas d'explication claire à avancer pour justifier cet écart.

La valeur du paramètre i_p^∞ / i_p^0 n'est, en revanche, pas comparable à celle obtenue par voltammétrie cyclique. En effet, la valeur du courant dépend de \sqrt{D} dans le cas de la voltammétrie cyclique sur électrode stationnaire, tandis qu'elle dépend de $D^{2/3}$ dans le cas des conditions hydrodynamiques de la goutte tournante. Si bien que dans le premier cas :

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \sqrt{\frac{D_{AT}}{D_T}} = 0,5 \quad \Leftrightarrow \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = 0,25$$

Et dans le second cas :

$$\frac{i_p^\infty}{i_p^0} = \left(\frac{D_{AT}}{D_T}\right)^{2/3} = 0,31 \quad \Leftrightarrow \quad \frac{D_{AT}}{D_T} = 0,17$$

Ces rapports de coefficients de diffusion sont finalement cohérents et en bon accord avec ce que l'on peut attendre d'un rapport de coefficients de diffusion entre un acide aminé et un acide nucléique monocaténaire de 49 nucléotides.

e. Détermination du k_{on}

Afin d'extraire les paramètres k_{on} et K_d à partir des résultats expérimentaux (Fig 82.a), il est nécessaire d'établir l'équation cinétique qui relie le changement de concentration en L-Tym libre en solution avec le temps (Annexe IV p139). Si on considère l'équilibre suivant :



$$\text{Avec } K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (35)$$

L'équation différentielle qui décrit la cinétique est donnée par :

$$-\frac{dC_T}{dt} = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_{AT}}{dt} = \frac{dx}{dt} = k_{on} \cdot (C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - k_{off} \cdot x \quad (36)$$

ou

$$\frac{dx}{(C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - K_d \cdot x} = k_{on} \cdot dt \quad (37)$$

Qui après intégration conduit à :

$$x(t) = \frac{r_2 - r_1 \cdot \exp\left\{(r_2 - r_1)\left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}}{1 - \exp\left\{(r_2 - r_1)\left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}} \quad (38)$$

Où r_1 et r_2 sont les racines de l'équation :

$$x^2 - x(C_T^0 + C_A^0 + K_d) + C_T^0 \cdot C_A^0 = 0 \quad (39)$$

si on considère χ_f :

$$\chi_f = \frac{C_T}{C_T^0} = \frac{C_T^0 - C_{AT}}{C_T^0} = 1 - \frac{x}{C_T^0} \quad (40)$$

et que l'équation générale de la variation de courant est donnée par l'équation (7) (chapitre I) alors :

$$\frac{i_p(t)}{i_p^0} = 1 - \frac{x(t)}{C_T^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (41)$$

A partir de cette équation et son ajustement non linéaire aux données expérimentales il devient alors possible de déterminer les paramètres K_d , k_{on} et i_p^∞/i_p^0 . La figure 84 montre les courbes théoriques ajustées aux données expérimentales pour le jeu de valeurs $K_d = 5,9 \mu\text{M}$, $i_p^\infty/i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

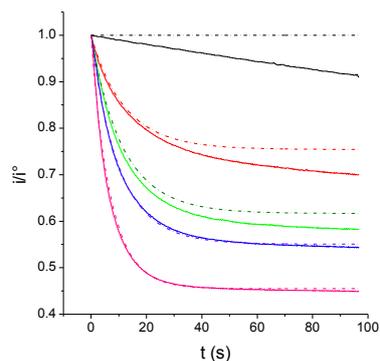


Fig 84 : Ajustement des résultats expérimentaux à l'aide de l'équation (33) pour $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 5, 10, 15$ et $25 \mu\text{M}$,
 $K_d = 5,9 \mu\text{M}$, $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 650 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Sur cette figure, les courbes théoriques ne s'ajustent pas parfaitement aux résultats expérimentaux notamment pour les concentrations faibles en aptamère et aux temps longs. Cela résulte de la consommation de la *L*-Tym. Il est donc nécessaire d'introduire un terme correctif dans l'équation (41) permettant de tenir compte de la variation de C_T^0 au cours du temps.

Ayant évalué précédemment la cinétique de consommation pour la *L*-Tym libre, une correction itérative de la concentration en *L*-Tym a donc été introduite dans le calcul (pour chaque incrément de temps, la concentration en *L*-Tym libre est recalculée en fonction de la consommation et de la complexation, ces deux phénomènes étant interdépendants).

Ainsi ce calcul itératif permet d'ajuster les résultats présentés figure 85.a et b en introduisant les paramètres K_d et i_p^∞ / i_p^0 déterminés grâce au courant stationnaire aux temps longs et k_{cons} obtenus précédemment. Un $k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (quel que soit la concentration en aptamère) est obtenu. Cette valeur permet de calculer un k_{off} de $0,03 \pm 0,01 \text{ s}^{-1}$.

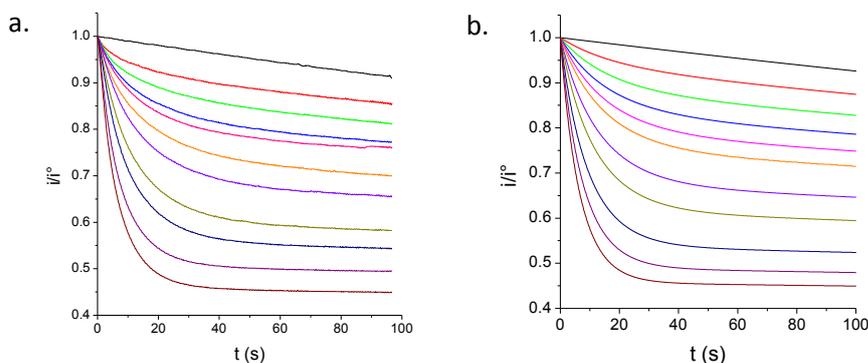


Fig 85 : a. Chronoampérommes normalisés obtenus après injection de *L*-Tym puis de *D*-Apta₄₉
 b. Simulations de ces résultats pour $K_d = 5,86 \pm 0,45 \mu\text{M}$, $i_p^\infty / i_p^0 = 0,31 \pm 0,02$ et $k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
 $[D\text{-Apta}_{49}] = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 5, 10, 15, 20, 25 \mu\text{M}$ ($n = 2$).

Parallèlement, l'équipe du Département de Pharmacochimie Moléculaire (E. Peyrin) de l'Université Joseph Fourier de Grenoble a déterminé un $k_{on} = 2455 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et un k_{off} de $0,03 \text{ s}^{-1}$ pour le même couple aptamère/cible, mais pour une concentration *suboptimale* en magnésium¹¹⁹ ($250 \mu\text{M}$). Ce résultat est cohérent avec celui déterminé par électrochimie dans les mêmes conditions ($k_{on} = 1500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $k_{off} = 0,09 \text{ s}^{-1}$).

III-3- Conclusion

Déterminer les constantes cinétiques entre un aptamère et sa cible est important pour comprendre le mécanisme de reconnaissance et pour l'optimisation de méthodes analytiques.

Un certain nombre de données dans la littérature existent, et la valeur de k_{on} déterminée au cours de ce travail ($k_{on} = 5000 \pm 500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est dans la moyenne des valeurs publiées^{188,189, 208, 209, 210}. Par exemples, un $k_{on} = 2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a été mesuré lors de l'interaction spécifique entre un *riboswitch* et la thiamine pyrophosphate¹⁸⁹ par la technique *kinITC*, et des k_{on} entre 340 et 410 $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ont pu être déterminés par électrophorèse capillaire (ppKCE) pour des mutants de l'aptamère anti-quinine¹⁸⁷. Par *Stopped-Flow* couplé à de la spectroscopie de fluorescence, des k_{on} entre 2×10^4 et $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ont également été déterminés pour des *riboswitch*^{208,209} et l'aptamère anti-théophylline²¹⁰.

Dans ce chapitre nous avons donc décrit les principales caractéristiques d'une méthodologie électrochimique en microvolume dédiée à la caractérisation cinétique d'une réaction chimique. La résolution temporelle est pour le moment limitée à la seconde mais des développements sont en cours d'étude pour améliorer la vitesse de mélange (introduction de bulle d'air dans le microvolume en rotation ou utilisation d'une interface rugueuse au niveau de l'embout tournant).

En principe, cette technique pourrait aussi être adaptée à des réactions homogènes provoquant un changement de potentiel formel ou un changement de cinétique de transfert électronique. A l'image du travail réalisé dans le chapitre II, cette méthode pourrait également être adaptée en condition d'échange compétitif.

Chapitre IV : Influence de la longueur de l'aptamère sur le processus de reconnaissance

Jusqu'ici, ces travaux ont permis de déterminer les paramètres caractéristiques d'une reconnaissance entre un aptamère et sa cible par voie électrochimique. Mais ces méthodologies de détection d'une complexation aptamère/cible fournissent aussi des résultats qualitatifs sur la spécificité de la séquence d'aptamère utilisée. En combinant une approche basée sur la prédiction des structures tertiaires de l'aptamère (qui dépendent de la séquence nucléotidique) et l'utilisation de ces méthodologies, la séquence de l'aptamère anti-L-Tym a pu être optimisée.

IV-1- Structure secondaire de l'aptamère anti-L-Tym

a. Hypothèse de départ : le G-quartet

Au sein de la séquence d'aptamère anti-L-Tym se trouvent quatre doublets de guanine susceptibles de former une structure en G-quartet (5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGC GG TGCCC-3'). Ces quadruplexes sont connus pour se former en présence d'un ion monovalent entre chaque plan de quatre guanines. Des études sur la stabilité de cette structure montrent qu'en présence d'ions Li^+ , Na^+ et K^+ les quartets ont des topologies²¹¹, et des températures de fusion (T_m) différentes. Ainsi, les quadruplexes de guanines présentent des T_m plus élevés en présence de K^+ qu'en présence de Na^+ . En présence d'un ion encore plus petit, le Li^+ , la T_m est encore plus basse²¹². Nous avons donc envisagé de tirer partie de la méthodologie électrochimique décrite précédemment pour tester l'hypothèse de formation d'un G-quartet en évaluant la reconnaissance de l'aptamère vis-à-vis de sa cible dans des tampons contenant exclusivement soit du K^+ , du Na^+ ou du Li^+ . Le tampon de reconnaissance utilisé jusqu'à présent est constitué d'un mélange de 5 mM de Tris pH 7,4, 10 mM de MgCl_2 et 50mM de NaCl . Des tampons à 50 mM de KCl et LiCl ont donc été préparés, et des expériences de reconnaissance directe de la L-Tym réalisées.

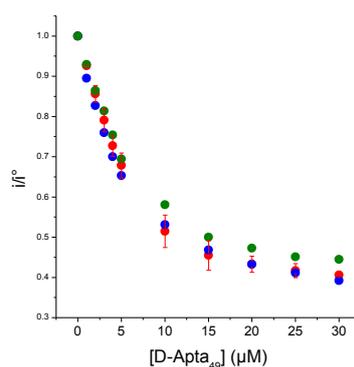


Fig 86 : Représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-apta}_{49}])$ pour les tampons contenant l'ion Na^+ , K^+ et Li^+
 $[\text{L-Tym}] = 5 \mu\text{M}$, $[\text{Os}^{\text{III/II}}(\text{bpy})_3]^{3+/2+} = 1 \mu\text{M}$.

Comme représenté sur la figure 86, quel que soit la nature de l'ion monovalent utilisé, aucune différence d'affinité de l'aptamère pour sa cible n'a pu être révélée. L'hypothèse d'un quadruplexe de guanine n'est cependant pas à exclure définitivement. En effet, aucune information n'indique si la formation d'un G-quartet n'est pas le produit final d'un processus de reconnaissance induit lors de la

complexation de la cible. De ce fait, seule l'hypothèse d'une préstructuration en quadruplexe peut être rejetée.

b. Appariement Watson-Crick

La séquence de 49 nucléotides comprenant 14 % de A, 31 % de T, 16 % de C et 39 % de G, des appariements de type Watson-Crick sont susceptibles de se produire. Le logiciel *mfold* permet de prédire quatre structures secondaires (Fig 87).

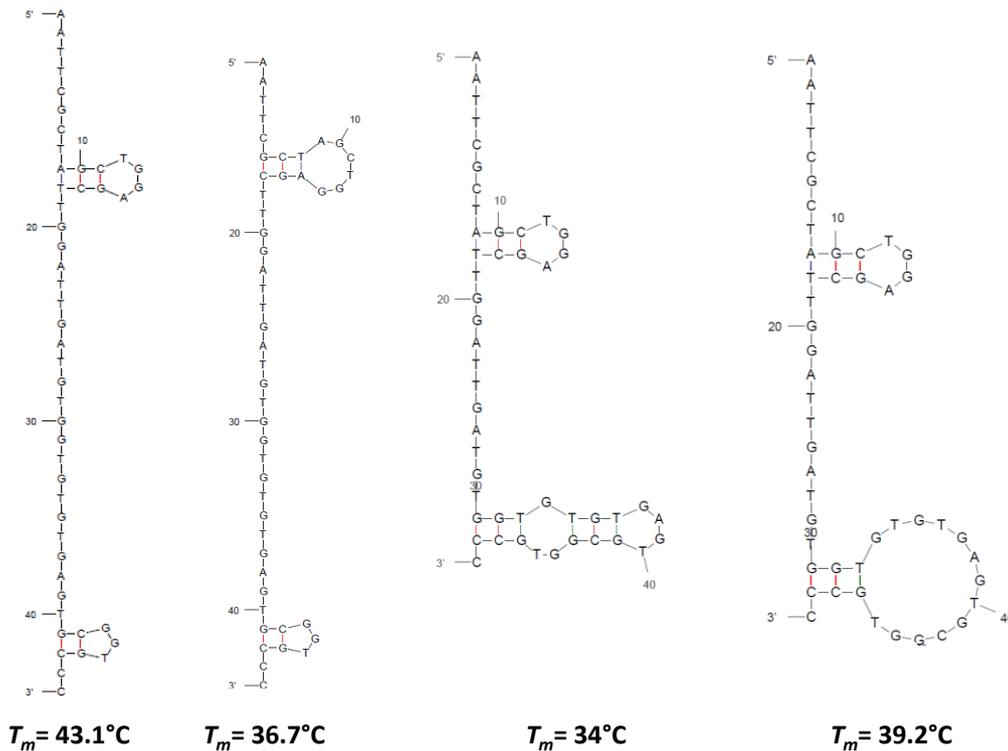


Fig 87 : structures secondaires calculées par *mfold* : en rouge les appariements de type Watson-Crick, en vert les appariements Wobble

Ces structures secondaires possèdent des appariements des côtés 5' et 3' de la séquence, impliquant moins de 5 appariements de type Watson-Crick. Les températures de fusion étant néanmoins au-dessus de la température ambiante, ces appariements sont susceptibles de coexister.

D'après cette simulation, le monobrin d'ADN n'a donc pas de structuration dominante en double hélice. Toutefois, ces interactions ne sont pas les seules susceptibles de structurer la séquence. Comme évoqué dans le chapitre I, des appariements de type Hoogsteen, des interactions de type π -stacking ou encore des interactions guanine-phosphate peuvent se produire et contraindre l'aptamère à coexister sous diverses conformations secondaires et tertiaires non prises en compte par ce logiciel. Cette simulation a néanmoins l'avantage de proposer une structuration largement rencontrée dans le domaine des aptamères : la structure en tige-boucle. Pour des aptamères dirigés contre des acides aminés ou contre de petites molécules organiques, cette structure présente souvent un site de fixation dans la zone non appariée de la séquence, c'est-à-dire dans la boucle.

Quatre structures en tige boucle différentes (TB 1, 2, 3 et 4, fig 88) sont ainsi identifiées dans le cas de l'aptamère anti *L-Tym*.

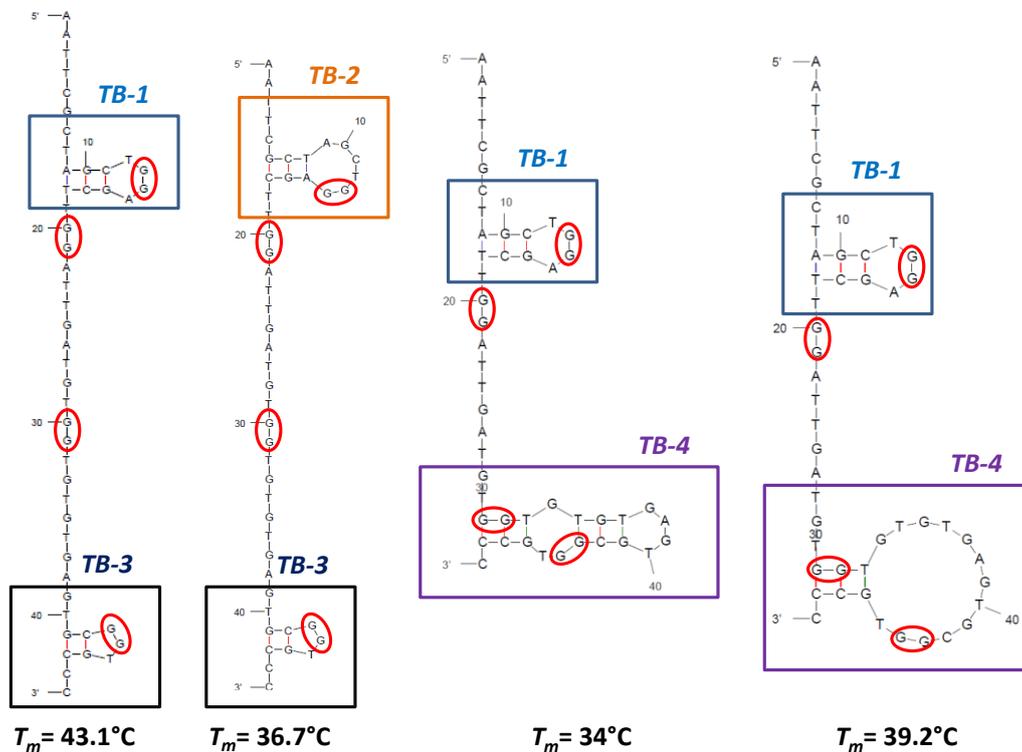


Fig 88 : **TB 1, 2, 3, 4** : structures en tige boucle, en rouge sont entourées les doublets de guanine susceptibles de structurer un G-quartet

Toutes ces *tiges-boucles* contiennent un doublet de guanine. Ces structures ne semblent donc pas compatibles avec la formation d'un quartet : étant donnée l'énergie thermique à apporter pour rompre ces structures, il paraît peu probable que la reconnaissance moléculaire de la cible puisse induire une reconfiguration en G-quartet.

- Etude de la séquence de reconnaissance

Les hypothèses de structuration ne peuvent prévoir qu'une ébauche de structure tertiaire. L'approche développée dans ce travail a d'abord été de muter l'aptamère pour essayer d'identifier les séquences indispensables à la reconnaissance, qu'elles soient structurantes ou impliquées directement dans la reconnaissance.

Pour se faire, l'hypothèse du G-quartet a été conservée, et les séquences de nucléotides entre les doublets ont été mutées par des séquences faites uniquement de thymine. Cette approche permet d'empêcher la formation des structures *TB 1, 2, 3* et *4* mais aussi d'évaluer le rôle des nucléotides 22 à 28 qui n'interviennent dans aucune structure secondaire (Fig 90).

