



HAL
open science

Modifications chimiques des aptamères, pour des applications en imagerie biomédicale

Aref Hassan

► **To cite this version:**

Aref Hassan. Modifications chimiques des aptamères, pour des applications en imagerie biomédicale. Ingénierie biomédicale. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0242 . tel-01925859

HAL Id: tel-01925859

<https://theses.hal.science/tel-01925859>

Submitted on 18 Nov 2018

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ Biochimie

Par **Aref HASSAN**

**Modifications chimiques des aptamères, pour des applications en
imagerie biomédicale**

Sous la direction de : **Laurent AZÉMA**

Soutenue le 17 Novembre 2016

Membres du jury :

Mme. BESTEL Isabelle, Pr. , Directrice des études, Université de Bordeaux.	Présidente
M. LADAME Sylvain, Dr. , Joint Lecturer, Imperial College of London, U.K.	Rapporteur
M. PAQUEREAU Laurent, Pr. , IPBS, Université de Toulouse.	Rapporteur
M. KRYZA, David, Dr. , Praticien Hospitalier, Université Claude Bernard Lyon 1.	Examineur
M. AZEMA Laurent, Dr. , Inserm U1212, Université de Bordeaux.	Invité

A mon fils, Jad

A mon épouse, Rana

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué au sein du Laboratoire ARNA (Acides Nucléiques: Régulations Naturelles et Artificielles) à l'INSERM U1212 (Université de Bordeaux).

Je voudrais tout d'abord remercier mon Université Tishreen qui m'a attribuée une bourse de thèse dans le cadre de l'accord de collaboration scientifique Franco-Syrien.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie la Professeur Isabelle BESTEL qui m'a fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Toute ma reconnaissance également pour le Professeur Laurent PAQUEREAU, le Docteur Sylvain LADAME et le Docteur David KRYZA pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail en acceptant de le juger.

Je remercie Dr. Laurent AZEMA, mon directeur de thèse, pour m'avoir confié ce projet de recherche. Je te remercie de m'avoir encadré tout au long de ce travail de thèse. Je remercie également M. Jean Jacques TOULMÉ pour tous ses conseils dans les réunions d'équipes.

Je remercie l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail au sein de laboratoire «Institut des Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine» INCIA UMR-CNRS 5287 et au sein de laboratoire «Physico-Chimie des Matériaux Luminescents» IMTHERNAT -LPCML, UMR 5260 CNRS (Université Claude Bernard Lyon1) : Pr. Marc JANIER, Pr. Michèle ALLARD, Pr. Philippe FERNANDEZ, Dr. David KRYZA et Dr. Jürgen SCHULZ.

Je remercie également Dr. Sybille KENNEL, une amie très particulière avec qui j'ai eu le plaisir de partager ses années de thèse. Merci Sybille pour ton amitié, ta grande gentillesse tes conseils et toutes les aides. Merci pour ton soutien durant ces années de thèse et surtout à la fin. Tous mes vœux du bonheur dans ta nouvelle vie.

Je remercie toutes les personnes de l'équipe pour leur aide précieuse et je remercie l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail et les stagiaires Charlotte et Victor.

J'adresse un grand MERCI à tous les chercheurs, étudiants et techniciens que j'ai eu le plaisir de côtoyer au laboratoire, pour la bonne humeur et la convivialité qu'ils ont répandues au quotidien. Je remercie en particulier Pr. Philippe BARTHELEMY, Dr. Laurent LATXAGUE, Dr. Arnaud GISSOT, Dr. Eric AMIGUES et Dr. Valérie DESVERGNES.

Je tiens à remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu tisser des liens d'amitié au cours de cette thèse : Ananda, Sébastien, Jacques, Michaël, Shujaat, Maya, Thinhinane, Amira et Nabil.

Je remercie également Brune VIALET pour ses implications dans les synthèses d'oligonucléotides.

Je tiens à remercier Mme. katell BATHANY, Dr. Frédéric ROSU et Loïc KLINGER pour avoir réalisé toutes mes analyses de spectrométrie de masse.

Je voudrais adresser mes plus sincères remerciements et ma profonde gratitude à ma famille et ma belle famille en Syrie.

Mais surtout à toi, Rana, ma chère épouse. Merci pour ton amour et ton soutien. Dans tout ce que j'ai pu souffrir et obtenir, tu étais l'autre moi. Tu m'as donné du courage et une force que je ne me connaissais pas pour surmonter bien des obstacles. Merci ma chérie: Dr. Haidar.

En fin, pour terminer un grand Merci à mon petit bout de chou, mon fils Jad, à qui je dois tout ce bonheur et à qui je dédie cette thèse.

Un grand hommage en dernier lieu à mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes études, j'espère que vous êtes, comme toujours, fiers de moi.

Sommaire

Abréviations.....	8
CHAPITRE I : INTRODUCTION	11
A. Les aptamères.....	12
A.1. Introduction aux aptamères acides nucléiques	12
A.2. Structure des aptamères	13
B. SELEX.....	14
C. Propriétés et caractéristiques des aptamères.....	16
C.1. Taille	16
C.2. Affinité	16
C.3. Spécificité	19
C.4. Avantages et limitations des aptamères et des anticorps	20
C.5. Exemples d'aptamères	21
D. Modifications chimiques des aptamères.....	22
D.1. Les modifications pré SELEX :	23
D.2. Les modifications post-SELEX	25
E. Synthèse chimique des aptamères.....	26
E.1. La synthèse en solution	26
E.2. La synthèse sur support.....	26
E.3. Synthèse d'oligonucléotides par la méthode au phosphoramidite	27
CHAPITRE II : APTAMERES EN IMAGERIE BIOMEDICALE	32
A. Les différentes techniques d'imagerie médicale.....	33
A.1. Introduction.....	33
A.2. Imagerie nucléaire.....	33
A.3. Imagerie optique	38
A.4. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	42
A.5. Imagerie multimodale	42
B. Aptamères <i>in vivo</i>	43
B.1. Aptamère anti-tenascine	44
B.2. Aptamère anti-PSMA.....	45
B.3. Aptamère Sgc8	46
B.4. Aptamère AS1411.....	46
C. Amélioration de la sonde pour des applications <i>in vivo</i>	46

C.1. Amélioration de la biodisponibilité des aptamères	46
C.2. greffage de groupes d'intérêt	48
PROJET DE THESE	53
CHAPITRE III : SONDE MONOMERIQUE DE F3B	60
A. Synthèse des dérivés de F3B	61
B. Validation de la reconnaissance des F3B modifiés avec la protéine MMP-9	62
B.1. SPR.....	63
B.2. Polarisation de Fluorescence.....	67
C. Travaux en collaboration sur les aptamères in imagerie biomédicale (ImMelApt)	70
D. Modification l'aptamère F3B avec une chaîne PEG ₂₀₀₀₀	88
CHAPITRE IV : SONDE MULTIMERIQUES ET MULTIFONCTIONNELLES DE F3B	90
A. Travaux en collaboration sur l'Imagerie Photonique <i>In Vivo</i> à l'aide de conjugués Aptamère-Nanoparticule	93
B. Sonde multimériques et multifonctionnelles.....	95
B.1. Synthèse d'une plateforme Biotine-dendron-2F3B	95
B.2. Résultat de SPR de la plateforme Biotine-dendron-2F3B [D(F3B- espaceur HEG) ₂]	102
B.3. Synthèse d'une plateforme dendron-2F3B-2DOTA	105
B.4. Synthèse d'une plateforme dendron-F3B-11F46A.....	109
B.5. Synthèse d'une sonde tétramérique bifonctionnelle H ₂ N-dendrimère Janus -2F3B-2(11F46A)	113
B.6. Synthèse d'une plateforme biotine-dendrimère PAMAM-nF3B-nDOTA	119
Conclusions Générale et perspectives	126
CHAPITRE V : PARTIE EXPERIMENTALE	130
A. Matériel et méthodes	131
A.1. Solvants et réactifs	131
A.2. Techniques Chromatographiques	131
A.3. Oligonucléotides.....	133
B. Synthèse des dérivés de F3B et de 11F46A	139
B.1. Synthèse de F3B- espaceur HEG-NH ₂	139
B.2. Synthèse de F3B- dT-NH ₂	139
B.3. Synthèse de F3B- espaceur HEG-SH	140
B.4. F3B-espaceur HEG-alcyne.....	141
B.5. 11F46A-espaceur HEG-alcyne	142
B.6. Synthèse de F3B- espaceur HEG-DOTA	142
B.7. Synthèse de F3B- dT-Cy5	144

B.8.	Synthèse de F3B- espaceur HEG-ATTO 590.....	145
B.9.	Synthèse de F3B- espaceur HEG-Biotine	146
B.10.	Synthèse de F3B- dT-Biotine	147
B.11.	11F46A- espaceur HEG-Biotine	148
C.	Synthèse des dérivés de dendron/dendrimère.....	150
	Références Bibliographiques.....	173

Abréviations

A	Adénine
ACN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
AcOH	Acide acétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMV	Avian myeloblastosis <i>virus</i>
ARN	Acide Ribonucléique
ATG	Analyse Thermo Gravimétrique
ATP	Adénosine triphosphate
BODIPY	Bore-dipyrométhène
C	Cytidine
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CD₃OD	Methanol-d4
CE	Capture électronique
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CHCl₃	Chloroforme
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLHP	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CPG	Controlled Pore Glass
CuAAC	Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition
DCC	Dicyclohexylcarbodiimide
DCM	Dichlorométhane
DCU	Dicyclohexylurée
DLS	Dynamic light scattering
DMAP	4-Diméthylaminopyridine
DMF	Diméthylformamide
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMTr-Cl	4,4'-Diméthoxytrityl chloride
DO	Densité Optique
DOPA	3,4-Dihydroxyphénylalanine
DOTA	Acide 1,4,7,10-tetraazacyclododécane-1,4,7,10-tetraacétique
Dox	Doxorubicine
DRIFT	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
DTPA	Acide diéthylène triamine penta acétique
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGFRvIII	Variante du récepteur du facteur de croissance épidermique III
ELISA	Enzyme Like ImmunoSorbent Assay
EpCAM	Molécule d'adhésion cellulaire épithéliale
EPR	Enhanced Permeability and Retention
eq	Equivalents
ESI	Electrospray Ionization
Et₃N	Triéthylamine
Et₂O	Diéthyl éther
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
FDG	Fluoro-Desoxy-Glucose
FMT	Tomographie Moléculaire de Fluorescence

FPR	Récepteur Peptidique Formyle
FRET	Fluorescence ou Förster Resonance Energy Transfer
G	Guanine
GMPS	Guanosine monophosphothioate
GTX1/4	Gonyautoxine 1/4
HDP	HydroxyDiPhosphonate
HEG	Hexaethylene glycol
HER2	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2
HNA	Hexitol nucleic acid
ICMCB	Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux
IECB	Institut Européen de Chimie et Biologie
INCIA	Institut de Neurosciences cognitives et intégratives d'Aquitaine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ISM	Institut des Sciences Moléculaires
K_d	Constante de dissociation
kDa	Kilo dalton
k_{off}	Constantes cinétique de dissociation
k_{on}	Constantes cinétique d'association
LAGEP	Laboratoire d'Automatique et de Génie des Procédés
LNA	locked nucleic acid
M2	CH ₂ Cl ₂ : AcOEt 1 : 1
MAG	Mercaptoacétylglycine
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation- time-of-flight mass spectrometry
MB	Molecular beacon
MDP	MéthylèneDiPhosphonate
MeOH	Methanol
TEM	Transmission electron microscopy
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMP-9	Métalloprotéase matricielles 9
MMTr	4-Methoxytriphenylchloromethane
MS	Spectrométrie de masse
mTECs	Mouse tumor endothelial cells
MUC1	Mucine1
N	Normalité
NF-KB	Nuclear factor-kappa B
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NMP	<i>N</i> -méthylpyrrolidone
NOTA	1,4,7-triazacyclononane- <i>N,N',N''</i> -triacetic acid
NPC	Nasopharyngeal carcinoma
NS1	protéine 1 non-structurale
NTA	Nitrilotriacetic acid
nts	Nucléotides
2'-O-Me	2'-O-méthyl
OPN	Ostéopontine
³¹P	Phosphore
PAMAM	Poly(amidoamine)
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyéthylène glycol
pH	Potentiel hydrogène
POE	polyoxyethylene
ppm	Partie par million
PSMA	Prostate-specific membrane antigen

PTK7	Protéine tyrosine kinase 7
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSB	Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques
rpm	Rotation par minute
SA	Streptavidine
SAACQ	Single Amino Acid Chelate Quinoline
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
SERCA2a	Sarco / réticulum endoplasmique Ca ²⁺ -ATPase 2a
SPR	Résonance plasmonique de surface
T	Thymine
TA	Température ambiante
TAR	Trans-activation response
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1.2.3-triazol-4-yl)méthyl]amine
TEAA	Triéthylammonium acétate
TEG	Triéthylène glycol
TEMP	Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP	Tomographie par émission de positons
THF	Tétrahydrofurane
TIMP-2	Metallopeptidase inhibitor 2
TMA	Tissue Micro Array
TMTr-Cl	Timéthoxytrityl chloride
Tris	Tris (hydroxyméthyl)aminométhane
TTA-1	Tumor Targeting by an Aptamer
U	Uridine
UMR	Unité mixte de recherche
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
ξ	Coefficient d'extinction molaire

CHAPITRE I :
INTRODUCTION

A. Les aptamères

A.1. Introduction aux aptamères acides nucléiques

La découverte de nouvelles molécules capables d'interagir fortement et spécifiquement avec des cibles biologiques (protéines, petites molécules, peptides, acides nucléiques, cellules intactes, etc...) présente un double intérêt: détecter la présence d'une biomolécule (toxine, marqueur tumoral) d'une part et utiliser un signal d'entrée dans une cellule (tel que le récepteur VEGF) pour délivrer un médicament d'autre part. Parmi ces molécules, les anticorps jouent un rôle central [1]. Mais depuis 25 ans, une autre classe de ligand artificiel émerge, les aptamères. Ces courtes séquences oligonucléotidiques ADN, ARN ou ARN modifié, sont capables de lier spécifiquement une cible. Ce terme vient du mot latin «apta» qui signifie «être adapté à». Ils peuvent être dirigés contre des cibles très variées des protéines aux petites molécules organiques [2, 3]. Les aptamères s'inspirent de structures naturellement présentes dans les systèmes biologiques: les "riboswitch", régulateurs de l'expression génique. Ces systèmes à structure ARN sont composés de deux parties en perpétuelle relation: une partie aptamère permettant la reconnaissance d'un métabolite, suivi en aval d'une plateforme d'expression génique influencée par la partie aptamérique. La présence ou non de la cible engendre une réponse de type ON/OFF sur l'expression du ou des gènes associés. En se basant sur la théorie de l'évolution, on peut supposer que ces riboswitchs sont les structures les plus adaptées à la fonction, obtenues par sélection à partir de plusieurs séquences possibles. Suivant ce principe, une méthode *in-vitro* de sélection d'aptamères a été développée au début des années 1990 [4, 5]; l'approche SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) vise à sélectionner à partir d'une banque initiale d'oligonucléotides (jusqu'à 10^{15} séquences), des séquences suivant un critère défini (tel que la fixation d'une cible), permettant ainsi d'obtenir les séquences les plus affines pour le critère choisi [6].

Ces courts acides nucléiques trouvent des applications dans de nombreux domaines: santé, cosmétique, sciences environnementales. De par leurs structures 3D, les aptamères sont capables de se lier avec une haute spécificité et affinité à une large variété de molécules suivant des interactions de type Van der Waals, électrostatiques, ioniques ou liaisons hydrogènes [7, 8].

Ils possèdent les mêmes avantages que les anticorps en terme de reconnaissance de leur cible, mais ils sont beaucoup moins chers à produire, plus résistants et ne provoquent pas de réaction du système immunitaire. Ils peuvent être facilement marqués ou conjugués, ce qui permet de les utiliser pour des applications diagnostiques, analytiques (fixation sur des biopuces, radiomarquage, balises moléculaires fluorescentes) ou thérapeutiques (vectorisation, conjugaison à des chaînes polyéthylène glycol). Ils ont ainsi commencé à être utilisés en essais cliniques pour des maladies telles que le cancer, le VIH et la dégénérescence maculaire [9]. De nombreux aptamères ont été mis au point sur le plan

clinique en tant qu'inhibiteurs de cibles telles que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et la thrombine.

A.2. Structure des aptamères

Les acides nucléiques sont des polymères de briques élémentaires; les nucléotides. Chaque nucléotide est constitué de trois parties: une base azotée, un sucre et un groupement phosphate (Figure 1.1). L'ADN et l'ARN se différencient par la nature du sucre qui les compose: le 2-désoxyribose pour l'ADN et le ribose pour l'ARN. Concernant les bases azotées, l'adénine (A), la cytosine (C) et la guanine (G) sont présentes à la fois dans l'ADN et l'ARN, alors que la thymine (T) est spécifique de l'ADN et l'uracile (U) de l'ARN [10]. Un nucléotide est donc un nucléoside portant un ou plusieurs groupements phosphates sur une des fonctions hydroxyles du sucre.

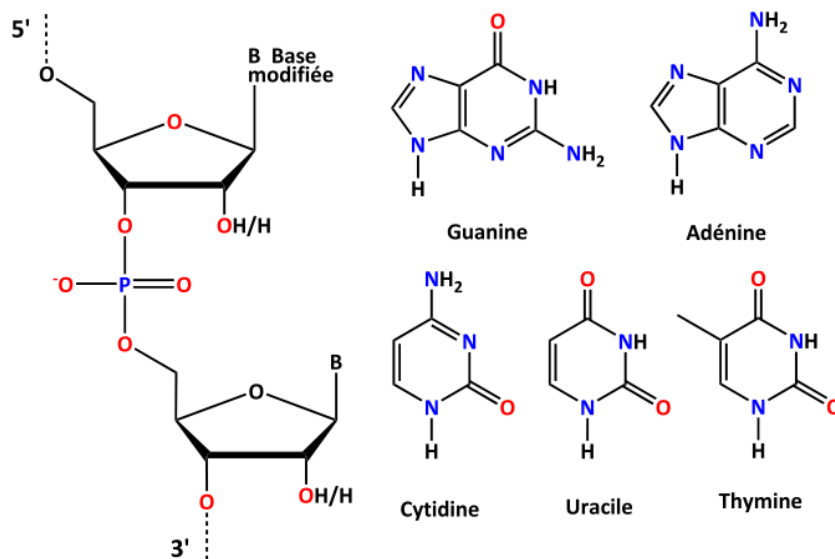


Figure 1.1. Nucléotides à bases puriques et pyrimidiques. B peut être : Guanine, Adénine, Cytidine, Uracile ou Thymine

La structure de l'ADN se caractérise par deux chaînes polynucléotidiques appariées antiparallèlement l'une à l'autre en une structure hélicoïdale régulière. La structure des acides nucléiques est hiérarchisée en structure primaire, secondaire et tertiaire.

La stabilité de l'ensemble de la molécule d'ADN est ainsi assurée entre autres par les liaisons hydrogène existantes entre les bases complémentaires (Figure 1.2). En effet deux bases puriques ne peuvent se faire face, car du fait de leur grande taille, il y aurait encombrement stérique; de même deux bases pyrimidiques sont trop petites et donc trop éloignées pour qu'il y ait interaction. La thymine s'apparie avec l'adénine et la cytosine avec la guanine grâce à la présence de fonctions donneuses et acceptrices de liaison hydrogènes [11].

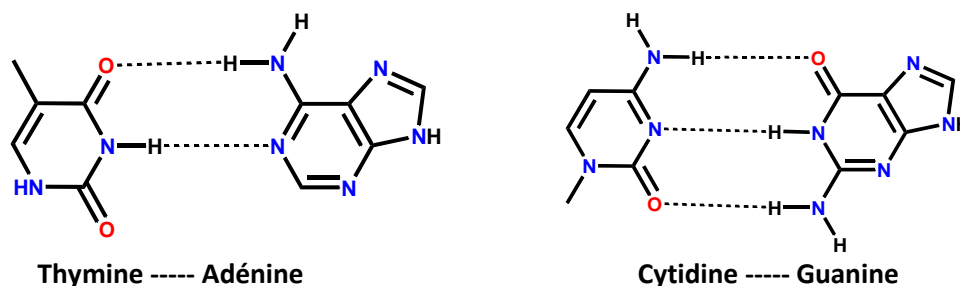


Figure 1.2. Représentation des liaisons hydrogène entre les bases appariées

Les aptamères sont des structures habituellement simple brin, présentant des structures secondaires par repliement intramoléculaire. La stabilisation d'une tige-boucle dépend de la taille et de la composition des parties boucles et tiges. Les structures les plus stables sont celles composées de quatre ou cinq bases dans la partie boucle alors que les tige-boucles d'ARN les plus stables en comportent six ou sept [12]. Les structures tridimensionnelles d'aptamères les plus courantes sont présentées dans la figure 1.3 [13, 14]: ALIL (apical loop, internal loop), tige boucle (avec ou sans renflement), pseudo-nœud, tétrade de G.

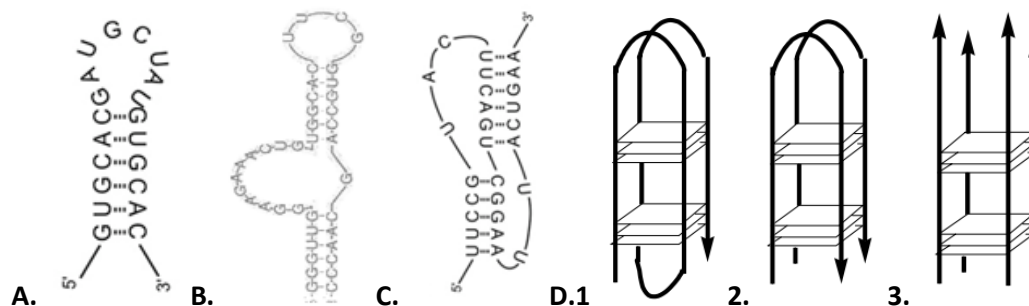


Figure 1.3. Structures tridimensionnelles des aptamères en solution, A) Epingle, B) Tige-boucle, C) Pseudo-nœud, D.1) Quadruplex monomérique, D.2) Quadruplex dimérique antiparallèle, D.3) Quadruplex tétramérique [13, 14]

B. SELEX

Le SELEX est une méthode de sélection *in vitro* permettant d'isoler à partir d'une large banque d'oligonucléotides des séquences spécifiques pour une cible donnée [4, 5]. La taille de la partie variable dicte la diversité de la banque qui est égale à 4^n , chaque position pouvant être occupée par l'un des quatre nucléotides A, T, G ou C. Ainsi, les banques explorées comprennent jusqu'à 10^{15} composés différents, ce qui correspond à une banque où la taille de la séquence variable n est de 25 nucléotides et où tous les candidats sont représentés, ou encore à une banque où n est égal à 30. Ainsi, plus n augmente, plus la proportion de séquences théoriques testées diminue. La banque initiale de candidats est composée de séquences de type ADN, ARN, ARN 2'OH purine/2'-F pyrimidine synthétisées chimiquement [1]. Elles comportent une région variable composée classiquement de 30 nucléotides, encadrée par des régions fixes identiques pour tous les candidats de la banque. Ces régions fixes permettent la manipulation de la banque au cours du SELEX, notamment

l'amplification par PCR. En résumé, l'utilisation de cette méthode combinatoire repose sur la maîtrise de trois étapes essentielles (Figure 1.4) : la synthèse d'une banque de composés, le criblage de ces composés afin de sélectionner celui ou ceux qui possèdent les propriétés désirées et enfin l'identification des candidats sélectionnés. Après sélection, les candidats sont amplifiés par PCR, ou RT-PCR/transcription dans le cas d'un criblage avec une banque d'ARN. Les produits de cette amplification peuvent à nouveau être criblés pour la propriété recherchée. L'alternance sélection/amplification permet de diriger l'évolution de la population.

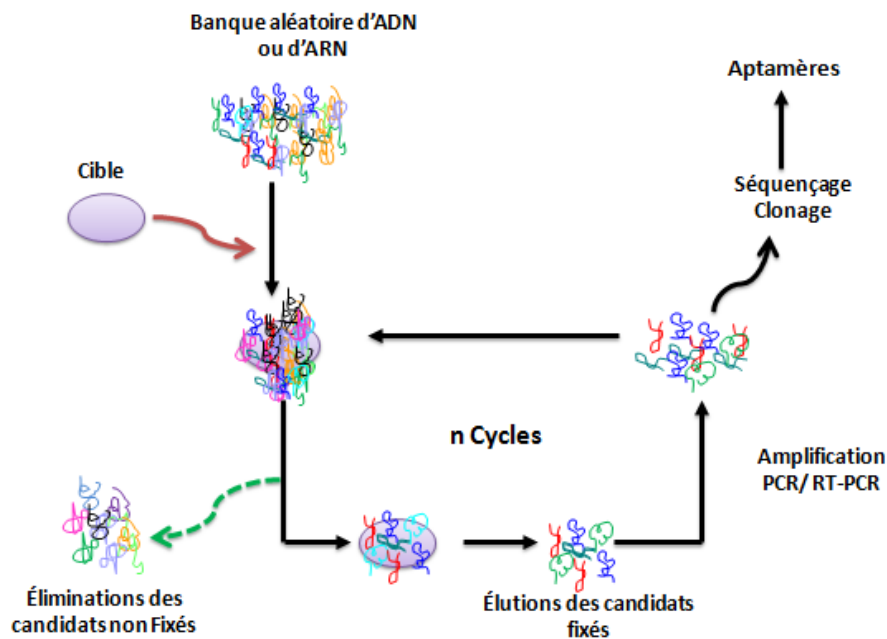


Figure 1.4. La stratégie SELEX pour l'identification d'aptamères [15]

Cette technique, largement employée depuis 1990, a conduit à l'identification d'aptamères dirigés contre de petites molécules organiques, des protéines, des acides nucléiques, des ions, ou des systèmes biologiques complexes (cellules, virus) [16-19]. Des aptamères ont ainsi été décrit pour cibler le cancer du côlon [20], le cancer du sein [21], la leucémie [22] et le cancer du foie [23, 24].

Enfin, on peut noter que la technologie SELEX a bénéficié depuis sa mise au point de différentes améliorations ou variations, pour conduire à une plus grande efficacité de sélection ou à des sélections originales basées sur la fonction de l'aptamère [13, 25-27]. On peut citer : le **photo-SELEX**, également appelé SELEX covalent, permet de sélectionner des oligonucléotides via la formation d'une liaison covalente photo induite avec la cible. Les aptamères ainsi obtenus sont appelés photo-aptamères. Le **Cell-SELEX** [28] et le **Tissu-SELEX** [29] ont été développés pour identifier des aptamères capables de reconnaître les cellules cancéreuses ou les tissus tumoraux pour le traitement du cancer et le diagnostic. Le **Neutral SELEX** : sans étape de sélection. Le **Non-SELEX** : cette stratégie impliquant la répétition d'étapes de sélection sans phase d'amplification a conduit, par exemple, à la caractérisation d'un aptamère dirigé contre la protéine h-Ras [30]. L'absence d'amplification par PCR entre

chaque cycle de sélection permet de réduire considérablement le temps nécessaire pour obtenir l'aptamère recherché. Le **CE-SELEX** : l'électrophorèse capillaire (EC) peut être utilisée pour séparer un mélange d'aptamères libres et d'aptamères liés à leur cible. Cette méthode permet de séparer, sous l'influence d'un champ électrique, des espèces ionisées en fonction de leur charge, des forces de friction qui s'exercent sur elles et donc de leur rayon hydrodynamique [31]. Après incubation en solution de la bibliothèque d'oligonucléotides avec la cible, le mélange est injecté en entrée du capillaire. Les séquences liées et non liées à la cible sont alors séparées du fait de leur différence de mobilité. Cette technique permet d'améliorer significativement la rapidité et l'efficacité de l'étape de sélection. Le **Cross-over SELEX** : cette stratégie permet de développer un aptamère reconnaissant une cible membranaire par alternance de cycle de sélection *in-vitro* contre la protéine isolée et *in vivo* par Cell-SELEX [32]. **AFM-SELEX** : cette stratégie est basée sur l'utilisation de la microscopie à force atomique. Une mesure dynamique de la force d'adhésion entre une surface d'or fonctionnalisée par la molécule-cible et un levier fonctionnalisé par une banque d'oligonucléotides simple brin permet la sélection d'aptamères de haute affinité, comme démontré dans une preuve de concept pour un aptamère dirigé contre la thrombine [33]. **Spiegelmers** (de « Spiegel », miroir en allemand): cette technique a pour but d'augmenter la résistance aux nucléases en utilisant une propriété physico-chimique des acides nucléiques : leur chiralité. La sélection d'un aptamère en série D contre l'énantiomère de la cible assure la reconnaissance de la cible par l'énantiomère en série L de l'aptamère. L'aptamère en série L ainsi obtenu sera résistant aux nucléases. On peut citer comme exemple : un aptamère dirigé contre des nucléosides (D-adénoside), des acides aminés (L-arginine) et des peptides (vasopressine) telle la gonadolibérine ou GnRH [34].

C. Propriétés et caractéristiques des aptamères

C.1. Taille

La taille d'un aptamère est en général inférieure à 100 nucléotides. Selon la séquence des aptamères sélectionnés par le procédé SELEX, il est préférable que l'aptamère soit le plus petit possible, pour un problème de coût, pour des raisons d'accessibilité de la cible et pour minimiser les interactions non spécifiques. Par exemple, le motif minimal des aptamères spécifiques du VEGF comprend entre 23 et 35 nucléotides. L'aptamère antithrombine, constitué de 15 nucléotides, est un des aptamères les plus courts [35]. L'aptamère anti-cocaïne est de 38 nucléotides [36]. L'aptamère spécifique d'une protéase à sérine du sang (la protéine C) est de 99 nucléotides [37].

C.2. Affinité

Le paramètre qui rend compte de l'affinité d'un aptamère envers sa cible est la constante de dissociation K_d . Les affinités entre la molécule cible et ligands dépendent des liaisons non covalentes qui s'établissent entre les deux molécules, qui peuvent être des

liaisons de nature électrostatique, hydrophobe, des liaisons hydrogène, etc. Plus la valeur de K_d est faible, plus l'affinité de l'aptamère pour sa cible est forte.

L'interaction réversible entre le ligand et la cible est décrite comme suit :



A : aptamère; B : cible; AB : complexe aptamère/cible; k_{on} : Constante cinétique d'association de la réaction $M^{-1}.s^{-1}$; k_{off} : Constante cinétique de dissociation s^{-1} .

Selon la loi d'action de masse : $v_1 = k_{\text{on}}[A].[B]$ et $v_2 = k_{\text{off}}[AB]$

A l'équilibre du système : $v_1 = v_2$ donc $k_{\text{on}}[A].[B] = k_{\text{off}}[AB]$

Si l'on considère le quotient des deux constantes cinétiques k_{off} et k_{on} on obtient le K_d :

$$K_d = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[A].[B]}{[AB]}$$

Ce modèle simple est valable lorsque la stœchiométrie 1/1 entre cible et aptamère est confirmée. Sans connaissance exacte de celle-ci, on déterminera un K_d apparent, correspondant à 50% de formation de complexe.

Les constantes de dissociation des aptamères sont de l'ordre de la micro molaire jusqu'au pico molaire selon la taille des molécules d'intérêts [38]. Une affinité importante pour une cible est obtenue avec des ligands possédant une adéquation parfaite de forme pour la molécule cible, une distribution de charges parfaitement complémentaire et du nombre d'épitopes (plus des interactions spécifiques sont possibles, plus le complexe sera stable, et donc se formera facilement). Ainsi, les aptamères fixant les protéines possèdent en général, les plus hautes affinités. On peut citer certains exemples d'aptamères sélectionnés contre des cibles différentes (Tableau 1.1): des molécules inorganiques, des petites molécules organiques, des peptides, des protéines, des hydrates de carbone, des antibiotiques et des cibles complexes que les cellules entières, les bactéries et les virus utilisés en tant que cible dans la sélection des aptamères.

Tableau 1.1. Liste Certains exemples de cibles utilisées dans SELEX depuis 1990 avec leurs constantes de dissociation

Cible	Chimie	K_d	Référence
α-thrombin	ADN	200 nM	[35]
Riboflavin	ARN	1-5 μ M	[39]
Zn²⁺	ARN	1.2 nM	[40]
Adenosine/ATP	ADN	6 μ M	[41]
Biotine	ARN	5 μ M	[2]
Dopamine	ARN	2.8 μ M	[42]
TAR RNA element of HIV-1	ARN	20-50 nM	[43]

Tetracycline	ARN	1 µM	[44]
U251 glioblastoma cells	ARN	5 nM	[45]
Adénine	ARN	10 µM	[46]
Immunoglobulin E	ADN	23-39 nM	[47]
L-Histidine	ARN	8-54 µM	[48]
Ethanolamine	ADN	6-19 nM	[49]
HIV-1 RT	ADN	180-500 pM	[50]
Streptavidin	ADN	57-85 nM	[51]
Hepatis C virus RdRp	ADN	1.3-23.5 nM	[52]
Tumor marker MUC1	ADN	0.1-34 nM	[53]
Ricin toxin	ADN	58-105 nM	[54]
CCRF-CEM leukemia cells	ADN	0.8-229 nM	[28]
Dendritic cell SIGN protein	ADN	21.73 nM	[55]
Tetracycline	ADN	63-483 nM	[3]
Liver cancer cell (MEAR)	ADN	4.51-157 nM	[23]
NF-KB	ARN	11-149 nM	[56]
2-anilinophenyl acetic acid	ADN	42.7-166.3 nM	[57]
(1-3)-β-D-glucon	ADN	303 nM	[58]
8-OHd6	ADN	0.1 µM	[59]
Amyloid β-peptide	ARN	10.9-21.6 µM	[60]
Prostate specific antigen	ADN	40-100 nM	[61]
Colorectal Cancer Cells	ADN	0.7-302 nM	[62]
Ovarian Cancer Cells	ADN	0.25-132 nM	[63]
HIV-1 LTR DNA duplex	ADN	0.1-2 µM	[64]
Interleukin 17A	ARN	72.2 nM	[65]
Bisphenol A	ADN	8.3-208 nM	[66]
Acetamidrid	ADN	4.98 µM	[67]
UO₂²⁺	ADN	84.6 pM	[68]
Human HER2	ARN	3.5 nM	[69]
Human PSMA	ARN	5.0 nM	[70]
EpCAM	ARN	55 nM	[71]
Mouse TrkB	ARN	2 nM	[72]
Rat HER2	ARN	60.8 nM	[73]
OPN	ARN	18 nM	[74]
U118-MG glioblastoma cells	ADN	20 nM	[75]
Salmonella Typhimurium	ARN	20 nM	[76]
NS1	ADN	18.91 nM	[77]
EGFRvIII	ADN	100 nM	[78]
mGP2	ARN	110 nM	[79]
mTECs	ADN	43 nM	[80]
T-2 Toxin	ADN	20.8 nM	[81]
EpCAM	ADN	5.48 µM	[82]
SERCA2a	ARN	11 nM	[83]
HER2	ADN	270 nM	[84]
β-Casomorphin-7	ADN	7.7-156.7 nM	[85]
HepG2	ADN	64-349 nM	[24]

REase inhibition	ARN	12-30 nM	[86]
mini-hairpin	ADN	33 pM	[87]
GTX1/4	ADN	17.7 nM	[88]
(1→3)-β-D-glucans	ADN	79.7- 103.7 nM	[89]
K 308 glioblastoma cells	ADN	21 nM	[90]
Streptococcus pyogenes (M-type 11)	ADN	7 nM	[91]
A12 LNCap cells PSMA	ADN	33.78 PM	[92]
B1 LNCap cells PSMA	ADN	57.49 PM	[92]
S3 NPC	ADN	11.93 nM	[93]

C.3. Spécificité

Les aptamères possèdent une grande spécificité envers leur cible. Il est important de noter que la spécificité n'est pas liée à la taille, à la complexité ou à la quantité de molécule cible. Cette spécificité peut être une propriété imposée par les conditions choisies lors du SELEX grâce aux cycles de contre sélection. De nombreux exemples montrent l'extraordinaire spécificité de certains aptamères tel que l'aptamère anti-cocaïne. En effet, ce dernier ne reconnaît pas le métabolite principal de la cocaïne, la benzoylecgonine qui diffère seulement par l'absence d'un groupement méthyle [36, 38]. De même l'aptamère sélectionné contre la transcriptase inverse du VIH-1 [94] n'interagit pas avec les enzymes homologues du virus aviaire (AMV), ni avec celles du virus murin (MMLV). Les aptamères ont la capacité de distinguer des sucres épimères, anomères et même une modification du lien osidique [95]. On peut citer également en exemple l'aptamère anti-théophylline. L'utilisation de cycles de contre sélection avec la caféine a permis d'obtenir une différence d'affinité d'un facteur 10^4 pour la caféine (Figure 1.5) [96].

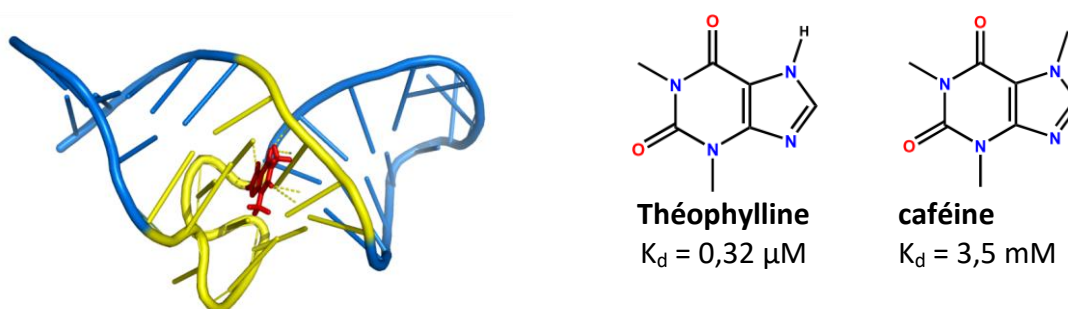
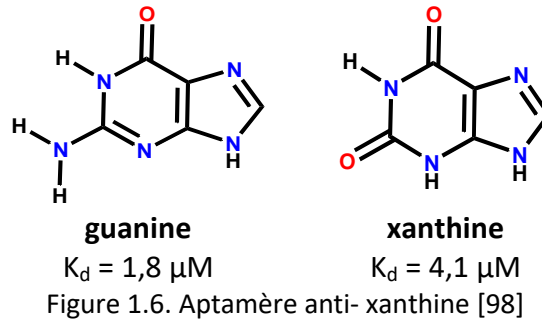


Figure 1.5. Aptamère anti- théophylline

Les capacités de discrimination ne sont cependant pas observées pour tous les aptamères. On peut citer quelques exemples : Les aptamères sélectionnés contre le coenzyme A reconnaissent également l'AMP [97]. Ceux sélectionnés contre la xanthine reconnaissent aussi la guanine (Figure 1.6) [98].



Ceux sélectionnés contre le facteur de croissance des plaquettes sanguines humaines reconnaissent leurs homologues murins [99]. Ceux sélectionnés contre la cellobiose reconnaissent la cellulose [95].

C.4. Avantages et limitations des aptamères et des anticorps

Les aptamères ont des avantages distincts par rapport aux anticorps comme agents thérapeutiques et diagnostiques potentiels. Ils peuvent être isolés *in vitro* et rapidement modifiée pour inclure des chromophores, des fluorophores, des marqueurs radioactifs ou des nouveaux groupes chimiques [100]. Les aptamères peuvent remplacer les anticorps protéiques conventionnels parce qu'ils sont plus stables, peu coûteux, faciles à produire, rapide et moins toxiques. Ils sont par ailleurs moins immunogènes, facteur important pour des applications thérapeutiques animales ou humaines [101]. Les aptamères peuvent être dénaturé de manière réversible. La taille plus réduite des aptamères, qui représente environ un dixième de celle des anticorps [102], permet un greffage plus dense sur un support, et permet d'avoir accès à des épitopes de protéines qui pourraient être bloqués ou cachés [103]. *In vivo*, plusieurs aptamères sont disponibles pour le ciblage des biomarqueurs antigéniques : PSMA, HER-3 ou anti-mucine (anti-MUC1) [104, 105].

Cependant, la petite taille rend l'aptamère sensibles à la filtration rénale et donc une clairance plus rapide. Les aptamères non modifiés sont très sensibles aux exonucléases et aux endonucléases.

En parallèle, les anticorps ont quant à eux apporté une énorme contribution à un large éventail d'applications basées sur la reconnaissance moléculaire. Les anticorps sont largement utilisés en raison de leurs grandes spécificités et affinité pour son antigène ($K_d = 10^{-7} - 10^{-10}\text{M}$) [14]. Ils ne sont pas sensibles à la dégradation induite par les nucléases et leur grande taille empêche la filtration. Beaucoup d'anticorps sont polyclonaux.

On peut toutefois citer plusieurs limitations à l'utilisation d'anticorps, liées à leur mode de production et au caractère immunogène qui en découle. De plus, sa grande taille conduit à une faible pénétration dans les compartiments biologiques [14]. La contamination virale ou bactérienne lors de la production peut affecter la qualité du produit. Cette production *in vivo* utilise le système immunitaire des animaux, ce qui peut rendre difficile l'identification d'anticorps utile chez l'homme, en condition physiologique [106]. De plus, leur développement est limité pour des cibles peu immunogènes (petites molécules) ou toxique

pour l'animal (toxines). Par ailleurs, les anticorps sont sensibles à la dénaturation irréversible par un solvant organique ou par la température et ont une courte durée de vie. Enfin, la fixation spécifique d'une étiquette (position et nombre d'incorporation connue) est délicate. Les techniques classiques utilisant une chimie par couplage d'un ester activé ne permettent pas une charge contrôlée, le nombre de lysines accessibles sur l'anticorps étant souvent élevé.

C.5. Exemples d'aptamères

On peut citer trois exemples d'aptamères, visant des structures très différentes : une protéine et une petite molécule et un acide nucléique structuré en tige-boucle.

C.5.1. Aptamère anti thrombine:

L'aptamère antithrombine est un oligonucléotide de 60 désoxyribonucléotides, son affinité pour la thrombine est inférieure à 200 nM [35] et sa structure a été déterminée par R. Macaya et al. par RMN [107]. Il forme un G-quadruplexe monomérique constitué de deux G-quartets connectés entre eux par deux boucles TT et une boucle TGT (Figure 1.7). Il est, comme toute tétrade guanine, stabilisé par les ions K^+ .

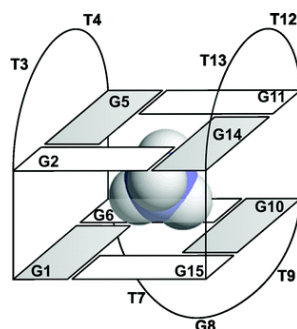


Figure 1.7. Aptamère antithrombine [107]

L'aptamère antithrombine présente en outre une activité inhibitrice *in vitro* [35] et *in vivo* [108] se traduisant par une augmentation du temps de coagulation plasmatique. Contrairement à l'héparine, l'effet anticoagulant de l'aptamère antithrombine disparaît quasi instantanément après la fin de la perfusion du fait de la dégradation très rapide de l'aptamère par les nucléases sanguines (demi-vie de l'ordre de 100 secondes chez le singe) [108]. La facilité de sa manipulation et son changement de conformation en présence de la cible en a fait un outil de choix pour des applications dans le domaine des biocapteurs [109].

C.5.2. Aptamère anti cocaïne:

L'aptamère anti-cocaïne est composé de 38 désoxyribonucléotides [36]. Son affinité pour la cocaïne est inférieure à 5 μ M. Une structure secondaire a été proposée (présentée en Figure 1.8). Le site de reconnaissance de la cocaïne est localisé à la jonction de trois tiges. La cavité hydrophobe formée est très riche en charges négatives, ce qui nécessite des tiges d'une longueur et d'une complémentarité suffisantes pour stabiliser la structure.

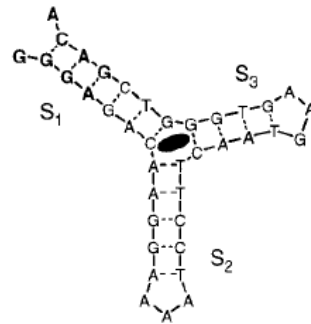


Figure 1.8. Structure secondaire de l'aptamère anti-cocaïne lié à sa cible (ellipse noire) [36]

C.5.3. Aptamère anti- VIH-1:

Cet aptamère ARN adoptent un repliement de type tige-boucle et interagissent avec la cible (elle-même structurée en tige-boucle) par reconnaissance boucle-boucle pour former un complexe enlacé ou "kissing complex" (Figure 1.9) [110]. Des appariements de type Watson-Crick se créent entre les deux boucles et donnent naissance à une structure très stable, plus stable que la simple interaction anti-sens correspondante. L'analyse de cette structure par RMN a révélé que l'introduction d'une paire GA permet la stabilisation du complexe par un réseau de liaisons hydrogènes inter sucre et l'appariement de deux paires de bases supplémentaires. Cette méthode a rationalisé le rôle stabilisateur de la paire GA à la jonction tige/boucle dans les kissing complexes, et devrait permettre le développement de nouvelles molécules bioactives ayant pour cible des boucles d'ARN impliquées dans des fonctions biologiques importantes.

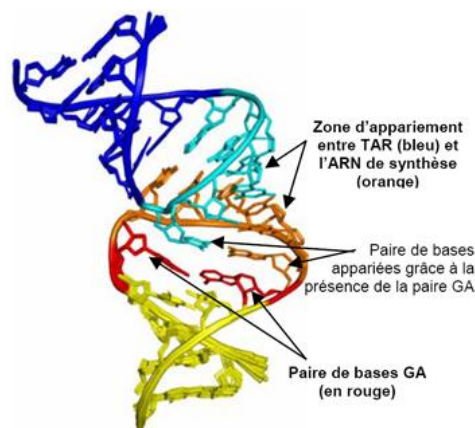


Figure 1.9. Kissing complexe entre la séquence TAR du VIH (bleu foncé et bleu clair) et l'ARN de synthèse (jaune, orange et rouge) [110]

D. Modifications chimiques des aptamères

Les ARNs et les ADNs naturels sont rapidement dégradés par les nucléases (en quelques minutes dans le plasma [111]). En effet, la présence du 2-désoxyribose et le pont phosphodiester rend l'oligonucléotide fragile à l'hydrolyse. Dans le but d'améliorer la

stabilité *in vivo* des aptamères, des modifications peuvent être apportées sur différents sites: le lien phosphate, le sucre ribose, ou encore la base nucléique (Figure 1.10). Il est possible d'introduire des modifications chimiques sans altérer les propriétés de reconnaissance. Certaines de ces modifications sont introduites au cours de la synthèse automatisée des oligonucléotides, par l'utilisation de phosphoramidites modifiés. Elles permettent de développer des aptamères stabilisés possédant une demi-vie plus longue. Par ailleurs, l'introduction de modifications permet de conférer certaines fonctionnalités, comme par exemple la transformation d'un aptamère en sonde pour l'imagerie [112].

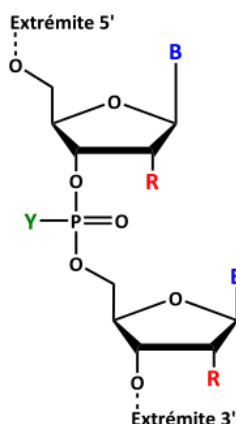


Figure 1.10. Des modifications chimiques possibles sur des nucléotides, R: modification sur le Sucre en 2', Y: modification sur le phosphodiester et B : modification sur la base

D.1. Les modifications pré SELEX :

Une première approche fut l'introduction de nucléotides non naturels dans le cycle SELEX ce qui en résulte l'obtention d'aptamères modifiés insensibles aux nucléases. Ces modifications doivent être compatibles avec les enzymes utilisées pendant les étapes d'amplification, ce qui restreint considérablement leur choix. En pratique, seules certaines modifications chimiques en 2' du ribose augmentent la stabilité des oligonucléotides tout en restant compatibles avec l'utilisation des polymérases (Figure 1.11).

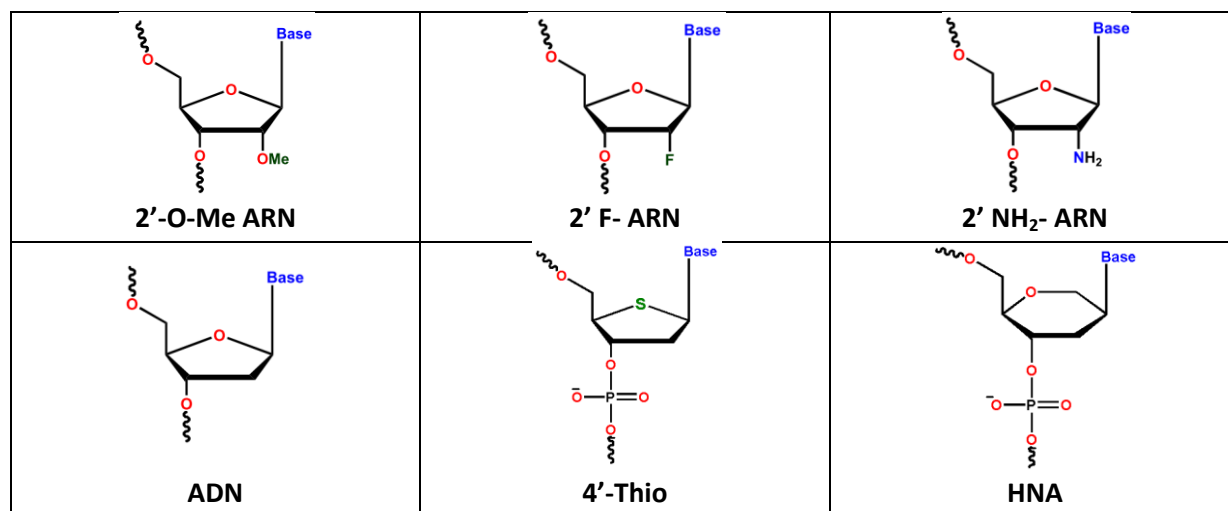


Figure 1.11. Modifications chimiques des aptamères, compatibles avec le SELEX [113, 114]

Un aptamère contenant des 2'-NH₂-2'-désoxypyrimidines à la place des 2'-OH-pyrimidines a été le premier aptamère modifié sélectionné en 1994 [115]. Les modifications des bases sont souvent réalisées dans le but d'améliorer les propriétés de polarisabilité ou d'empilement des bases afin de stabiliser le complexe aptamère-cible [116, 117]. Quelques exemples sont décrits dans la figure 1.12 :

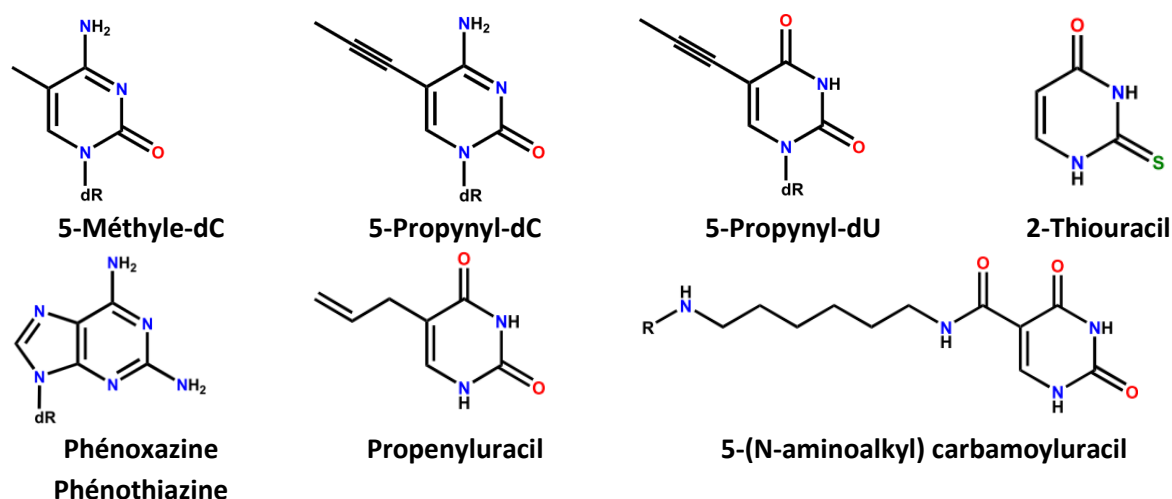


Figure 1.12. Différentes modifications possibles sur les bases

Les modifications 2' F-ARN permettent également aux siRNAs d'être plus stables en présence de sérum [118]. Les acides nucléiques comportant des modifications 2'-fluoro-2'-désoxynucléosides ont une haute stabilité thermique et sont stables vis-à-vis des nucléases. Ainsi, un aptamère sélectionné à partir d'une bibliothèque aléatoire contenant des 2'-fluoro-2'-désoxypyrimidine contre le VEGF possède une affinité supérieure pour le VEGF en comparaison à la version non modifiée de l'aptamère. La modification 2' OMe sur les nucléotides ARNs permet d'augmenter l'affinité d'hybridation ainsi que la stabilité vis-à-vis des nucléases [119, 120]. Il est intéressant de noter que les 2' fluoro et les 2' OMe nucléotides triphosphates sont incorporés par les polymérases. Ils peuvent donc être employés dès le début de la sélection, évitant ainsi des modifications post-sélection pouvant altérer la spécificité et l'affinité pour la cible de la séquence retenue [121]. Par exemple, l'aptamère anti-VEGF : ils n'ont pas pu remplacer tous les 2' OH par des 2' OMe, car cela conduisait à une perte d'activité [122].