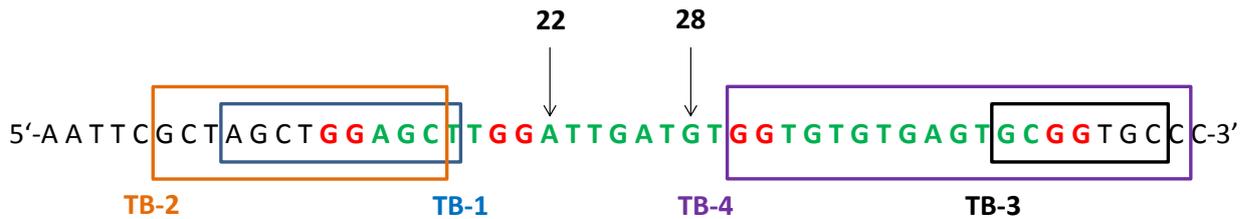


Fig 89 : Représentation schématique de la localisation des structures en *tige-boucle* simulées par *mfold*.
En vert les séquences mutées

Un protocole d'évaluation de la reconnaissance entre les aptamères mutés et la cible par voltamétrie cyclique a alors été mis au point. Les séquences d'aptamères utilisées sont les suivantes (les mutations par rapport au brin initial (Wt = Wild type) sont identifiées en bleu, (M=Mutant) :

Wt : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGGCGGTGCC-3'

M1 : 5'-AATTCGCTAGCTGGTTTTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGGCGGTGCC-3'

M2 : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGTTTTTTGGTGTGTGAGTGGCGGTGCC-3'

M3 : 5'-AATTCGCTAGCTGGAGCTTGGATTGATGTGGTTTTTTTTGGTGTGCC-3'

Les résultats expérimentaux $i/i^0 = f([D\text{-Apt}_{49}])$ sont représentés figure 90.

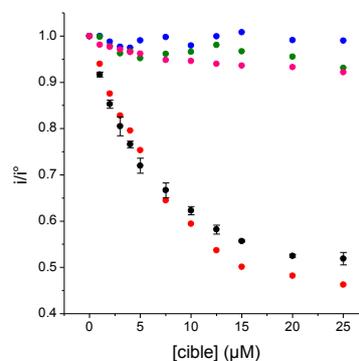


Fig 90 : Tests de reconnaissance de la L-Tym avec les aptamères mutés : Wt (wild type), M1, M2, M3, D-Aléa₄₉

D'après ces résultats, seul l'aptamère M1 reconnaît encore la cible. Les nucléotides mutés dans M1 ne sont donc pas indispensables, contrairement à ceux de M2 et M3, dont les tests de reconnaissances sont voisins du D-Aléa₄₉ (aucune complexation).

Sur la base de cette conclusion, un aptamère tronqué de 17 nucléotides en 5' (soit un aptamère de 32 nucléotides) a été testé (5'-TTGGATTGATGTGGTGTGTGAGTGGCGGTGCC-3'). Cette nouvelle séquence permet de tester la séquence non mutée de M1, et d'exclure expérimentalement l'hypothèse du G-quartet.

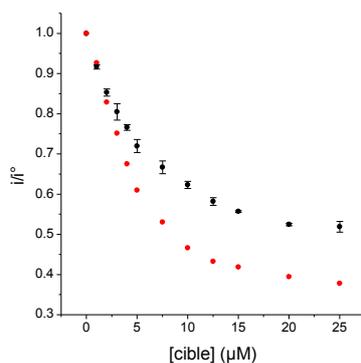


Fig 91 : Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D\text{-apta}])$ pour des aptamères de 49 et 32 nucléotides.

Le test de reconnaissance de la *L*-Tym par voltammétrie cyclique montre alors que cette séquence raccourcie contient toujours les bases nécessaires à la reconnaissance (Fig 91). Cette troncature a même comme effet l'amélioration de l'affinité de l'aptamère pour sa cible, puisqu'un $K_d^{32} = 1,8 \mu\text{M}$ a pu être déterminé ($K_d^{49} = 2,8 \mu\text{M}$). L'hypothèse d'un quadruplexe est définitivement écartée par cette expérience.

Cette démarche par troncature de la séquence ayant été concluante, ce travail de réduction par l'extrémité 5' a été poursuivi. Sur la figure 92 sont représentés les résultats d'expérience de reconnaissance avec les aptamères de 28 et 23 nucléotides.

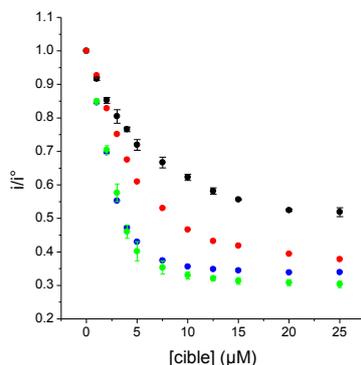


Fig 92 : Représentation graphique $i/i^{\circ} = f([D\text{-apta}])$ pour des aptamères de 49, 32, 28 et 23 nucléotides.

Ces aptamères plus courts reconnaissent toujours la cible, et avec des affinités plus grandes : en effet pour une même concentration d'aptamère, les chutes de courant sont plus importantes avec la réduction en taille du brin, ce qui signifie qu'une plus grande quantité de *L*-Tym s'est complexées à l'aptamère. Au final, cette démarche a permis d'isoler une séquence minimale de 23 nucléotides de $K_d^{23} = 0,8 \mu\text{M}$.

En poursuivant la troncature côté 5', aucune séquence conservant son affinité n'a pu être isolée. Du côté 3', la simple perte de la première cytosine fait perdre les propriétés de reconnaissance.

Cette séquence de 23 bases (5'-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3') est faite de A à 4 %, de C à 17 %, de T à 31 % et de G à 48 %. Les simulations par *mfold* pour l'aptamère de 23 nucléotides sont rapportées figure 93.

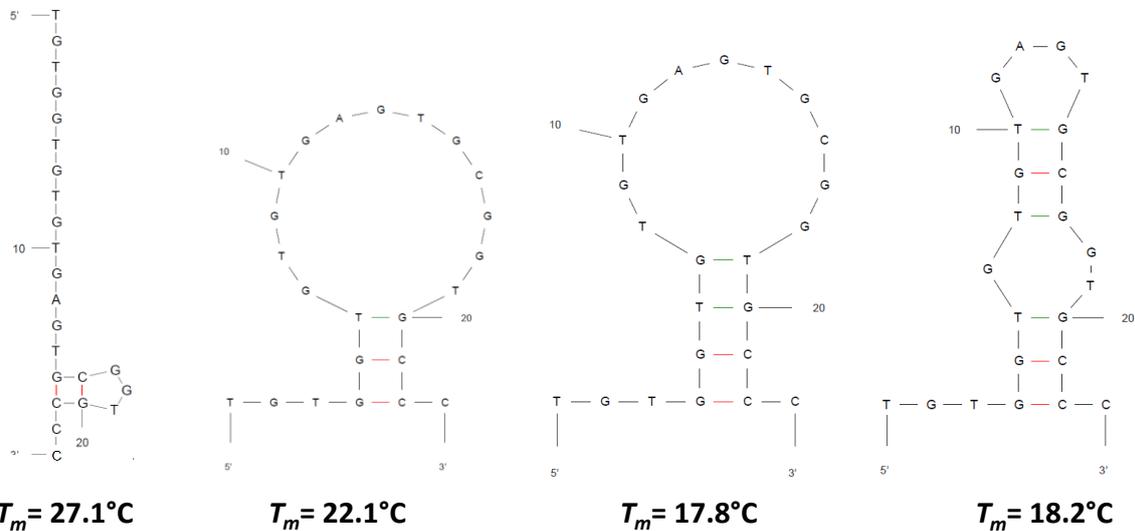


Fig 93 : Structures secondaires calculées par *mfold* pour l'aptamère de 23 nucléotides : en rouge les appariements de type *Watson-Crick*, en vert les appariement *Wobble*

Deux des structures proposées par *mfold* ont des températures de fusion en dessous de la température ambiante, et font apparaitre des appariements de type *wobble*, moins stables que les *Watson-Crick*. Ces deux structures ne sont donc que très peu représentées en solution.

La même démarche que pour l'aptamère de 49 nucléotides a alors été appliquée : des brins mutés ont été testés afin de déterminer les bases strictement nécessaires à la reconnaissance.

Wt : 5'-TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M4 : 5'-TGTTTTGTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M5 : 5'-TGTGGTTTTTGTGAGTGCGGTGCCC-3'

M6 : 5'-TGTGGTGTGTTTTGCGGTGCC-3'

M7 : 5'-TGTGGTGTGTGAGTTTTTGCCC-3'

Cependant, aucune de ces séquences n'a conservée d'affinité pour la cible. Aucune conclusion sur la structure et la séquence du brin ne peut alors être déduite de ces expériences : chaque nucléotide semble jouer un rôle déterminant pour la reconnaissance.

Cette méthodologie a néanmoins permis d'isoler une séquence plus courte, avec une meilleure affinité, et qui sera désigné *D-Apta₂₃*.

c. Détermination des K_d des brins réduits

Pour tenter de mieux comprendre les raisons du gain d'affinité, des brins de différentes longueurs (*D*-apta₄₉ raccourci par le côté 5' jusqu'à 23 nucléotides) ont dans un premier temps été étudiés par voltammétrie cyclique, et leur constante de dissociation vis-à-vis de la *L*-Tym déterminée (Fig 94).

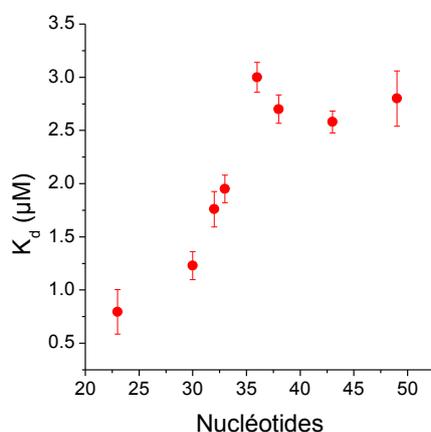


Fig 94 : Représentation graphique de $K_d = f(\text{nucléotides})$

D'après la figure 94, plus le brin de départ *D*-Apta₄₉ est raccourci en 5', plus la valeur de K_d diminue, jusqu'à une valeur seuil de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$ pour le *D*-Apta₂₃, soit environ 5 fois moins que pour le *D*-Apta₄₉. Ces résultats suggèrent que la séquence du 1^{er} au 19^{ème} nucléotide gène la reconnaissance entre le ligand et son récepteur.

Cependant, ces résultats n'indiquent pas si cette gène dépend de la séquence nucléotidique ou de la simple présence de nucléotides supplémentaires. Pour répondre à cette question, des aptamères *D*-Apta₂₃ allongés en 5' de 6, 16 ou 26 adénines en 5' ont été étudiés (Fig 95).

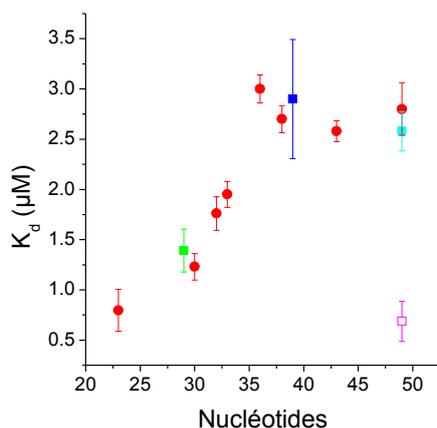


Fig 95 : $K_d = f(\text{nucléotides})$. En **ronds rouges** les K_d mesurés pour le *D*-Apta₄₉ raccourci, en **carré plein** les K_d du *D*-Apta₂₃ allongé de 6, 16 et 26 adénosines en 5'. En **carré rose vide**, le K_d du *D*-Apta₂₃ allongé de 26 adénosines du côté 3'.

D'après la figure 95, la variation de la constante de dissociation est indépendante de la séquence en 5' au-delà des 23 nucléotides nécessaires à la reconnaissance. De plus, la variation du K_d avec la taille de l'aptamère est orientée puisque l'allongement de l'aptamère *D*-Apta₂₃ du côté 3' ne change pas la valeur de ce paramètre (carré rose sur la figure 95).

a. Détermination des k_{on} des brins réduits

La diminution de K_d avec la taille du brin peut s'expliquer par une modification des constantes cinétiques (k_{on} , k_{off}) de la reconnaissance. La détermination des paramètres cinétiques a alors été entreprise via la technique électrochimique sur goutte tournante.

La figure 96.a représente l'évolution des K_d mesurés par cette technique. L'amplitude de variation est dans ce cas de 0,7 à 5,8 μM , soit un facteur 7 entre le $D\text{-Apta}_{49}$ et le $D\text{-Apta}_{23}$, ce qui est similaire aux résultats précédemment obtenus par voltammétrie cyclique dans des conditions non hydrodynamiques.

La figure 96.b représente les cinétiques obtenues après injection de 5 μl de 25 μM d'aptamères de 49, 33, 31, 28 et 23 nucléotides à une solution de 5 μM de médiateur et 5 μM de $L\text{-Tym}$.

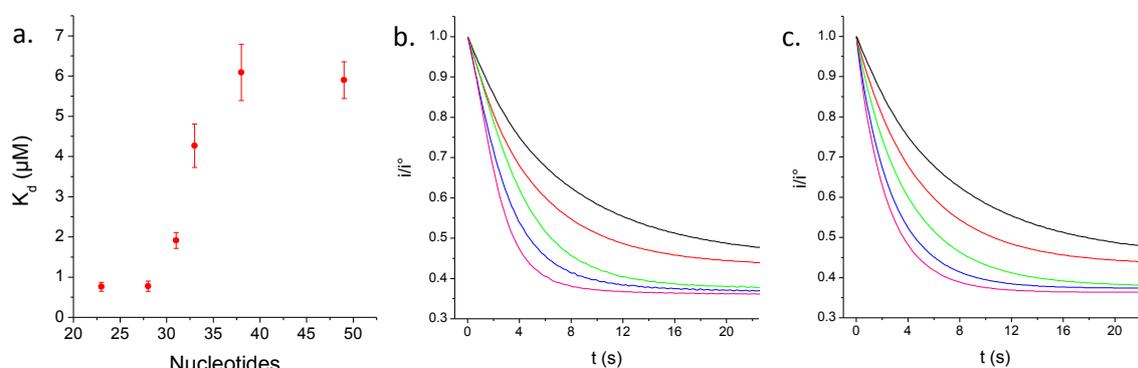


Fig 96: a. Détermination des K_d par EDT

b. Chronoampérogrammes obtenus après injection de 5 μM de $L\text{-Tym}$ dans 5 μM de complexe d'osmium (II), puis de 25 μM de $D\text{-Apta}$ de 49, 33, 31, 28 et 23, $E = 0,7 \text{ V vs Ag/AgCl}$, température ambiante.

c. Simulation des chronoampérogrammes

D'après ces courbes, il apparait clairement que plus l'aptamère est court, plus l'équilibre est atteint rapidement. Une simulation de ces cinétiques a été réalisée à partir des valeurs de K_d et des valeurs de i_p^∞/i_p^0 déterminées expérimentalement pour chaque brin et en ajustant la valeur de k_{on} entre 18000 et 5000 $\text{M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ (Fig 97.c).

L'évolution de k_{on} et k_{off} (déduite à partir du K_d) en fonction de la longueur du brin est représentée figure 97.

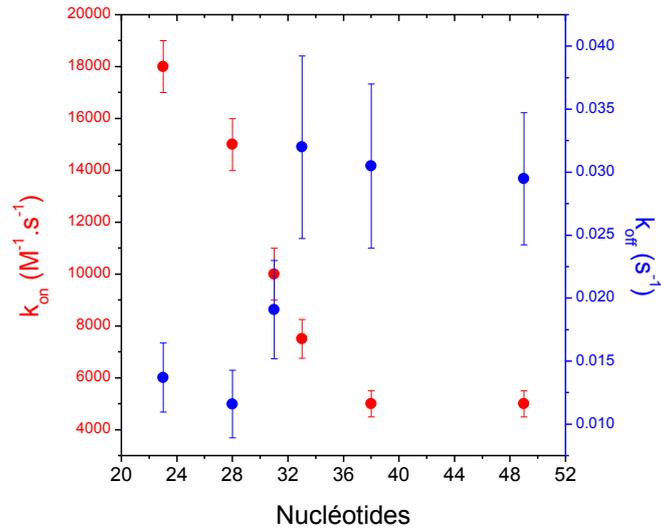


Fig 97: Evolution du k_{on} et du k_{off} en fonction de la taille de l'aptamère.

D'après ces résultats, il semblerait qu'une extension du $D-Apt_{23}$ par des nucléotides affecte la formation du complexe non seulement lors de la cinétique de formation mais aussi lors de la dissociation.

b. Discussion

Il existe deux grands modèles de mécanisme pour décrire les phénomènes d'association entre un simple brin d'ADN et une molécule de faible poids moléculaire : la recherche de conformation et le processus de reconnaissance induite (Fig 98).

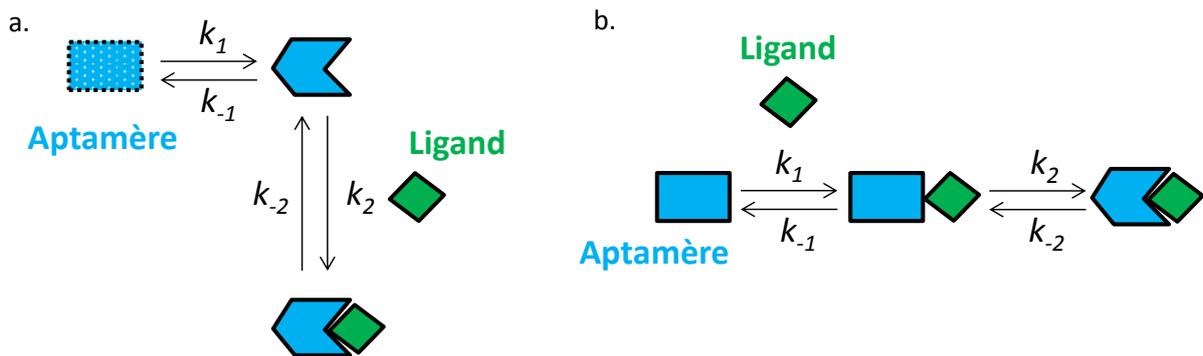


Fig 98: a. Illustration du mécanisme de recherche de conformation pour lequel l'aptamère coexiste sous différentes structures tridimensionnelles et dont une présente un site de fixation complémentaire de son ligand ;
 b. Illustration du mécanisme de processus de reconnaissance induite où l'aptamère non structuré forme un complexe précurseur au contact de la cible avant de se lier plus fortement.

i. Recherche de conformation

Dans ce modèle, l'hypothèse est faite que l'aptamère coexiste sous différentes structures métastables. Ainsi une solution d'aptamère doit être vue comme une population de conformations rendues possibles grâce à des interactions variées entre les éléments constitutifs de la séquence (cf chapitre I). Or ces structures sont stabilisées par la présence d'ions, et notamment Mg^{2+} qui joue un rôle structurant. Toutefois, en augmentant la concentration en Mg^{2+} , certaines structures peuvent alors être favorisées, sans que ce ne soit forcément la conformation la plus favorable à la reconnaissance de la cible (conduisant alors à des pièges cinétiques²¹³). Ainsi, un mécanisme de recherche de conformation se traduit par une augmentation de l'affinité avec la concentration en Mg^{2+} jusqu'à une valeur seuil à partir de laquelle l'affinité décline. La mise en évidence expérimentale d'un tel comportement indiquerait un processus de reconnaissance par recherche de conformation.

Des expériences de reconnaissance entre les aptamères anti-*L*-Tym de 49 et 23 nucléotides ont alors été réalisées pour différentes concentrations en Mg^{2+} , et les K_d et k_{on} déterminés (Fig 99).