La substitution du phosphate (phosphorothioates, méthylphosphonates, phosphoramidates) stabilise fortement les oligonucléotides vis-à-vis des nucléases, mais améliore aussi leurs propriétés d'hybridation en permettant de former des duplexes et triplexes plus stables. Les liaisons boranophosphates sont fonctionnelles et ont montré une meilleure activité du siRNA qui les porte, en comparaison avec les liaisons inter-nucléotides PS et phosphodiester. Mais pour que l'efficacité du siRNA soit maximale les liens boranophosphates ne doivent pas être placés au centre du siRNA [123].

D.2. Les modifications post-SELEX

Certaines des modifications chimiques destinées à améliorer les propriétés pharmacologique pharmacocinétique des oligonucléotides ne sont pas acceptées par les enzymes utilisées pendant le processus de sélection. Elles ne peuvent être réalisées de ce fait qu'après la sélection.

Dans le cas des aptamères ARN, le remplacement ciblé de différents riboses par des 2' OMe-ribose ou des 2'-4' LNA (Locked Nucleic Acid) permet d'améliorer la résistance aux nucléases, sans altérer les propriétés de reconnaissance. L'inconvénient majeur de cette approche vient du fait qu'elle procède par essai/erreur afin de trouver le meilleur compromis résistance/reconnaissance [110]. Les LNAs sont des nucléotides modifiés (Figure 1.13) dont le pentose a été rigidifié par le biais d'une liaison méthylène entre l'oxygène en 2' avec le carbone en 4' du sucre. Leur rigidité permet d'augmenter leur affinité d'hybridation. L'introduction de modifications LNAs en post-selex permet également de stabiliser les aptamères [124], car ils engendrent une meilleure stabilité thermique, une résistance à la dégradation par les nucléases et sans modifier l'affinité [125].

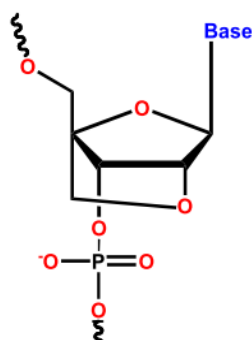


Figure 1.13. Structure des acides nucléiques verrouillés (LNAs)

Les aptamères LNA ont montré une grande affinité et stabilité que les simple-brins d'ADN et d'ARN. Par exemple, il a été démontré que l'ajout à l'extrémité 3' d'au moins deux monomères LNA, permettait d'atteindre des temps de vie de plusieurs heures en présence de sérum [126].

La protection des extrémités 5' et 3' peut également augmenter la résistance des aptamères aux exonucléases. Par exemple, la demi-vie d'un aptamère ADN dirigé contre le PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes), modifié 2' F, 2' OMe et protégé en extrémité 3' (par une jonction inversée 3'-3') a été augmentée de 0,6 h à 8 h dans le sérum de rat [99].

Récemment, l'équipe de Hirao ont réussi à augmenter la stabilité de l'aptamère ADN anti VEGF₁₆₅ aux exonucléases en introduisant une séquence d'ADN mini-épingle à cheveux en extrémité 3' (GCGAAAGC ou GCGAAGC). Cette modification a augmenté la température de fusion à 75°C, montrant un gain important en stabilité. Ils ont aussi remplacé les paires A-T dans la tige des aptamères d'ADN par des paires G-C. Par cette méthode de stabilisation,

plus de 70% de l'aptamère anti-interféron- γ ont survécu dans un sérum humain à 37 °C après 3 jours [127].

E. Synthèse chimique des aptamères

La chimie de l'ADN permet la synthèse de fragments pour des études de réactivité structurale et biologique des acides nucléiques. On présente ici les principes généraux des méthodes de synthèse des acides nucléiques et plus particulièrement la méthode aux phosphoramidites, utilisée pour la préparation des oligonucléotides modifiés. Nous présentons aussi les groupements protecteurs utilisés dans la préparation des synthons nucléotidiques. Synthétiser un fragment d'aptamère consiste à relier des nucléosides entre eux par un groupement phosphate, en formant des liens phosphodiester entre un groupe phosphoramidite porté par la fonction alcool secondaire 3'-OH du 2-désoxyribose du premier nucléoside et la fonction alcool primaire 5'-OH du 2-désoxyribose du second nucléoside. La synthèse chimique s'effectue donc dans le sens 3' \rightarrow 5'.

E.1. La synthèse en solution

La première synthèse totale d'un gène de l'ARN de transfert de l'alanine a été décrite par Khorana en 1958 [128]. Cette synthèse a été réalisée en solution (en milieu homogène) et conduit directement en présence d'un agent de condensation (DCC) au dinucléoside phosphodiester désiré (Figure 1.14).

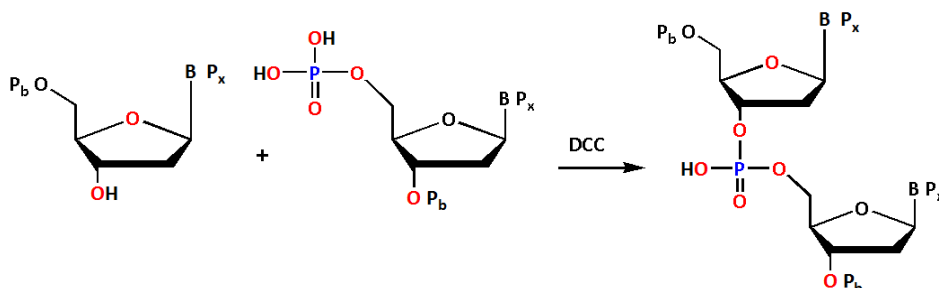


Figure 1.14. Synthèse de dinucléoside phosphodiester en solution, P_x , P_b groupe protection

La voie phosphodiester présente de nombreux inconvénients, tels que des difficultés de purification des intermédiaires chargés, la diminution des rendements avec la longueur de la chaîne.

E.2. La synthèse sur support

La première synthèse d'oligonucléotides sur support a été réalisée par la méthode phosphotriester [129]. Différents types de supports solides ont été utilisés tels que le polystyrène, le polyacrylamide, le composite de polydiméthylacrylamide, la silice ou les disques de cellulose [130-133]. Cependant le support solide le plus utilisé reste les billes à base de verre à porosité contrôlée (CPG, 200 à 3000 Å, dont la porosité est choisie selon la taille de l'oligonucléotide demandé) [134] ou à base de polymères. Le verre est

fonctionnalisé par réaction entre les résidus hydroxyles présents à sa surface et le dérivé silylé $\text{EtO}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$. Le premier nucléoside est ensuite introduit par réaction entre des résidus amines à la surface du support et un succinate diester (Figure 1.15). Une fois l'allongement terminé, l'oligonucléotide synthétisé sera conjugué au support par une liaison ester de type succinate. Le support solide possède la première base de la séquence oligonucléotidique (A, T, C, G). Pour la synthèse des oligonucléotides courts, les supports assurent une grande efficacité de couplage et un bon rendement.

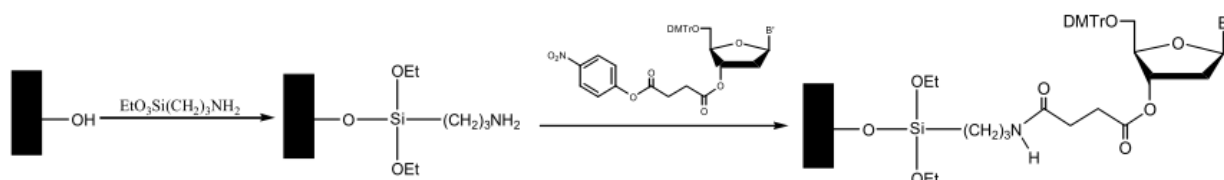


Figure 1.15. Synthèse des supports

La synthèse sur support présente de nombreux avantages tels qu'un temps de couplage plus court, la possibilité de travailler à une échelle de quelque micro molaire, le fait qu'elle soit mécaniquement stable et que le support ne gonfle pas dans les solvants organiques. L'automatisation de la synthèse sur support a été généralisée à partir du début des années 80 [135]. Aujourd'hui, la commercialisation d'appareils de synthèse automatisés sur support solide et des réactifs utilisés permet la production en routine d'oligonucléotides avec et sans modifications.

E.3. Synthèse d'oligonucléotides par la méthode au phosphoramidite

Les aptamères sont produits à grande échelle suivant la synthèse classique sur support solide aux phosphoramidites. Dans le cas des phosphoramidites en série 2'-désoxy, 2'-OMéthyle et 2'-fluoro, seules les bases nécessitent un groupe protecteur. Les phosphoramidites 2'-hydroxyle nécessitent quant à eux une protection supplémentaire, en 2', classiquement par un groupe *tert*-butyldiméthylsilyle. Le cycle de synthèse des oligonucléotides par la méthode aux phosphoramidites comprend plusieurs étapes : la détritulation, l'activation, le "capping" et l'oxydation (Figure 1.16).

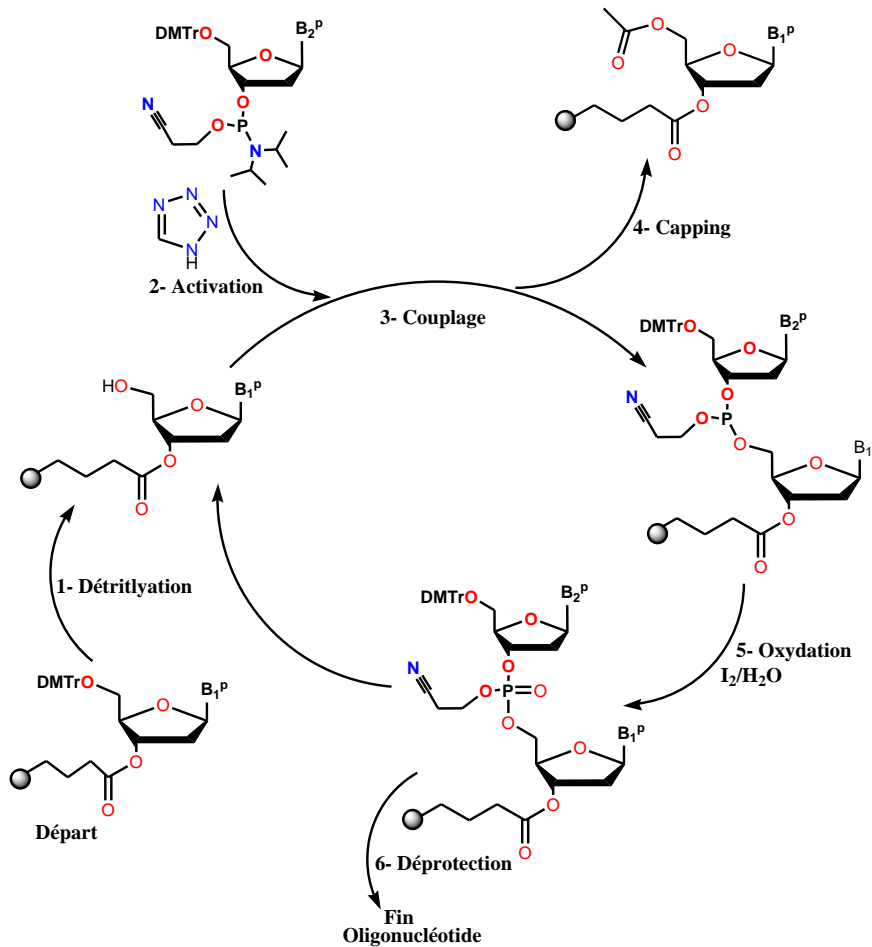


Figure 1.16. Cycle de synthèse d'oligonucléotides sur support par la méthode aux phosphoramidites

1- Déprotection : Le nucléoside étant fixé par sa fonction alcool 3'-OH au support solide, le groupement protecteur de l'hydroxyle en 5' est clivé à l'aide d'une solution d'acide trichloroacétique à 3 % dans le DCM (Figure 1.17). Le couple acide trichloroacétique/alcool tritylé constitue un bon compromis puisque la détritylation se déroule en quelques secondes. De plus, l'acidité reste suffisamment faible pour minimiser les phénomènes de dépurination. Le support est ensuite rincé avec de l'acétonitrile afin d'éliminer les traces d'acide.

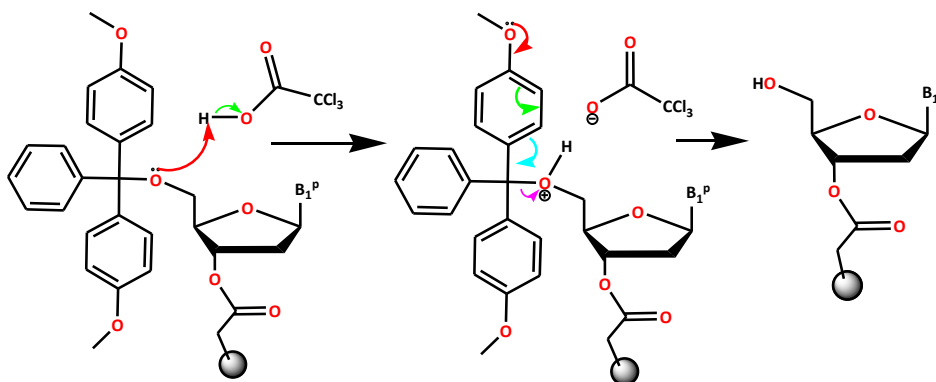


Figure 1.17. Mécanisme réactionnel de déprotection d'un oligonucléotide protégé

2- Couplage : Le phosphoramidite protégé par un groupement cyanoéthyle est introduit et réagit avec l'hydroxyle 5' qui vient d'être déprotégé. Le couplage s'effectue en présence d'un acide faible, classiquement le tétrazole. Ce dernier est un activateur. Il agit par protonation du groupe diisopropylamino suivie de la substitution de ce groupe par l'ion tétrazolium (Figure 1.18). Cet acide faible servant d'activateur pour permettre le couplage et la formation d'un phosphite triester.

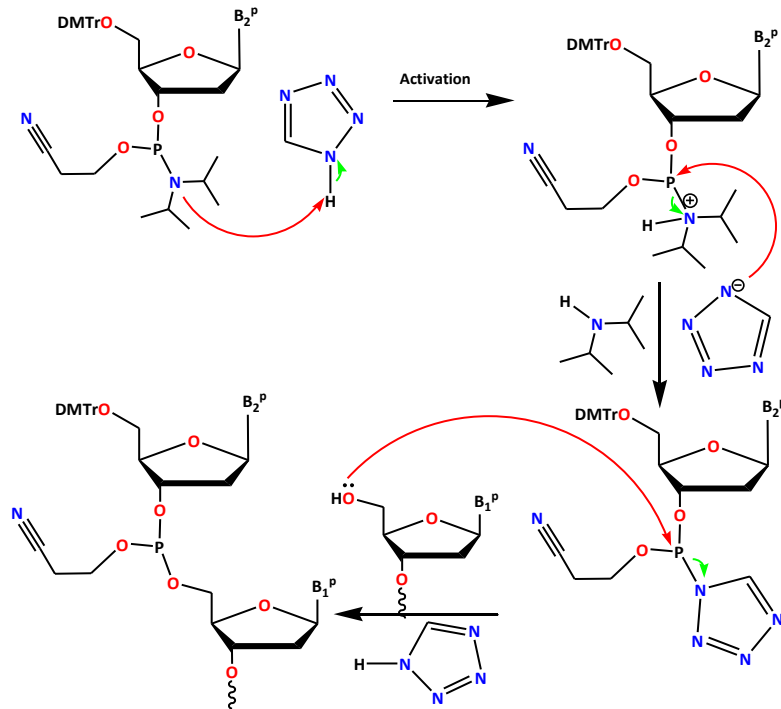


Figure 1.18. Mécanisme réactionnel de couplage au phosphoramidite

3- Capping: Le couplage à chaque étape de synthèse n'est jamais total (> 99,5%) et certains hydroxyles en 5' restent libres. Pour éviter la formation d'oligonucléotides tronqués, l'anhydride acétique est utilisée afin d'acétyler les hydroxyles libres et par conséquent d'empêcher les fonctions alcools primaires de réagir lors du futur cycle de synthèse et faciliter la purification des oligonucléotides en fin de synthèse.

4- Oxydation: La liaison phosphite est oxydée afin d'obtenir la liaison phosphate triester, grâce à une solution d'iode 0.02 M dans un mélange THF/eau/pyridine. La réaction d'oxydation est rapide et boucle le cycle de synthèse (Figure 1.19). Une nouvelle condensation peut alors avoir lieu. Ce processus est répété autant de fois qu'il y a de nucléosides à incorporer.

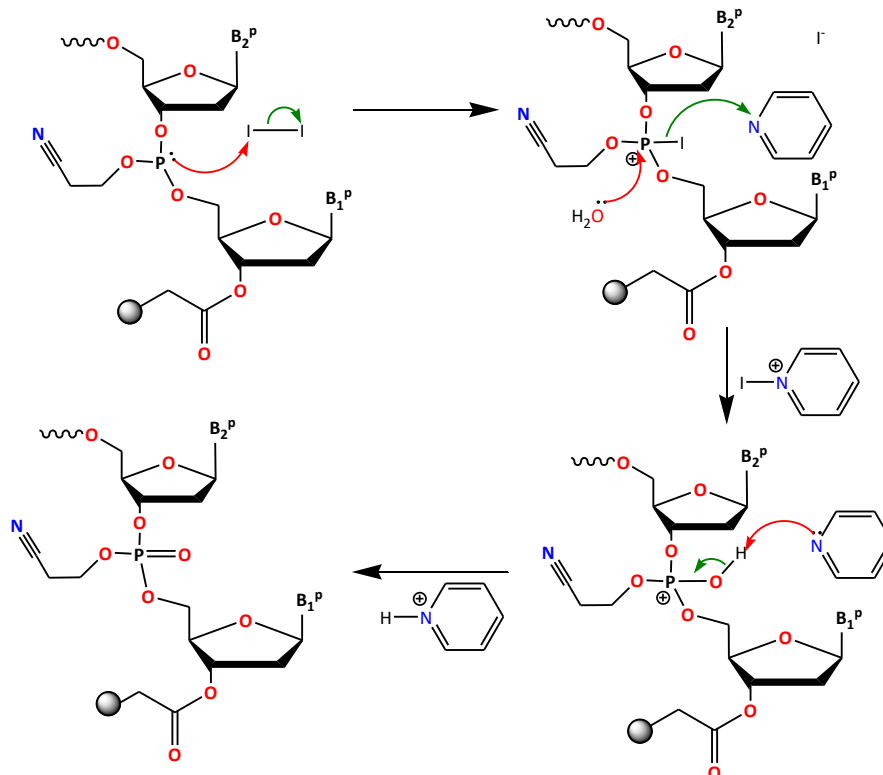


Figure 1.19. Mécanisme réactionnel de l'oxydation, étape 4

5- Déprotection : En fin de synthèse, un traitement à l'ammoniac concentré 28-32% à chaud (55°C, 4h) ou à température ambiante (1 nuit) permet de détacher l'oligonucléotide du support et de déprotéger les bases et les groupes phosphates. Selon la nature des groupements protecteurs, la méthode de déprotection peut être aménagée. Dans le cas des ARN, un traitement supplémentaire réalisé par une solution de fluorure de tétrabutylamonium/ triéthylamine (HF/TEA) permet ensuite de déprotéger l'hydroxyle en 2' (Figure 1.20), suivant un mécanisme S_N2 .

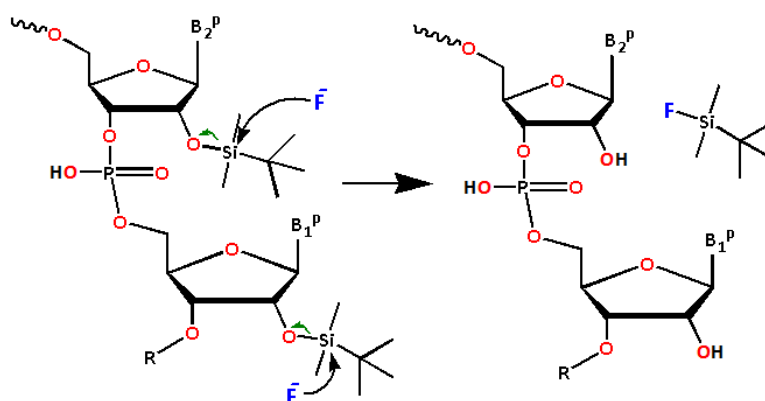


Figure 1.20. Déprotection de la position 2' des ARN

Le groupement MMTr ou DMTr terminal est conservé en fin de synthèse (mode MMTr-on ou DMTr-on) selon l'étape suivante sur l'oligonucléotide. Principalement conservé avec une modification 5' C6 amino, le groupement MMTr présente une déprotection plus lente que le

DMTr (Figure 1.21). Il est éliminé par traitement acide et les oligonucléotides sont à nouveau purifiés.

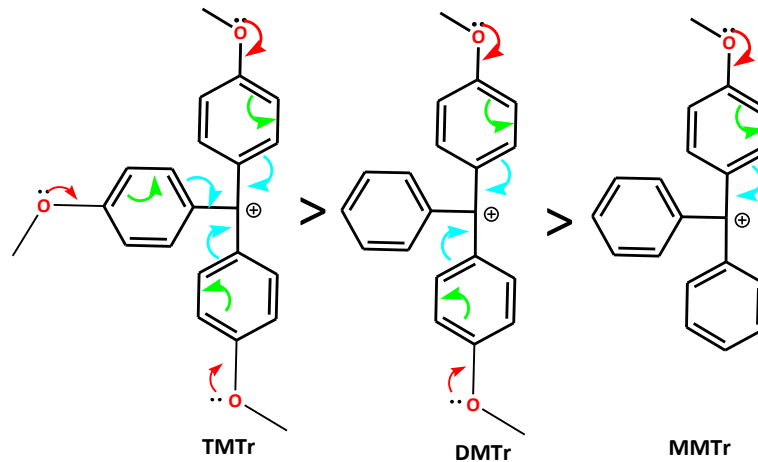


Figure 1.21. Stabilisation des groupes de protection par mésomérie étendue en fonction du nombre de groupes méthoxy présents

On voit ici que cette approche permet d'introduire aisément toute sorte de modifications chimiques sur l'aptamère, en 5' ou 2' du sucre, ou sur les bases. Enfin, la taille d'un oligonucléotide à synthétiser est d'environ 25-40 nucléotides [102]. Bien que la synthèse chimique d'un aptamère plus de 60 nt est plus coûteuse et difficile à réaliser.

CHAPITRE II :
APTAMERES EN IMAGERIE
BIOMEDICALE

A. Les différentes techniques d'imagerie médicale

A.1. Introduction

De nos jours, l'imagerie médicale (Figure 2.1) est un domaine en pleine expansion. Elle permet d'établir des diagnostics de plus en plus précis à des stades de pathologie de plus en plus précoces. Première technique d'imagerie médicale, développée par Wilhelm Röntgen à la fin du XIX^{ème} siècle, la radiographie repose sur l'utilisation des rayons X. Par la suite, les techniques se sont améliorées et diversifiées rapidement avec l'arrivée de la scintigraphie, du scanner, de l'échographie, de l'IRM, de la tomodensitométrie et plus récemment les techniques optiques. L'ensemble de ces modalités permet actuellement d'explorer quasiment toutes les composantes du corps humain, d'un point de vue morphologique et/ou fonctionnel.

On peut classer les techniques d'imagerie médicale en deux catégories : l'imagerie anatomique (radiographie, IRM, etc...) et l'imagerie moléculaire qui permet après injection d'une sonde de pouvoir visualiser des phénomènes physiologiques *in vivo*. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'imagerie moléculaire et en particulier aux techniques d'imagerie nucléaires (TEP et TEMP) et à l'imagerie de fluorescence.


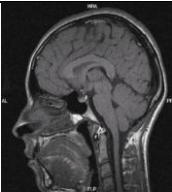
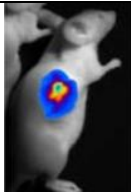

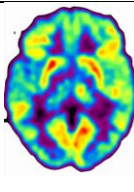
	Radio	Microonde	Infrarouge	Visible	Ultra-violet	X-Ray	Gamma Rays
longueur d'onde λ (m)	10^3-10^{-1}	$10^{-1}-10^{-3}$	$10^{-3}-10^{-6}$	$10^{-6}-10^{-7}$	$10^{-7}-10^{-8}$	$10^{-8}-10^{-11}$	$10^{-11}-10^{-15}$
Fréquence (Hz)	10^6-10^{10}	$10^{10}-10^{12}$	$10^{12}-10^{15}$	$10^{15}-10^{16}$	$10^{16}-10^{17}$	$10^{17}-10^{21}$	$10^{21}-10^{24}$
							
	Echographie	IRM	Fluorescence			Radiographie	TEMP ou TEP

Figure 2.1. Représentation des différentes modalités imageries médicales avec les longueurs d'ondes

A.2. Imagerie nucléaire

L'imagerie nucléaire permet l'obtention d'images fonctionnelles et métaboliques. Son principe repose sur l'injection par voie intraveineuse d'un traceur radiomarqué spécifique. L'image est obtenue par détection externe grâce à une caméra adaptée. L'imagerie nucléaire comprend deux techniques : la TEMP et la TEP.

L'évolution de ces techniques est liée au développement rapide de l'appareillage et des techniques utilisés en imagerie médicale. Dans les services de médecine nucléaire le développement de ces techniques passe par l'étude de nouveaux chélates et de nouveaux

marqueurs mais surtout par le développement de nouveaux ligands ou vecteurs spécifiques de cibles biologiques à étudier.

A.2.1. Tomographie par émission monophotonique (TEMP)

L'imagerie TEMP est une technique d'imagerie médicale nucléaire tomographique basée sur la scintigraphie et inventée par Anger en 1953. La tomographie (du grec *tomos* « section, coupe » et *graphein* « écrire ») désigne tout processus d'imagerie ayant pour résultat un cube de données c'est-à-dire un objet tridimensionnel, visible de ce fait en coupe. L'acquisition d'images autour de l'animal permet d'obtenir après reconstruction tomographique une image TEMP 3D.

Afin de pouvoir effectuer un examen TEMP, le patient se voit injecter un produit radioactif qui émettra des rayonnements gamma [136]. Un collimateur est utilisé au niveau de la caméra pour permettre la sélection des photons gamma émis suivant une incidence particulière en corrigeant ce phénomène d'atténuation. Cette correction permet d'obtenir avec précision l'activité reconstruite et donc de la quantifier. La TEMP est utilisée entre autres pour visualiser le fonctionnement du muscle cardiaque, pour le diagnostic d'embolie pulmonaire, pour le diagnostic des maladies osseuses ou pour détecter des dysfonctionnements de la thyroïde.

A.2.2. Tomographie par émission de positons (TEP)

La TEP est également une technique d'imagerie isotopique utilisant des traceurs marqués ici avec des radioéléments émetteurs de positons (particules β^+), qui sont caractérisés par un défaut relatif de neutrons dans leurs noyaux (Figure 2.2).