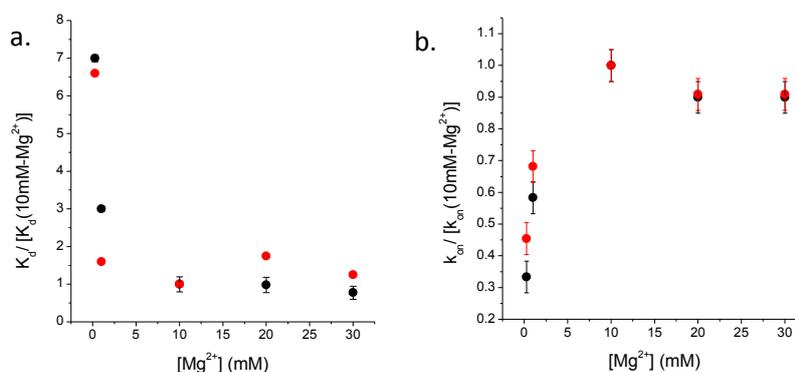


Fig 99 : a. Variations du a. K_d et b. k_{on} normalisées par rapport au K_d et k_{on} déterminés dans les conditions optimales de reconnaissance (*i.e* 10 mM de $MgCl_2$) en fonction de la concentration en Mg^{2+} pour *D-Apta₄₉* et *D-Apta₂₃*.
[Mg^{2+}] = 0,25, 1, 10, 20 et 30 mM, Tris 5 mM, pH 7,4, force ionique constante (140 mM de charges)

D'après les résultats de la figure 99, le magnésium joue un rôle majeur dans la reconnaissance puisque pour 250 μ M, l'affinité de l'aptamère pour sa cible (quelque soit la longueur) est 7 fois moins bonne que pour des concentrations en magnésium supérieur à 10 mM. Au-delà de 10 mM de Mg^{2+} en solution, ni l'affinité, ni la vitesse de complexation ne sont affectées par un excès de magnésium. Le modèle de recherche de conformation semble ainsi inapproprié.

Par ailleurs, une autre remarque peut appuyer cette conclusion. Les résultats obtenus figure 95 montrent que le K_d est indépendant de la séquence en 5' au-delà des 23 nucléotides strictement requis pour la reconnaissance. De plus, des expériences de mesure du k_{on} pour un brin *D-Apta₂₃* allongé en 5' par 26 adénosines montrent que ce brin se comporte cinétiquement comme le brin *D-Apta₄₉*. Il semblerait alors, dans le cadre du modèle de recherche de conformation, que les populations d'aptamères entre le *D-Apta₄₉* et le *D-Apta₂₃*-PolyA soient les mêmes, et donc que ces populations soient indépendantes de la séquence en 5'. Or, plus une séquence est courte, plus la diversité de population est restreinte et les reconfigurations structurales rapides. De ce fait, il semble

peu probable d'estimer une *Recherche de Conformation* cinétiquement limitante dans le cas de la L-Tyrosinamide.

ii. Processus de reconnaissance induite

Dans ce modèle, l'aptamère modifie sa conformation après qu'une reconnaissance faiblement affine a eu lieu. L'étape cinétiquement limitante de la formation du complexe est alors une reconfiguration plus stable autour de la cible.

Les résultats obtenus figure 95 montrent que le gain d'affinité avec la réduction de la séquence en 5' est indépendante de la séquence, et que lorsque 26 adénines sont introduites en 3' de l'aptamère, ce brin conserve un K_d voisin du D-Apta₂₃. L'affinité n'étant pas dépendante du nombre total de nucléotides mais uniquement de la présence de nucléotides en 5', il est très probable qu'une gêne stérique soit à l'origine de la différence d'affinité entre les différentes séquences. Cette observation est compatible avec un processus de reconnaissance induite, dont la dynamique peut être attribuée à l'extrémité 5' de l'aptamère.

Cette gêne aurait alors un impact entropique défavorable dans le processus de reconnaissance. Un moyen de vérifier cette hypothèse serait de faire des mesures d'affinité par ITC avec le brin de 23 nucléotides.

La méthodologie de détermination des paramètres cinétiques d'une reconnaissance aptamère/cible par électrochimie ne permet cependant pas d'avoir accès directement aux constantes cinétiques k_2 et k_{-2} du modèle de processus de reconnaissance induite. En effet, les complexes précurseurs et complexes aptamère/cible ont des coefficients de diffusion identiques.

D'après ces hypothèses, la reconfiguration induite de l'aptamère autour de sa cible est orientée du côté 5'. Cet élément d'information est primordial pour le développement d'un aptacapteur où l'aptamère serait greffé sur une surface. En effet l'immobilisation de la séquence de 23 nucléotides par le côté 5' ou 3' doit entraîner des réponses différentes, en raison des contraintes différentes dans les degrés de liberté entre le côté greffé et le côté libre.

Il a donc été entrepris des expériences de reconnaissance hétérogène de la L-Tym par le D-Apta₂₃ immobilisé sur une surface par microbalance à quartz.

IV-2- Microbalance à quartz électrochimique avec dissipation (eQCM-D)

Une description du fonctionnement de la microbalance à quartz électrochimique avec dissipation est présentée en Annexe V p141.

a. Considération expérimentale

Dans la configuration d'aptacapteur envisagée, les aptamères doivent être greffés sur la surface du quartz recouvert d'or. Pour cela, la stratégie retenue est l'utilisation d'aptamères fonctionnalisés par un thiol en 5' ou en 3'. Une fois les aptamères greffés en surface (cf matériels et méthodes p 113), la

concentration surfacique (Γ_{apta}) nécessite d'être déterminée afin de pouvoir interpréter quantitativement l'affinité des brins immobilisés à partir des variations de fréquences. Pour ce faire, l'aptamère de 23 nucléotides a été modifié à une extrémité par un thiol et à l'autre par un ferrocène (Fig 100). L'électroactivité du ferrocène permet alors de déterminer Γ_{apta} .



Fig 100 : Aptamère anti-L-Tyr utilisé pour la fonctionnalisation des quartzs.

Ces brins ont été chimisorbés sur or après réduction du pont disulfure par du tris(2-carboxyéthyl)phosphine (TCEP) pendant une heure à température ambiante et à l'obscurité. Cette réaction a pour conséquence de cliver la molécule en une molécule d'aptamère 5'-Fc-D-Apta₂₃-(CH₂)₆-SH-3' et une molécule HO-(CH₂)₃-O-(CH₂)₂-SH. En présence d'une surface d'or, il y aura donc un codépôt de ces molécules.

Après la fonctionnalisation par les aptamères, la surface d'or non recouverte est comblée grâce à une molécule diluante, le mercaptohexanol (MCH, 1mM dans 1M de NaClO₄), largement utilisée dans le développement des aptacapteurs électrochimiques¹⁴⁰⁻¹⁴². La présence de MCH limitera les interactions non-spécifiques entre l'ADN et l'or.

b. Détermination de la concentration surfacique en aptamère

L'injection d'aptamère dans la chambre de réaction du module de Microbalance à Quartz électrochimique avec Dissipation (e-QCMD) provoque une forte variation de fréquence ($\Delta f = -35$ Hz) signifiant que l'aptamère s'est déposé à la surface du quartz (Fig 101). La variation de la dissipation ($\Delta D = +1,1$) est due au caractère viscoélastique de la couche d'ADN greffée. Le rinçage entraîne une forte variation de la dissipation ($\Delta D = +0,8$) et une légère augmentation de la masse ($\Delta f = -2$ Hz), ce qui pourrait indiquer une modification d'hydratation de la couche. A cette étape de la fonctionnalisation, la détection du ferrocène en 5' peut se faire par voltammétrie cyclique, et Γ_{apta} est déterminée à partir de l'intégration des pics d'oxydation et de réduction.

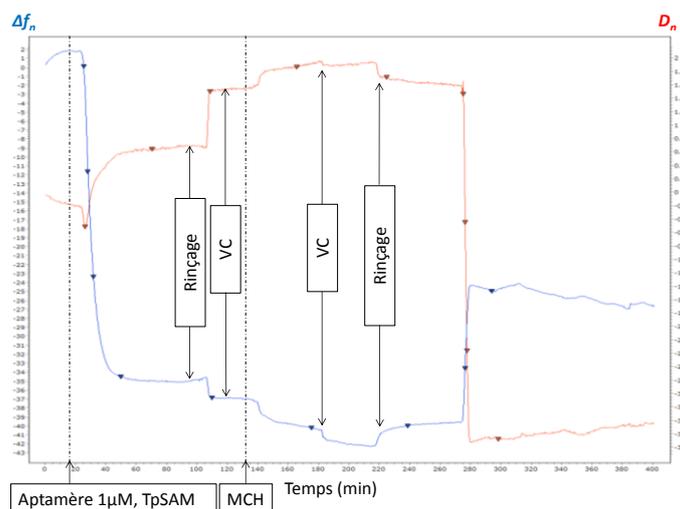


Fig 101 : Variation de fréquence Δf et de dissipation ΔD au cours d'une fonctionnalisation d'un quartz par l'aptamère Fc - 5'- Apta₂₃- 3'- SS -(CH₂)₂- O - (CH₂)₃- OH préalablement réduit par TCEP, à température ambiante.
VC : Voltammétrie Cyclique

La fonctionnalisation par le MCH provoque une légère variation de fréquence ($\Delta f = -2$ Hz) et de dissipation ($\Delta D = +1,1$). La caractérisation électrochimique montre un courant capacitif plus faible après l'introduction de MCH. L'intégration des pics du ferrocène est similaire avant et après ce dépôt (fig 102).

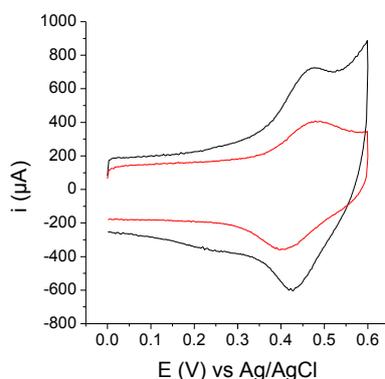


Fig 102 : voltammogrammes réalisés **avant** et **après** le dépôt de MCH
 $v = 20 \text{ V.s}^{-1}$ vs Ag/AgCl, température ambiante.

Quantitativement, l'intégration des pics d'oxydation et de réduction pour deux expériences indique que 5,5 et 6,5 pmol/cm² d'aptamère ont été greffées à la surface du quartz. Ces valeurs sont en bon accord avec la littérature^{138,141,142}.

c. Détermination des K_d pour différentes stratégies de greffage

Quatre configurations d'aptamère ont été testées dans ce travail (Fig 103) : le greffage en 5' ou en 3' mais également des séquences allongées de 6 thymines pour éloigner la séquence de la surface. Cette dernière configuration permet d'éviter deux gênes éventuelles :

- celle provoquée par la proximité du MCH avec la cytosine terminale en 3' indispensable à la reconnaissance ;

- celle induite par une trop grande proximité de la surface : un repliement trop conséquent du côté 5' vers l'extrémité 3' sera dans ce cas peu probable.

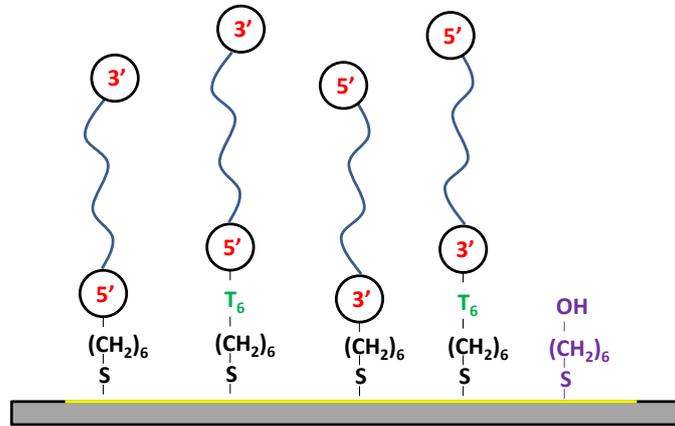


Fig 103 : Représentation des différentes stratégies de greffage : T₆ = chaîne nucléotidique de 6 thymines, en violet le MCH.

i. Greffage du côté 3'

Dans cette expérience, deux quartz ont été fonctionnalisés en parallèle par un aptamère avec ou sans les 6 thymines (Fig 103). Le protocole de détermination des K_d consiste à introduire une concentration donnée de *L-Tym* puis à faire circuler le tampon sans cible pour régénérer la surface.

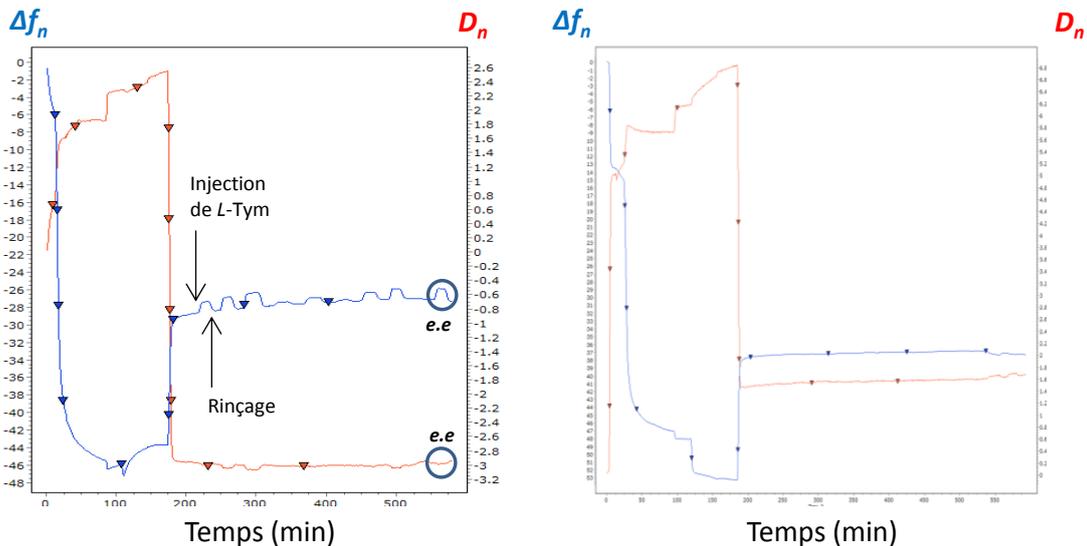


Fig 104 : Variations de fréquence et de dissipation pour un quartz fonctionnalisé par
a. 5'-Apta₂₃-C₆-T₆-SH-3' et b. 5'-Apta₂₃-C₆-SH-3'.

Pour l'aptamère allongé de 6 thymines, l'ajout de concentrations croissantes de *L-Tym* (de 0,5 à 100 μ M) provoque une augmentation de Δf (perte de masse) et une diminution de D (diminution de la

viscoélasticité et/ou de la hauteur de la couche). Cette variation est réversible avec le rinçage. En présence de *D*-Tym à 2 mM ($t = 520$ min), aucune variation de Δf ou de D n'est enregistrée, montrant ainsi l'énantiosélectivité de la reconnaissance. De plus, 20 μM de *L*-Tym dans 2mM de *D*-Tym entraîne une réponse en fréquence comme en dissipation, ce qui montre bien la capacité de l'aptamère à détecter des *e.e* (Fig 104.a).

Aucune variation de Δf et de ΔD n'est enregistrée dans le cas de l'aptamère greffé sans les 6 thymines (Fig 104.b). Cela prouve que les variations observées figure 104.a sont bien spécifiques à la configuration de greffage.

L'analyse de ces variations de fréquence en utilisant le modèle de Sauerbrey permet de tracer $\Delta m = f([L\text{-Tym}])$. Grâce à une isotherme de Langmuir (Fig 105), un K_d^{app} d'environ 5 μM peut être évalué, en admettant une variation maximale de masse de 30 ng.

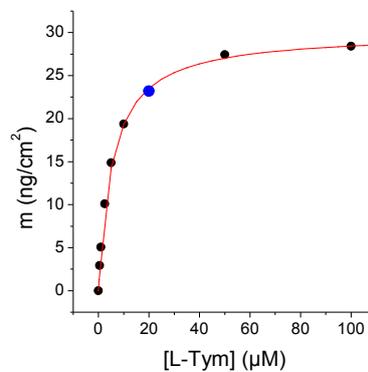


Fig 105 : Perte de masse enregistrée en fonction de la concentration de *L*-Tym.

Le point **bleu** est une mesure d'excès énantiomérique à 1 % (20 μM de *L*-Tym dans 2 mM de *D*-Tym).

Ici, la constante de dissociation que nous définissons est dite « apparente » car le phénomène de reconnaissance est analysé indirectement, via la perte d'eau engendrée par la reconfiguration de l'aptamère lors de la complexation de la cible.

ii. Greffage du côté 5'

La même expérience a été faite avec le couple d'aptamère avec et sans les 6 thymines mais cette fois avec la fonction thiol du côté 5' de l'aptamère (Fig 106).

Dans ce cas, le brin sans les thymines ne montre toujours pas de signe de reconnaissance de la cible, tandis que le brin avec les 6 thymines interagit spécifiquement avec la *L*-Tym. En effet les variations de fréquence et de dissipation sont réversibles après rinçage. De la même manière que son homologue greffé en 3', ce brin conserve une énantiosélectivité (pas de réponse à la présence de *D*-Tym) et une capacité de reconnaissance de la *L*-Tym à 1 % dans une matrice de *D*-Tym.

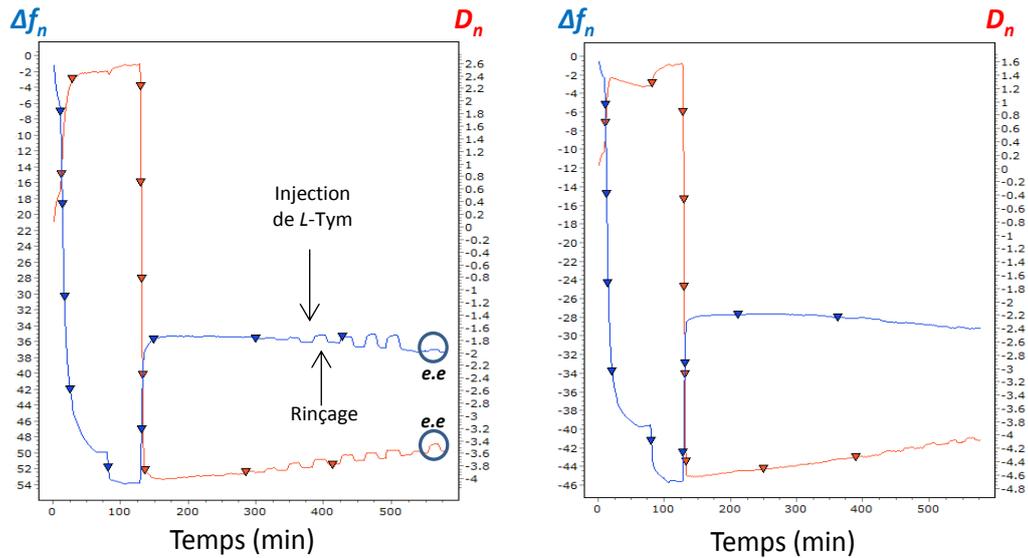


Fig 106 : Variations de fréquences et de dissipation pour un quartz fonctionnalisé par a. 5'- HS - C₆ - T₆ - Apta23-3', et b. 5'- HS - C₆ - Apta23 - 3'.

L'analyse des variations de masse calculées par l'application de la relation de Sauerbrey à partir de variations de fréquence nous permet de déterminer un K_d^{app} d'environ 80 μM et une variation maximale de masse de 34,28 ng/cm^2 (Fig 107).

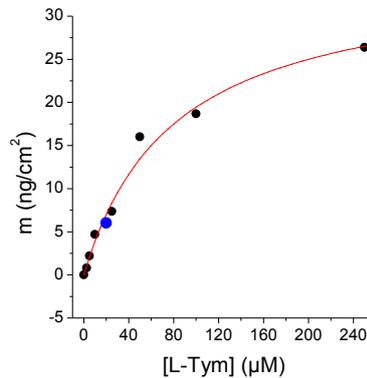


Fig 107 : Perte de masse enregistrée en fonction de la concentration de L-Tym.
Le point **bleu** est une mesure d'excès énantiomérique à 1 % (20 μM de L-Tym dans 2mM de D-Tym).

Outre cette différence de K_d (80 μM vs 5 μM) pour les 2 types de greffage (3' et 5') des séquences contenant 6 thymines, la variation de dissipation en présence de L-Tym évolue dans des sens opposés : elle diminue dans le cas du greffage en 3' et elle augmente dans le cas du greffage en 5'. Ce comportement reproductible demeure inexpliqué à ce jour.

IV-3- Conclusion

Ce chapitre exploratoire a permis d'optimiser la séquence d'aptamère en la réduisant à 23 nucléotides, en ne faisant que des hypothèses sur la structuration de la séquence en solution. Cette séquence s'est avérée plus affine pour sa cible, et en utilisant des brins de 23 nucléotides allongés en 5' ou en 3' par des séquences de tailles variables de poly-adenosine, nous avons pu mettre en

évidence un effet stérique expliquant la différence d'affinité entre des séquences de 23 et 49 nucléotides. La dynamique de reconnaissance orientée vers le côté 5' a pu être confirmée par une étude en configuration d'aptacapteur, montrant alors la complémentarité des études en homogène avant celles en configuration hétérogène.

Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse montre pour la première fois que l'électrochimie en condition homogène peut être utilisée à des fins analytiques pour caractériser l'affinité d'un récepteur pour sa cible (électroactive ou non), en discriminant les ligands libres et liés par leurs coefficients de diffusion. L'électrochimie apparaît alors comme un outil pratique, performant et compétitif pour l'étude d'interactions aptamère/cible. D'une part parce que la méthodologie de détermination de la constante de dissociation est simple et rapide à mettre en œuvre avec une sensibilité telle qu'il est possible de déterminer un excès énantiomérique de 0,1 %, et d'autre part parce que la méthodologie de détermination des paramètres cinétiques de reconnaissance permet d'explorer les mécanismes moléculaires de complexation récepteur/cible. Ces performances n'auraient cependant pas pu être atteintes sans les propriétés remarquables des aptamères, à savoir leur affinité, sélectivité et énantiosélectivité.

En alliant à la fois l'analyse quantitative (détermination de K_d , d'*e.e.*, de k_{on} et k_{off}) et qualitative (par l'intermédiaire d'analogues structuraux, de sondes et de brins mutés/tronqués) ces méthodologies pourraient trouver leur place dans les services de chimie analytique comme dans les laboratoires de recherche fondamentale. En effet, dans le premier cas, l'adaptation de ces techniques pour des analyses (bio)chimiques concrètes (pour le secteur médical ou environnemental) pourrait d'ores et déjà être envisagée. Dans le second cas, ces méthodologies pourraient contribuer à la compréhension des phénomènes de reconnaissance bimoléculaire impliquant des aptamères, notamment en combinant ces méthodes avec une technique d'analyse structurale des acides nucléiques comme le dichroïsme circulaire ou la RMN.

Ces techniques explorées ici peuvent encore être optimisées et adaptées à d'autres systèmes. A propos de la technique de détermination des constantes thermodynamiques de complexation, une stratégie consistant à immobiliser des aptamères sur des objets de taille micrométrique permettrait de distinguer les formes libres et liées des cibles avec une plus grande amplitude (plus grande variation de coefficient de diffusion) tout en permettant des analyses avec des récepteurs de moins bonne affinité (gamme de concentration en aptamère utilisable plus large). Cette stratégie pourrait également être utilisée pour la détection de plusieurs analytes simultanés (multiplexage).

Dans le cas de la méthodologie de détermination des paramètres cinétiques de complexation, des analyses à température contrôlée permettraient de déterminer les variations enthalpiques et entropiques de n'importe quel complexe aptamère/cible. Ce dispositif peut également être utilisé pour l'étude de mécanismes enzymatiques en condition homogène.

Matériels et Méthodes

Titration des Aptamères

Les aptamères en série (*D*) et (*L*) ont été synthétisés et purifiés par RP-HPLC par Eurogentec (Angers, France). Ces aptamères sont reçus sous forme lyophilisée dans un tube type Eppendorf. Après avoir été solubilisés, leurs concentrations sont systématiquement mesurées par spectroscopie UV-Visible avec un NanoDrop 2000 (ThermoFisher).

A la réception, Eurogentec fournit une fiche technique détaillée précisant la quantité de matière envoyée après la purification. Dans ce travail, les aptamères étaient resuspendus à 1,25 mM.

A partir de cet échantillon mère, plusieurs solutions de 0,5 à 5 μM sont préparées et leurs absorbances mesurées à 260 nm. La figure M1 présente un exemple de variation de la densité optique en fonction de la concentration théorique en aptamère. Ces résultats peuvent être ajustés par une droite.

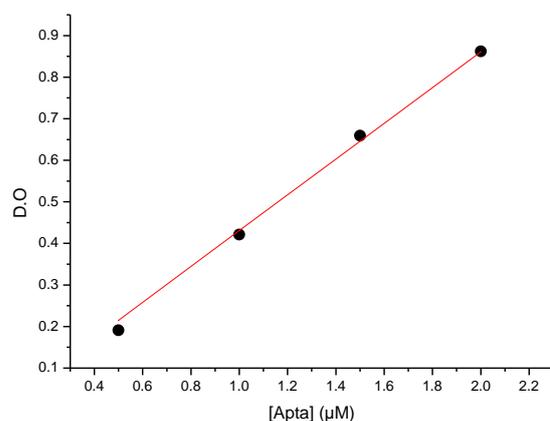


Fig M1 : $D.O = f([D\text{-Apta}_{49}])$ pour un aptamère de 49 nucléotides.

$$\text{Pente} = 430533 \text{ M}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}, R^2 = 0.9966$$

D'après la loi de Beer Lambert :

$$DO = \varepsilon \cdot l \cdot C_i$$

Où ε est le coefficient d'extinction molaire en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, l est le trajet optique en cm et C_i la concentration en espèce i . Pour un trajet optique de 1 cm, l'ajustement linéaire des résultats expérimentaux permet d'obtenir une valeur expérimentale ε , pente de la régression linéaire. Dans l'exemple présenté figure M1, la pente est de $430533 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour une valeur théorique de $463600 \text{ M}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, soit 93 % de la valeur théorique. La concentration de la solution mère n'est donc pas de 1,25 mM mais 1,16 mM.

Electrodes sérigraphiées

Une sérigraphieuse semi-automatique DEK modèle 65 (Presco, USA) a été utilisée pour déposer successivement de fines couches d'encre sur des films plans de téréphthalate de polyéthylène à travers des grilles d'acier inoxydable (230 fils d'acier inoxydable par pouce carré). Ce dispositif permet de sérigraphier 20 électrodes en même temps. L'électrode de travail et la contre électrode sont préparées à partir d'une encre Electrodrag PF-407A (Acheson Colloids Co), tandis que la pseudo électrode de référence est préparée à partir d'encre d'argent Electrodrag 418S (Acheson Colloids Co).

Une première couche d'argent est déposée pour former le contact électrique puis séchée dans un four 15 minutes à 120°C. Puis la couche de carbone permettant de former l'électrode de travail et la contre électrode est appliquée et séchée 15 minutes à 120°C. Enfin, une couche diélectrique hydrophobe (Vinilfast 36, Kiian, Italie) est appliquée et séchée dans les mêmes conditions afin d'isoler chaque cellule électrochimique de 5 mm de diamètre, ce qui permet à un volume de 50 μl de solution d'être maintenue à la surface des électrodes sans s'étaler.

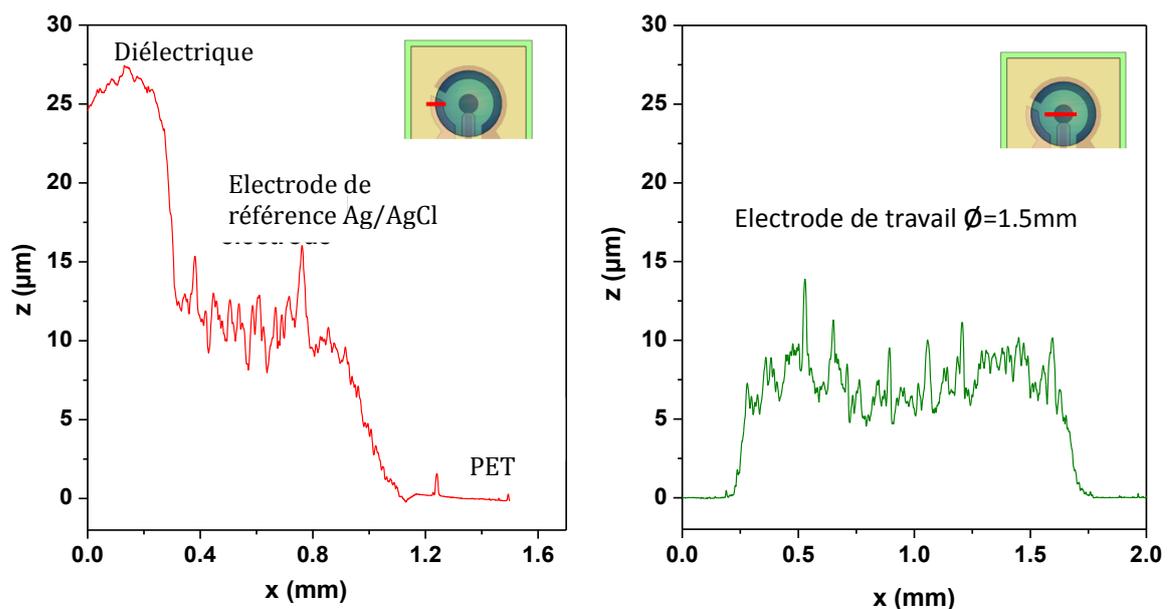


Fig M2 : Profil transversal des électrodes le long d'une coupe indiquée en rouge. A gauche, à proximité du bord de la cellule électrochimique, à droite la coupe est réalisée à travers l'électrode de travail.

L'épaisseur des couches a été déterminée grâce à un profilomètre (modèle Alpha-Step 500, KLA-Tencor, USA, Fig M2). L'épaisseur de la couche d'argent est de $10 \pm 0,5 \mu\text{m}$ et celle de carbone de $6 \pm 0,5 \mu\text{m}$. La couche d'isolant quant à elle est de $15 \pm 0,5 \mu\text{m}$.

Protocole expérimental de détermination des constantes thermodynamiques

Toutes les procédures électrochimiques ont été réalisées avec un AUTOLAB PGSTAT 12 potentiostat/galvanostat contrôlé par ordinateur. Les données étaient acquises par le logiciel GPES 4.9007 (EcoChemie, Pays Bas).

Afin de déterminer le K_d d'un aptamère pour la *L-Tym* le protocole suivant a été appliqué :

- Cycliser 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 1,2 V vs Ag/AgCl à 500 mV.s^{-1} ;
- Déposer 50 μl de solution de BSA (Bovin Serum Albumine) à 1 g/L pendant 10 min. Cette étape a pour but de limiter l'adsorption de l'osmium et de la *L-Tym* à la surface de l'électrode ;
- Rincer l'électrode 3 fois avec 50 μl de tampon Tris pH 7,4, $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{MgCl}_2] = 10 \text{ mM}$;
- Cycliser 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 0,8 V vs Ag/AgCl à 500 mV.s^{-1} en tampon ;
- Changer la goutte de 50 μl ;
- Placer le système dans une enceinte humide pour limiter l'évaporation de la goutte ;
- Introduire le complexe d'osmium en ajoutant 0,2 μl d'une solution à 250 μM ($C_{os} = 1 \mu\text{M}$) ;
- Cycliser 10 fois l'électrode sérigraphiée entre 0 et 0,8 V vs Ag/AgCl à 500 mV.s^{-1} ;
- Introduire 5 μM de *L-Tym* en ajoutant 0,2 μl d'une solution à 1,25 mM ($C_T^0 = 5 \mu\text{M}$) ;
- Cycliser l'électrode **une seule fois** à 50 mV.s^{-1} entre 0,3 et 0,75 V vs Ag/AgCl puis **agiter vivement la goutte à la pipette**. Recommencer jusqu'à ce que l'oxydation catalytique de la *L-Tym* soit stable (typiquement 5 à 7 fois) ;
- Introduire 0,2 μl de solutions d'aptamère :
 - à 250 μM pour incrémenter la concentration en aptamère de 1 μM ;
 - à 625 μM pour incrémenter la concentration en aptamère de 2,5 μM ;
 - à 1250 μM pour incrémenter la concentration en aptamère de 5 μM ;

Les points de gamme réalisés sont 0 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 7,5 ; 10 ; 12,5 ; 15 ; 20 et 25 μM en aptamère.

Après chaque addition, 3 voltammogrammes de la solution sont réalisés et enregistrés, en **agitant vivement la solution entre chaque cycle**. Le pic d'oxydation du dernier voltammogramme est retenu comme valeur expérimentale.

- A la fin de l'expérience, s'assurer que le volume de la goutte est toujours de 50 μl .
- Pour la représentation graphique $i/i^\circ = f([D\text{-Apta}_x])$, i° est recalculé en fonction de la dilution.
- Chaque détermination de K_d est réalisée à partir d'au moins trois expériences, avec trois électrodes différentes et différents lots d'aptamères. Ainsi, des barres d'erreur $< 5 \%$ sont calculées.

Protocole expérimental de détermination des constantes cinétiques

Toutes les procédures électrochimiques ont été réalisées avec un AUTOLAB PGSTAT 12 potentiostat/galvanostat contrôlé par ordinateur. Les données étaient acquises par le logiciel GPES 4.9007 (EcoChemie, Pays Bas).

L'électrode tournante utilisée est une électrode disque-anneau (disque de carbone vitreux, anneau de platine) de *Princeton Applied Research, Model 636 RDE*.

Afin de contrôler finement la position de l'électrode sérigraphiée sous l'électrode tournante, un dispositif (*Sutter Instrument*) destiné à la micromanipulation a été utilisé. Ce dispositif permet de contrôler le positionnement en x , y , z d'une électrode sérigraphiée immobilisée en vis-à-vis de l'électrode tournante (Fig M3).

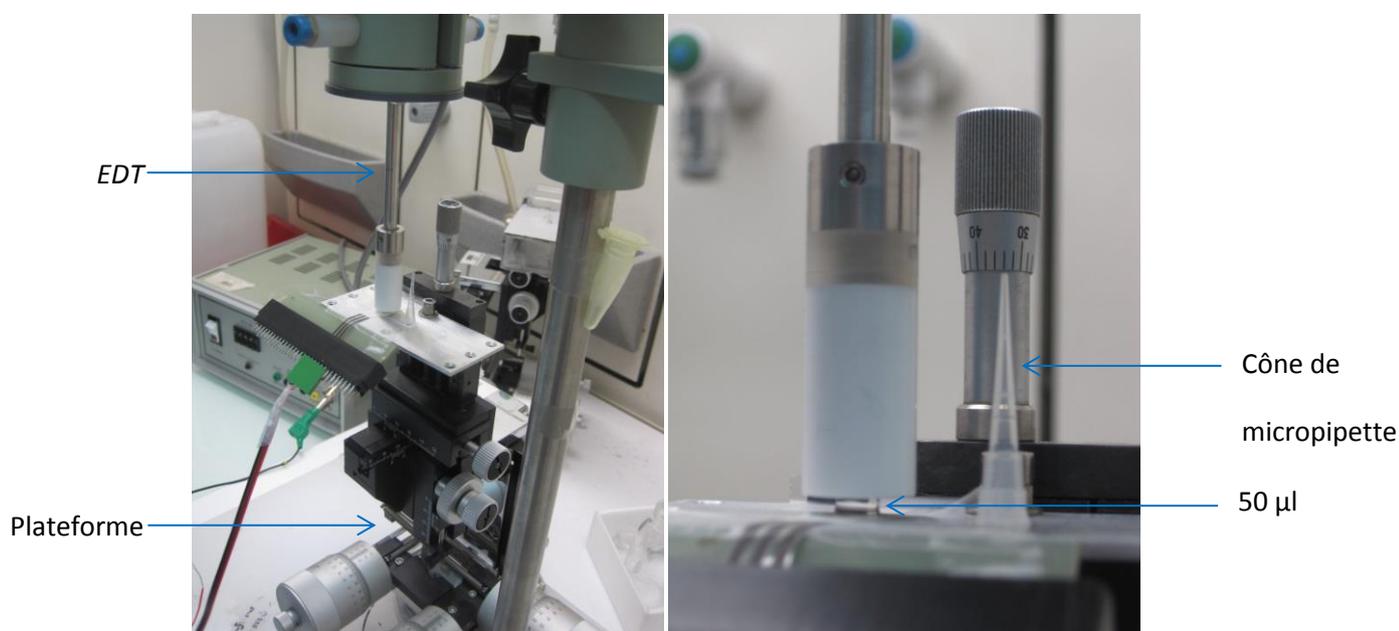


Fig M3 : A gauche le dispositif d'électrode tournante, à droite le dispositif de micromanipulation.

Avant toute expérience les électrodes sérigraphiées sont prétraitées comme suit :

- 10 cycles entre 0 et 1,2 V vs Ag/AgCl à $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$;
- Dépôt de 50 μl de solution de BSA (Bovin Serum Albumine) à 1 g/L pendant 10 min ;
- 3 rinçages avec 50 μl de tampon Tris pH 7,4, $[\text{NaCl}] = 50 \text{ mM}$, $[\text{MgCl}_2] = 10\text{mM}$ en agitant bien avec la pipette ;
- 10 cycles entre 0 et 0,8 V vs Ag/AgCl à $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ en tampon;

L'électrode tournante est prétraitée comme suit :

- polir sur alumine 0,3 μm pendant une minute ;
- Rincer à l'acétone ;
- Placer l'électrode dans un sonicateur quelques secondes dans l'acétone ;
- Dépôt de 50 μl de solution de BSA (Bovin Serum Albumine) à 1 g/L pendant 10 min ;
- Rincer 3 fois avec 50 μl de tampon en agitant bien avec la pipette.

Une fois l'électrode de travail positionnée en face de l'électrode tournante, une goutte de 48 μl contenant le complexe d'osmium (II) à 5 μM est déposée sur l'électrode de travail. Celle-ci est alors surélevée en z à l'aide du dispositif de micromanipulation jusqu'à ce que la goutte de 50 μl entre en contact avec l'électrode tournante. L'écart entre électrode tournante et électrode de travail est alors d'environ 2,5 mm.

Une faible vitesse de rotation est initialement appliqué (500 rpm). Il est impératif qu'à faible vitesse la forme de la goutte en rotation ne se distingue pas de celle au repos. Si ce n'est pas le cas, c'est que l'électrode de travail est mal positionnée vis-à-vis de l'électrode tournante. Il faut donc réajuster sa position. Puis, l'électrode est progressivement mise en rotation jusqu'à 2500 rpm.

La mesure de complexation entre la *L-Tym* et son aptamère est obtenue en utilisant le protocole suivant :

- Lancer la chronoampérométrie à 0,7 V vs Ag/AgCl ;
- A t = 60 s, injecter 1 μl d'une solution de *L-Tym* à 250 μM ($C_T^0 = 5 \mu\text{M}$) ;
- A t = 90 s, injecter 1 μl d'une solution d'aptamère concentré 50 fois.
- A t = 200s, la mesure s'arrête.

Chaque injection d'aptamère est reproduite au moins 3 fois avec des électrodes différentes et des lots différents d'aptamère.

L'ajustement numérique est réalisé à partir d'Excel ou de Gepasi.

e-QCMD

Le module principal des eQCM-D vendues par Q-Sense est une chambre (Fig M4) dans laquelle est installé le quartz, et l'étanchéité est assurée par des joints toriques. Au travers de cette chambre peut circuler un flux afin que la surface du quartz puisse être séquentiellement en présence de différents analytes. Les mesures en configuration de QCM-D sont donc réalisées en continu.

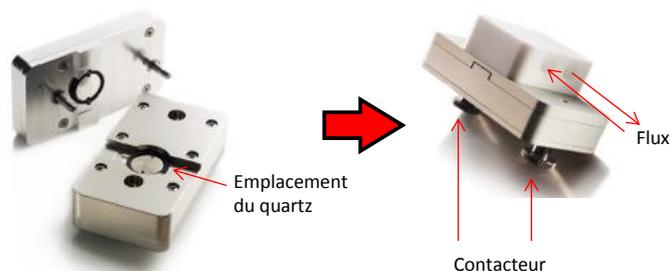


Fig M4 : Module principal de eQCM-D fourni par Q-Sense. Les contacteurs sous la chambre servent à l'acquisition des signaux.

Pour la configuration électrochimique, la surface d'or en contact avec le flux sert d'électrode de travail. Deux orifices sont alors dédiés à l'introduction d'une électrode de référence et d'une contre électrode, en contact avec la solution dans la chambre de mesure.