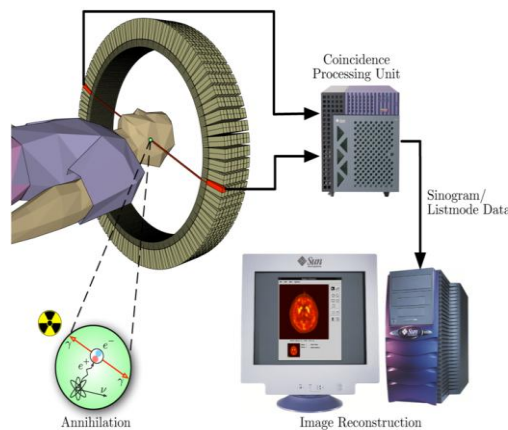


Figure 2.2. Schéma représentatif d'une machine TEP

Ils se désintègrent vers un état stable par la transformation d'un proton en un neutron qui conduit à l'émission d'un positon e^+ et d'un neutrino ν .
$${}^A_ZX \rightarrow {}^{A}_{Z-1}Y + {}^0_1e^+ + {}^0_0\nu$$

Une fois dans l'organisme ces positons perdent leur énergie cinétique avant de se recombiner avec un électron selon un processus appelé annihilation. Deux photons γ d'énergie 511 keV sont alors émis en coïncidence à 180° l'un de l'autre (Figure 2.3).

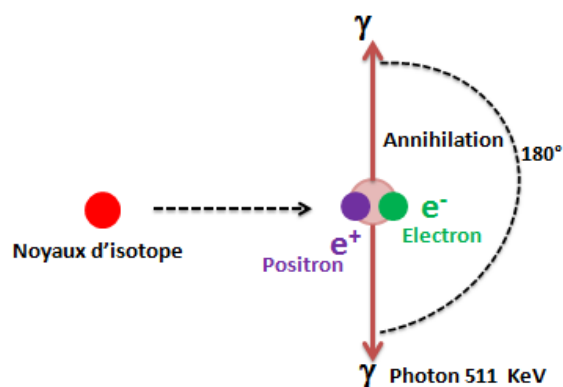


Figure 2.3. Réaction d'annihilation et émission des photons γ

Une couronne de détecteur entourant le patient permet de détecter ces deux photons γ simultanément. La distribution tridimensionnelle du traceur est visualisée après une reconstruction informatique complexe [137]. La durée de vie très courte des radioisotopes nécessite que l'équipement soit installé à proximité d'un cyclotron et d'un laboratoire de biochimie permettant la production et la mise en œuvre des isotopes [138].

Les systèmes micro-PET développés pour le petit animal ont une résolution limitée de l'ordre de 1 mm à 2 mm mais bénéficient d'une haute sensibilité d'environ 10^{-11} mol/L [139]. Les temps d'acquisition d'une image peuvent être relativement courts (de l'ordre de la seconde) permettant l'étude dans le temps de l'évolution du traceur mais aussi par exemple l'étude dynamique du cœur [140].

Le principe de la TEP est donc assez proche de celui de la TEMP dans le sens où il s'agit également d'une tomographie d'émission utilisant un radiopharmaceutique. Mais ces deux types d'imageries sont basés sur l'utilisation de radioéléments différents. En effet, les radionucléides couramment utilisés en TEP tels que le ^{11}C , le ^{18}F , le ^{68}Ga possèdent une demi-vie courte en comparaison à ceux utilisés pour la TEMP tels que le $^{99\text{m}}\text{Tc}$, le ^{99}Tc , ^{125}I , ^{131}I ou encore l' ^{111}In .

Ces techniques présentent l'avantage majeur d'avoir une haute sensibilité [141]. Dans le cas de l'imagerie tumorale, le développement de radioligands spécifiques de l'angiogenèse tumorale a permis la détection précoce de tumeurs lors des premiers stades de croissance. L'imagerie nucléaire apporte alors des informations d'ordre fonctionnel sur des zones internes à la tumeur, permettant ainsi l'ajustement des traitements administrés aux patients.

A.2.3. Radiotracteur

L'utilisation optimale d'un isotope en imagerie est dépendante des propriétés nucléaires du radionucléide c'est-à-dire le type et l'énergie du rayonnement émis, la demi-vie et le mode de production. La demi-vie physique du radionucléide doit être suffisamment longue pour lui permettre d'atteindre sa cible, mais aussi suffisamment courte afin de limiter l'irradiation de l'organisme. Egalement, la demi-vie détermine la possibilité d'utilisation d'un

radionucléide à distance du lieu de sa production. **Le traceur** peut-être sous la forme d'un atome, une molécule simple, un médicament, une hormone, un peptide, un anticorps, une cellule (globules rouges ou blancs), spécifique à l'organe et même spécifique d'une fonction métabolique de l'organe. Il est important d'évaluer l'impact du marquage sur l'activité biologique de la molécule marquée. En médecine nucléaire, **le marqueur**, est un isotope permettant la détection externe de la répartition spatiale du traceur. On admet que le traceur marqué possède le même comportement que le traceur non marqué, appelé traceur froid. La différence de masse entre les isotopes et les phénomènes de radiolyse sont considérés comme négligeables.

Le radiotraceur est l'association entre un radionucléide (marqueur) et une molécule spécifique (traceur) localisée de façon sélective au niveau d'une structure (Figure 2.4).

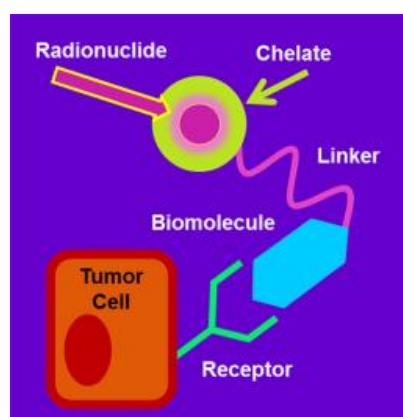


Figure 2.4. Schéma générale des radiotraceurs TEP ou TEMP [142]

Les stratégies de marquage sont différentes suivant que l'on marque des petites ou des grosses molécules. Pour **les petites molécules**, le marquage le plus simple est la substitution directe. Elle consiste à remplacer un atome stable par un des ses isotopes radioactif. Le composé résultant possède les mêmes propriétés chimiques et physiques que le composé non marqué. Cette technique est bien adaptée pour les marqueurs qui sont des éléments naturellement présents dans l'organisme (^{15}O , ^{11}C , ^{13}N , ^{18}F). Pour **les grosses molécules** (anticorps, peptides, protéines), la stratégie consiste le plus souvent à fixer, via un groupe prosthétique, le marqueur loin du site biologiquement actif de la molécule, de sorte que le marquage n'interfère pas avec les propriétés biologiques de la molécule. Ainsi, il peut être nécessaire d'introduire sur les molécules vectrices des fonctionnalités qui vont permettre le couplage spécifique des différents éléments. Les principaux isotopes utilisés comme marqueur *in vivo* sont les ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , et ^{131}I . Mais on peut citer également l'utilisation dans des cas moins fréquents du xénon 133, du thallium 201 et du krypton 81m.

Pour des processus biologiques rapides, un radioisotope à courte demi-vie sera préférée afin de limiter au maximum l'exposition du patient aux radiations alors que dans le cas de processus présentant une pharmacocinétique plus longue, des radioisotopes présentant une longue période seront nécessaires. La plupart des radionucléides utilisés en imagerie sont

produits par des réacteurs nucléaires, des générateurs ou des cyclotrons. Les radionucléides sont ensuite associés aux substances traceuses par différentes stratégies de marquage.

Tableau 2.1. Présentation des différents radioisotopes avec leurs demi-vie utilisés en imagerie médicale, CE : Capture d'électrons

Radioisotope	Rayonnement	Demi-vie	Chimie
^{15}O	β^+	2.07 min	covalente
^{13}N	β^+	9.97 min	covalente
^{11}C	β^+	20.3 min	covalente
^{68}Ga	β^+	68 min	Coordination
^{18}F	β^+	109.7 min	covalente
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	γ	6 h	Coordination
^{123}I	γ	13 h	covalente
^{111}In	γ (CE)	67 h	Coordination
^{67}Ga	γ	78 h	Coordination

Le premier radiotracer utilisé en TEP a été le ^{18}F -FDG (2-désoxy-2- ^{18}F fluoro-D-glucose [143]). Ce traceur de la consommation régionale en glucose, est utilisé en oncologie, neurologie mais également en cardiologie pour identifier les patients susceptibles de bénéficier d'une revascularisation du myocarde après un infarctus. Malgré son manque de spécificité, ce traceur reste majoritairement utilisé aujourd'hui en clinique. Depuis 2010, plusieurs autres traceurs sont disponibles en TEP tels que la ^{18}F -choline (précurseur des membranes cellulaires) pour des indications autorisées dans le cancer prostatique et le carcinome hépatocellulaire, le ^{18}F -Na (fluorure de sodium) pour des tomoscintigraphies osseuses avec les mêmes indications que la scintigraphie osseuse classique mais avec les performances de la TEP, la ^{18}F -DOPA (fluoro-dihydroxyphénylalanine) pour des indications en cancérologie (certaines tumeurs endocrines) ou en neurologie (syndromes Parkinsoniens) (Figure 2.5).

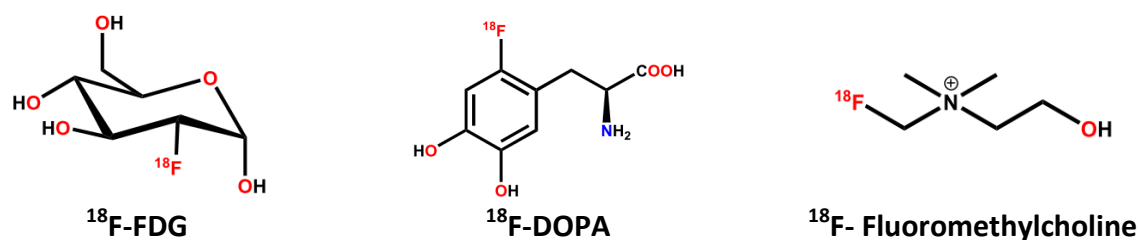


Figure 2.5. Structures des traceurs utilisés pour l'imagerie TEP

En TEMP, les radioéléments couramment employés sont le technétium métastable ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), l'indium 111 (^{111}In) et l'iode 123 (^{123}I). Le technétium 99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) présente une demi-vie moyenne de 6h et est produit facilement au moyen d'un générateur par désintégration β du molybdène 99. Il permet grâce à ses propriétés physiques et électrochimiques l'obtention de bonnes images scintigraphiques sans risque d'irradiation excessive [144]. $^{98}\text{Mo} \rightarrow ^{99}\text{Mo} \rightarrow ^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Le technétium 99m permet l'exploration de nombreuses parties du corps et n'émet que des rayonnements gamma dont l'énergie (140 KeV) est adaptée aux détecteurs des gamma-caméras (Figure 2.6A). Le premier agent marqué au technétium 99m approuvé par la FDA a été le Cardiolite® ou (^{99m}Tc-Sestamibi). Le Yoview® ou (^{99m}Tc-Tetrafosmin) a été ensuite développé pour la réalisation de mammographies scintigraphiques. Des dérivés phosphonates du technétium tels que le ^{99m}Tc-Méthylène DiPhosphonate (MDP) et le ^{99m}Tc-Hydroxy DiPhosphonate (HDP) sont quant à eux utilisés pour l'imagerie de l'activité ostéoblastique. L'indium, découvert en 1863 par Reich et Richter, possède une demi-vie de 62 h et est produit au moyen d'un cyclotron : il se décompose par capture électronique (CE) avec émission de photons gamma de 173 et 247 KeV (89% et 95% respectivement) [142] (Figure 2.6B). Les traceurs marqués à l'indium 111 sont principalement utilisés pour la détection de cancers et le ciblage des antigènes et des récepteurs surexprimés dans certaines tumeurs. L'¹¹¹In³⁺ forme des complexes très stables avec des ligands qui sont constituées par des chélates macrocycliques contenant les atomes donneurs d'azote et d'oxygène ou d'azote et de soufre comme NOTA, DOTA, DTPA et TETA [145]. Ainsi, l'¹¹¹In complexé par un DTPA a été utilisé dans un premier temps pour l'imagerie rénale et cérébrale. Aujourd'hui, il est couramment utilisé pour l'imagerie du fluide cérébro-spinal.

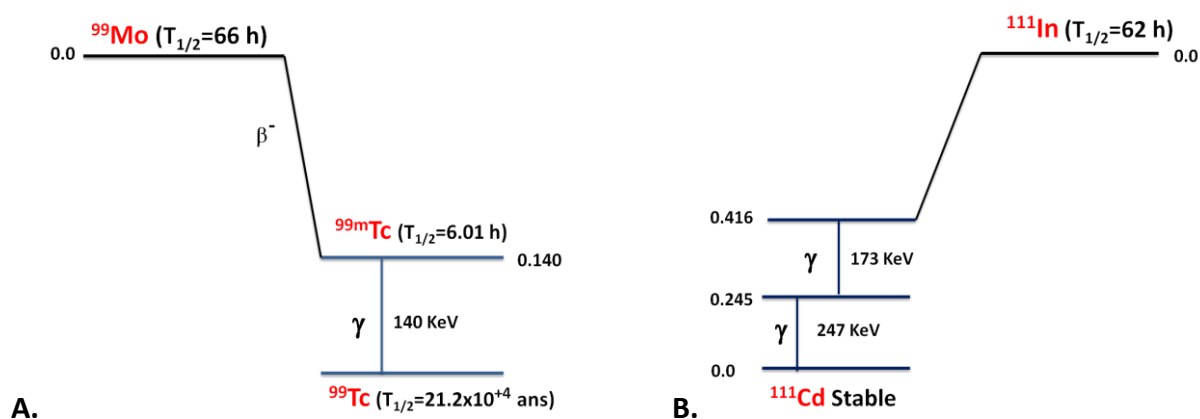


Figure 2.6. Schéma de décroissance : A) du ^{99m}Tc et B) de l'¹¹¹In

A.3. Imagerie optique

De par sa facilité de mise en œuvre (synthèse, hygiène-sécurité) et son coût moindre, l'imagerie optique est une alternative intéressante à l'imagerie nucléaire. Des progrès rapides de résolution spatiale (brillance des fluorophores et précision des caméras optiques) permettent d'envisager à l'avenir de nombreuses applications biomédicales.

A.3.1. Principe de l'imagerie optique

Le principe de l'imagerie optique repose sur l'absorption de photons par un atome ou par une molécule, le ou la faisant passer de son état fondamental à un état excité. Cette molécule est excitée par un rayonnement de longueur d'onde λ , produit généralement par une lampe ou un laser dont les photons possèdent une énergie $E = h \nu = hc/\lambda$ où "c" est la célérité de la lumière dans le vide, "h" la constante de Planck et "v" la fréquence de

vibration [146]. Cette absorption de lumière se fait de façon extrêmement rapide (environ 10^{-15} s). Le retour à l'état fondamental se fait par émission d'un photon qui pourra être capté et transformé en image (Figure 2.7).

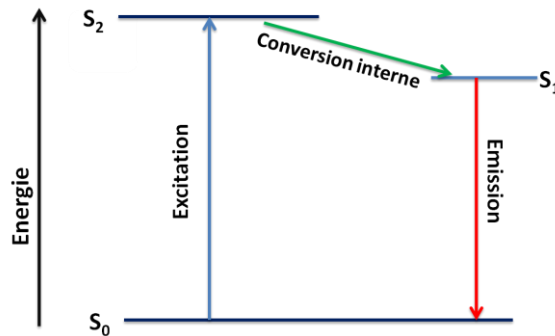


Figure 2.7. Diagramme de Jablonski simplifié

Cette détection par fluorescence est le mode le plus utilisé dans les systèmes miniaturisés [147]. Les molécules fluorescentes ont la particularité de posséder un groupe d'atomes formant structurellement un chromophore (ou fluorochrome). Ce sont généralement des cycles aromatiques interagissant entre eux et ayant des électrons π délocalisés qui forment le centre fluorescent des molécules.

A.3.2. Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET)

Cette technique a été développée par Förster à la fin des années 40 [148]. C'est plus tard que cette technique fut appliquée au domaine des acides nucléiques au milieu des années 80. Elle utilise deux fluorophores, l'un est donneur d'énergie et l'autre est accepteur d'énergie (Figure 2.8), le spectre d'émission du premier devant recouvrir le spectre d'absorption du second. En absence d'accepteur, l'irradiation de donneur à son λ_{Max} aboutit à un signal correspondant à l'émission de donneur. Cette technique permet d'obtenir un signal d'émission décalé par rapport à celui du donneur.

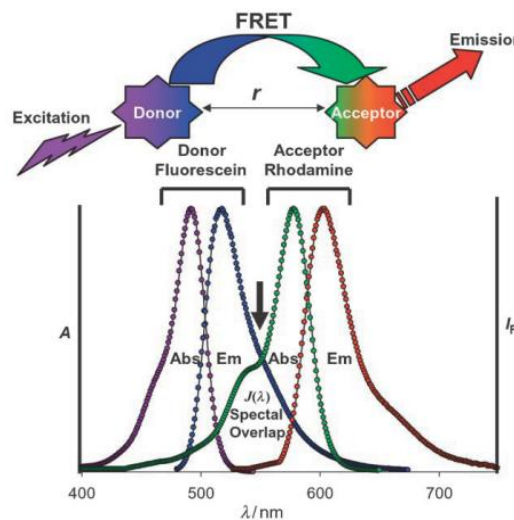


Figure 2.8. Schéma du processus FRET [148]

L'efficacité du FRET dépend de la distance r entre les deux marqueurs, déterminée par la formule $1/[1 + (r/R_0)^6]$ où R_0 représente le rayon de Förster [149], distance à laquelle 50 % de l'énergie d'excitation du donneur est transférée à l'accepteur (comprise généralement entre 10 et 100 Å). Par exemple, cette technique est appliquée aux acides nucléiques en utilisant du couple pyrène (donneur) / pérylène (accepteur) [150].

A.3.3. Balises moléculaires (molecular beacon MB)

Les balises moléculaires (MB) sont formées d'un brin d'ADN en épingle à cheveu, chacune des extrémités portant un fluorophore. L'un est dit reporter et l'autre quencher. La partie centrale de la séquence est complémentaire de la cible alors que les deux extrémités sont auto-complémentaires et forment le pied du molecular beacon (en moyenne de 5 à 8 paires de bases). Le molecular beacon se retrouve donc dans une conformation dite de tige-boucle à l'état libre où le donneur et l'accepteur sont en contact. La fluorescence du donneur est donc inhibée ou modifiée. De ce fait, en présence de la cible, le molecular beacon s'ouvre et s'hybride sur la séquence cible car ce nouveau complexe est plus stable que le molecular beacon replié du fait du plus grand nombre d'appariements formés (Figure 2.9) [151]. Les premières sondes Scorpion étaient basées sur un format boucle-épingle à cheveux semblable aux molecular beacon [152]. Un autre exemple, un capteur de cocaïne par inhibition de fluorescence été décrit par Zhang et ses collaborateurs [36, 153]. Le molecular beacon peut également être un aptamère changeant de structure telle que l'aptamère Sgc8 activable AAP [188].

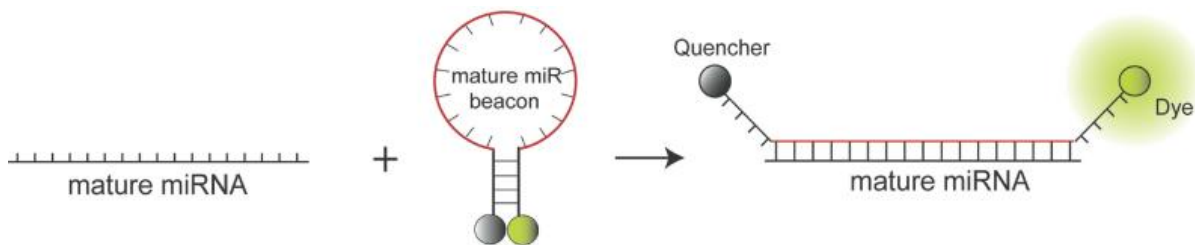


Figure 2.9. Structure et fonctionnement d'un molecular beacon sur leur cible [151]

On peut utiliser pour l'imagerie de fluorescence des fluorophores émettant dans le proche-infrarouge (vers 700 nm), ce qui présente de nombreux avantages tels que la haute sensibilité, l'absence de radioactivité ainsi qu'une grande profondeur de pénétration tissulaire [154]. En effet, l'utilisation de longueurs d'onde d'excitation et d'émission comprises dans la région du proche infrarouge (600 – 900 nm) limite le phénomène d'absorption du rayonnement par les tissus permettant ainsi une faible autofluorescence de ces tissus. La figure 2.10 représente la variation des coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde [155, 156], les valeurs maximales des spectres d'émission de fluorescence sont d'environ 810 nm dans l'eau et 830 nm dans le sang. Pour les applications médicales, l'absorption maximale est à environ 800 nm dans le plasma sanguin, dû à l'adsorption de la molécule sur les protéines plasmatiques.

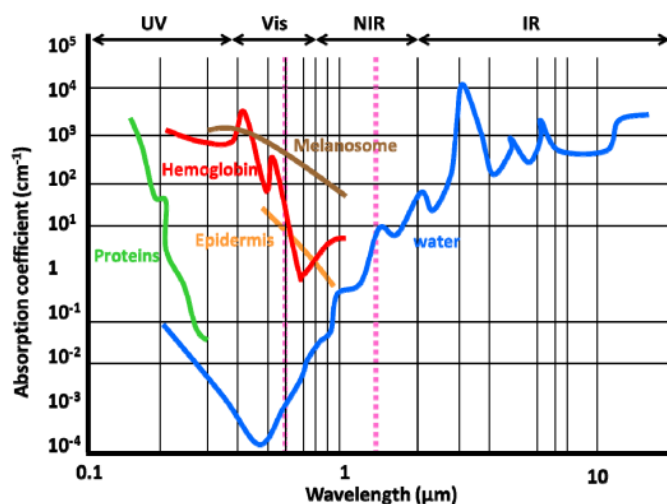


Figure 2.10. Coefficients d'absorption de différents tissus organiques en fonction de la longueur d'onde [156]

La figure 2.11 montre la relation entre les longueurs d'onde d'excitation/émission et l'autofluorescence des tissus [157]. De nombreux organes (peau, intestin, vessie) sont fluorescents dans les longueurs d'onde du visible. Dans le vert, l'autofluorescence de la peau, des viscères, et surtout de la vésicule biliaire, de l'intestin grêle et de l'urine est très importante. Dans le rouge, l'autofluorescence diminue notablement mais les intestins restent fluorescents principalement du fait de la chlorophylle présente dans l'alimentation.

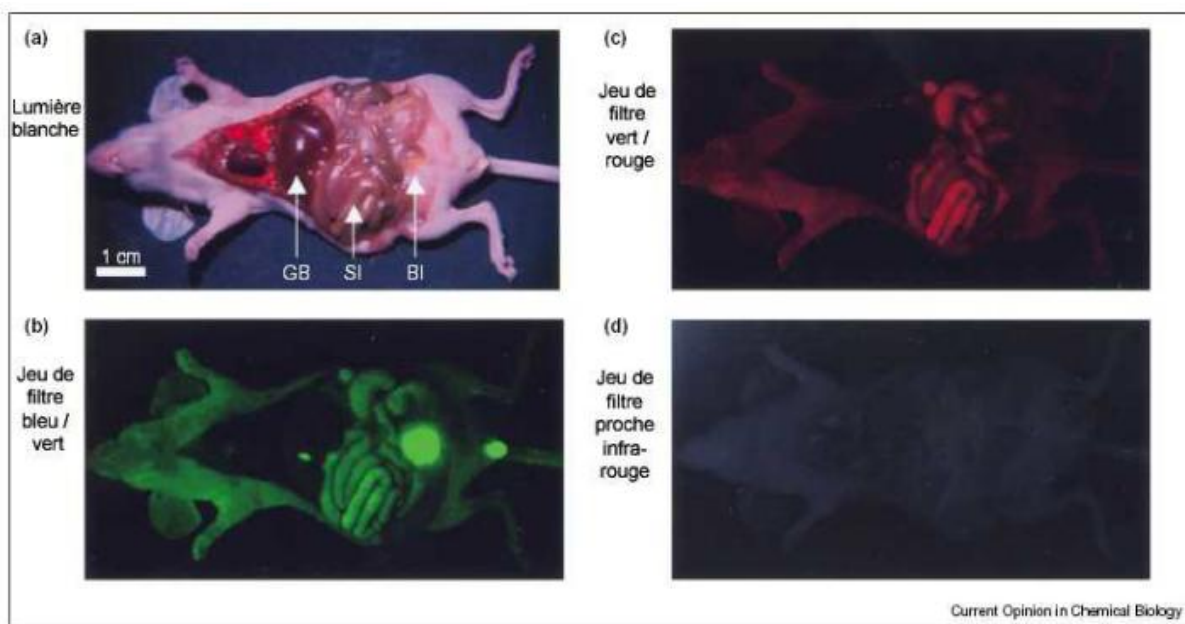


Figure 2.11. Auto-fluorescence des organes de la souris dans différentes conditions optiques des longueurs d'ondes d'émission/excitation [157]

L'imagerie de fluorescence nécessite, comme toutes les techniques d'imagerie moléculaire, l'injection d'agents de contraste ou traceurs, qui sont dans ce cas des fluorophores tels que la Cyanine, l'ATTO ou encore la fluorescéine. La recherche de nouveaux fluorophores absorbant et émettant dans les régions spectrales du visible et du proche infrarouge

présente un grand intérêt en raison de leurs possibles applications en biologie, diagnostic médical et imagerie [158]. Les fluorophores les plus couramment employés sont les dérivés de la fluorescéine, de la rhodamine, la série des BODIPYs et les Cyanines [159, 160]. Si la fluorescence est une technique fortement répandue dans le domaine biomédical, notamment à l'échelle moléculaire (ADN ou protéine) ou cellulaire, elle est encore peu employée pour de l'imagerie *in vivo*.

A.4. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM est une technologie utilisée pour la première fois dans le début des années 1980. Cette technique permet d'obtenir des images anatomiques en trois dimensions avec une excellente résolution. Elle permet l'étude des tissus dits mous, tels que le cerveau, la moelle épinière, les muscles permettant ainsi d'en connaître la structure anatomique. Un des avantages majeurs de cette technique est le fait qu'elle n'utilise pas de rayonnements ionisants. L'IRM visualise la relaxation des protons de l'eau d'un tissu et sa densité après une impulsion radio-fréquence. Environ 35% des examens IRM sont réalisés avec injection d'un agent de contraste non spécifique telle que le Gd-DTPA (sous le nom commercial Magnevist®) [161] et le Gd-DOTA (sous le nom commercial Dotarem®) [162]. Depuis, des recherches pour mettre au point des agents de contraste spécifiques ont été mises en œuvre et sont encore actuellement très actives afin de permettre un diagnostic plus précis de certaines pathologies. L'objectif est d'augmenter le temps de relaxation des protons de l'eau et ainsi d'obtenir un meilleur contraste. L'inconvénient majeur du gadolinium en imagerie médicale est sa toxicité sous sa forme libre. Du fait de sa toxicité, le principal est de s'assurer qu'il n'y ait pas de relargage de Gd(III) libre.