Préalablement à leur utilisation, les quartz recouverts d'or sont irradiés par un traitement UV-ozone pendant 10 minutes puis immergés dans de l'éthanol et mis sous agitation pendant 20 minutes. Après séchage sous flux d'azote, ces quartz sont immédiatement introduits dans la cellule de mesure.

Toutes les expériences ont été réalisées en Tampon Tris 5mM, NaClO_4 1M pour la fonctionnalisation et en tampon Tris 5 mM, NaClO_4 50 mM et $\text{Mg}[\text{ClO}_4]_2$ 10 mM, le pH ajusté à 7,4 à l'acide perchlorique.

Références bibliographiques

Chapitre I :

- [1] Augustin Fresnel ; *Mémoire sur la double réfraction que les rayons lumineux éprouvent en traversant les aiguilles de cristal de roche suivant les directions parallèles à l'axe*, extrait du tome Ier des œuvres complètes par Sénarmont, Verdet & Léonor Fresnel, Imprimerie impériale, 1922
- [2] Oeuvres de Pasteurs réunies par Pasteur Vallery-Radot, tome premier, *Dissymétrie moléculaire*, librairie de l'académie de médecine, 1922
- [3] J.M. Bijvoet ; *Phase determination in direct Fourier synthesis of crystal structures*, Proc. K. Ned. Akad. Wet. B, 313-314, 1949
- [4] R.S. Cahn, C.K. Ingold, V. Prelog ; *Specification of Molecular Chirality*, Angew. Chem. Int. Ed., 385–415, 1966
- [5] J.E. Elsiva, D.P. Galvin, J.P. Dworkin ; *Cometary glycine detected in samples returned by Stardust*, Meteoritics & Planetary science , 1323-1330, 2009
- [6] P. Schmitt-Kopplin, G. Zelimir, R.D. Gougeon, A. Fekete, B. Kanawati, M. Harir, I. Gebefuegi, G. Eckel, N. Hertkorn ; *High molecular diversity of extraterrestrial organic matter in Murchison meteorite revealed 40 years after its fall*, Proc. Nat. Acad. Sci., 2763–2768, 2010
- [7] R.A. Rosenberg, M.A. Haija, P.J. Ryan ; *Chiral-selective chemistry induced by spin polarized secondary electrons from magnetic substrate*, Phys. Rev. Lett., 17830-17834, 2008
- [8] A.S. Burton, J.E. Elsiva, J.E. Hein, D.P. Galvin, J.P. Dworkin ; *Extraterrestrial amino acids identified in metal-rich CH and CB carbonaceous chondrites from Antarctica*, Meteoritics & Planetary science, 390-402, 2013
- [9] M. Di Giulio ; *The Origin of the genetic code: theories and their relationships, a review*, BioSystems, 175–184, 2005
- [10] M.J. Schell, M.E. Molliver, S.H. Snyder ; *D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release*, Proc. Nat. Acad. Sci., 3948-3952, 1995
- [11] J. De Miranda, A. Santoro, S. Engelender, H. Wolosker ; *Human serine racemase: molecular cloning, genomic organization and functional analysis*, Gene, 183–188, 2000
- [12] S. Etoh, K. Hamase, A. Morikawa, T. Ohgusu, K. Zaitso ; *Enantioselective visualization of D-alanine in rat anterior pituitary gland: localization to ACTH-secreting cells*, Anal. Bioanal. Chem., 217-223, 2009
- [13] B. Holmstedt, H. Frank, B. Testa, R. Alan ; *The use of enantiomers in biological studies: an historical review*, Chirality and Biological Activity, 1–14, 1990
- [14] L.H. Easson, E. Stedman ; *Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action*, Biochem. J., 1257–1266, 1933
- [15] B.K. Patel, A.J. Hutt ; *Stereoselectivity in Drug Action an Disposition: an Overview*, publié par Indra K. Reddy, et Reza Mehvar, 2004
- [16] P.N. Patil, J.B. Lapidus, A. Tye ; *Steric aspects of adrenergic drugs*, J. Pharm. Sci., 1205–1234, 1970
- [17] A.G. Ogston ; *Interpretation of Experiments on Metabolic processes, using Isotopic Tracer Elements*, Nature, 963-963, 1948

- [18] A.G. Ogston ; *Conditions for Differential Reaction of 'identical' Chemical Groups*, Nature, 1462-1462, 1958
- [19] R. Bentley ; *Ogston and the development of prochirality theory*, Nature, 673–676, 1978
- [20] V.I. Sokolov, N.S. Zefirov ; *Enantioselectivity in two-points binding: the model of rocking tetrahedron*, Dokl. Akad. Nank., 1382–1383, 1991
- [21] T.D. Booth, D. Wahnon, I.W. Wainer ; *Is chiral recognition a three-point process?*, Chirality, 96–98, 1997
- [22] T.D. Booth, I.W. Wainer ; *Investigation of the enantioselective separations of α -alkylarylcarboxylic acids on an amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase using quantitative structure-enantioselective retention relationships Identification of a conformationally driven chiral recognition mechanism*, J. Chromatogr. A, 157–169, 1996
- [23] A.D. Mesecar, D.E. Koshland ; *Structural Biology: A new model for protein stereoselectivity*, Nature, 614–615, 2000
- [24] W.H. Pirkle, J.M. Finn, J.L. Schreiner, B. C. Hamper ; *A widely useful chiral stationary phase for the high-performance liquid chromatography separation of enantiomers*, J. Am. Chem. Soc., 3964-3966, 1981
- [25] W.H. Pirkle, M.H. Hyun, B. Bank ; *A rational approach to the design of highly-effective chiral stationary phases*, J. Chromatogr. A, 585-604, 1984
- [26] V.A. Davankov, S.V. Rogozhin ; *Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: Stereoselective effects in α -amino acid copper(II) complexes*, J. Chromatogr. A, 284-312, 1971
- [27] D.W. Armstrong, W. Demond ; *Cyclodextrin Bonded Phases For the Liquid Chromatographic Separation of Optical, Geometrical, and Structural Isomers*, J. Chromato. Sci., 411-415, 1984
- [28] T. Shinbo, T. Yamaguchi, K. Nishimura, M. Sugiura ; *Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings*, J. Chromatogr. A, 145-153, 1987
- [29] G. Blaschke, J. Maibaum ; *Chromatographic resolutions : XIV. Optical resolution of the racemic anticancer drug ifosfamide and other chiral oxazaphosphorines*, J. Chromatogr. A, 329-334, 1986
- [30] K.R. Lindner, A. Mannschreck ; *Separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography on triacetylcellulose*, J. Chromatogr. A, 308-310, 1980
- [31] J. Haginaka ; *Protein-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography enantioseparations*, J. Chromatogr. A, 253-273, 2001
- [32] D.W. Armstrong, K.L. Rundlett, J.R. Chen ; *Evaluation of the Macrocyclic Antibiotic Vancomycin as a Chiral Selector for Capillary Electrophoresis*, Chirality, 496-509, 1994
- [33] J.A. Cruz-Aguado, G. Penner ; *Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers*, Anal. Chem., 8853–8855, 2008
- [34] B.T. Nguyen, E.V. Anslyn ; *Indicator displacement assay*, Coord. Chem. Rev., 3118–3127, 2006
- [35] D. Leung, E.V. Anslyn ; *Using Enantioselective Indicator Displacement Assays To Determine the Enantiomeric Excess of α -Amino Acids*, J. Am. Chem. Soc., 12328–12333, 2008

- [36] G. Mirri, S.D. Bull, P.N. Horton, T.D. James, L. Male, J.H. Tucker ; *Electrochemical Method for the Determination of Enantiomeric Excess of Binol Using Redox-Active Boronic Acids as Chiral Sensors*, J. Am. Chem. Soc., 8903–8905, 2010
- [37] G. Wuff, A. Sahran ; *Über die Anwendung von enzymanalog gebauten Polymeren zur Racemattrennung*, Angew. Chem., 364, 1972
- [38] T. Takagishi, J.M. Klotz ; *Macromolecule-small molecule interactions: introduction of additional binding sites in polyethyleneimine by disulfide cross-linkages*, Biopolymers, 483-491, 1972
- [39] K. Mosbach ; *Molecular Imprinting*, Trends Biochem. Sci., 9-14, 1994
- [40] G. Vlatakis, L.I. Anderson, R. Müller, K. Mosbach ; *Drug assay Using Antibody Mimics Made by Molecular Imprinting*, Nature, 645-647, 1993
- [41] L.I. Andersson, K. Mosbach ; *Enantiomeric Resolution on Molecular Imprinted Polymers Prepared with only Non-Covalent and Non-ionic Interactions*, J. Chromatogr., 313-322, 1990
- [42] O. Ramström, I.A. Nicholls, K. Mosbach ; *Synthetic peptide receptor mimics: highly stereoselective recognition in non-covalent molecularly imprinted polymers*, Tetrahedron : Assymetry, 649-656, 1994
- [43] L. Fischer, R. Müller, B. Ekberg, K. Mosbach ; *Direct enantioseparation of β -adrenergic blockers using a chiral stationary phase prepared by molecular imprinting*, J. Am. Chem. Soc., 9358-9360, 1991
- [44] M. Kempe, K. Mosbach ; *Chiral separation using molecular imprinted heteroaromatic polymers*, J. Mol. Recognit., 25-29, 1993
- [45] M. Siemann, L.I. Andersson, K. Mosbach ; *Separation and detection of macrolide antibiotics by HPLC using macrolide-imprinted synthetic polymers as stationary phases*, J. Antibiot., 89-91, 1997
- [46] B. Sellergren ; *Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 227–252, 2001
- [47] K. Landsteiner ; *The Specificity of Serological Reactions*, Dover Publications, New York, 1962
- [48] O. Hofstetter, H. Hofstetter, V. Schurig, M. Wilchek, B. Green ; *Antibodies Can Recognize the Chiral Center of Free α -Amino Acids*, J. Am. Chem. Soc., 3251-3252, 1998
- [49] O. Hofstetter, H. Hofstetter, V. Schurig, M. Wilchek, B. Green ; *Production and Applications of Antibodies Directed Against the Chiral Center of alpha-Amino Acids*, Int. J. Bio-Chromato., 165-174, 2000
- [50] O. Hofstetter, H. Lindstrom, H. Hofstetter ; *Effect of the mobile phase on antibody-based enantiomer separations of amino acids in high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 85-95, 2004
- [51] A.C. Lua, T.Y. Chou ; *Preparation of immunoaffinity columns for direct enantiomeric separation of amphetamine and/or methamphetamine*, J. Chromatogr. A, 191-199, 2002
- [52] T.K. Nevanen, L. Soderholm, K. Kukkonen, T. Suortti, T. Teerinen, M. Linder ; *Efficient enantioselective separation of drug enantiomers by immobilised antibody fragments*, J. Chromatogr. A, 89-97, 2001
- [53] T.K. Zeleke, J.M. Zeleke, H. Hofstetter, O. Hofstetter ; *Stereoselective antibodies to free α -hydroxy acids*, J. Mol. Recognit., 334-340, 2005
- [54] C. Ravelet, E. Peyrin ; *Recent developments in the HPLC enantiomeric separation using chiral selectors identified by a combinatorial strategy*, J. Separat. Sci., 1322-1331, 2006

- [55] M.D. Weingarten, K. Sekanina, W.C. Still ; *Enantioselective Resolving Resins from a Combinatorial Library. Kinetic Resolution of Cyclic Amino Acid Derivatives*, J. Am. Chem. Soc., 9112-9113, 1998
- [56] W.H. Pirkle, D.W. House, J.M. Finn ; *Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases*, J. Chromatogr. A, 143-158, 1980
- [57] E. Brahmachary, F.H. Ling, F. Svec, J.M.J. Fréchet ; *Chiral recognition: design and preparation of chiral stationary phases using selectors derived from Ugi multicomponent condensation reactions and a combinatorial approach*, J. Comb. Chem., 441-450, 2003
- [58] K. Lewandowski, P. Murer, F. Svec, J.M.J. Fréchet ; *A Combinatorial Approach to Recognition of Chirality: Preparation of Highly Enantioselective Aryl-Dihydropyrimidine Selectors for Chiral HPLC*, J. Comb. Chem., 105-112, 1999
- [59] M. Chiari, V. Desperati, E. Manera, R. Longhi ; *Combinatorial Synthesis of Highly Selective Cyclohexapeptides for Separation of Amino Acid Enantiomers by Capillary Electrophoresis*, Anal. Chem., 4967-4973, 1998
- [60] C. Tuerk, L. Gold ; *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase*, Science, 505-510, 1990
- [61] A.D. Ellington, J.W. Szostak ; *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*, Nature, 818-822, 1990
- [62] D.L. Robertson, G.F. Joyce ; *Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA*, Nature, 467-468, 1990
- [63] X. B. Yang, X. Li, T.W. Prow, L.M. Reece, S.E. Bassett, B.A. Luxon, N.K. Herzog, J. Aronson, R.E. Shope, J.F. Leary, D.G. Gorenstein ; *Immunofluorescence assay and flow-cytometry selection of bead-bound aptamers*, Nucleic Acids Res., 1-8, 2003
- [64] J. Tok, J. Lai, T. Leung, S.F.Y. Li ; *Selection of aptamers for signal transduction proteins by capillary electrophoresis*, Electrophoresis, 2055-2062, 2010
- [65] T.S. Misono, P.K.R. Kumar ; *Selection of RNA aptamers against human influenza virus hemagglutinin using surface plasmon resonance*, Anal. Biochem., 312-317, 2005
- [66] Y. Miyachi, N. Shimizu, C. Ogino, A. Kondo ; *Selection of DNA aptamers using atomic force Microscopy*, Nucleic Acids Res., 1-8, 2010
- [67] L. Peng, B.J. Stephens, K. Bonin, R. Cubicciotti, M. Guthold ; *A combined atomic force /fluorescence microscopy technique to select aptamers in a single cycle from a small pool of random oligonucleotides*, Microscopy Research and Technique, 372-381, 2007
- [68] L. Lin, D. Hom, S. M. Lindsay, J. C. Chapu ; *In Vitro Selection of Histone H4 Aptamers for Recognition Imaging Microscopy*, J. Am. Chem. Soc., 14568-14569, 2007
- [69] M. Rajendran, A.D. Ellington ; *Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc*, Anal. Bioanal. Chem., 1067-1075, 2008
- [70] S. Chao, G. Hongxi, M. Cuiping ; *An aptamer-based fluorescent biosensor for potassium ion detection using a pyrene-labeled molecular beacon*, Anal. Biochem., 99-102, 2010
- [71] B. Pagano, L. Martino, A. Randazzo, C. Giancolay ; *Stability and Binding Properties of a Modified Thrombin Binding Aptamer*, Biophys. J., 562-569, 2008

- [72] S. Xiao, H. Ping Ping, X. Dong Wu, Y. Li Zou, L. Qiang ; *Sensitive Discrimination and Detection of Prion Disease-Associated Isoform with a Dual-Aptamer Strategy by Developing a Sandwich Structure of Magnetic Microparticles and Quantum Dots*, Anal. Chem., 9736–9742, 2010
- [73] J. Lee, M.D. Canny, A. De Erkenez, D. Krilleke, Y. Ng, D.T. Shima, A. Pardi, F. Jucker ; *A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF₁₆₅*, Proc. Nat. Acad. Sci, 18902–18907, 2005
- [74] X. Ye, A.D. Gorin, D.A. Ellington, D.J. Patel ; *Deep penetration of an alpha-helix into a widened RNA major groove in the HIV-1 rev peptide-RNA aptamer complex*, Nat. Struct. Mol. Biol., 1026-1033, 1996
- [75] C. Lozuponz, S. Changayil, I. Majerfeld, M. Yarus ; *Selection of the simplest RNA that binds isoleucine*, RNA, 1315–1322, 2003
- [76] C. Mannironi, C. Scerch, P. Fruscoloni, G.P. Tocchini-Valentini ; *Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: the evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif*, RNA, 520–527, 2000
- [77] S.A. Robertson, K.Harada, A.D. Frankel, D.E. Wemmer ; *Structure determination and binding kinetics of a DNA aptamer-argininamide complex*, Biochemistry, 946-954, 2000
- [78] E. Vianini, M. Palumbo, B. Gatto ; *In vitro selection of DNA aptamers that bind L-tyrosinamide*, Bioorg. Med. Chem., 2543–2548, 2001
- [79] D. Kiga, Y. Futamura, K. Sakamoto, S. Yokoyama ; *An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition*, Nucl. Acids. Res., 1755-1760, 1998
- [80] D.E. Huizenga, J.W. Szostak ; *A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP*, Biochemistry, 656-665, 1995
- [81] P.C. Anderson, S. Mecozzi ; *Unusually Short RNA Sequences: Design of a 13-mer RNA that Selectively Binds and Recognizes Theophylline*, J. Am. Chem. Soc., 5290-5291, 2005
- [82] H. Jiang, L. Yuan, F. Mingtao, L. Xianjin ; *Isolation and Identification of the DNA Aptamer Target to Acetamidrid*, J. Agric. Food Chem., 1582–1586, 2011
- [83] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin ; *A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC*, J. Am. Chem. Soc., 8672-8679, 2005
- [84] M. Michaud, E. Jourdan, C. Ravelet, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin ; *Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers*, Anal. Chem., 1015-1020, 2004
- [85] J. Ruta, C. Grosset, C. Ravelet, J. Fize, A. Villet, A. Ravel, E. Peyrin ; *Chiral resolution of histidine using an anti-D-histidine L-RNA aptamer microbore column*, J. Chromatogr. B, 186-190, 2007
- [86] C. Ravelet, R. Boulkedid, A. Ravel, C. Grosset, A. Villet, J. Fize, E. Peyrin ; *A L-RNA aptamer chiral stationary phase for the resolution of target and related compounds* , J. Chromatogr. A, 62-70, 2005
- [87] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin ; *Chiral stationary phase based on a biostable L-RNA aptamer*, Anal. Chem., 1993-1998, 2005
- [88] A. Geiger, P. Burgstaller, H. von der Eltz, A. Roeder, M. Famulok ; *RNA Aptamers That Bind L-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity*, Nucleic Acids Res., 1029–1036, 1996

- [89] J.D. Watson, F. Crick ; *Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid*, Nature, 737-738, 1953
- [90] D.L Abramovitz, A.M. Pyle ; *Remarkable morphological variability of a common RNA folding motif: the GNRA tetraloop-receptor interaction*, J. Mol. Biol, 493-506, 1996
- [91] M. Nakano, E.M Moody, J. Liang, P.C. Bevilacqua ; *Selection for thermodynamically stable DNA tetraloops using temperature gradient gel electrophoresis reveals four motifs: d(cGNNAg), d(cGNABg), d(cCNNGg), and d(gCNNGc)*, Biochemistry, 14281–14292, 2002
- [92] C. Lin , D.J. Patel ; *Encapsulating an amino acid in a DNA fold*, Nat. Struct. Biol., 1046-1050, 1996
- [93] K. Hoogsteen ; *The crystal and molecular structure of a hydrogen-bonded complex between 1-methylthymine and 9-methyladenine*, Acta. Cryst., 907-916, 1963
- [94] P.S. Ho, M. Carter ; *DNA Replication-Current advances*, book edited by Herve Seligmann, 2011
- [95] A. Rich ; *DNA comes in many forms*, Gene, 99–109, 1993
- [96] E.T. Kool ; *Hydrogen bonding, Base stacking, and steric effects in DNA replication*, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1-22, 2001
- [97] E. Protozanova, P. Yakovchuk, M.D. Frank-Kamenetskii ; *Stacked–Unstacked Equilibrium at the Nick Site of DNA*, J. Mol. Biol., 775-885, 2004
- [98] J. Kondo, E. Westhof ; *Classification of pseudo pairs between nucleotide bases and amino acids by analysis of nucleotide–protein complexes*, Nucleic Acids Res., 1–10, 2011
- [99] J. Kondo, E. Westhof ; *Base pairs and pseudo pairs observed in RNA–ligand complexes*, Mol. Recogni., 241-252, 2010
- [100] G. Lancelot, C. Helene ; *Phosphate-guanosine interactions. A model for the involvement of guanine derivatives in autocatalytic reactions of ribonucleic acids*, J. Bio. Chemi., 15046-15050, 1984
- [101] D.W Staple, S.E Butcher ; *Pseudoknots: RNA Structures with Diverse Functions*, Plos Biol, 956-959, 2005
- [102] C. Wilson, J. Nix, J. Szostak ; *Functional requirements for specific ligand recognition by a biotin-binding RNA pseudoknot*, Biochemistry, 14410-14419, 1998
- [103] O. Kensch, B.A. Connolly, H. Steinhoff, A. McGregor, R.S. Goody, T. Restle ; *HIV-1 Reverse Transcriptase-Pseudoknot RNA Aptamer Interaction Has a Binding Affinity in the Low Picomolar Range Coupled with High Specificity*, J. Bio. Chem., 18271–18278, 2000
- [104] L. McFail-Isom, G.G. Hu, L.D. Williams ; *The B-DNA dodecamer at high resolution reveals a spine of water on sodium*, Biochemistry, 8341-8355, 1998
- [105] M.J. Serra, J.D. Baird, T. Dale, B.L. Fey, K. Retatagos, E. Westhof ; *Effects of magnesium ions on the stabilization of RNA oligomers of defined structures*, RNA, 307-323, 2002
- [106] B. I. Kankia ; *Binding of Mg²⁺ to single-stranded polynucleotides: hydration and optical studies*, Biophys. Chem., 643-659, 2003
- [107] J. Buck, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe ; *Dissecting the influence of Mg²⁺ on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain*, Nucleic Acids Res., 4143–4153, 2010
- [108] J. Zhang, M.W. Lau, A.R. Ferre-D’Amare ; *Ribozymes and riboswitches: modulation of RNA function by small molecules*, Biochemistry, 9123–9131, 2010