A.5. Imagerie multimodale

Toutes les techniques d'imagerie médicale sont quotidiennement au service des patients (Échographie, Scanner, IRM, TEP). Elles possèdent leurs avantages et inconvénients en termes de résolution [163], de sensibilité, de spécificité et de type de rayonnement utilisé. Mais les informations spécifiquement apportées par chacune de ces modalités sont complémentaires. La fusion dans une même sonde de différentes techniques conduit à la possibilité de mettre en œuvre une imagerie multimodale. Ainsi, l'imagerie multimodale grâce à un système intégré TEP/IRM bénéficie de la possibilité d'optimisation des deux méthodes grâce à leur complémentarité et à la simultanéité des acquisitions [164]. Cette imagerie nécessite le développement de nouveaux marqueurs tels que des liposomes, des macromolécules, des lipoprotéines, des petites molécules organiques et des nanoparticules [165, 166]. Les combinaisons bimodales les plus utilisées sont IRM/imagerie optique, imagerie optique/imagerie nucléaire et IRM/imagerie nucléaire (Figure 2.12).

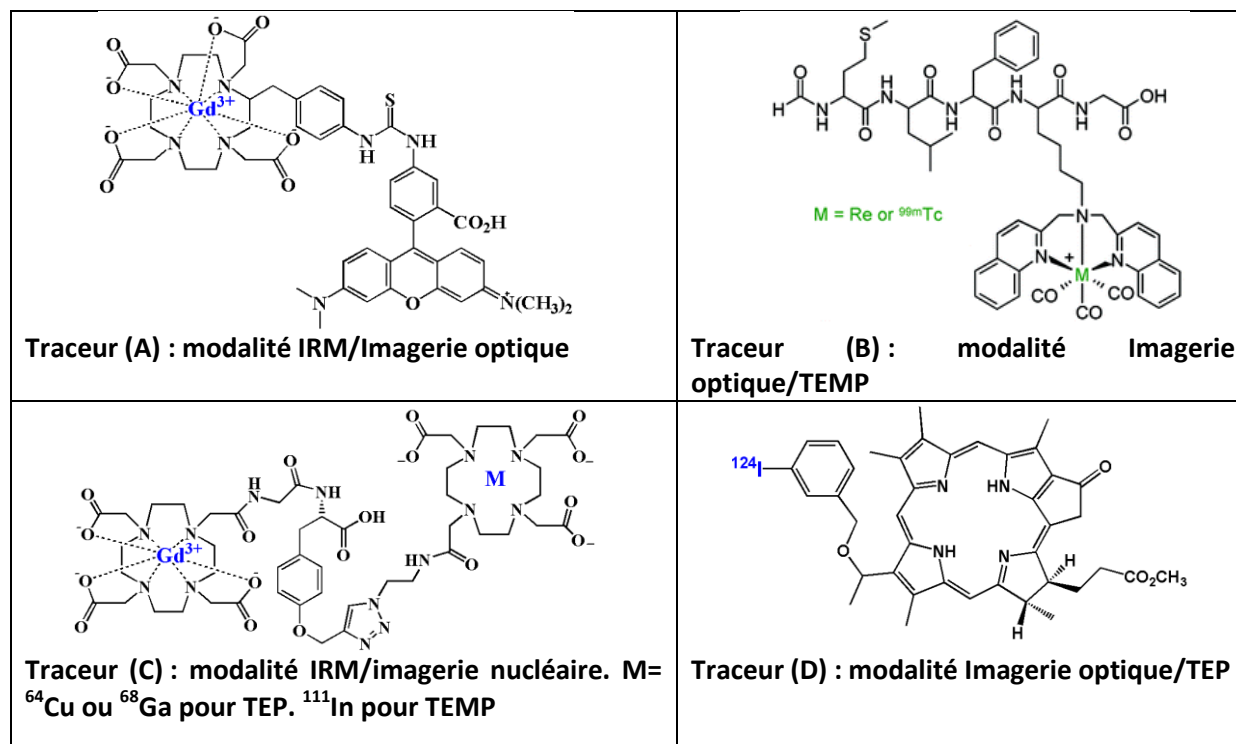


Figure 2.12. Différents traceurs pour différentes imageries multimodales : Traceur (A) complexe de Gd-DOTA-aminobenzyl conjugué à un dérivé tétraméthylrhodamine pour la modalité IRM/Imagerie optique [167]. Traceur (B) SAACQ (dérivé de la lysine sur lequel deux groupements quinolines sont greffés sur l'amine de la chaîne latérale) du rhénium ou du technétium 99m afin de pouvoir visualiser les neutrophiles en ciblant des récepteurs peptidiques formyles (FPR) par la modalité Imagerie optique/TEMP [168]. Traceur (C) d'un dérivé de deux macrocycles similaires pour la chélation du gallium et du gadolinium, le DO3A pour la modalité TEP/IRM, ou la chélation d'¹¹¹In et du gadolinium [169]. Traceur (D) d'un dérivé porphyrinique photosensible sur lequel un atome d'iode 124 est introduit par substitution électrophile aromatique. Ce traceur est prometteur pour la modalité Imagerie optique/TEP [170].

B. Aptamères *in vivo*

Les capacités de reconnaissance moléculaire des aptamères en font un outil de choix pour la détection *in vivo* de marqueurs, par exemple tumoraux. On trouve de nombreux exemples d'application en oncologie. Des aptamères ont été développés pour cibler des protéines oncogènes telles que l'EGFR [171] surexprimée dans les glioblastomes, HER2 et MUC1 surexprimées dans les cancers du sein, et CD30 et CD4 surexprimés dans les cellules de lymphome [172-174]. Comme on l'a mentionné précédemment les aptamères ont été utilisés comme alternative aux anticorps dans de nombreuses techniques de détection : approche de type Elisa, électrophorèse capillaire ou cytométrie de flux. Ils sont aussi à l'origine de méthodes originales de détection. Le faible poids moléculaire des aptamères (10 à 15 contre 150 kDa pour les anticorps) tout comme leur relativement bonne délivrance tissulaire et leur clairance sanguine rapide en font de bons candidats pour

l'imagerie. La première étude publiée à ce sujet visait à visualiser la réaction inflammatoire grâce à un aptamère anti-élastase et montrait que l'image obtenue par l'imagerie TEP présentait un meilleur rapport signal sur bruit que celle obtenue avec l'anticorps de référence [175].

L'absence de toxicité des aptamères est un réel avantage pour leur utilisation en tant qu'agents d'imagerie. De plus, leur spécificité élevée pour leur cible permet un ciblage précis, et une diffusion rapide par la circulation sanguine. L'utilisation de ces molécules peut donc augmenter la certitude des résultats obtenus pendant le diagnostic ou l'analyse clinique [176].

Des aptamères ont été sélectionnés contre des protéines en solution, des récepteurs membranaires ou même des cellules vivantes, permettant le suivi de cibles choisies notamment des marqueurs de pathologies tumorales [177-179]. L'aptamère sert ici de traceur sur lequel on peut greffer différents fluorophores (Cy_n , ATTO) ou ligands correspondant à différentes modalités d'imagerie tels que le ^{99m}Tc , l' ^{111}In pour l'imagerie TEMP, le ^{64}Cu pour l'imagerie TEP ou encore le Gd pour l'IRM. La figure 2.13 présente un exemple de l'utilisation d'un aptamère ARN 14-16 pour l'imagerie de tissus cancéreux du colon [29].

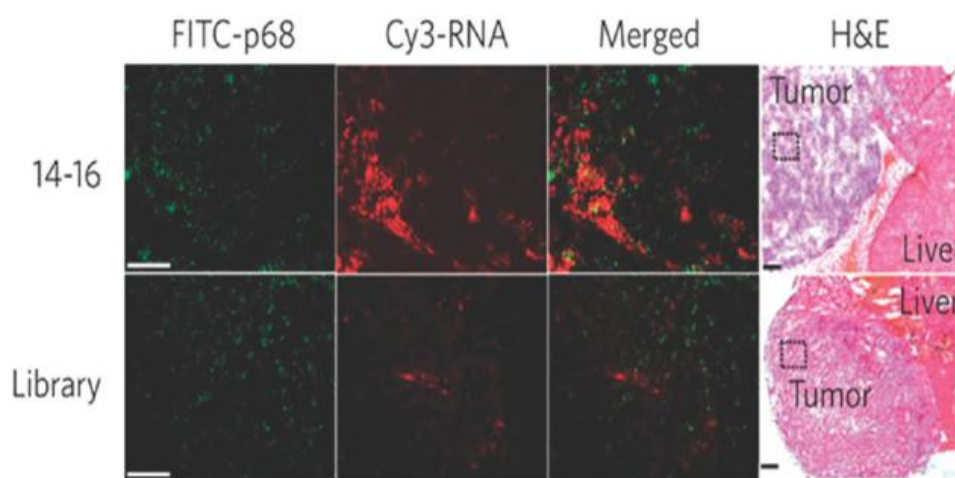


Figure 2.13. La détection de l'aptamère (ARN14-16) - fluorescence Cy3 (rouge) colocalise avec sa cible à base de microscopie à fluorescence, p68 (vert), exprimé dans les tumeurs hépatiques (panneau supérieur). Bibliothèque d'ARN aléatoire est injectée en tant que témoin (panneau inférieur), (200× magnification). Bar, 100µm

B.1. Aptamère anti-tenascine

La tenascine est une métalloprotéase de la matrice extracellulaire, fortement surexprimée dans de nombreuses tumeurs. Un aptamère ARN de 39 nucléotides, TTA-1, dirigé contre cette protéine avec une grande affinité ($K_d= 5$ nM), a été développé et son efficacité pour la détection de tumeurs a été étudiée *in vivo* [45, 180]. La figure 2.14 présente la structure de l'aptamère et son utilisation *in vivo*, qui a nécessité la fixation d'un

ligand du technetium. TTA-1 est capable de détecter un gliome de type U251, même 20 h après injection.

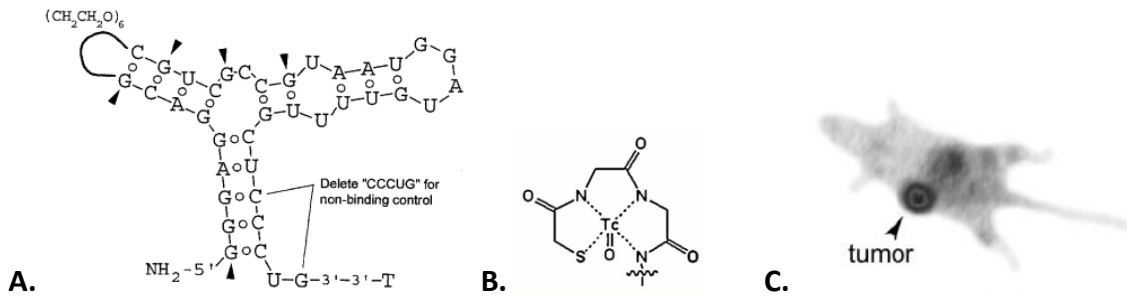


Figure 2.14. A/ structure de l'aptamère TTA-1, 2'F Pyrimidine et 2'OCH₃ Purine sauf les cinq Gs (indiquer par un flèche) qui sont resté 2'-OH. B/ groupe MAG, chélatant du ^{99m}Tc , fixé en position 5'-NH₂ de TTA-1. C/ détection d'une tumeur de type U-251

Il présente un synthon inversé en position 3'-3'-T, pour prévenir l'action des exonucléases. La chaîne hexylamine en 5' sert à fixer le ligand de technetium, MAG. L'aptamère anti-tenascine, marqué au ^{18}F ou au ^{64}Cu , peut être utilisé comme un traceur pour l'imagerie TEP de l'expression par la tumeur de la tenascine-C [181].

B.2. Aptamère anti-PSMA

L'antigène PSMA (prostate specific membrane antigen) est surexprimé dans les cellules cancéreuses prostatiques. Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez l'homme et il est la deuxième cause de mortalité par cancer après celui du poumon. La mortalité liée au cancer de la prostate chute mais le nombre de cas augmente. Le PSMA est un excellent marqueur du cancer de la prostate et il peut être ciblé au moyen de petites molécules de la famille des urées. Certains de ces agents sont déjà utilisés chez l'homme [182]. Un aptamère ARN modifié 2'F (71 nucléotides), reconnaît spécifiquement cette protéine PSMA [183]. Cet aptamère a été fusionné à un siARN (21 mères) dirigé contre un gène de survie cellulaire (Plk1 ou Bcl2) (Figure 2.15a). Il a été lié par liaison phosphodiester directement sur le brin sens du siRNA. L'injection intratumorale de cette chimère (sonde) inhibe la croissance des tumeurs surexprimant l'antigène PSMA dans des souris [184]. La conjugaison de cette sonde en 5' de siRNA à un PEG 20 kDa, a permis d'allonger sa demi-vie de 35 min à 30h et d'améliorer de la biodisponibilité de cette sonde (Figure 2.15b) [185].

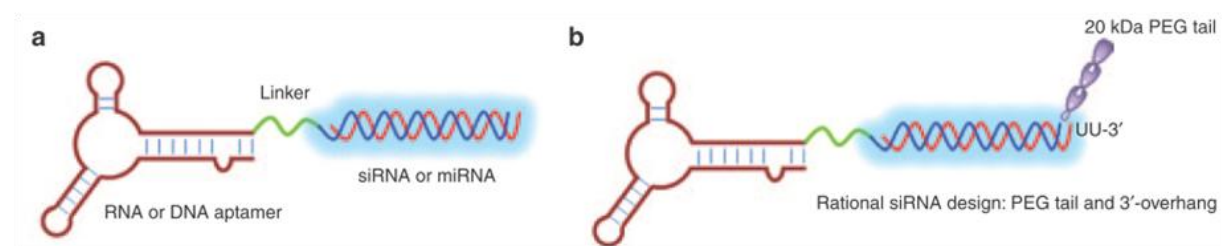


Figure 2.15. a) Formule simplifiée du complexe aptamérique anti-PSMA et un siARN dirigé contre le gène de survie cellulaire Plk1. b) Conjugaison de la sonde en 5' de siRNA à un PEG 20 kDa [185].

B.3. Aptamère Sgc8

Cet aptamère structuré en tige-boucle de 88 nucléotides présente une grande affinité ($K_d = 0,8$ nM) pour la protéine tyrosine kinase 7 (PTK7) [19]. Cette protéine participe à la transduction du signal au cours du développement et de la propagation métastatique des tumeurs malignes [186]. Afin d'améliorer la biodisponibilité de l'agent chimiothérapeutique, l'aptamère Sgc8 a été conjugué de manière covalente à la Doxorubicine (Dox). Le conjugué Sgc8-Dox est alors préférentiellement liée et internalisée par les cellules cibles [187]. Shi et al. ont développée une sonde d'aptamères Sgc8 activable (AAP) pour l'imagerie de la leucémie lymphoblastique aiguë humaine *in vivo* [188]; cette sonde est fluorescente uniquement en présence des cellules cibles (cellules CCRF-CEM), suivant un processus de balise moléculaire. Les mêmes auteurs ont ensuite développé une autre sonde utilisable pour l'imagerie bimodale (fluorescence/IRM) pour la même cible cancéreuse [189].

B.4. Aptamère AS1411

L'aptamère AS1411 (ADN, 26 nucléotides, tétrade de guanine) est spécifique de la protéine transmembranaire de nucléoline surexprimée dans des cellules cancéreuses dans la phase I et de phase II [190]. L'aptamère AS1411 est marquée avec un radioisotope ^{64}Cu chélaté avec quatre ligands déférents (DOTA, CB-TE2A, DOTA-Bn et NOTA-Bn) pour l'utiliser en imagerie TEP comme un agent d'imagerie diagnostique potentiel pour la détection du cancer du poumon [191]. Récemment, l'aptamère AS1411 a été conjugué de manière covalente avec Doxorubicine (Dox) en présence le bicarbonate d'ammonium (ABC, un agent de génération de bulle). Cette nouvelle sonde (AS1411- liposome) est ensuite utilisée pour cibler les cellules cancéreuses du sein DOX-résistant (MCF-7/ADR) [192].

C. Amélioration de la sonde pour des applications *in vivo*

C.1. Amélioration de la biodisponibilité des aptamères

C.1.1. Poly (éthylène glycol) (PEG)

L'approche la plus classique pour diminuer la clairance d'un oligonucléotide consiste à introduire un polymère d'éthylène glycol à une extrémité 3' ou 5'. Ce type de groupement améliore la furtivité de la molécule et évite sa prise en charge par les systèmes de détoxification. Le PEG présente l'avantage d'être soluble en milieu aqueux, non toxique, non influence notable sur l'affinité [105, 193] et en outre faiblement immunogène et antigène. Les aptamères porteurs d'un PEG présentent un temps de résidence dans le sang allongé, une meilleure résistance aux nucléases (par la fixation en 5') et une diminution de leur accumulation dans les tissus non ciblés [194-196]. Un exemple de cette approche est le pegaptanib [122], cet aptamère dirigé contre le récepteur au VEGF est le premier commercialisé, sous le nom de Macugen©, pour la résorption de la dégénérescence

maculaire liée à l'âge (DMLA). Il présente un PEG de 40 kDa à son extrémité 5' et un nucléotide inversé en 3' pour la résistance aux exonucléases (Figure 2.16).

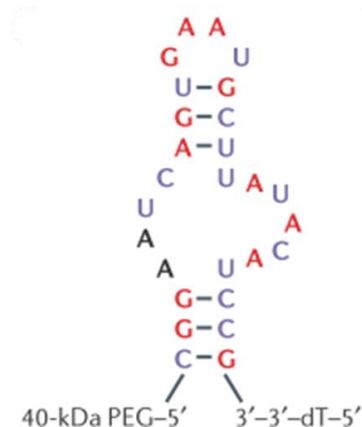


Figure 2.16. Structure de l'aptamère pegaptanib. 2' OMe purine en rouge; 2' Fluoro pyrimidine en bleu; ribonucléotide non modifié en noir; 5' PEG (40 kDa) et 3' dT inversé [122].

On peut citer comme exemple le travail de Blom *et al.* qui ont démontré que la conjugaison de chélateurs de radionucléides *via* un PEG diminuent l'absorption non spécifique des traceurs radio-marqués avec du ^{64}Cu et du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ [197]. Un autre exemple concerne l'aptamère MUC1 qui permet un ciblage des mucines, marqueurs tumoraux connus présents dans une grande variété de tumeurs malignes. Les études *in vivo* de ciblage et d'analyse semi-quantitative ont indiqué que l'aptamère porteur démontre une plus grande accumulation tumorale chez des souris porteuses de tumeurs MUC1 en comparaison à l'aptamère sans PEG [154]. Dans une autre étude, l'aptamère anti-MUC1 conjugué à un ligand MAG_2 radiomarqué au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a été modifié par introduction d'un PEG de 20 kDa ou de 17 kDa. Les auteurs n'observent pas d'influence notable du PEG sur l'affinité de l'aptamère *in vitro*; alors *qu'in vivo*, la présence du PEG conduit à une augmentation de l'absorption tissulaire de l'aptamère. Par ailleurs, il a également été mis en évidence que la clairance des aptamères PEGylés est réduite [195].

C.1.2. Applications des dendrimères en biologie et en imagerie

Afin de pouvoir être utilisés en biologie [198] les dendrimères doivent présenter une très faible toxicité [199, 200], ne pas être immunogène et avoir une tolérance vis-à-vis des dégradations enzymatiques dans le flux sanguin. Les dendrimères de petites générations ($G < 5$) ne sont pas toxiques et aucune immunogénicité n'a été observée [201]. Les dendrimères cationiques présentent une toxicité et une tendance à l'hémolyse accrue à faible concentration comparée à celle des dendrimères anioniques. De plus, les dendrimères cationiques ont tendance à déstabiliser les membranes cellulaires (chargées négativement) et à provoquer une lyse cellulaire [202].

Les propriétés des dendrimères, telles que leur structure uniforme, leur haut degré de ramification, leur hydrosolubilité, leur multivalence, la présence de sites internes d'inclusion

ainsi qu'une grande variabilité de composition chimique, en font des matériaux très attractifs pour des applications biologiques [203-204]. La plupart des dendrimères ont des propriétés particulières de solubilité dans l'eau, de viscosité, de stabilité thermique qui offrent une large palette d'applications notamment en IRM [205-208], optique [209-211] ou en imagerie nucléaire [212, 213]. Les fonctions présentes à la surface des dendrimères permettent le greffage d'agents de contraste, de fluorochromes et d'agents de ciblage [214, 215].

Par ailleurs, les dendrimères jouent un rôle important dans le domaine de la thérapie génique. Dans ce domaine, Vincent *et al.* ont décrit l'inhibition du grossissement tumoral et de l'angiogenèse par un oligonucléotide de 36-mère délivrant des gènes codant pour l'angiostatine et un inhibiteur des métalloprotéinases (TIMP-2). Ces oligonucléotides ont été greffés sur des dendrimères (PAMAM) [216]. Afin d'illustrer l'utilisation des dendrimères *in vivo*, on peut citer les travaux de l'équipe d'Hammond qui a développé une sonde "ligand-cluster" pour le ciblage de tumeur *in vivo* [217, 218].

Une propriété intéressante des dendrimères est que leur volume augmente quand ils sont chargés positivement. En s'appuyant sur cette propriété les dendrimères pourraient être utilisés dans les systèmes de transport d'éléments chimiques qui permettent de délivrer un médicament directement dans une partie ciblée de l'organisme (tumeur par exemple) [219, 220].

C.2. greffage de groupes d'intérêt

L'incorporation de groupes permettant une amélioration de la persistance dans l'organisme, ou le suivi de la sonde par diverses techniques d'imagerie, est plus aisée en post-synthèse des oligonucléotides. Elle nécessite l'introduction de points d'ancrage sur l'oligonucléotide, incorporés au cours de la synthèse via un phosphoramidite modifié. Puis la fixation de la modification nécessite une réaction d'incorporation parfaitement sélective et à haut rendement, même en milieu aqueux. Même si de nombreux phosphoramidites commerciaux présentant des groupes d'intérêt (fluorophores, chaînes polycationiques) ont été développés ces vingt dernières années, il est toujours important de pouvoir présenter sur les aptamères des sites de fixation post-synthétiques.

Les aptamères ARN fluorescents peuvent être obtenus par synthèse en phase solide. Cependant, le rendement de la synthèse supportée ne permet pas de préparer des ARNs de plus de 60 nucléotides. Des modifications d'ARN à l'extrémité 5' peuvent être faites par voie enzymatique, par transcription *in vitro* avec des ARN T7 polymérases ou en présence d'initiateur nucléotide tel que la guanosine monophosphothioate (GMPS) [221].

C.2.1. Greffage en 5' ou 3' de groupes d'intérêt

L'incorporation des groupes d'intérêt en 3' est réalisée avant le décrochage de la séquence de son support CPG, ou avant le couplage en solution sur un aptamère déprotégé ou enfin avant l'introduction du marqueur sur le support CPG et donc avant le couplage du

phosphoramidite suivant, cette étape ne devant pas perturber la synthèse. Les marqueurs introduits doivent être résistants aux conditions de synthèse et de déprotection de l'oligonucléotide. De nos jours, il existe certains marqueurs commerciaux ou groupe d'intérêt couplés directement sur un support CPG (Figure 2.17).

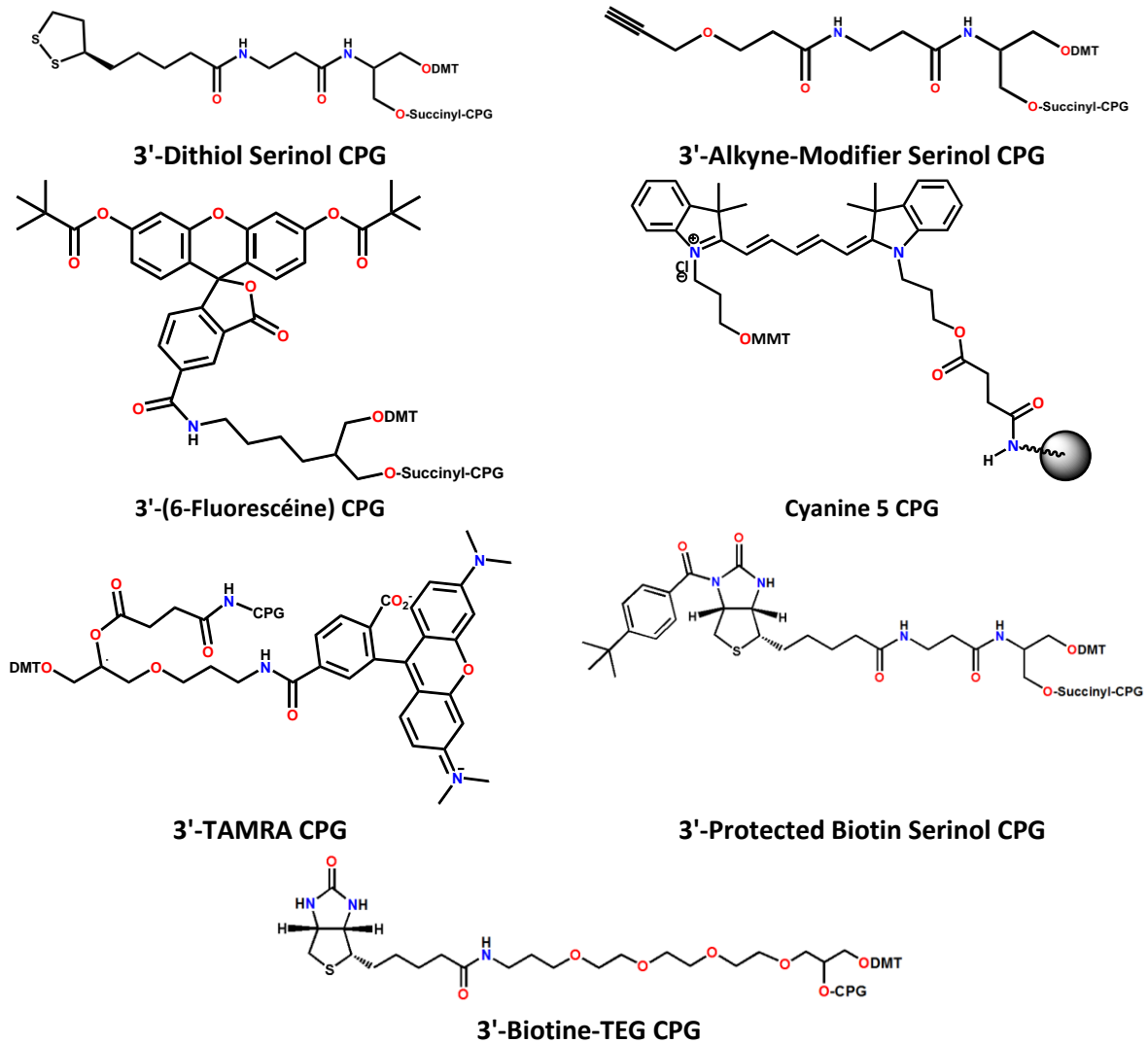
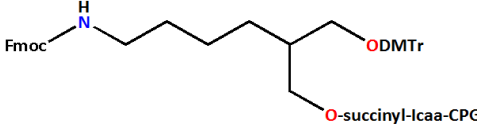
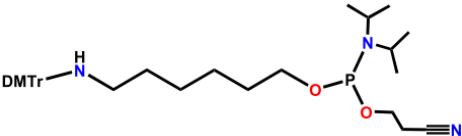
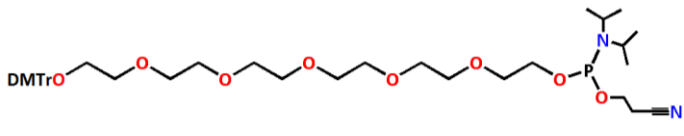
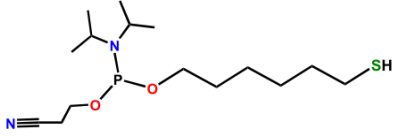
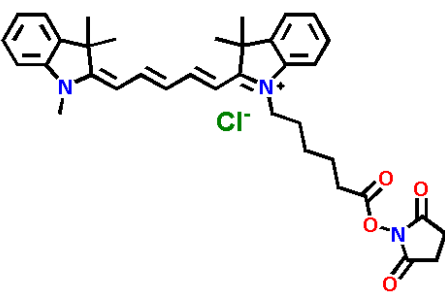
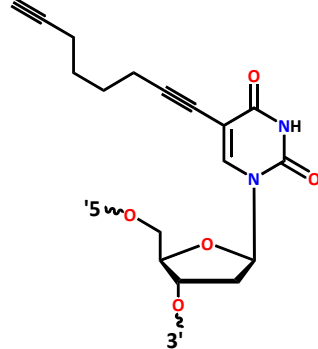
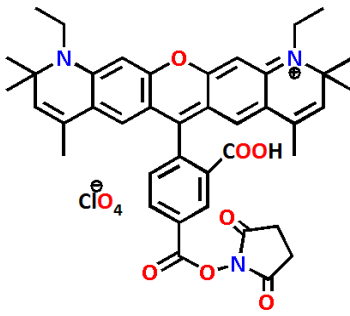
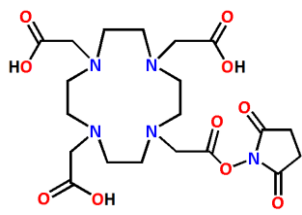


Figure 2.17. Directement groupe d'intérêt sur support CPG

Une fonction amine primaire, alcyne ou thiol peut être introduite sous forme protégée sur l'oligonucléotide encore fixé sur support par couplage en 5' du phosphoramidite (tableau 2.2). L'aptamère est donc adaptable aux différentes stratégies d'étiquetage, comme par exemple le greffage sur des nanoparticules et l'introduction de radioisotopes pour une utilisation en imagerie TEP [180].

Tableau 2.2. Différentes molécules commerciale pour l'introduction de ces groupes d'intérêt au cours de la synthèse des aptamères.

	
3'-Amino-Modifier C7 CPG	Amino-Modifié C6-CE Phosphoramidite
	
Espaceur HEG Modifié-CE Phosphoramidite	Thiol-Modifié C6-CE Phosphoramidite
	
Cy5-NHS ester	Alcyne sur un nucléoside
	
ATTO590-NHS ester	DOTA-NHS ester

C.2.2. Couplage orthogonal: approche «chimie - click»

La synthèse d'analogues d'oligonucléotides, nécessite des réactions avec de hauts rendements associés à des temps très courts. Par ailleurs des modes opératoires simples sont nécessaires afin de minimiser les étapes de purifications, et d'éviter des étapes de protection et déprotection, et de réduire ainsi le nombre d'étapes total. Le concept de «chimie-click» est associé à ce type de réactions. Cette notion de «chimie - click» définit un ensemble de réactions permettant la conjugaison covalente et irréversible de groupes d'intérêt dans des conditions de réactions douces (possible en milieu aqueux) et spécifiques [222]. Elles doivent permettre un contrôle de la régiosélectivité, avec des rendements élevés, et peu de sous-produits. Elles doivent de plus être insensibles à l'oxygène et l'eau et utiliser des matières premières facilement disponibles.

Une liaison thioéther peut également être obtenue par chimie click entre un thiol et un maléimide. Cette méthode a été utilisée la première fois sur les peptides en 1995 pour la synthèse de TASP (Template Assembled Synthetic Protein) (Schéma 2.1).

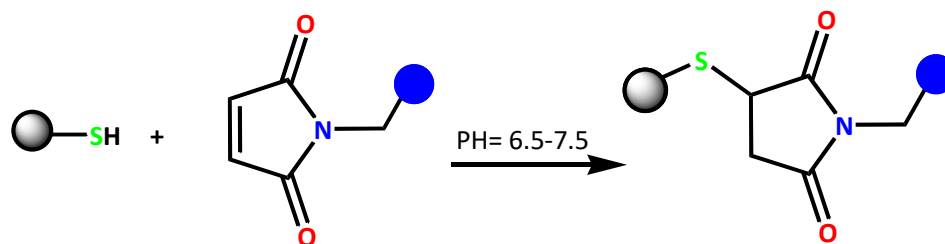


Schéma 2.1. Chimie click entre un thiol et un maléimide

Réaction de Huisgen

Parmi les réactions de « chimie-click » défini par Sharpless, la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen entre un alcyne terminal et un azoture (qui peut être porté par un bras espaceur) est rapidement devenu la plus populaire [223]. La réaction génère un mélange de triazoles 1,4 et 1,5 disubstitués (Schéma 2.2). De plus, elle peut être effectuée dans une grande variété de solvants organiques ainsi que dans l'eau.

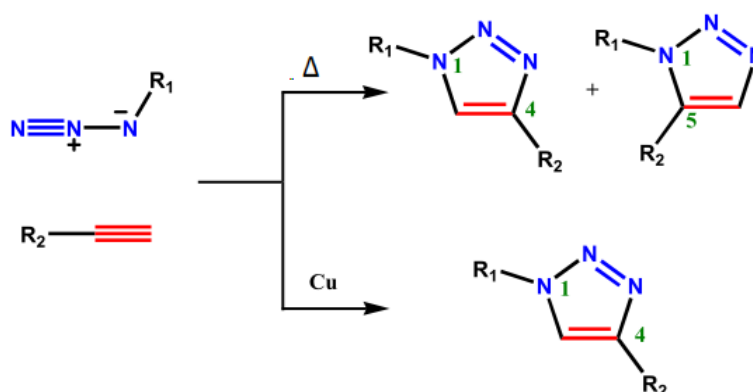


Schéma 2.2. 1,2,3-Triazole via Huisgen 1,3-Dipolar Cycloaddition pour la fixation covalente de groupes d'intérêt

L'addition de cuivre (I) permet de favoriser très largement l'addition 1,4 (Schéma 2.3). Cette réaction est couramment appelée CuAAC pour «Copper-Catalyzed Azide-AlkyneCycloaddition». La CuAAC a été utilisée pour la première fois en 2003 dans le domaine de la chimie des acides nucléiques pour fixer un marqueur fluorescent sur des séquençages automatisés d'ADN [224].

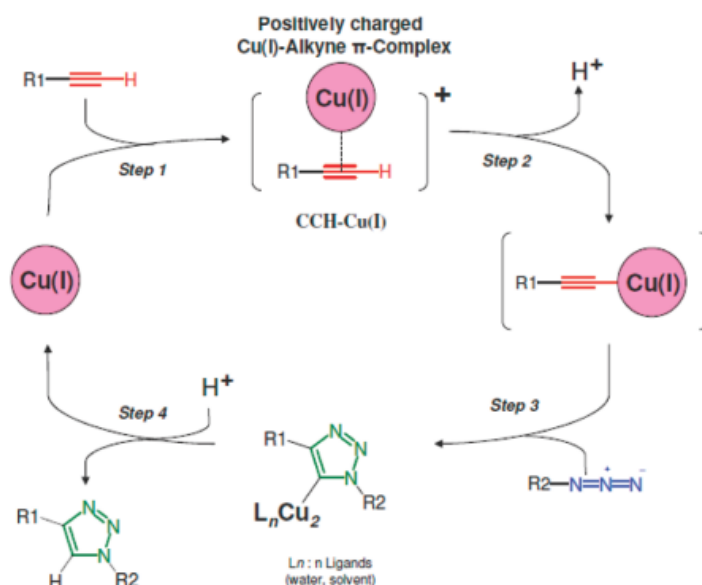


Schéma 2.3. Cycle catalytique proposé pour la réaction de cycloaddition catalysée par le cuivre entre un azoture et un alcyne terminal (CuAAC) [225]

La réaction de Huisgen implique donc la présence de cuivre pour favoriser la formation d'un composé majoritaire. Cependant, l'introduction du cuivre dans des structures d'acides nucléiques peut présenter deux inconvénients majeurs : un risque d'hydrolyse des liens phosphodiester et une impossibilité à éliminer le cuivre en fin de réaction. Afin de résoudre ce problème, Phillip et al. ont proposé l'utilisation de chélatant du cuivre I [226].

Récemment, l'utilisation d'alcynes cycliques très contraints a permis de développer le couplage de Huisgen, sans utilisation de catalyseur cuivré [227, 228] (Schéma 2.4). En 2007, l'équipe de Bertozzi a décrit l'utilisation d'un cyclooctyne afin de réaliser une réaction de « chimie-click » sans catalyseur tout en gardant un contrôle de la régiosélectivité [229]. Du fait qu'elles n'utilisent pas de cuivre, ces conditions de réaction permettent d'avoir des applications *in vivo* telles que le marquage sélectif de biomolécules injectées chez des souris [230]. Le schéma 2.4 présente un alcyne cyclique qui se couple en post-synthèse sur une amine en 5' [231].

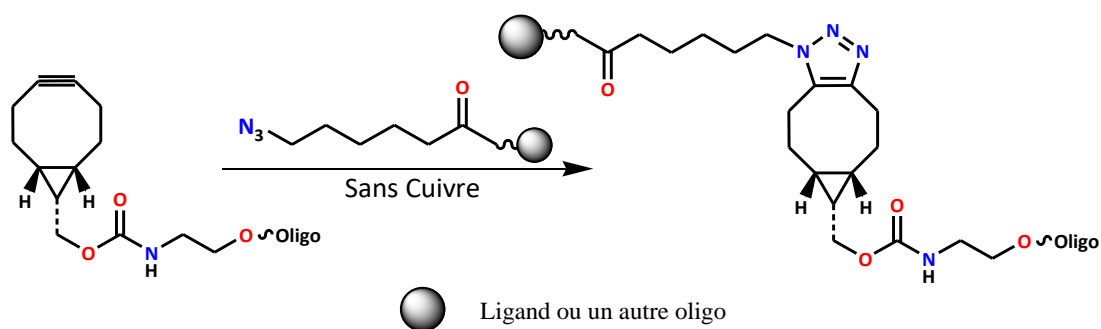


Schéma 2.4. La cycloaddition via Huisgen entre un alcyne cyclique et un azoture sans cuivre [231]

PROJET DE THESE

L'objectif de ma thèse était de développer de nouvelles sondes utilisables en imagerie médicale, basées sur l'utilisation d'aptamères, pour la détection de deux types de tumeurs : les glioblastomes et les mélanomes. L'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus physiologique normal peut être pathologique dans le cas de cancers, où il devient primordial pour la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases. Ainsi, au cours du développement des tumeurs, les cellules cancéreuses vont libérer dans leur environnement de nombreuses molécules, et plus particulièrement une protéine appelée facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), des intégrines et des métalloprotéases matricielles (MMPs en particulier MMP-2 et MMP-9) [232, 233]. La MMP-9 est l'un des types de métalloprotéases matricielles, elle est produite par les cellules inflammatoires comme les polynucléaires neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les lymphocytes et parfois par les cellules endothéliales et épithéliales. Les MMPs jouent un rôle dans la modification de la matrice extracellulaire (MEC). Dans les tumeurs, l'expression des MMP, MMP-2 et MMP-9 en particulier, est généralement augmentée, essentiellement au niveau où les processus d'invasion sont actifs [234]. Les MMPs sont utilisées comme marqueurs tumoraux à différents stades de progression [235].

Les traceurs développés ont pour objectif de cibler la protéine hMMP-9. C'est dans ce contexte qu'un aptamère a été sélectionné au sein de notre laboratoire, suite à une précédente thèse [236]. Cet aptamère nommé F3B (ARN modifié, 36 nucléotides, $K_d = 20$ nM) est de chimie modifié en 2' OH du ribose : 2'F pour les nucléotides pyrimidiques et 2' OMe pour les nucléotides puriques. Cet aptamère présente comme structure : 5' –UGC CCU GCC CUC ACC CGU UAG CCU GAG CGC CCC GCA- 3'. Après des essais concluants de détection de la protéine sur des coupes de tumeurs, il a été envisagé de transformer cet aptamère en une sonde pour l'imagerie biomédicale.

Nous disposons en effet d'un deuxième aptamère, nommé 11F46A (ADN, 41 nucléotides, $K_d = 70$ nM), synthétisé par le laboratoire Novaptech par sélection contre le site actif de l'hMMP-9. Il a été démontré par SPR que les aptamères F3B et 11F46A n'interagissent pas avec la même partie de la protéine.

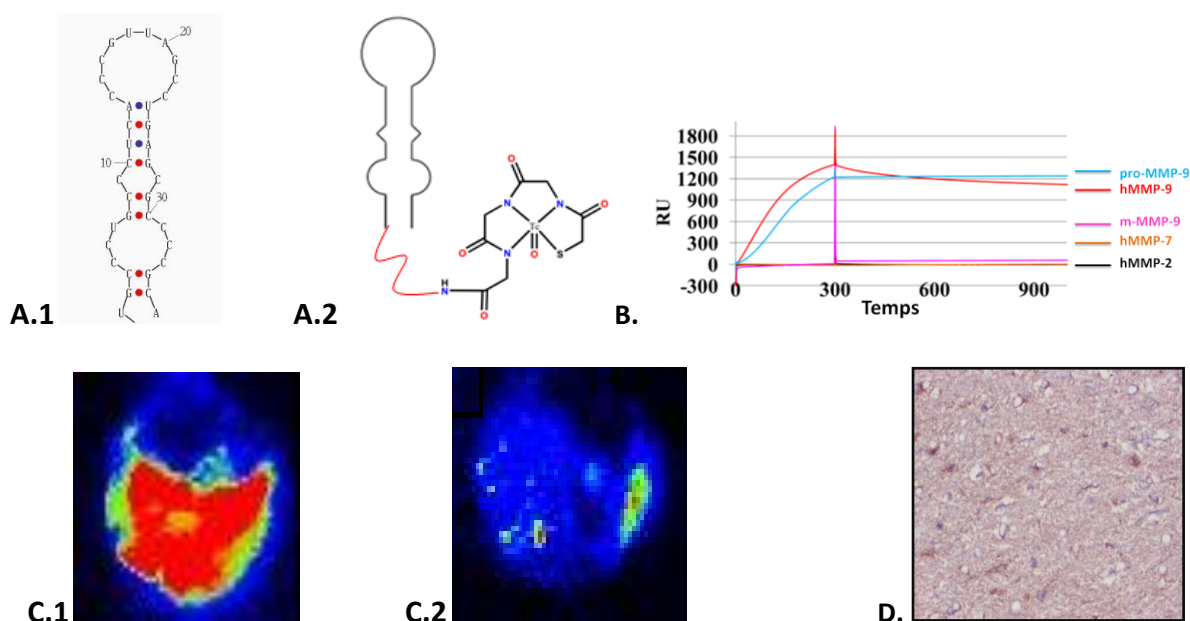
1. Sélection et structure

La sélection, en série 2'F pyrimidine, 2'OH purine a été effectuée à l'aide d'une approche SELEX, par rétention sur filtre de la protéine. Le candidat le plus fortement représenté dans la banque d'oligonucléotides à l'issue du quatorzième tour de sélection a été cloné. Après un changement de chimie pour le rendre résistant aux nucléases, il a été raccourci, afin d'obtenir le meilleur compromis taille/affinité pour la molécule cible. Ainsi, l'aptamère F3B, structuré en tige boucle, présente un K_d pour la protéine hMMP-9 de 20 nM (Figure 1, Projet de thèse).

2. Détection de glioblastomes

2.1. Activité *in vitro*

L'efficacité de l'aptamère F3B dans la détection de tumeurs de type glioblastome [237], a ensuite été démontrée. Après conjugaison en 5' d'un ligand MAG_3 , le F3B a été radiomarqué par du $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figure 1, A.2, Projet de thèse). L'observation au β -imager de son interaction avec la protéine hMMP-9 sur des coupes de glioblastome est présentée sur la figure 1 (C.1, C.2, Projet de thèse). Sa spécificité est telle qu'il ne reconnaît pas l'hMMP-2, ni l'hMMP-7 et ni la MMP-9 murine (mMMP-9) (Figure 1.B, Projet de thèse).



2.2. Activité *in vivo*

Toutefois, les premiers essais *in vivo* visant à détecter l'hMMP-9 de tumeurs humaines (U87) xéno greffées sur des souris immunodéficientes se sont révélés infructueux [236]. On peut formuler plusieurs hypothèses (non exclusives) à cet échec et proposer des stratégies palliatives :

- 1) Une clairance rénale et hépatique beaucoup trop rapide et le temps d'interaction avec la cible est trop court, qui peut être lié à une faible concentration en hMMP-9.
- 2) La biodistribution et la pharmacocinétique des oligonucléotides sont peu favorables à l'imagerie : la conjugaison des aptamères à des dendrimères/dendrons ou à des

nanoparticules doit permettre de moduler leur persistance dans le flux sanguin, de favoriser l'accumulation et la rétention spécifique au niveau des tumeurs et d'améliorer ainsi la détection (sensibilité) (diminution du k_{off}) [238].

2.3. Développement d'outils biotechnologiques basés sur l'aptamère F3B

Afin d'accroître la force d'interaction entre le ligand et sa cible, deux types de modifications sont envisagées. La première est de développer des structures multimériques de F3B (Figure 2, Projet de thèse). Cela devrait permettre une amélioration du K_d , en modifiant la composante k_{off} de la constante d'équilibre du complexe aptamère-protéine. Il a été démontré dans la littérature que l'affinité des traceurs vis-à-vis de leur cible biologique pouvait être améliorée en synthétisant des dimères de biomolécules [239, 240]. La seconde est d'élaborer un système bifonctionnel, utilisant deux aptamères différents dirigés contre la protéine MMP-9. On vise également ici une amélioration du K_d par modification des composantes k_{on} et k_{off} de la constante. Ce phénomène s'explique par un double effet : d'une part deux biomolécules peuvent se lier à deux récepteurs biologiques de manière simultanée et d'autre part la concentration locale en biomolécule est augmentée [239, 240], on peut citer l'exemple, l'aptamère antithrombine présente une activité inhibitrice *in vitro* et *in vivo* se traduisant par une augmentation du temps de coagulation plasmatique [35, 108].

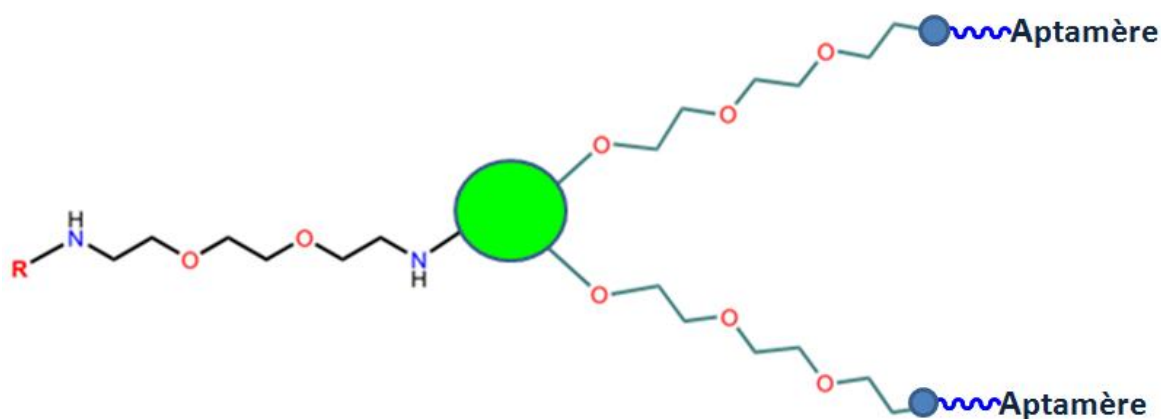
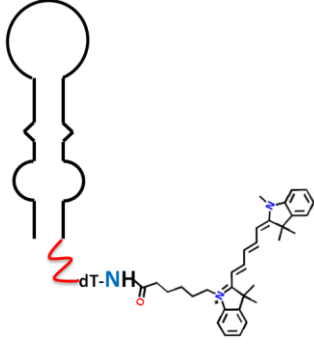
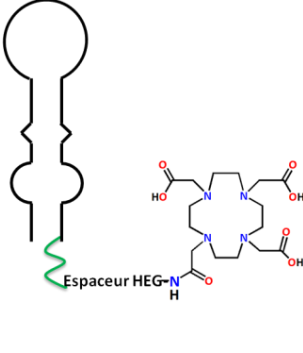
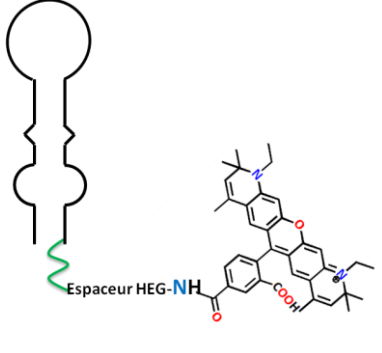
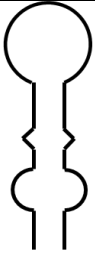
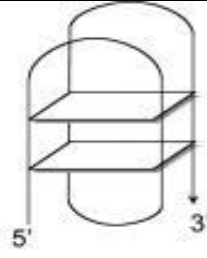
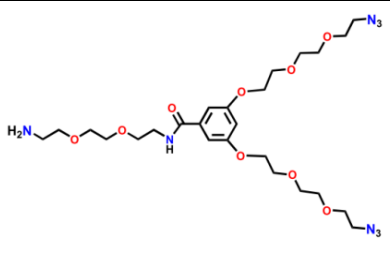
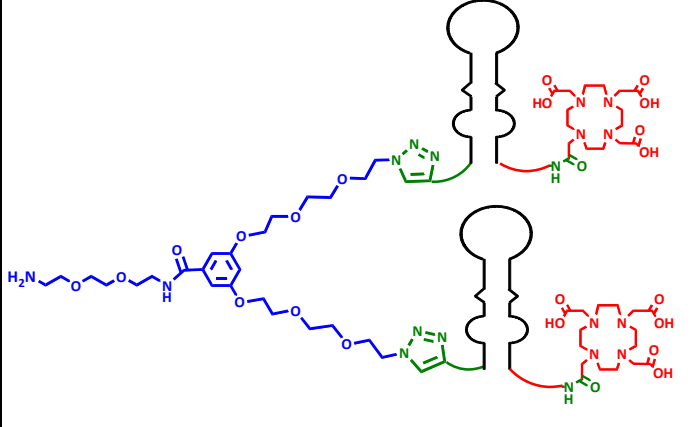
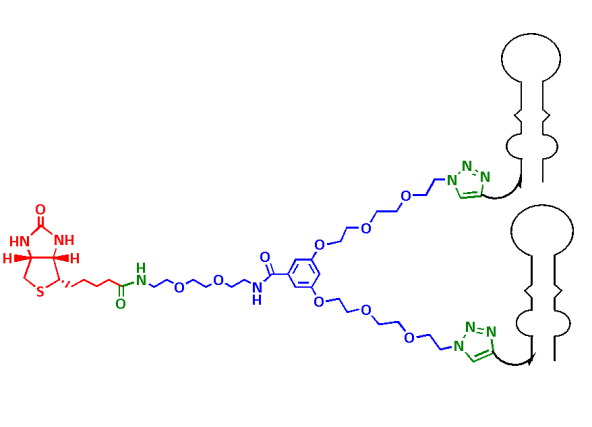


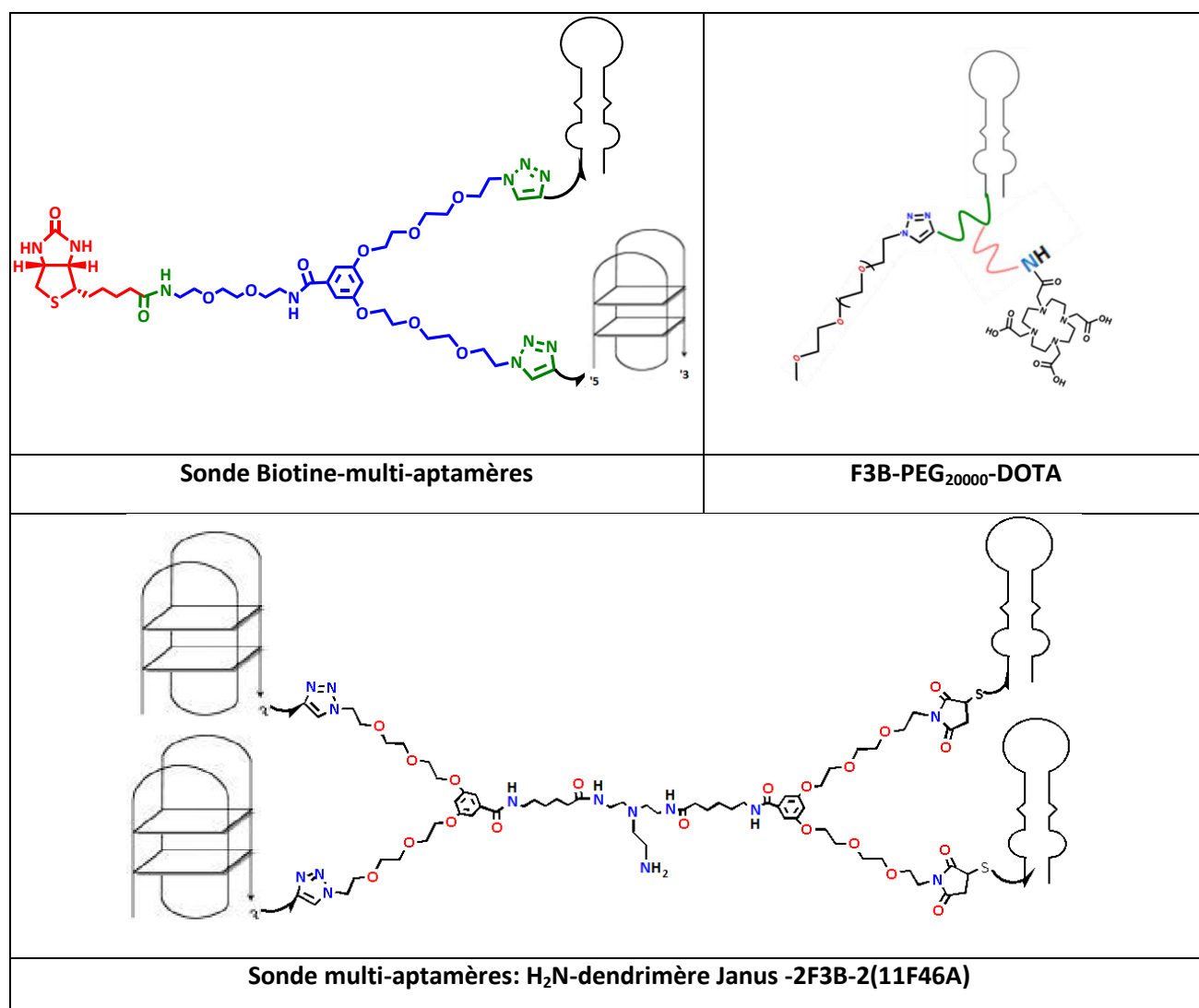
Figure 2. Structures multimériques et multifonctionnelles : dendrimère/dendron portant des chaînes PEG (polyéthylène glycol) et présentant plusieurs copies de deux aptamères de structures différentes ou non (F3B, 11F46A), pour les différents types d'imageries (R : ligand pour l'imagerie ex : Biotine, DOTA, NOTA, Cy5 et ATTO 590)

On se propose donc de mettre au point une nouvelle structure, un système pince, afin d'améliorer l'affinité envers la cible. Sur cette molécule servant de support on peut fixer deux ou trois bras espaceurs porteurs d'un groupement azoture utilisé pour le couplage avec les aptamères par « chimie-click ». Il a également été envisagé d'introduire un groupement

maléimide utilisé pour le couplage avec les aptamères portant les groupements thiol par « chimie-click ». Comme il a été mentionné précédemment différentes stratégies ont été développées dans le but d'augmenter le temps d'interaction entre la cible et la sonde consistant en l'association de deux aptamères de structures différentes ou non, portés par un même dendrimère/dendron et introduits par « chimie-click » afin d'obtenir une sonde multimérique ou multifonctionnelle. Il a par la suite été envisagé d'introduire un marqueur fluorescent et/ou un ligand de radioélément afin d'avoir accès à différentes modalités d'imagerie (Tableau 1, Projet de thèse).