- [109] A. Haller, M.F. Souliere, R. Micura ; *The Dynamic Nature of RNA as Key to Understanding Riboswitch Mechanisms*, Acc. Chem. Res., 1339–1348, 2011
- [110] M. Yarus, J.J. Widmann, R. Knight ; *RNA–amino acid binding: A stereochemical era for the genetic code*, J. Mol. Evol., 406–429, 2009
- [111] M. Yarus ; *RNA-ligand chemistry: a testable source for the genetic code*, RNA, 475-484, 2000
- [112] D. Shu, P. Guo; *A Viral RNA That Binds ATP and Contains a Motif Similar to an ATP-binding Aptamer from SELEX*, J. Bio. Chem., 7119–7125, 2003
- [113] R.B. Kotia, L. Li, L.B. McGown; *Separation of nontarget compounds by DNA aptamers*, Anal. Chem., 827-831, 2000
- [114] M.T. Reetz, K.M. Kuhling, H. Hinrichs, A. Deege ; *Circular dichroism as a detection method in the screening of enantioselective catalysts*, Chirality, 479–482, 2000
- [115] F.G. Sanchez, A.N. Diaz, A.G. Pareja ; *HPLC determination of tryptophan enantiomers with photometric, fluorimetric and diode-laser polarimetric detection*, Chromatographia, 494–498, 1996
- [116] Y. Chu, L.Z. Avila, H.A. Biebuyck, G.M. Whitesides ; *Use of Affinity Capillary Electrophoresis To Measure Binding Constants of Ligands to Proteins*, J. Med. Chem., 2915-2917, 1992
- [117] J. Ruta, C. Ravelet, I. Baussanne, J.L. Déccout, E. Peyrin ; *Aptamer-Based Enantioselective Competitive Binding Assay for the Trace Enantiomer Detection*, Anal. Chem., 4716-4719, 2007
- [118] J. Ruta, S. Perrier, C. Ravelet, J. Fize, E. Peyrin ; *Noncompetitive fluorescence polarization aptamer-based assay for small molecule detection*, Anal. Chem., 7468–7473, 2009
- [119] L. Po-Hsun, Y. Shih-Lun, L. Ming-Shen, C. Yung, L. Selva Roselins, H. Akon, C. Wen-Yih ; *Microcalorimetrics Studies of the Thermodynamics and Binding Mechanism between L-Tyrosinamide and Aptamer*, J. Phys. Chem. B, 6665–6673, 2008
- [120] S. Tyagi, F.R. Kramer ; *Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization*, Nature Biotech., 303-308, 1996
- [121] R. Yamamoto, K. Penmetcha, R. Kumar ; *Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1*, Genes to Cells, 389-396, 2000
- [122] S. Gopinath, T.S. Misono, P. Kumar ; *Prospects of Ligand-Induced Aptamers*, Crit. Rev. Anal. Chem., 34-47, 2008
- [123] S. Nagatoishi, Y. Tanaka, K. Tsumoto ; *Circular dichroism spectra demonstrate formation of the thrombin-binding DNA aptamer G-quadruplex under stabilizing-cation-deficient conditions*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 812–817, 2007
- [124] I. Russo Krauss, A. Merlino, A. Randazzo, E. Novellino, L. Mazzarella, F. Sica ; *High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity*, Nucleic Acids Res., 8119-8128, 2012
- [125] S. Paramasivan, L. Rujan, P.H. Bolton ; *Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding*, Methods, 324–331, 2007
- [126] F. Nishikawa, K. Murakami, A. Matsugami, M. Katahira, S. Nishikawa ; *Structural Studies of an RNA Aptamer Containing GGA Repeats Under Ionic Conditions Using Microchip Electrophoresis, Circular Dichroism, and 1D-NMR*, Oligonucleotides, 179-190, 2009

- [128] P. Lin, R. Chen, C. Lee, Y. Chang, C. Chen, W. Chen ; *Studies of the binding mechanism between aptamers and thrombin by circular dichroism, surface plasmon resonance and isothermal titration calorimetry*, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 552–558, 2011
- [129] S. Kelley, S. Boroda, K. Musier-Forsyth, B. Kankia ; *HIV-integrase aptamer folds into a parallel quadruplex: A thermodynamic study*, Biophys. Chem., 82–88, 2011
- [130] T. Sakamoto, A. Oguro, G. Kawai, T. Ohtsu, Y. Nakamura ; *NMR structures of double loops of an RNA aptamer against mammalian initiation factor 4A*, Nucleic Acids Res., 745–754, 2005
- [131] J. Carothers, J. Davis, J. Chou, J. Szostak ; *Solution structure of an informationally-complex high-affinity RNA aptamer to GTP*, RNA, 567–579, 2006
- [132] A. Wacker, J. Buck, D. Mathieu, C. Richter, J. Wöhnert, H. Schwalbe ; *Structure and dynamics of the deoxyguanosine-sensing riboswitch studied by NMR-spectroscopy*, Nucleic Acids Res., 6802–6812, 2011
- [133] A. Dale, D. L. Dull, H. S. Mosher ; *α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines*, J. Org. Chem., 2543–2549, 1969
- [134] H. Navratilova ; *Enantiomeric analysis of (3S,4R)-4-(4-fluorophenyl)-3-hydroxymethyl-1-methylpiperidine by ^{19}F NMR spectroscopy*, Magn. Reson. Chem., 727, 2011
- [135] W.H. Pirkle, D.L. Sikkenga, M.S. Pavlin ; *Nuclear magnetic resonance determination of enantiomeric composition and absolute configuration of γ -lactones using chiral 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol*, J. Org. Chem., 384–387, 1977
- [136] A.K.H. Cheng, D. Sen, H. Yu ; *Design and testing of aptamer-based electrochemical biosensors for proteins and small molecules*, Bioelectrochem., 1–12, 2009
- [137] L. Shen, Z. Chen, Y. Li, P. Jing, S. Xie, S. He, P. He, Y. Shao ; *A chronocoulometric aptamer sensor for adenosine monophosphate*, Chem. Commun., 2169–2171, 2007
- [138] A.B. Steel, R.L. Levicky, T.M. Herne, M.J. Tarlov ; *Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly*, Biophys. J., 975–981, 2000
- [139] X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, C. Fan ; *A Target-Responsive Electrochemical Aptamer Switch (TREAS) for Reagentless Detection of Nanomolar ATP*, J. Am. Chem. Soc., 1042-1043, 2007
- [140] B.R. Baker, R.Y. Lai, M.S. Wood, E.H. Doctor, A.J. Heeger, K.W. Plaxco ; *An electronic, aptamer-based small molecule sensor for the rapid, reagentless detection of cocaine in adulterated samples and biological fluids*, J. Am. Chem. Soc., 3138-3139, 2006
- [141] Y. Xiao, A.A. Lubin, A.J. Heeger, K.W. Plaxco ; *Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor*, Angew. Chem. Int., 5456–5459, 2005
- [142] A.J. Bonham, K. Hsieh, S. Ferguson, A. Vallée Bélisle, F. Ricci, H.T. Soh, K.W. Plaxco ; *Quantification of transcription factor binding in cell extracts using an electrochemical, structure-switching biosensor*, J. Am. Chem. Soc., 3346–3348, 2012
- [143] P. Hong, W. Li, J. Li ; *Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics*, Sensors, 1181-1193, 2012
- [144] Y. Wang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Yuan, L. Bai, Y. Liao ; *A multi-amplification aptasensor for highly sensitive detection of thrombin based on high-quality hollow CoPt nanoparticles decorated graphene*, Biosens. Bioelectron., 61–66, 2011

- [145] J. Huang, X. Luo, I. Lee, Y. Hu, X.T. Cui, M. Yun ; *Rapid real-time electrical detection of proteins using single conducting polymer nanowire-based microfluidic aptasensor*, Biosens. Bioelectron., 306–309, 2011
- [146] Y. Liu, N. Tuleouva, E. Ramanculov, A. Revzin ; *Aptamer-based Electrochemical Biosensor for Interferon Gamma Detection*, Anal. Chem., 8131–8136, 2010
- [147] F. Pu, Z. Huang, D. Hu, J. Ren, S. Wang, X. Qu ; *Sensitive, selective and label-free protein detection using a smart polymeric transducer and aptamer/ligand system*, Chem. Commun., 7357–7359, 2009
- [148] X. Zhang, Z. Zhao, H. Mei, Y. Qiao, Q. Liu, W. Luo, T. Xia, X. Fang ; *A fluorescence aptasensor on DNA charge transport for sensitive protein detection in serum*, Analyst, 4764-4769, 2011
- [149] F. Kleinjung, S. Klussmann, V.A. Erdmann, F.W. Scheller, J.P. Furst, F.F. Bier ; *High-Affinity RNA as a Recognition Element in a Biosensor*, Anal. Chem., 328-331, 1998
- [150] R.A. Potyrailo, R.C. Conrad, A.D. Ellington, G.M. Hieftje ; *Adapting Selected Nucleic Acid Ligands (Aptamers) to Biosensors*, Anal. Chem., 3419-3425, 1998
- [151] S.J. Lee, B.S. Youn, J.W. Park, J.H. Niazi, Y.S. Kim, M.B. Gu ; *ssDNA Aptamer-Based Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Retinol Binding Protein 4 for the Early Diagnosis of Type 2 Diabete*, Anal. Chem., 2867–2873, 2008
- [152] H.Bai, R. Wang, B. Hargis, H. Lu, Y. Li ; *A SPR Aptasensor for Detection of Avian Influenza Virus H5N1*, Sensors, 12506-12518, 2012
- [153] C. Yao, Y. Qi, Y. Zhao, Y. Xiang, Q. Chen, W. Fu ; *Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE*, Biosens. Bioelectron., 2499–2503, 2009

Chapitre II :

- [154] L. Challier, F. Mavr , J. Moreau, C. Fave, B. Schöllhorn, D. Marchal, E. Peyrin, V. No l, B. Limoges ; *Simple and highly enantioselective electrochemical aptamer-based binding assay for trace detection of chiral compounds*, Anal. Chem., 5415-5420, 2012
- [155] T. Def ver, M. Druet, M. Rochelet-Dequaire, M. Joannes, C. Grossiord, B. Limoges, D. Marchal ; *Real-time electrochemical monitoring of the polymerase chain reaction by mediated redox catalysis*, J. Am. Chem. Soc., 11433-11441, 2009
- [156] V. Okhonin, A. Petrov, M. Berezovski, S. Krylov ; *Plug-plug Kinetic Capillary Electrophoresis: a method for direct determination of rate constants of complex formation and dissociation*, Anal. Chem., 4803-4810, 2006
- [157] Y. Ma, C. Zhu, P. Ma, K.T. Yu ; *Studies on the Diffusion Coefficients of Amino Acids in Aqueous Solutions*, J. Chem. Eng. Data, 1192-1196, 2005
- [158] E. Stellwagen, Y. Lu, N.C. Stellwagen ; *Unified Description of Electrophoresis and Diffusion in DNA and other Polyions*, Biochemistry, 11745-11750, 2003
- [159] J.A. Hansen, J. Wang, A. Kawde, Y. Xiang, K. Gothelf, G. Collins ; *Quantum-Dot/Aptamer-Based Ultrasensitive Multi-Analyte Electrochemical Biosensor*, J. Am. Chem. Soc., 2228-2229, 2006

- [160] J. Moreau, L. Challier, N. Laloui, V. Noël, B. Limoges, B. Schöllhorn, C. Fave ; *Rational design of redox labelled chiral target for enantioselective aptamer-based electrochemical binding assay*, soumis, Org. Biomol. Chem., 2013
- [161] T. Skeika, C.R. Zuconelli, S.T. Fujiwara, C.A. Pessoa ; *Preparation and Electrochemical Characterization of a Carbon Ceramic Electrode Modified with Ferrocenecarboxylic Acid*, Sensors, 1361-1374, 2011 ;
- [162] L. Challier, R. Miranda-Castro, D. Marchal, V. Noël, F. Mavré, B. Limoges ; *Kinetic Rotating Droplet Electrochemistry: a Simple and Versatile Method for Reaction Progress Kinetic Analysis in Microliter Volumes*, soumis, J. Am. Chem. Soc., 2013

Chapitre III :

- [163] B. Chance ; *Rapid mixing and sampling in biochemistry*, Academic Press, New York, 1964
- [164] S. Takahashi, Y. Ching, J. Wang, D. Rousseau ; *Microsecond Generation of Oxygen-bound Cytochrome c Oxidase by rapid Solution Mixing*, J. Bio. Chem., 8405-8407, 1995 ;
- [165] S. Takahashi, S. Yeh, T.K. Das, C. Chan, D.S. Gottfried, D. Rousseau ; *Folding of Cytochrome c Initiated by Submillisecond Mixing*, Nature Structural and Molecular Biology, 44-50, 1997 ;
- [166] J. Udgaonkar, R. Baldwin ; *NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A*, Nature, 694-699, 1988 ;
- [167] L. Pollack, M.W. Tate, N.C. Darnton, J.B. Knight, S.M. Gruner, W. Eaton, R.H. Austin ; *Compactness of the denatured state of a fast-folding protein measured by submillisecond small angle x-ray scattering*, Proc. Natl. Acad. Sci., 10115-10117, 1999 ;
- [168] M.C. Shastry, H. Roder ; *Evidence for barrier-limited protein folding kinetics on the microsecond time scale*, Nat Struct. Biol., 385-392, 1998
- [169] M.R. Eftink, M.C. Shastry ; *Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions*, Methods Enzymol., 258-286, 1997
- [170] R.L. Berger, B. Balko, H.F. Chapman ; *High Resolution Mixer for the Study of the Kinetics of Rapid Reactions in Solution*, The Review of Scientific Instrument, 493-498, 1967
- [171] U. Förster, J.E. Weigand, P. Trojanowski, B. Suess, J. Watchveilt ; *Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer*, Nucleic Acid Res., 1-11, 2011
- [172] C. Tongsook, J. Sucharitakul, K. Thotsaporn, P. Chaiyen ; *Interactions with the substrate phenolic group are essential for hydroxylation by the oxygenase component of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase*, J. Biol. Chem., 44491-44502, 2011
- [173] D.H. Turner, G.W. Flynn, N. Sutin, J.V. Beitz ; *Laser Raman temperature-jump study of kinetics of triiodide equilibrium. Relaxation times in 10^{-8} - 10^{-7} second range*, J. Am. Chem. Soc., 1554-1559, 1972
- [174] S. Williams, T.P. Causgrove, R. Gilmanishin, K.S. Fang, R.H. Callender, W.H. Woodruff, R.B. Dyer ; *Fast events in protein folding: helix melting and formation in a small peptide*, Biochemistry, 691-697, 1996
- [175] R. Giri, A. Morrone, C. Travaglini-Allocatelli, P. Jemth, M. Brunori, S. Gianni ; *Folding pathways of proteins with increasing degree of sequence identities but different structure and function*, Proc. Nat. Acad. Sci., 17772-17776, 2012

- [176] R.M. Clegg, B.W. Maxfield ; *Chemical kinetic studies by a new small pressure perturbation method*, Rev. Sci. Instrum, 1383-1393, 1976
- [177] D.S. Pearson, G. Holtermann, P. Ellison, C. Cremona, M.A. Geeves ; *A novel pressure-jump apparatus for the microvolume analysis of protein-ligand and protein-protein interactions: its application to nucleotide binding to skeletal-muscle and smooth-muscle myosin subfragment-1*, Biochem. J., 643-651, 2002
- [178] J. Woenckhaus, R. Köhling, R. Winter ; *High pressure-jump apparatus for kinetic studies of protein folding reactions using the small-angle synchrotron X-ray scattering technique*, Rev. Sci. Instrum., 3895-3900, 2000
- [179] G. Porter ; *Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions*, Proceedings of the Royal Society of London, Series A, Mathematical and Physical Sciences, 284-300, 1950
- [180] R.G.W. Norrish, G. Porter ; *Spectroscopic Studies of the Hydrogen-Oxygen Explosion Initiated by the Flash Photolysis of Nitrogen Dioxide*, Proceedings of the Royal Society of London Series A, Mathematical and Physical Sciences, 439-460, 1952
- [181] J. McCray, L. Herbet, T. Kihara, D. Trentham ; *Tension relaxation induced by pulse photolysis of caged ATP in partially crosslinked fibers from rabbit psoas muscle*, Proc. Natl. Acad. Sci., 7237-7241 ; 1980
- [182] J. Corrie, A. Desantis, Y. Katayama, K. Khodakhah, J. Messenger, D. Ogden, D. Trentham ; *Postsynaptic activation at the squid giant synapse by photolytic release of L-glutamate from a 'caged' L-glutamate*, J. Physiol., 1-8, 1993
- [183] Y. Bernardinella, C. Haerberli, J. Chatton ; *Flash photolysis using a light emitting diode: An efficient, compact, and affordable solution*, Cell Calcium, 565-572, 2005
- [183] M.V. George , J.C. Scaiano ; *Photochemistry of o-nitrobenzaldehyde and related studies*, J. Phys. Chem., 492-495, 1980
- [185] P. Wenter, B. Fürtig, A. Hainard, H. Schwalbe, S. Pitsh ; *Kinetics of Photoinduced RNA Refolding by Real-Time NMR Spectroscopy*, Angew. Chem. Int., 2600-2603, 2005
- [186] M. Berezovski, S. Krylov ; *Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures – A Single Experiment Reveals Equilibrium and Kinetic Parameters of Protein–DNA Interactions*, J. Am. Chem. Soc., 13674-13675, 2002
- [187] V. Okhonin, M. Berezovski, S. Krylov ; *Sweeping Capillary Electrophoresis: A Non-Stopped-Flow Method for Measuring Bimolecular Rate Constant of Complex Formation between Protein and DNA*, J. Am. Chem. Soc., 7166-7167, 2004
- [188] J. Bao, S. Krylova, O. Reinstein, P. Johnson, S. Krylov ; *Label-free solution-based kinetic study of aptamer-small molecule interactions by kinetic capillary electrophoresis with UV detection revealing how kinetics control equilibrium*, Anal. Chem., 8387-8390, 2011
- [189] D. Burnouf, E. Ennifar, S. Guedich, B. Puffer, G. Hoffmann, G. Bec, F. Disdier, M. Baltzinger, P. Dumas ; *kinITC: A New Method for Obtaining Joint Thermodynamic and Kinetic Data by Isothermal Titration Calorimetry*, J. Am. Chem. Soc., 559-565, 2012