Tableau 1. Présente différents molécules synthétisée pour différents types d'imageries *in vivo*

		
<p>F3B- dT- CY5</p>	<p>F3B- espacer HEG- DOTA</p>	<p>F3B- espacer HEG- ATTO</p>
		
<p>F3B</p>	<p>11F46A</p>	<p>Dendron multifonctionnelle pour différent imagerie</p>
		
<p>Sonde multi-aptamères: dendron rattaché à 2 copies de F3B-DOTA</p>		<p>Sonde multi-aptamères: dif3B-dendron-Biotine</p>



Le second paramètre à améliorer pour l'obtention de sondes est d'augmenter le temps de résidence des aptamères dans l'organisme afin d'améliorer la furtivité des molécules. Donc, la fixation d'une chaîne PEG et un bras espaceur HEG à l'extrémité 5' des aptamères devrait permettre de remédier à ce problème [195, 240, 241].

Plusieurs types d'imageries sont envisagés, en utilisant un marqueur spécifique d'une cible, afin de détecter *in vivo* un processus pathologique TEMP (^{99m}Tc ou ^{111}In), TEP (^{18}F ou ^{64}Cu), IRM (DOTA-Gd) et fluorescence (Cy5 ou ATTO 590).

2.4. Implication dans différents projets autour de F3B

2.4.1. ImMelApt: Imaging Melanome with Aptamers.

Nous souhaitons développer des sondes pour l'imagerie des mélanomes sur la base d'un aptamère F3B précédemment identifié et caractérisé spécifique pour la MMP-9

humaine. Donc, différentes modalités d'imagerie sera considéré (Optique, TEMP et TEP) et appliqué à la détection de la MMP-9 dans les deux environnements différents: i) des biopsies de tumeurs humaines, et ii) une xéno greffe de modèle de souris avec des cellules de mélanome humain [A375 (mélanome humain) et B16F0 (mélanome murin)]. Ce projet est en collaboration avec Pr. JANIER Marc et Dr. KRYZA David (LAGEP UMR 5007 CNRS, Université de Lyon 1) et Pr. FERNANDEZ Phillippe, Pr. ALLARD Michelle et Dr. Jürgen SCHULZ (CNRS, INCIA, UMR 5287, CHU de Bordeaux).

2.4.2. Imagerie Photonique *In Vivo* à l'aide de conjugués Aptamère-Nanoparticule.

Ce projet porte sur la production d'un aptamère F3B modifié, porteur d'une fonction thiol. Cette nouvelle modification permettra l'ancrage de F3B sur les nanoparticules via un couplage click thiol-maléimide. Ce projet consiste à développer une nouvelle sonde d'imagerie biomédicale. Cette sonde sera composée d'une nanoparticule hybride à base de silice, portant en son cœur un fluorophore et recouverte de l'agent de ciblage, l'aptamère F3B (Figure 3, Projet de thèse). Elle sera évaluée *in vivo* en imagerie photonique, sur des modèles murins, en mettant à profit le développement de lignée cellulaire U87 exprimant la protéine MMP-9 de façon contrôlée et inductible. Ce projet est en collaboration avec : M. Couillaud Franck (RMSB, CNRS, UMR 5536, CHU de Bordeaux) et M. Mornet Stéphane (ICMCB, ISM, CNRS, UPR 9048, Université de Bordeaux).

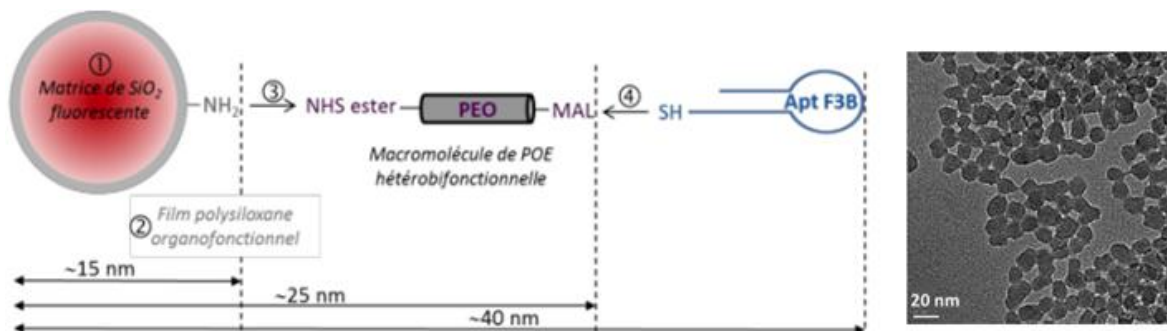


Figure 3. Schéma de principe montrant la stratégie d'élaboration des nanoparticules cœur-couronne fonctionnalisées comme marqueur fluorescent de l'aptamère F3B. A droite image de MET des nanoparticules de silice fluorescentes

CHAPITRE III :
SONDE MONOMERIQUE DE F3B

A. Synthèse des dérivés de F3B

La stratégie de synthèse utilise des phosphoramidites modifiés qui sont couplés sur l'oligonucléotide pendant sa synthèse automatisée en position 5' (Figure 3.1). Différents groupes ont ainsi été introduits sur F3B: amine, alcynes, ou bien encore thiol. La fonction amine a été introduite avec un espaceur C6 afin de l'éloigner de la séquence nucléotidique et pour fixer un marqueur (biotine-NHS ester, DOTA-NHS ester, ATTO 590-NHS ester ou Cyanine-NHS ester). De même la fonction alcynes a été introduite sur un dT avec un espaceur HEG et la fonction thiol a été introduite sous une forme protégée avec un espaceur HEG (Tableau 2.2 et Tableau 3.1).

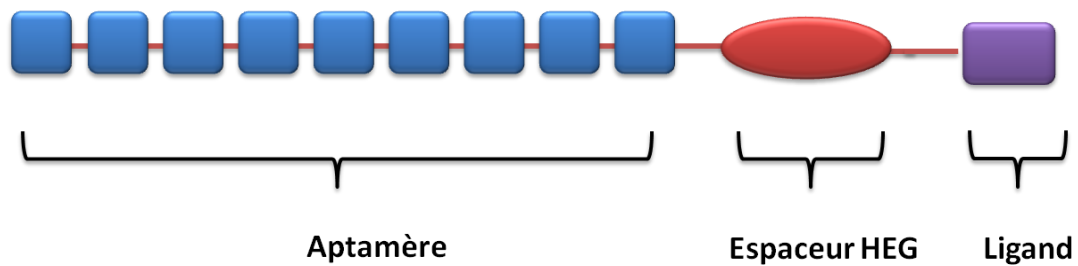
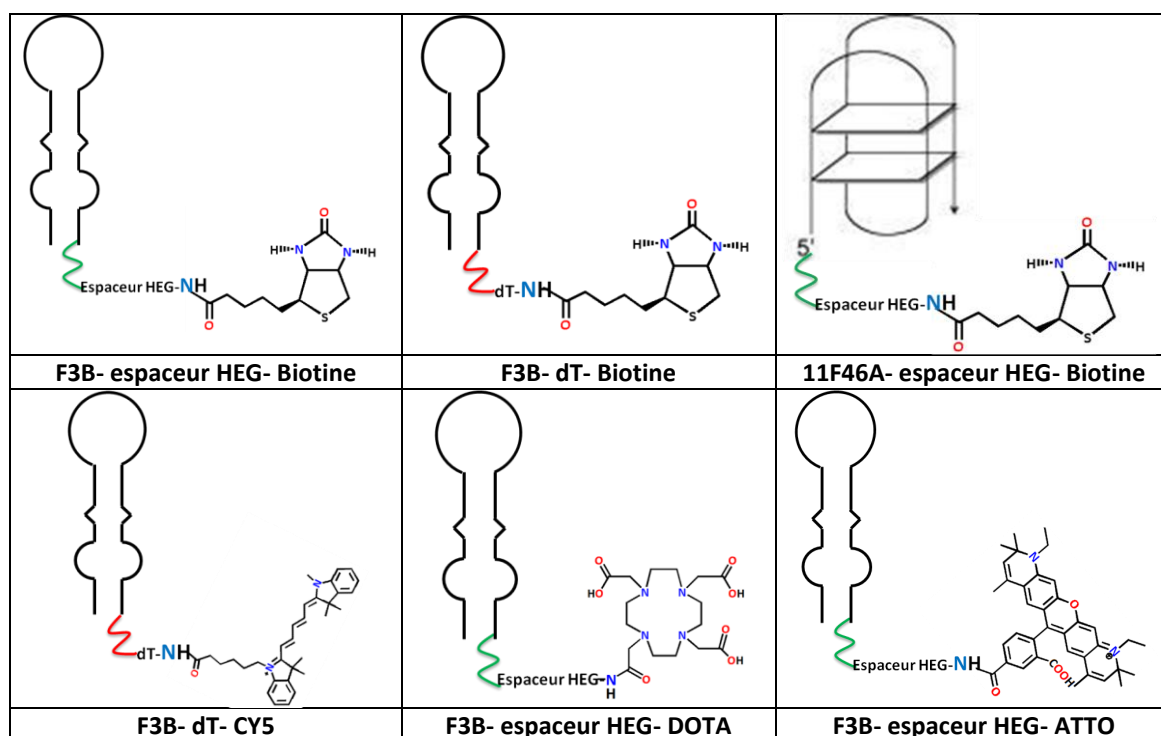


Figure 3.1. Schéma d'un aptamère porte sur la position 5' un ligand

Tableau 3.1. Molécules synthétisées pour différents types d'imageries *in vivo*

<p>Espaceur HEG-NH₂</p>	<p>dT-NH₂</p>	<p>Espaceur HEG-SH</p>
F3B- espaceur HEG-NH₂	F3B- dT- NH₂	F3B- espaceur HEG-SH
	<p>NH₂</p>	<p>5' 3'</p>
F3B- espaceur HEG-alcynes	F3B- espaceur HEG-alcynes-NH₂	11F46A- espaceur HEG-alcynes



Un oligonucléotide contrôle ou scramble est synthétisé en parallèle; celui-ci présente la même composition en bases que le F3B, mais elles sont disposées dans un ordre aléatoire. Des études préalables ont montré que le scramble ne reconnaissait pas la cible c'est-à-dire la MMP-9.

Les oligonucléotides F3B-espaceur HEG-DOTA (Schéma 5.1), F3B-dT-Cy5 (Schéma 5.2), F3B-espaceur HEG-ATTO 590 (Schéma 5.3) et Contrôle-espaceur HEG-DOTA (Schéma 5.1), Contrôle-dT-Cy5 (Schéma 5.2), Contrôle-espaceur HEG-ATTO 590 (Schéma 5.3) (Tableau 3.1) ont été préparés afin de valider la fixation des aptamères F3B modifiés avec la protéine MMP-9. Nous avons réalisé des tests de compétition en présence de ces aptamères modifiés ainsi que des oligonucléotides contrôles.

B. Validation de la reconnaissance des F3B modifiés avec la protéine MMP-9

Nous avons vérifié ici, par SPR, que ces aptamères modifiés (DOTA, Cy5 ou ATTO 590) ont conservé ses propriétés de fixation de la protéine hMMP-9 avec la même efficacité que l'aptamère F3B.

B.1. SPR

B.1.1. Principe de SPR

La résonance plasmonique de surface (SPR) est une technique optique permettant la mesure de la liaison d'un "ligand" sur un "récepteur" adsorbé à la surface d'une couche métallique (Al, Ag, Au, Cu, métaux riches en électrons mobiles). Il existe différentes surfaces selon le type de ligand à immobiliser (carboxyméthyle CM5, nickel NTA, streptavidine SA). La SPR est très utilisée durant le procédé SELEX pour évaluer l'affinité des candidats au cours des cycles. Elle donne des informations sur l'interaction entre des molécules, typiquement entre des protéines et d'autres protéines ou bien avec des acides nucléiques, ou encore avec des petites molécules [242]. D'un point de vue technique, une solution incluant le récepteur est injectée dans le système permettant le contact du récepteur avec le ligand immobilisé. Les photons de l'onde évanescente vont alors entrer en résonance avec les nuages électroniques du métal (plasmon). Le faisceau réfléchi va présenter une chute d'intensité avec un angle défini, l'angle de résonance. Les interactions moléculaires entre un ligand retenu sur la surface et un analyse en solution vont entraîner un changement de masse induite par l'association ou la dissociation des complexes, ce qui va modifier l'indice de réfraction du milieu et décaler la position de l'angle de résonance (Figure 3.2). L'enregistrement de la variation de l'angle de résonance permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Ces changements sont détectés par le système et enregistré par le logiciel de contrôle sous forme de "unités de résonance" (RU). Lorsque le récepteur se lie, il y a une augmentation du signal SPR. Inversement, lorsqu'il se sépare du ligand le signal SPR diminue.

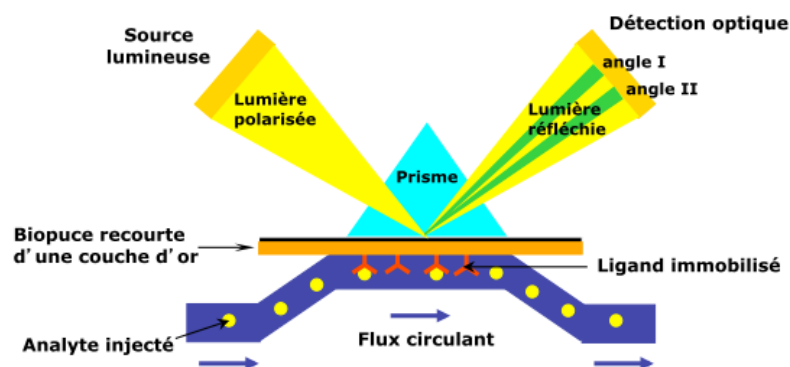


Figure 3.2. Représentation du principe de résonance plasmonique de surface

L'injection successive d'une série de concentrations de récepteur génère des courbes SPR. Par modélisation, suivant le modèle de Langmuir, il est alors possible de retrouver les constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d) pour le couple sonde / cible et par extension la constante d'équilibre de la réaction aussi nommée constante d'affinité (Figure 3.3) [243].

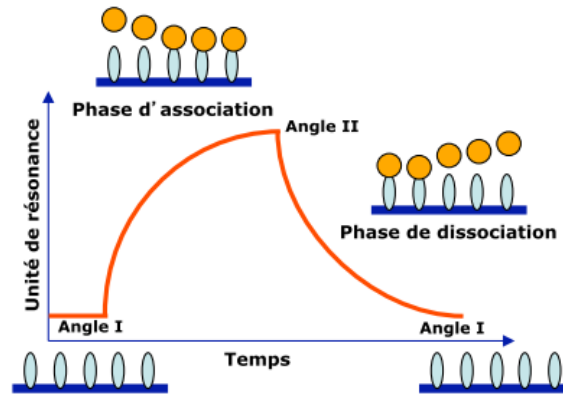


Figure 3.3. Suivi cinétique en temps réel de la réflectivité décrivant successivement une phase d'association et une phase de dissociation

B.1.2. Préparation la protéine hMMP-9

Pour vérifier la pureté des hMMPs-9, un gel de polyacrylamide SDS dénaturant a été réalisé. Une quantité de 100 ng a été déposée et une coloration aux sels d'argent a permis de révéler la migration des hMMPs-9. L'analyse a permis de déduire une taille de 83 kDa pour l'hMMP-9 (Figure 3.4).

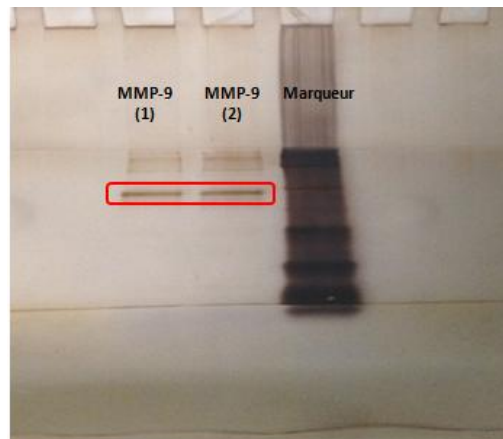


Figure 3.4. Vérification hMMP-9 par l'électrophorèse SDS-PAGE dénaturant. A droite, le marqueur de poids moléculaire est indiqué. Les bandes correspondant à la taille attendue sont encadrées en pointillés rouge pour les deux échantillons de la protéine hMMP-9

B.1.3. Tests de compétition des aptamères et contrôles modifiés

L'immobilisation choisie pour l'aptamère F3B et de son contrôle repose sur l'interaction classique streptavidine-biotine, donc, nous avons préparé des dérivés F3B et contrôle biotinylés (Tableau 3.1).

La figure 3.5 résume la distribution des oligonucléotides à la surface de la biopuce SAD.

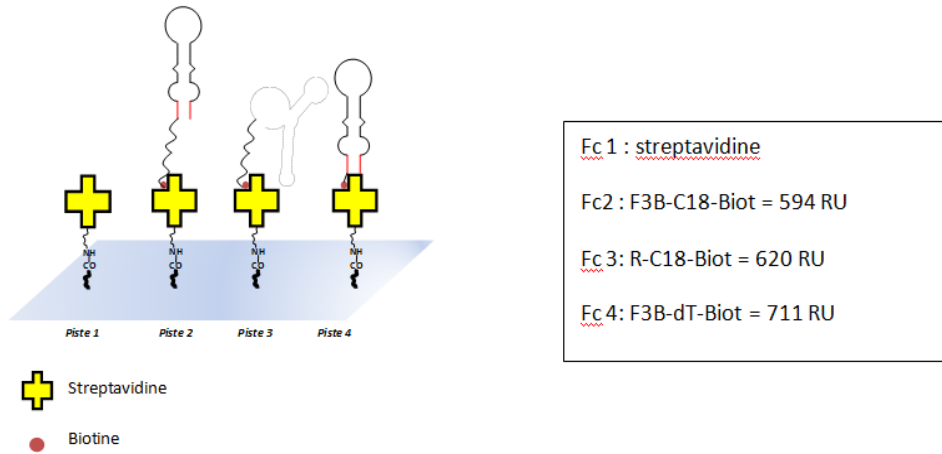


Figure 3.5. Schéma résumant la distribution des aptamères à la surface de la biopuce SAD sur les trois pistes

Pour les tests de compétition, la protéine hMMP-9 est incubée à une concentration de 50 nM pendant 10 minutes à température ambiante avec les aptamères F3B-espaceur HEG-DOTA, F3B-dT-Cy5 et F3B-espaceur HEG-ATTO 590 ou les oligonucléotides Contrôle-espaceur HEG-DOTA, Contrôle-dT-Cy5 et Contrôle-espaceur HEG-ATTO 590 à une concentration de 200 nM. Les mélanges (hMMP-9/aptamère (B) ou hMMP-9/Contrôle (R)) sont ensuite injectés à la surface de la biopuce.

Tableau 3.2. Données SPR brutes post-injection, en RU

	SA	F3B-HEG-Biotine	Contrôle-HEG-Biotine	F3B-dT-Biotine
[hMMP-9] 50nM	27.8	247	15	463
[hMMP-9] 50 nM + [F3B-HEG-ATTO 590] 200 nM	- 102	34	49	44
[hMMP-9] 50 nM + [F3B-dT-Cy5] 200 nM	119	42	50	35
[hMMP-9] 50 nM + [F3B-HEG-DOTA] 200 nM	35	27	24	20
[hMMP-9] 50 nM + [Contrôle-HEG-ATTO 590] 200 nM	54.9	205	71	352
[hMMP-9] 50 nM + [Contrôle-dT-Cy5] 200 nM	38.4	169.5	23.9	322.8
[hMMP-9] 50 nM + [Contrôle-HEG-DOTA] 200 nM	80	243	70	417
[hMMP-9] 50 nM fin journée	39	210	25	390

Chaque sensorgramme est double référencé : pour chaque piste, le signal obtenu avec le tampon de course et le bruit de fond observé sur la streptavidine sont soustraits afin de détecter le signal propre du F3B- espaceur HEG et du Contrôle-espaceur HEG. Les profils de fixation du F3B-espaceur HEG et du Contrôle-espaceur HEG, sont représentés sur les figures 3.6 et 3.7 respectivement.

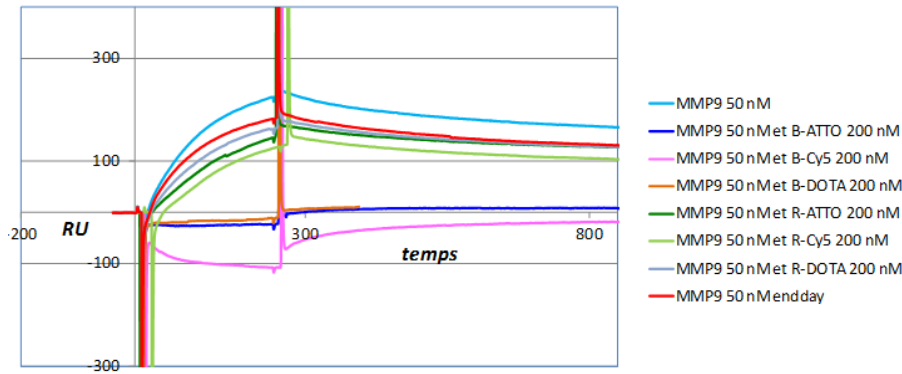


Figure 3.6. Compétition hMMP-9 50nM avec Oligonucléotides 200 nM sur Piste F3B-espaceur HEG-Biotine

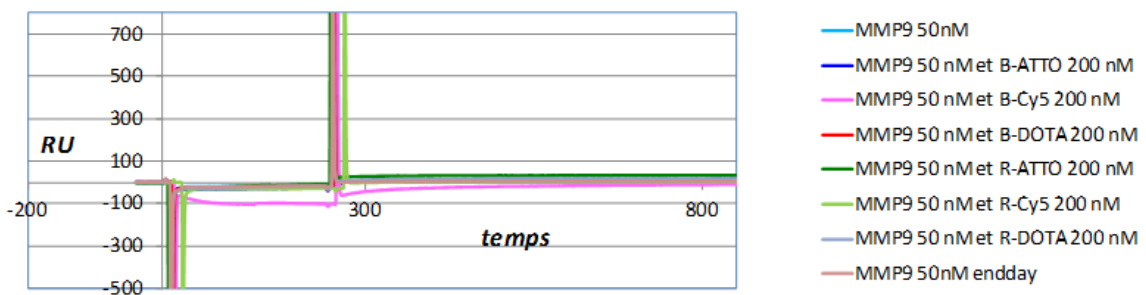


Figure 3.7. Compétition hMMP-9 50nM avec Oligonucléotides 200 nM sur Piste Contrôle-espaceur HEG-Biotine

Lorsque les aptamères F3B-espaceur HEG-ATTO 590, F3B-dT-Cy5 ou F3B-espaceur HEG-DOTA sont incubés avec la protéine hMMP-9, aucune fixation n'est observée pour les F3B immobilisés sur la biopuce (sensorgrammes bleu, rose et orange, Figure 3.6). Les aptamères F3B modifiés forment un complexe avec l'hMMP-9 et entrent en compétition avec l'aptamère F3B immobilisé. Les aptamères F3B modifiés reconnaissent la protéine hMMP-9 avec la même efficacité que l'aptamère F3B.

Les tests de compétition mettant en jeu les oligonucléotides contrôles modifiés Contrôle-espaceur HEG-ATTO 590, Contrôle-dT-Cy5 et Contrôle-espaceur HEG-DOTA incubés avec la protéine, montrent que la protéine libre, non associée à ces derniers, peut se fixer sur l'aptamère F3B immobilisé sur la biopuce (sensorgrammes vert clair, vert foncé et gris, Figure 3.6), c'est-à-dire que le contrôle n'a pas empêché l'aptamère F3B de connaître sa cible (hMMP-9). L'intensité du signal lors de ces compétitions n'est pas identique au signal correspondant à la fixation de l'hMMP-9 seule (courbe bleue claire, Figure 3.6). Néanmoins, les signaux correspondants aux tests de compétition sont équivalents au signal de la fixation de l'hMMP-9 après les tests (hMMP-9 endday). En effet, les régénérations successives au cours des tests de compétition altèrent les oligonucléotides immobilisés à la surface de la biopuce, et diminuent le signal détecté.

D'autre part, aucune fixation de la protéine n'est détectée sur le Contrôle R immobilisé sur la piste 3, quelle que soit la compétition réalisée. En effet, l'hMMP-9 n'est pas reconnue par cet oligonucléotide contrôle (Figure 3.7).

Les sensorgrammes présentés dans la figure 3.8 montrent une fixation de l'hMMP-9 sur F3B-espaceur HEG (en bleu) et F3B-dT (en vert), et aucune association avec le contrôle-espaceur HEG (en rouge et rose). Le signal obtenu sur F3B-dT est plus important que sur F3B-espaceur HEG. En effet, davantage de F3B-dT a été immobilisé (711 RU) sur la piste fc 4.