- [190] K.A. Van der Meulen, S.E. Butcher ; *Characterization of the kinetic and thermodynamic landscape of RNA folding using a novel application of isothermal titration calorimetry*, Nucleic Acids Res., 2140–2151, 2012
- [191] M. Lucia Biancon ; *Calorimetry of enzyme-catalyzed reactions*, Biophys. Chem., 59–64, 2007
- [192] S. Van Stroey-Biezen, A. Janssen, L. Janssen ; *A kinetic study of soluble glucose oxidase using a rotating-disk electrode*, Bioelectron. Bioenerg., 55–60, 1994
- [193] C. Léger, S. Dementin, P. Bertrand, M. Rousset, B. Guigliarelli ; *Inhibition and Aerobic Inactivation Kinetics of Desulfovibrio fructosovorans NiFe Hydrogenase Studied by Protein Film Voltammetry*, J. Am. Chem. Soc., 12162-12172, 2004
- [194] A. Anne, A. Chovin, C. Demaille ; *Optimizing Electrode-Attached Redox-Peptide Systems for Kinetic Characterization of Protease Action on Immobilized Substrates. Observation of Dissimilar Behavior of Trypsin and Thrombin Enzymes*, Langmuir, 8804-8813, 2012
- [195] Z. Han, W. Li, Y. Huang, B. Zheng ; *Measuring Rapid Enzymatic Kinetics by Electrochemical Method in Droplet-Based Microfluidic Devices with Pneumatic Valves*, Anal. Chem., 5840–5845, 2009
- [196] H. Song, J.D. Tice, R.F. Ismagilov ; *A microfluidic system for controlling reaction network in time*, Angew. Chem. Int. Ed., 767-772, 2003
- [197] C.A. Wijayawardhana, H. B. Halsall, W. Heineman ; *Micro volume rotating disk electrode (RDE) amperometric detection for a bead-based immunoassay*, Anal. Chim. Acta, 3-11, 1999
- [198] J. H. Thomas, N. J. Ronkainen-Matsuno, S. Farell, H.B. Halsall, W. Heineman ; *Microdrop analysis of a bead-based immunoassay*, Microchem. J., 267-276, 2003 ;
- [199] H. Kuramitz, H. B. Halsall, W. Heineman ; *Magnetic microbead-based enzyme immunoassay for ovalbumin using hydrodynamic voltammetry and fluorometric detection*, Anal. Methods, 1783–1789, 2012
- [200] A. Cserey, M. Gratzl ; *Rotating Sample System: An Equivalent of a Rotating Electrode for Microliter Samples*, Anal. Chem., 3687-3692, 1997
- [201] G. Shetty, N. Syed, K. Tohida, M. Gratzl ; *Hydrodynamic electrochemistry in 20 μ l drops in the Rotating Sample System*, Anal. Sci., 1155-1160, 2005
- [202] A. Bard, L. Faulner ; *Electrochemical Methods*, John Wiley: New York, 1998
- [203] L. Hu, S. Han, Z. Liu, S. Parveen, Y. Yuan, G. Xu ; *A versatile strategy for electrochemical detection of hydrogen peroxide as well as related enzymes and substrates based on selective hydrogen peroxide-mediated boronate deprotection*, Electrochem. Commun., 1536-1538, 2011
- [204] E. Miller, A. Albers, A. Pralle, E. Isacoff, C. Chang ; *Boronate-Based Fluorescent Probes for Imaging Cellular Hydrogen Peroxide*, J. Am. Chem. Soc., 16652-16659, 2005
- [205] B.C. Dickinson, Y. Tang, Z. Chang, C. Chang ; *A Nuclear-Localized Fluorescent Hydrogen Peroxide Probe for Monitoring Sirtuin-Mediated Oxidative Stress Responses In Vivo*, Chem. Biol., 943-948, 2011
- [206] M. Leed, N. Wolkow, D. Pham, C. Daniel, J. Dunaief, K. Franz ; *Prochelators Triggered by Hydrogen Peroxide Provide Hexadentate Iron Coordination to Impede Oxidative Stress*, J. Inorg. Biochem., 1161-1172, 2011
- [207] H. Kuivila ; *Electrophilic Displacement Reactions. III. Kinetics of the Reaction between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid*, J. Am. Chem. Soc., 870-874, 1954

- [208] J. Wickiser, W. Winkler, R. Breaker, D. Crothers ; *The speed of RNA transcription and metabolite binding kinetics operate an FMN riboswitch*, Mol. Cell, 49-60, 2005
- [209] S. Gilbert, C. Stoddard, S. Wise, R. Batey ; *Thermodynamic and kinetic characterization of ligand binding to the purine riboswitch aptamer domain*, J. Mol. Biol., 754-768, 2006
- [210] F. Jucker, R. Phillips, S. McCallum, A. Pardi ; *Role of a Heterogeneous Free State in the Formation of a Specific RNA–Theophylline Complex*, Biochemistry, 2560-2567, 2003.

Chapitre IV :

- [211] S. Burge, G. Parkinson, P. Hazel, A. Todd, S. Neidle ; *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*, Nucleic Acid Res., 5402-5415, 2006
- [212] J.L. Mergny, A.T. Phan, L. Lacroix ; *Following G-quartet formation by UV-spectroscopy*, FEBS Letters, 74-78, 1998
- [213] D. Treiber, J. Williamson ; *Beyond kinetic trap in RNA folding*, Curr. Op. Struct. Bio., 309-314, 2001

Annexes :

- [214] J.M. Savéant ; *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*, Ed. Wiley-Interscience, 2006.
- [215] G. Sauerbrey ; *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*, Zeitschrift für Physik, 206-222, 1959
- [216] M. Voinova, M. Rodhal, M. Jonson, B. Kasemo ; *Viscoelastic Acoustic Response of Layered Polymer Films at Fluid-Solid Interfaces: Continuum Mechanics Approach*, Physica Scripta, 391-396, 1999

ANNEXES

Annexe I : Electrochimie

Dans le cadre de réactions électrochimiques hétérogènes qui impliquent des réactifs en solution, et une électrode solide, la densité de courant mesurée dépend de 2 cinétiques : la vitesse de transfert électronique et la vitesse de transfert de masse (Fig A1).

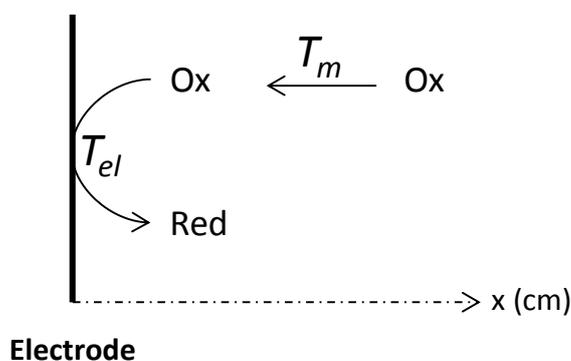


Fig A1 : Processus clé d'une réaction électrochimique : le transfert de charge T_{el} et le transfert de masse T_m .

- Transfert de charge :

La description cinétique du transfert de charge peut être traitée à partir de l'équation (A1) :



$$\frac{j}{nF} = - \left(\frac{dC_{red}}{nFdt} \right)_{x=0} = v_{ox} - v_{red} = k_a C_{red}^* - k_c C_{ox}^* \quad (A2)$$

Où j est la densité de courant, en $A.cm^2$, k_a et k_c sont respectivement les constantes de vitesse d'oxydation et de réduction en $cm.s^{-1}$, et C_{red}^* et C_{ox}^* sont les concentrations de *Red* et *Ox* à la surface de l'électrode.

La relation entre les constantes de vitesse et le potentiel d'électrode est donnée par l'équation de Butler-Volmer (approche empirique) ou de Marcus-Hush (approche quantique).

- Transfert de masse

Pour que le transfert électronique ait lieu, il est nécessaire que les espèces soient transportées au voisinage de l'électrode. Il est possible de distinguer trois types de transport:

- La diffusion : c'est le mouvement d'espèces provoqué par un gradient de concentration ;

- La migration : c'est le mouvement des espèces chargées provoqué par un gradient de potentiel (entre l'électrode de travail et la contre électrode) ;
- La convection : c'est le mouvement des espèces en solution provoqué par les forces mécaniques (convection forcée) ou par le mouvement Brownien (convection naturelle).

Ainsi, l'équation de Nernst-Planck décrit le flux de matière à l'électrode²⁰² :

$$J_i = -D_i \nabla C_i - z_i \omega_i F C_i \nabla \Phi_i + u C_i \quad (A3)$$

Le premier terme est relatif à la diffusion, le deuxième à la migration et le troisième à la convection. ∇ représente le gradient de concentration, J_i est le flux de l'espèce i , D_i est son coefficient de diffusion, C_i sa concentration, z_i sa valence, ω_i sa mobilité, Φ_i son potentiel électrostatique, u la vitesse du fluide et F la constante de Faraday.

Dans le cas général, l'investigation de processus électrochimiques est effectuée en large excès d'électrolytes support ce qui minimise les effets de migration des espèces électroactives. Les conditions de convection quant à elles fixent la taille maximale de la couche de diffusion. Ainsi, il ne reste plus que le terme relatif à la diffusion. C_i^* dépend donc uniquement de la diffusion de matière, qu'il est possible de modéliser en utilisant les deux lois de Fick.

La première loi de Fick permet d'effectuer le bilan de matière à la surface de l'électrode à une distance x de celle-ci :

$$J_i = \frac{j}{nF} = -D_i \text{grad} C_i = -D_i \frac{\partial C(x)}{\partial x} \quad (A4)$$

Où J_i est le flux de matière électroactive en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ et D_i est le coefficient de diffusion de l'espèce i en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Cette équation permet de relier la densité de courant et le flux des espèces électroactives en solution (Fig A2).

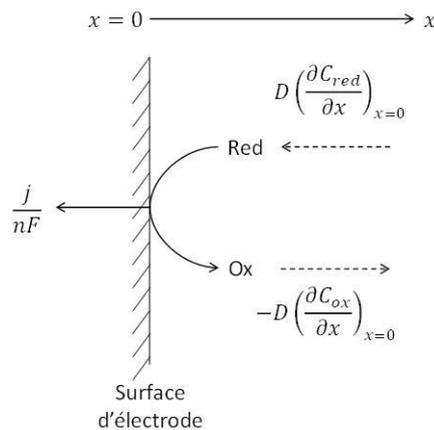


Fig A2 : Représentation schématique de l'égalité des flux à la surface d'une électrode

Sans convection forcée, l'application d'une surtension à l'électrode suffisante pour déclencher un processus redox aboutit à une modification de la proportion $[Ox]/[Red]$ au voisinage de l'électrode.

Un gradient de concentration s'établit, provoquant la diffusion de matière. Ce gradient diminue au cours du temps en s'établissant sur des distances de plus en plus grandes.

La distance à la surface de l'électrode où s'établit J est appelée couche de diffusion δ (Fig A3). Les densités de courant mesurées dépendent donc du temps nécessaire à une espèce électroactive pour traverser cette couche de diffusion.

La seconde loi de Fick permet de déterminer la variation de la concentration de l'espèce mesurée dans l'espace et dans le temps :

$$\frac{\partial C(x)}{\partial t} = \frac{\partial^2 C_i}{\partial x^2} \quad (A5)$$

La résolution de cette équation différentielle (par transformée de Laplace) fournit le profil de concentration $C_i(x, t)$ (Fig A3). Elle permet d'accéder à la densité de flux de diffusion en fonction de x , donc aux densités de courant ($J_{x=0}$)

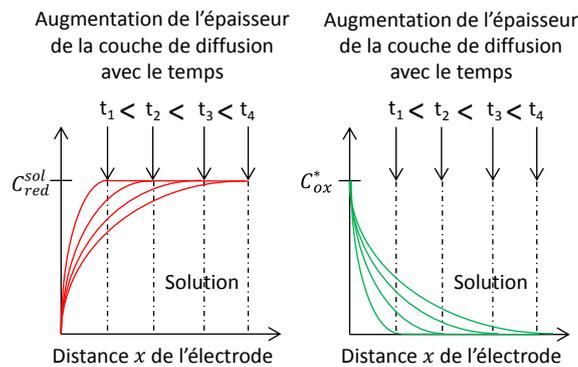


Fig A3 : Profil des concentrations des espèces Red et Ox au cours d'une réaction de réduction, où Red est seul en solution et consommé par une électrolyse sans convection forcée.

Ainsi, pour une surtension élevée appliquée à une solution où seule Red est présent, $j = f(t)$ s'exprime de la façon suivante:

$$j_a(t) = \frac{nFD_{red}C_{red}^0}{\delta} \quad (A6)$$

Pour un régime de diffusion naturelle, $\delta = \sqrt{\pi Dt}$. Ainsi, il est possible d'établir l'expression analytique du courant qui dépendra de la forme du créneau de potentiel imposé. Pour un potentiel constant, l'équation (A6) devient :

$$j_a(t) = \frac{nFD_{red}C_{red}^0}{\sqrt{\pi D_{red}t}} \quad (A7)$$

Dans le cas de diffusion convective (électrode tournante), le régime hydrodynamique permet de renouveler les espèces à l'électrode beaucoup plus efficacement que la diffusion naturelle. De ce fait,

le gradient de concentration J est constant car δ ne s'étend pas. Ces conditions expérimentales sont dites stationnaires, car la couche de diffusion est contrainte par le régime convectif.

○ Voltammétrie cyclique

La voltammétrie cyclique est une technique très utilisée en électrochimie. Le courant est enregistré suite à l'application d'une rampe de potentiel de la forme :

$$E = E_i \pm vt \quad (A8)$$

Où E est le potentiel d'électrode en Volt, E_i le potentiel initial d'électrode et v la vitesse de balayage en $V.s^{-1}$. La rampe de potentiel est appliquée jusqu'à une valeur E_{max} , puis le potentiel décroît, toujours en fonction de v jusqu'à E_i . Un signal typique de cette technique est présenté figure A4.

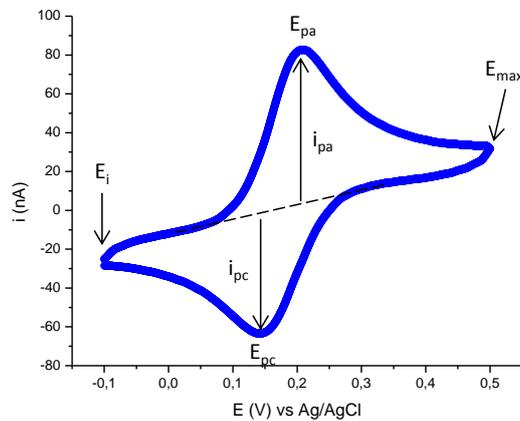


Fig A4: Voltammogramme d'une solution de L-Tym-Fc = 5 µM.

i_{pa} et i_{pc} sont les intensités de pic anodique et cathodique, E_{pa} et E_{pc} sont les potentiels de pic anodique et cathodique

Dans la forme de ce voltammogramme se retrouvent les processus de transfert de charge qui dépendent du potentiel : au voisinage du E° de la sonde redox utilisée, l'espèce s'oxyde dans le sens aller et se réduit dans le sens retour: un courant anodique est enregistré entre E_i et E_{pa} (potentiel de pic anodique) et cathodique entre E_{max} et E_{pc} (potentiel de pic cathodique).

L'apparition des pics d'intensité i_{pa} et i_{pc} est due à la limitation par diffusion des espèces Red et Ox respectivement.

L'exploitation de ces courbes voltampérométriques implique l'établissement de l'équation $j = f(E)$. L'intégration de la loi de Fick et l'application de la loi de Nernst ou de Butler-Volmer permettent de déterminer analytiquement $j = f(E)$ et l'expression des intensités de pics i_{pa} et i_{pc} , qui sont des points caractéristiques facilement exploitables.

Ainsi pour un transfert électronique rapide²⁰²:

$$i_{p,red} = -(2,69 \cdot 10^5) n^{\frac{3}{2}} S D_{ox}^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}} C_{ox}^{sol} = 0,446 n F S C_{ox}^{sol} \sqrt{D_{ox}} \sqrt{\frac{n F v}{RT}} \quad (A9)$$

Avec S la surface de l'électrode en cm².

Pour un régime de diffusion convective, la couche de diffusion restant de taille constante : les voltammogrammes obtenus ont une forme de sigmoïde, et pour $E > E^{\circ}$ et $E < E^{\circ}$, un courant stationnaire est enregistré (Fig A5).

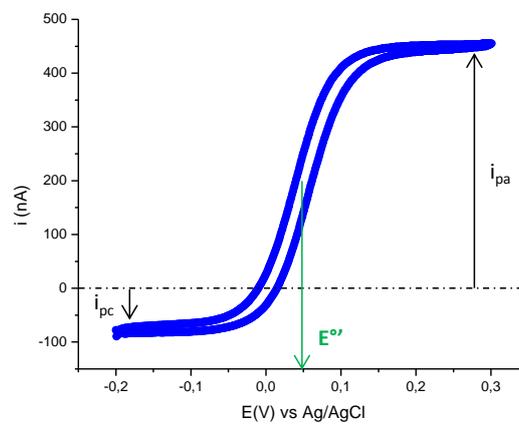


Fig A5 : Voltammogramme d'une solution de ferrocène-métanol à 500 µM en régime de diffusion convectif.
 i_{pa} et i_{pc} sont les intensités de plateaux anodique et cathodique

Dans ce cas l'intensité stationnaire mesurée pour $E \gg E^{\circ}$ est décrite par l'équation (A6), et l'épaisseur de la couche de diffusion est indépendante de la vitesse de balayage. Ici, i_{pa} et i_{pc} sont respectivement proportionnelles à [Red] et [Ox], si bien que $i_{pa}/i_{pc} = [Red]/[Ox]$

- Régime de catalyse électrochimique homogène

Un régime catalytique électrochimique consiste à utiliser un catalyseur oxydoréductible de manière réversible dont la transformation d'une forme à l'autre est assurée d'une part par un échange électronique à l'électrode, et d'autre part par une réaction chimique en solution (Fig A6).

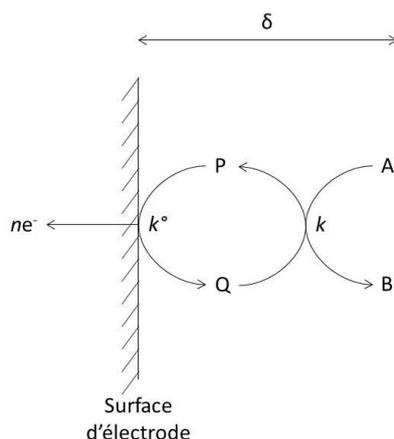


Fig A6 : Représentation schématique d'une catalyse de type EC (réaction Electrochimique puis réaction Chimique).
 Dans ce travail de thèse, $P = [\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{2+}$, $Q = [\text{Os}^{\text{III}}(\text{bpy})_3]^{3+}$, $A = L\text{-Tym}$ et $B = L\text{-Tym}^{\bullet}$

D'après la figure A6, la cinétique de catalyse peut être limitée (comme tout processus électrochimique) par le transfert de charge (k^o) et la réaction chimique en solution (k), ou par le transport de matière (D_P, D_A).

Les différentes formes de voltammogrammes qui peuvent être obtenues par voltammétrie cyclique dans un régime de catalyse homogène sont représentées figure A7.

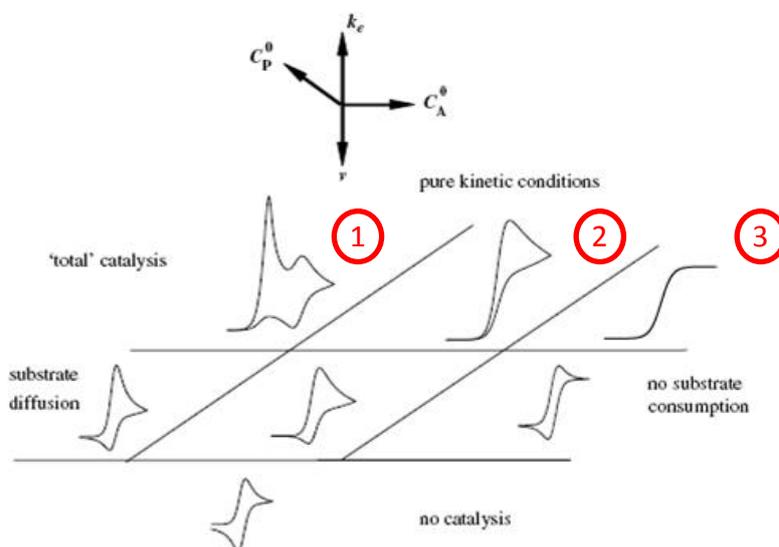


Fig A7 : Réaction de catalyse homogène par voltammétrie cyclique : diagramme de zone dans le cas où la réaction chimique homogène est l'étape limitante²¹⁴.

L'allure des voltammogrammes figure A7 dépend des paramètres k_e , C_A^0 , C_P^0 , et de la vitesse de balayage ν .

Lorsque k_e est grand comparé au temps caractéristique du voltammogramme (partie supérieure du diagramme de zone), trois cas de figure peuvent être rencontrés :

- (1) Le régime de catalyse est dit total : la catalyse est strictement limitée par la diffusion de substrat. Cela signifie un appauvrissement en substrat tel, que pour $E > E^\circ$ de la sonde, le catalyseur n'est plus impliqué dans la catalyse et se régénère à l'électrode, c'est pourquoi un voltammogramme réversible est observé après le pic de catalyse. L'intensité de pic de catalyse est décrite par l'équation²¹⁴ :

$$j_p = 0,609nFC_A^0\sqrt{D_A}\sqrt{\frac{Fv}{RT}} \quad (A10)$$

Où C_A^0 est la concentration initiale en substrat et D_A est son coefficient de diffusion.

- (2) Lorsque la concentration en substrat augmente, l'apport de substrat à l'électrode est suffisamment important pour maintenir le catalyseur dans la boucle catalytique, et ainsi les courants mesurés sont toujours limités par la diffusion du substrat ;
- (3) Lorsque la concentration en substrat augmente encore, sa consommation est largement négligeable devant son apport par diffusion à l'électrode. La réaction de catalyse est alors strictement limitée par la réaction chimique et un voltammogramme en forme de sigmoïde est obtenu. Pour des potentiels $E > E^\circ$ du catalyseur, la densité de courant est donnée par²¹⁴:

$$j_p = nFC_P^0\sqrt{D_P}\sqrt{k_e C_A^0} \quad (A11)$$

Où C_P^0 est la concentration initiale en catalyseur, D est son coefficient de diffusion, k_e est la constante de transfert électronique homogène et C_A^0 est la concentration initiale en molécule catalysée. Ce type de voltammogramme est obtenu pour une grande concentration en A devant P .

Annexe II : Expression analytique des variations de courant en configuration d'échange compétitif



$$\text{Avec} \quad K_d = (C_T \cdot C_A) / C_{AT} \quad (\text{A13a})$$

$$K_d^* = (C_{T^*} \cdot C_A) / C_{AT^*} \quad (\text{A13b})$$

Ou K_d^* représente la constante de dissociation de la cible marquée, C_{T^*} la concentration en cible marquée et C_{AT^*} la concentration en complexe cible marquée/ $D\text{-Apta}_{49}$.

D'après la loi de conservation des masses:

$$C_A^0 = C_{AT} + C_{AT^*} + C_A \quad (\text{A14a})$$

$$C_T^0 = C_T + C_{AT} \quad (\text{A14b})$$

$$C_{T^*}^0 = C_{T^*} + C_{AT^*} \quad (\text{A14c})$$

Après substitution et réarrangement:

$$C_A^3 + aC_A^2 + bC_A + c = 0 \quad (\text{A15})$$

$$\begin{aligned} \text{Avec} \quad a &= K_d + K_d^* + C_T^0 + C_{T^*}^0 - C_A^0 \\ b &= K_d \cdot (C_{T^*}^0 - C_A^0) + K_d^* \cdot (C_T^0 - C_A^0) + K_d \cdot K_d^* \\ c &= K_d \cdot K_d^* \cdot C_A^0 \end{aligned}$$

L'équation (A15) accepte 3 solutions mais une seule est physiquement acceptable :

$$C_A = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3}\sqrt{(a^2 - 3b)} \cdot \cos\frac{\theta}{3} \quad (\text{A16})$$

$$\text{Avec} \quad \theta = \arccos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

Si bien qu'à l'équilibre :

$$C_{AT} = \frac{C_T^0 \{2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}}{3K_d + \{2\sqrt{(a^2 - 3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}} \quad (\text{A17})$$

$$C_{AT^*} = \frac{C_{T^*}^0 \{2\sqrt{(a^2-3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}}{3K_d^* + \{2\sqrt{(a^2-3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}} \quad (A18)$$

En définissant la fraction libre de sonde en solution :

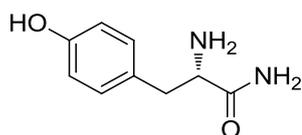
$$\chi_{L^*} = \frac{C_{T^*}}{C_{T^*}^0} = \frac{C_{T^*}^0 - C_{AT^*}}{C_{T^*}^0} \quad (A19)$$

Le dosage compétitif envisagé ici restant basé sur une différence de mobilité entre la cible libre et complexée, il est alors possible d'écrire l'expression du courant normalisé :

$$\frac{i_p}{i_p^0} = 1 - \frac{\{2\sqrt{(a^2-3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}}{3K_d^* + \{2\sqrt{(a^2-3b)} \cos(\frac{\theta}{3}) - a\}} \cdot \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (A20)$$

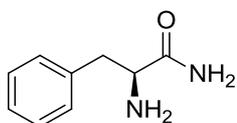
Annexe III : Liste des analogues structuraux et des cibles marquées

Analogues structuraux



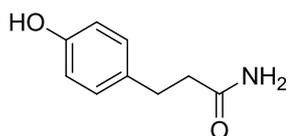
L-Tyrosinamide

$K_d = 2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$



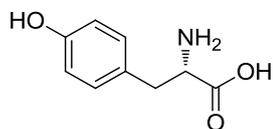
L-Phenylalaninamide

$K_d = 22 \pm 2 \mu\text{M}$



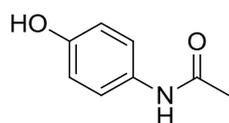
3-(4-hydroxyphenyl) propanamide

$K_d > 50 \mu\text{M}$



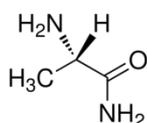
L-Tyrosine

Non Reconnue



Paracétamol

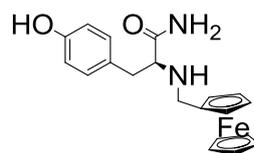
Non Reconnue



L-Alaninamide

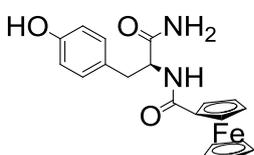
Non Reconnue

L-Tyrosinamide modifiée par une sonde redox



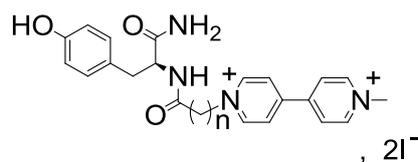
L-Fc-amine-Tym

Non Reconnue



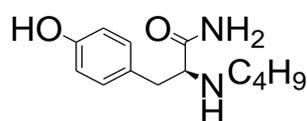
L-Fc-amide-Tym

Non Reconnue



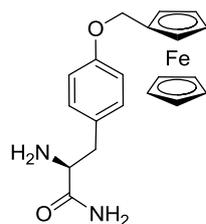
L-MV_n-Tym

Non Reconnue



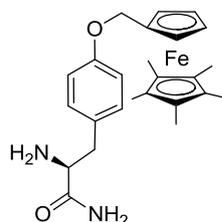
L-C₄H₉-amine-Tym

Non Reconnue



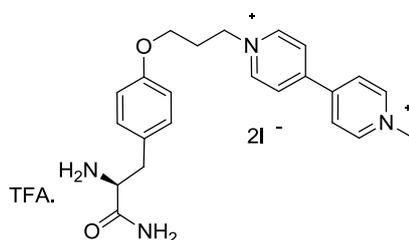
L-Tym-Fc

$K_d = 1,2 \pm 0,3 \mu\text{M}$



L-Tym-ptFc

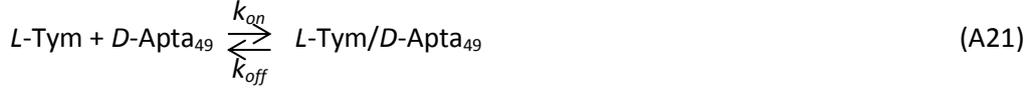
Non Reconnue



L-Tym-MV

$K_d = 0,4 \pm 0,1 \mu\text{M}$

Annexe IV : Expression analytique des courants pour l'analyse de la cinétique de la réaction de reconnaissance bimoléculaire



$$\text{Et} \quad K_d = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (\text{A22})$$

L'évolution des concentrations au cours du temps s'écrit alors :

$$-\frac{dC_T}{dt} = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_{AT}}{dt} = \frac{dx}{dt} = k_{on} \cdot (C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - k_{off} \cdot x \quad (\text{A23})$$

Ou

$$\frac{dx}{(C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - K_d \cdot x} = k_{on} \cdot dt \quad (\text{A24})$$

Où:

$$(C_T^0 - x)(C_A^0 - x) - K_d \cdot x = x^2 - x(C_T^0 + C_A^0 + K_d) + C_T^0 C_A^0 = 0 \quad (\text{A25})$$

Ce polynôme admet alors 2 solutions qui permettent de factoriser le polynôme du second degré :

$$\frac{dx}{(x-r_1)(x-r_2)} = k_{on} \cdot dt \quad (\text{A26})$$

Afin de pouvoir intégrer l'équation (A26), on pose:

$$\frac{1}{(x-r_1)(x-r_2)} = \frac{a}{x-r_1} + \frac{b}{x-r_2} \quad (\text{A27})$$

$$\text{Alors : } x(a+b) - a \cdot r_2 - b \cdot r_1 = 1 \quad (\text{A28})$$

$$\text{A condition que } x(a+b) = 0, \text{ alors } a = -b = \frac{1}{r_2 - r_1}$$

L'équation (A26) se réécrit :

$$\frac{dx}{(x-r_2)(x-r_1)} = \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \left(-\frac{1}{x-r_1} + \frac{1}{x-r_2} \right) \cdot dx = k_{on} \cdot dt \quad (\text{A29})$$

En intégrant, on obtient :

$$\frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln \frac{x-r_2}{x-r_1} = k_{on} \cdot t + C \quad (\text{A30})$$

$$\text{A } t=0 \text{ s, } x=0 \text{ soit } C = \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln \left(\frac{r_2}{r_1} \right) \quad (\text{A31})$$

En réarrangeant :

$$\ln\left(\frac{x-r_2}{x-r_1}\right) = (r_2 - r_1) \cdot \left(k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2-r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right) \quad (\text{A32})$$

$$\text{En posant : } (r_2 - r_1) \cdot \left(k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2-r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right) = \alpha$$

$$\text{On obtient : } \ln\left(\frac{x-r_2}{x-r_1}\right) = \alpha \quad \Leftrightarrow \frac{x-r_2}{x-r_1} = e^\alpha \quad \Leftrightarrow x = \frac{r_2-r_1 e^\alpha}{1-e^\alpha} \quad (\text{A33})$$

Cette mise en équation mène à définir χ_f , la fraction de cible libre :

$$\chi_f = \frac{C_T}{C_T^0} = \frac{C_T^0 - C_{AT}}{C_T^0} = 1 - \frac{1}{C_T^0} \cdot \frac{r_2 - r_1 \cdot \exp\left\{(r_2 - r_1) \left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}}{1 - \exp\left\{(r_2 - r_1) \left[k_{on} \cdot t + \frac{1}{r_2 - r_1} \cdot \ln\left(\frac{r_2}{r_1}\right)\right]\right\}} \quad (\text{A34})$$

Où r_1 et r_2 sont les racines de l'équation :

$$x^2 - x(C_T^0 + C_A^0 + K_d) + C_T^0 \cdot C_A^0 = 0 \quad (\text{A35})$$

L'équation générale pour la description d'une chute de courant due à un changement de coefficient de diffusion d'une sonde électrochimique peut être utilisée ici et donne :

$$\frac{i_p(t)}{i_p^0} = 1 - \frac{C_{AT}(t)}{C_T^0} \left(1 - \frac{i_p^\infty}{i_p^0}\right) \quad (\text{A36})$$

Annexe V : Microbalance à Quartz Electrochimique avec Dissipation (eQCM-D)

- Principe de la mesure par microbalance à quartz

Une microbalance à quartz est constituée d'un disque de quartz compris entre 2 électrodes d'or (fig A8).

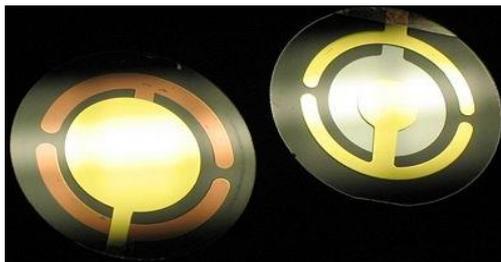


Fig A8 : Cristal de quartz recouvert d'électrode d'or : à gauche la surface de travail de 1 cm².

En appliquant une contrainte mécanique entre ces 2 électrodes, le cristal se déforme, provoquant un désordonnement des moments dipolaires et l'apparition d'une tension de part et d'autre du substrat piézoélectrique. A l'inverse, en appliquant une tension alternative aux bornes du quartz, des mouvements de cisaillement apparaissent dans le cristal. Ces 2 phénomènes sont indissociables. Grâce à cet effet *piézoélectrique*, il est donc possible de faire osciller le quartz à une fréquence de résonance de référence f° en appliquant une tension alternative (Fig A9).

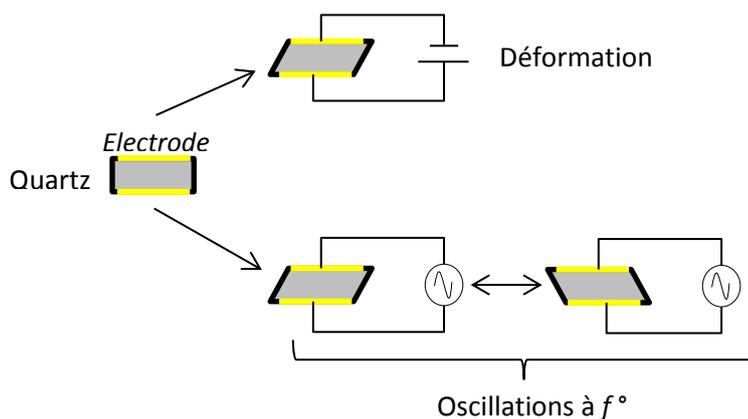


Fig A9 : Déformation du quartz pendant une polarisation, déformation du cristal de quartz avec une tension alternative.

Lorsque l'on construit une interface bioactive sur le cristal de quartz, sa fréquence de résonance est modifiée. Il est possible de convertir la variation de fréquence de résonance du quartz en une valeur de masse déposée dessus : lorsque des molécules s'adsorbent ou se greffent sur l'électrode de travail, ce nouveau matériau peut être considéré comme une extension du quartz en hauteur, et

dans le cas où il est considéré comme rigide et le dépôt homogène avec $\Delta f/f^o > 0,02$, alors on peut utiliser l'équation de *Sauebrey*²¹⁵:

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (A37)$$

Avec A la surface du quartz en cm^2 , ρ_q la densité du quartz en g.cm^{-3} et μ_q le module de cisaillement.

D'autres paramètres peuvent être extraits de ces expériences, en mesurant la dissipation de l'onde acoustique. Le principe de la mesure est de périodiquement éteindre/allumer la force motrice du capteur, et d'enregistrer la tension aux bornes du quartz provoquée par la relaxation de l'oscillation. Plus la couche est viscoélastique, plus la dissipation augmente. Par définition la dissipation est un nombre adimensionnel :

$$D = \frac{1}{Q} = \frac{E_{dissipée}}{2\pi E_{fournie}} \quad (A38)$$

Où Q est le facteur de qualité.

Cette approche de la microbalance à quartz ne peut cependant pas être traitée par le modèle de Sauerbrey. Lorsque le quartz est fonctionnalisé, la densité ρ_i , la hauteur h_i , ainsi que la viscosité η_i et l'élasticité du film μ_i vont influencer la fréquence de résonance du quartz, mais également la dissipation de l'onde acoustique.

En 1999, Voinova²¹⁶ a appliqué le modèle viscoélastique de Voigt pour analyser les données enregistrées par QCM-D. Le modèle viscoélastique est caractérisé par un module complexe qui dépend de h_i , ρ_i , η_i et μ_i . Des parties réelle et imaginaire de ce complexe, il est possible d'extraire respectivement ΔF et ΔD pour chaque couche constituant le film. L'analyse des variations de fréquences et de dissipation pour les harmoniques de fréquence d'oscillation fournit autant d'expérience indépendantes qu'il y a d'harmonique analysée. C'est le logiciel **Q-tools** qui permet d'ajuster théoriquement les données enregistrées.

Les supports de quartz étant recouverts d'or, ce matériau peut être utilisé comme électrode de travail pour faire des mesures électrochimiques parallèlement aux variations de fréquence. La société Q-Sense (Suède) commercialise ce type de dispositif (<http://www.q-sense.com/company>).

Résumé

Cette thèse porte sur la mise au point de nouvelles méthodologies électrochimiques pour la caractérisation d'une reconnaissance (bio)moléculaire énantiosélective entre un aptamère et sa cible.

En utilisant comme système modèle la L-Tyrosinamide et son aptamère de 49 nucléotides, un premier dispositif analytique pour la détection de la complexation en phase homogène a été mis au point. Cette approche repose sur la différence de coefficient de diffusion qui existe entre la forme libre de la cible et la forme complexée à l'aptamère. Initialement basée sur l'électroactivité intrinsèque de la cible via la fonction phénol, cette approche a été étendue aux molécules non électroactive grâce à une stratégie d'échange compétitif en marquant la cible par une fonction redox (ferrocène). Cette méthodologie a été utilisée avec succès pour la mesure précise d'excès énantiomériques jusqu'à 0,1 %. Couplée à une approche qualitative basée sur la prédiction des structures tertiaires de l'aptamère, cette technique a également permis de déterminer la séquence minimale requise de 23 nucléotides pour assurer la reconnaissance.

Un second dispositif combinant l'avantage de pouvoir travailler en microvolume (utilisation de faibles quantités de réactifs) aux avantages de mesures électrochimiques en convection forcée (temps de mélange rapide, courants stationnaires) a également été mis au point. Cette méthode d'électrochimie stationnaire en microvolume a alors permis de caractériser la cinétique (constante d'association k_{on} et de dissociation k_{off}) et la thermodynamique (K_d) de la réaction.

Abstract

This thesis concerns the development of new electrochemical methodologies for the characterization of enantioselective biomolecular recognition between an aptamer and its chiral target. By using a model system, the L-Tyrosinamide and its aptamer of 49 nucleotids, a first analytical device for the detection of the complexation in homogeneous phase was optimized. This approach is based on the difference of diffusion coefficient that exists between the free state of the target and the complexed state with the aptamer. Initially based on the intrinsic electroactivity of the target, via the phenolic function, this approach was extended to non electroactive molecules thanks to a competitive exchange strategy by marking the target with a redox function (ferrocene). This methodology was successfully used for the precise measure of enantiomeric excess until 0,1 %. Coupled with a qualitative approach based on the prediction of the tertiary structures of the aptamer, this technic also allowed to determine the minimal required sequence of 23 nucleotids to insure the recognition.

A second device combining the advantage of working in microvolume (use of small quantities of reactivities) and the advantages of electrochemical measures in forced convection (short mixing time, stationary current) was also developed. This method of stationary electrochemistry in microvolume then allowed the characterization of the kinetics (association constant k_{on} and dissociation constant k_{off}) and the thermodynamics (K_d) of the reaction.