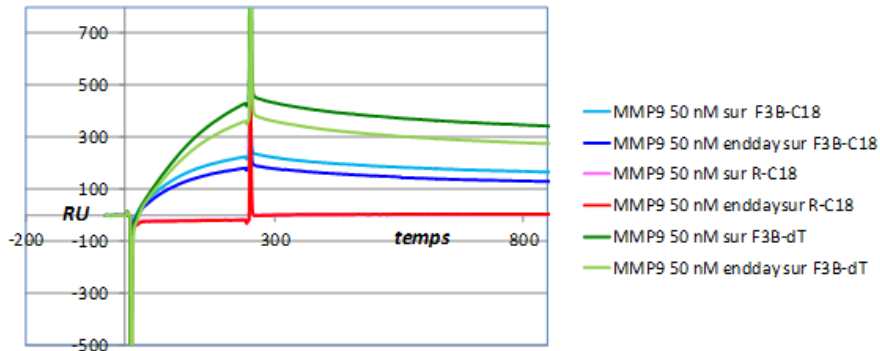


Figure 3.8. Injection hMMP-9 50 nM sur les Pistes: F3B-espaceur HEG-Biotine, Contrôle-espaceur HEG-Biotine et F3B-dT-Biotine

En effet, les aptamères F3B modifiés reconnaissent la protéine hMMP-9 avec la même efficacité que l'aptamère F3B. Donc, Les modifications n'entraînent pas de la reconnaissance d'hMMP-9.

B.2. Polarisation de Fluorescence

B.2.1. Principe de Polarisation de Fluorescence- Anisotropie

La polarisation de fluorescence est une propriété de la fluorescence dans laquelle la polarisation de fluorescence d'un fluorophore change en fonction de l'interaction entre un aptamère et sa molécule cible. Cette méthode de transduction permette d'étudier la reconnaissance entre un aptamère et une cible en conditions homogènes.

La lumière est une onde électromagnétique qui se propage dans toutes les directions. Mais on peut à l'aide de filtres exciter un fluorophore suivant un seul plan (lumière polarisée). L'émission pourra se faire suivant le même plan, ou dans différents plans si l'émission est dépolarisée. Cette dépolarisation de fluorescence des molécules diluées dans le milieu environnant l'échantillon (souvent milieu aqueux) peut provenir de mouvement brownien, de vibration, de torsion, transfert d'énergie; mais la principale cause est la diffusion par rotation des fluorophores. L'anisotropie est une mesure de la dépolarisation de fluorescence [244]:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

Où I_{\parallel} et I_{\perp} représentent les intensités de la fluorescence polarisée parallèlement ou perpendiculairement par rapport à la polarisation d'incidence (Figure 3.9).

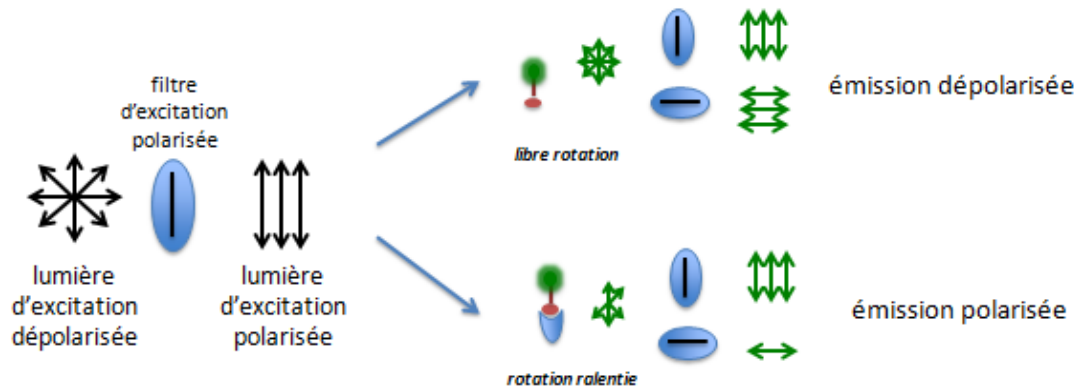


Figure 3.9. Principe de la Polarisation de fluorescence

Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par une lumière polarisée, i.e. dans un plan, la lumière est émise dans le même plan à condition que la molécule reste immobile à travers l'état [245]. Par contre, si la molécule tourne et sort hors du plan pendant l'état excité, la lumière sera émise dans un plan différent de celui dans lequel elle a été excitée. On peut ainsi mesurer des phénomènes d'interactions entre un aptamère et sa cible, un des deux partenaires étant marqué par un fluorophore. La formation du complexe alourdit la molécule fluorescente, conduisant à une modification de son anisotropie. On peut ainsi suivre et quantifier la formation du complexe, et en déduire une constante de dissociation du complexe.

En 2008, cette technique a été introduite pour la première fois pour les aptamères en étudiant le complexe formé par l'Ochratoxine A et son aptamère, la cible était alors en compétition avec un court brin d'ADN complémentaire de l'aptamère marqué par un fluorophore [246]. L'interaction avec la cible induit le déplacement du court brin complémentaire fluorescent, ce qui conduit à une variation de l'anisotropie de ce dernier. En 2009, cette technique a été également utilisée pour un aptamère anti (L)-Tyrosinamide marqué directement par un fluorophore de fluorescéine (Figure 3.10) [247].

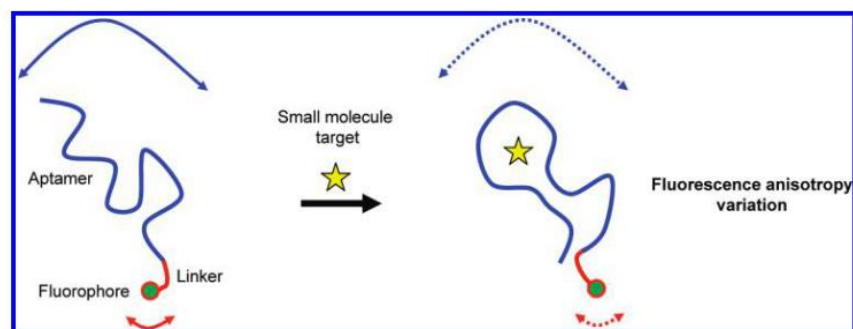


Figure 3.10. Schéma de la polarisation de fluorescence non compétitive de l'aptasensor. Les doubles flèches représentent les mouvements locaux et globaux contribuant à la variation d'anisotropie de fluorescence [247]

B.2.2. Evaluation de l'affinité F3B-espaceur HEG-ATTO 590

Afin d'évaluer l'affinité d'un aptamère, on utilise classiquement la résonance plasmonique de surface (SPR). Mais pour éviter les étapes de greffage et pour valider, en même temps, la l'interaction de l'aptamères F3B modifié avec la protéine hMMP-9, on peut effectuer des évaluations par Polarisation de Fluorescence. C'est pour quoi, il est nécessaire de conjuguer l'aptamère F3B à un fluorophore telle qu'ATTO 590 (Figure 3.11, Schéma 5.3). Les deux synthèses sont purifiées par CLHP sur colonne HEG (Figure 5.8), et sont confirmés par spectrométrie de Masse (ESI-MS, mode positif) (Figure 5.10).

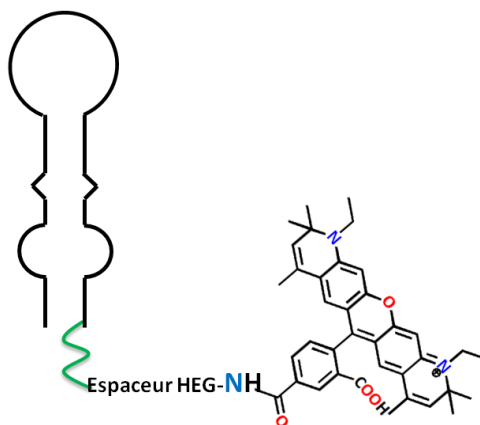


Figure 3.11. Conjugué F3B-espaceur HEG-ATTO 590

Les mesures ont été effectuées à TA en présence de concentration constante de l'aptamère F3B-espaceur HEG-ATTO 590 ($C = 10$ nM) avec des concentrations croissantes de leur cible hMMP-9 en nM dans volume total 50 μ l présenté dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4: présente les conditions expérimentales post-injection

	1	2	3	4	5	6
F3B-espaceur HEG-ATTO 590 μl	5	5	5	5	5	5
V hMMP-9 μl	0	0.208	0.416	0.832	2.08	4.16
C hMMP-9 nM	0	5	10	20	50	100
PBS (10X) μl	5	5	5	5	5	5
H₂O μl	40	39.79	39.58	39.17	37.92	35.84
V total μl	50	50	50	50	50	50

Le K_d est la concentration requise en hMMP-9 pour la formation de la moitié des interactions spécifiques maximales. On déduit de la courbe un $K_d = 17$ nM (Figure 3.12). Cette valeur est en accord avec les valeurs obtenues précédemment par SPR [236].

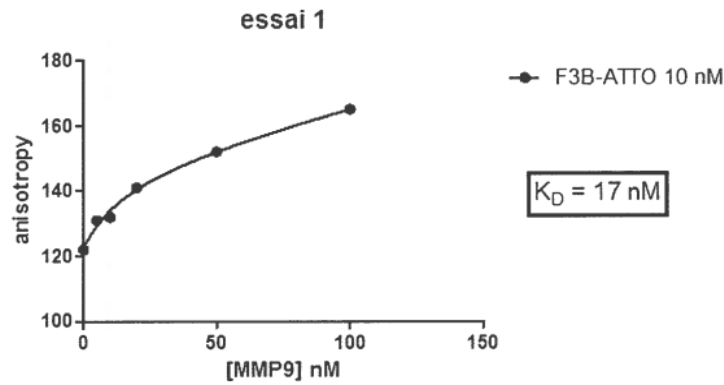


Figure 3.12. Mesure anisotropie de fluorescence d'interactions F3B-espaceur HEG-ATTO 590/hMMP-9

9

Nous avons synthétisé cette molécule F3B-espaceur HEG-ATTO 590 pour un projet intitulé: Evaluation des aptamères comme substituts aux anticorps pour la quantification de biomarqueurs tissulaires en anatomopathologie clinique. Ce projet porte sur l'évaluation de l'intérêt des aptamères (F3B, 11F46A) comme substituts aux anticorps dans le contexte du cancer du colon. En effet, ces aptamères seront ensuite utilisés sur une série unique de prélèvements tumoraux (cancer du colon) afin d'évaluer ses propriétés de marquage sur échantillons tissulaires et valider les bénéfices de ce marquage par rapport à un marquage anticorps standard. L'étude est effectuée sur des Tissue Micro Array (TMA) comprenant des échantillons provenant de tumeurs colorectales, ou d'autres tissus sains sélectionnés afin de générer une collection d'intérêt par rapport au contexte tumoral hMMP-9.

C. Travaux en collaboration sur les aptamères in imagerie biomédicale (ImMelApt)

Comme il a été mentionné dans les précédents chapitres du manuscrit, les aptamères présentent de différents caractères qui les rendent des excellents candidats pour l'imagerie. Ces oligonucléotides présentent une forte affinité et une reconnaissance spécifique de leur cible et sont faciles à synthétiser et à modifier. Les propriétés de liaison d'un aptamère sont liées à sa forme en trois dimensions qui résulte de repliement intramoléculaire de l'oligonucléotide, dictée par la séquence primaire. Ces aptamères peuvent être utilisés pour développer de nouveaux outils pour le diagnostic du cancer diagnostics. Jusqu'au maintenant, peu d'études sur la détection des tumeurs *in vivo* ont été réalisés en utilisant un aptamère marqué avec l'imagerie TEMP.

Le projet ImMelApt (Imaging Melanome with Aptamers) a pour objectif de développer des sondes pour l'imagerie des mélanomes humains en utilisant comme biovecteur un aptamère F3B. Ce projet est en collaboration avec : Pr. JANIER Marc et Dr. KRYZA David (LAGEP UMR 5007 CNRS, Université de Lyon 1) et Pr. FERNANDEZ Phillippe, Pr. ALLARD Michelle et Dr. Jürgen SCHULZ (CNRS, INCIA, UMR 5287, CHU de Bordeaux). Le F3B est un aptamère

spécifique d'un marqueur tumoral (hMMP-9) surexprimé dans plusieurs types de tumeurs parmi lesquelles le glioblastome.

De ce fait, il a été envisagé de développer des traceurs pour deux modalités d'imagerie différentes : l'imagerie de fluorescence et la TEMP. Ces traceurs devront alors permettre la détection de l'hMMP-9 sur des biopsies de tumeurs humaines et sur un modèle de xénotransplante de cellules de mélanome humain chez la souris. Les modifications qui seront introduites pour l'étiquetage [fluorophore ou radionucléide] ne devraient pas modifier les propriétés de liaison de l'aptamère. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet seront présentés sous la forme d'une publication intitulée « *Ex Vivo and In Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas* » qui est apparue dans la revue PLOS one.

Dans cette étude, la capacité de l'aptamère F3B marqués (F3B-Cy5, F3B-DOTA et F3B-MAG3) à détecter l'hMMP-9 *in vivo* (sur des souris porteuses de glioblastome ou mélanome A375 « mélanome humain ») et *ex vivo* sur des tissus a été évaluée.

Des études de biodistribution des F3B-DOTA et F3B-MAG3 ont été réalisées sur des souris portant le mélanome à trois temps (30min, 1h et 2h) après l'injection de ces dérivés. Les résultats ont montré que les deux aptamères marqués détectent spécifiquement l'hMMP-9. Par contre, l'accumulation de F3B-MAG3 dans le tube digestif a été plus importante que celle observée avec F3B-DOTA ce qui suppose que le DOTA pourrait être un bon candidat pour détecter la tumeur hMMP-9 de différents types d'imagerie. De plus, une concentration en F3B-DOTA dans la tumeur est trois fois supérieure à celle du contrôle-DOTA, et un haut niveau de la radioactivité F3B-DOTA a été observée dans les reins et la vessie. En *ex vivo*, le radiomarqué ^{111}In -DOTA-F3B induit un signal fort comparé au ^{111}In -DOTA-contrôle. De plus, la détection de la protéine hMMP-9 par F3B-Cy5 a été ensuite confirmée par l'imagerie de fluorescence. Alors que l'injection F3B-Cy5 chez des souris porteuses de mélanome a augmenté le signal de fluorescence à l'intérieur de la tumeur, la tumeur n'était pas localisée avec le contrôle-Cy5.

RESEARCH ARTICLE

Ex Vivo and *In Vivo* Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas

David Kryza^{1,2*}, Frédéric Debordeaux^{3,4}, Laurent Azéma^{5,6,7}, Aref Hassan^{5,6,7}, Olivier Paurelle^{5,6,7}, Jürgen Schulz^{3,4}, Catherine Savona-Baron³, Elsa Charignon², Pauline Bonazza², Jacqueline Taleb¹, Philippe Fernandez^{3,4}, Marc Janier^{1,2‡}, Jean Jacques Toulme^{5,6,7‡}

1 UNIV Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, LAGEP UMR 5007 CNRS, Villeurbanne, France, 2 Hospices Civils de Lyon, Imthertnat platform, Lyon, France, 3 Université de Bordeaux, CNRS, INCIA, UMR 5287, Bordeaux, France, 4 Service de Médecine Nucléaire, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France, 5 Inserm U1212, Bordeaux, France, 6 CNRS UMR5320, Pessac, France, 7 University of Bordeaux, ARNA Laboratory, Bordeaux, France

‡ MJ and JJT are co-directors of this work.

* david.kryza@chu-lyon.fr



CrossMark

click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Kryza D, Debordeaux F, Azéma L, Hassan A, Paurelle O, Schulz J, et al. (2016) *Ex Vivo* and *In Vivo* Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas. PLoS ONE 11(2): e0149387. doi:10.1371/journal.pone.0149387

Editor: Antonio Facchiano, IDI, Istituto Dermopatico dell'Immacolata, ITALY

Received: July 21, 2015

Accepted: February 1, 2016

Published: February 22, 2016

Copyright: © 2016 Kryza et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: This study - Imelapt - was supported by a public grant from the French Agence Nationale de la Recherche within the context of the Investments for the Future Program, referenced ANR-10-LABX-57 and named TRAIL.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

The human Matrix MetalloProtease-9 (hMMP-9) is overexpressed in tumors where it promotes the release of cancer cells thus contributing to tumor metastasis. We raised aptamers against hMMP-9, which constitutes a validated marker of malignant tumors, in order to design probes for imaging tumors in human beings. A chemically modified RNA aptamer (F3B), fully resistant to nucleases was previously described. This compound was subsequently used for the preparation of F3B-Cy5, F3B-S-acetylmercaptoacetyltriglycine (MAG) and F3B-DOTA. The binding properties of these derivatives were determined by surface plasmon resonance and electrophoretic mobility shift assay. Optical fluorescence imaging confirmed the binding to hMMP-9 in A375 melanoma bearing mice. Quantitative biodistribution studies were performed at 30 min, 1h and 2 h post injection of ^{99m}Tc-MAG-aptamer and ¹¹¹In-DOTA-F3B. ^{99m}Tc radiolabeled aptamer specifically detected hMMP-9 in A375 melanoma tumors but accumulation in digestive tract was very high. Following i.v. injection of ¹¹¹In-DOTA-F3B, high level of radioactivity was observed in kidneys and bladder but digestive tract uptake was very limited. Tumor uptake was significantly (student *t* test, *p*<0.05) higher for ¹¹¹In-DOTA-F3B with 2.0%ID/g than for the ¹¹¹In-DOTA-control oligonucleotide (0.7%ID/g) with tumor to muscle ratio of 4.0. Such difference in tumor accumulation has been confirmed by *ex vivo* scintigraphic images performed at 1h post injection and by autoradiography, which revealed the overexpression of hMMP-9 in sections of human melanomas. These results demonstrate that F3B aptamer is of interest for detecting hMMP-9 in melanoma tumor.

Introduction

Among oncological physiopathologic processes, angiogenesis appears to be a promising way for targeted therapies [1]. In this process, matrix metalloproteinases (MMP) are one of main actors of degradation of the extracellular matrix and basement membrane, facilitating tumor cell invasion [2]. Among them, MMP-9 is over-expressed in numerous malignant tumors [3] and particularly in cutaneous malignant melanoma [4–5].

Malignant melanoma is a tumor that arises from melanocytic cells and primarily involves the skin but it can also arise in the eye, meninges and on various mucosal surfaces. It can metastasize either by the lymphatic or haematogenous way. Distant metastases have a poor prognosis with no long-term curative treatment [6] and with a median survival in untreated patients being only 6–9 months. Efficient and accurate diagnosis is highly needed for this pathology. In high-risk patients, computerized tomography with or without FDG-positron emission tomography (FDG-PET) and magnetic resonance imaging may be indicated depending on the clinical findings. Nevertheless, those techniques lack specificity with relatively high false-positive rate and a low sensitivity for the detection of occult regional nodal metastases. Molecular imaging techniques, using specific target marker, are needed for *in vivo* mapping and measuring pathological processes at cellular or even molecular levels.

Developed in the early 1990s [7–9], aptamers are three-dimensional oligonucleotides, either with a deoxy- (DNA) or a ribo-scaffold (RNA). They bind with high affinity and high specificity to a large variety of targets ranging from small organic molecules to viruses and live cells [10–12], by interaction optimized by shape complementarity. Aptamers are generated by an iterative process of *in vitro* selection and amplification called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [13] and can be chemically-modified thus generating powerful tools for biomedical applications [14]. Particular interest is being paid to aptamers obtained by cell-SELEX, recognizing membrane proteins and receptors [15–17]. A number of reports describe aptamers specific of tumor markers [18–19]. Such aptamers are used for many different purposes such as biosensing [20], delivery [21–22], flow-cytometry [23], diagnostics [24–25] and therapeutics [21, 26]. The binding characteristics of aptamers, namely high affinity and specific recognition of the target as well as their easy of synthesis made them excellent candidates for imaging. Aptamer-based probes have been engineered for monitoring several tumor markers: nucleolin [27], tenascin [28], PSMA [29], PTK7 or MUC1 glycoprotein [30–31], annexin A2 [32] or MMP-9 [33]. The versatility of oligonucleotide synthesis allows the chemical modifications of aptamers at defined positions without effect on their binding properties. Indeed different imaging modalities were implemented with aptamer probes: Magnetic Resonance Imaging (MRI) [34], optical imaging [30; 35] or nuclear imaging probe [36–37]. Promising results are available notably for the *in vivo* detection in animal models of tenascin [28], nucleolin [27] or MUC1 glycoprotein [31].

The F3B aptamer that we previously raised against the human MMP-9 exhibits the desired properties for an imaging agent: affinity in the low nanomolar range, high specificity of binding and full nuclease resistance due to a chemically modified backbone [33]. We previously demonstrated its interest for *ex vivo* imaging sections of human brain without any further *in vivo* evaluation. In the present study, we evaluated the *ex vivo* and *in vivo* melanoma tumor targeting efficiency of F3B towards hMMP-9 protein using a fluorescent or isotope labelled aptamer.

Materials and Methods

Oligonucleotide Synthesis

F3B and the control sequence, bearing a 5' hexylamino function, were synthesized on a 1 μ mol scale with an ABI Expedite 8909 synthesizer, using conventional β -cyanoethyl phosphoramidite

chemistry (2'OMe-purine and 2'F-pyrimidine). Once purified (electrophoresis on denaturing gels: 20% (19:1 acrylamide/bis-acrylamide), 7M urea, Tris-Borate-EDTA buffer), oligonucleotides were conjugated to DOTA or Cy5, according to a previously described protocol for MAG₃ coupling [33]. Briefly, 20 nmol of oligonucleotide were suspended in 100 μ L of binding buffer (sodium bicarbonate/sodium carbonate 0.25 M, pH 8.3, sodium chloride 1 M, sodium ethylenediaminetetraacetate 1 mM) and gently stirred at room temperature. DOTA-NHS (Chematech[®]) or Cy5-NHS (Interchim[®]) (3 mg, in 30 μ L of DMF) was added in portions at room temperature over 3 h. After complete addition, the suspension was stirred for an additional hour, and the crude was directly purified by HPLC (Macherey-Nagel Nucleodur column, 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0, (acetonitrile/0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0: 80/20) gradient) to afford the oligonucleotide conjugates in 50–90% yield. Conjugate characterization was performed through MALDI-ToF mass spectrometry (Reflex III, Bruker) or Electro-spray ionization (LCT Premier, Waters).

Protein

The human MMP-9 was purchased from Calbiochem; samples were checked for purity by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Specificity Assays

Surface Plasmon Resonance. The specificity of F3B-DOTA and F3B-Cy5 derivatives for hMMP-9 was determined through competition with the F3B unmodified aptamer monitored by surface plasmon resonance (BiaCore 3000 apparatus, BiaCore AB, Sweden). 5'-biotin F3B and its control were immobilized on a Xantec[™] SAD 200m chip (50 μ L of 50 nM solution in PBS buffer, at a rate of 20 μ L/min). HMMP9 was firstly injected at 20 μ L/min on F3B and control channel. Then hMMP-9 (50 nM in PBS buffer) was incubated with F3B or with the control labelled derivatives (200 nM in PBS buffer) and injected on F3B-immobilized channel (80 μ L, 20 μ L/min) at 23°C. The complexes were dissociated with a pulse of a solution containing 40% formamide/3.6 M urea/30 mM EDTA.

Electrophoretic Mobility Shift Assay. MMP9/F3B-Cy5 complex was visualized on acrylamide/bis-acrylamide 37.5/1 8% native gel. The polymerization and electrophoresis buffer was TBE 0.5X (Euromed). F3B-Cy5 (20nM) and MMP9 (100nM) were allowed to form the complex at room temperature. Increasing concentration of competitor (0-100nM) was then added and the samples were loaded onto the gel after 30 minutes of incubation. Electrophoresis was performed on a cooled support (4°C) at 150 V. The fluorescence measurement was performed on a Imagequant (LAS4000, GE) at 635 nm for excitation and 670 nm for emission. Intensity of the shift band was calculated with ImageJ software.

Oligonucleotide sequences

2'OMe-R; 2'F-Y; X = hexylamino phosphate; Y = hexaethyleneglycol phosphate

F3Bomf-NH₂, 5' -XY UGC CCU GCC CUC ACC CGU UAG CCU GAG CGC CCC GCA-3'

Control-NH₂, 5' -XY UGC CAA ACG CGU CCC CUU UGC CCG GCC UCC GCC GCA-3'

Oligonucleotides Radiolabelling

Technetium 99m labelling. F3B-MAG3-aptamer and MAG3-control-sequence were labelled by modifying an existing protocol. Briefly, the oligonucleotides (20 μ g) were dissolved in phosphate buffer saline (PBS, 20 μ L) in a sterile vial. Then 20 μ L of a mixture of sodium tartrate (50 mg/mL) in sterile 0.5 M sodium bicarbonate, 0.18 M ammonium hydroxide, 0.25 M

ammonium acetate were added to the vial following by immediately adding 2 μL of a freshly prepared $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution in HCl 0.1 N (1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ was eluted as a physiological saline solution from a commercial $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ generator obtained from Cisbio-international (Saclay, France). 74 MBq of $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ was then added to the mixture, which was incubated 20 min at room temperature. The radiolabeling mixture was then purified from radiochemical impurities by steric exclusion chromatography through a PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) as follows. The column was first washed with 15 mL of isotonic saline and the mixture solution was then loaded on the column followed by elution with isotonic saline. The radiochemical purity (RCP) was assayed with a gamma isotope TLC analyzer (Raytest, Courbevoie, France) using ITLC-SG (Biodex Tec-control black, Biodex, NY, USA) and methyletylketone (MEK) as mobile phase. Finally, the fractions with the highest radiochemical purities were pooled.

Indium 111 labelling. F3B-DOTA-aptamer and DOTA-control-sequence (20 μg) were labelled by adding 300 μL of acetate buffer 0.1 M pH5 and 30–70 MBq of high purity ^{111}In -chloride at room temperature for 45 min. Free indium 111 was removed using a PD-10 column. The column was first washed with 15 mL of acetate buffer 0.1 M, then the labelled mixture was loaded on the column and eluted using acetate buffer. ^{111}In -DOTA-F3B or ^{111}In -DOTA-control were first eluted. RCP of each 0.5 mL fraction was evaluated using ITLC-SG (Biodex, Tec-control black) and citrate buffer 50 mM (pH 5) as mobile phase. ^{111}In -DOTA-F3B or control remained at the origin whereas unbound indium 111 migrated with an Rf of 0.9–1. The highest radiochemical purity fractions were pooled.

Stability testing. For stability testing, an aliquot of the purified $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3-F3B, ^{111}In -DOTA-F3B and labelled control-aptamer were incubated at 37°C in 2 mL phosphate buffer saline (pH 7.4) and radiochemical purity was evaluated as described above.

Biodistribution studies

Biodistribution studies were performed in compliance with the French guidelines and Ethics approval was obtained from the local animal committee of University Claude Bernard Lyon 1. Mice were obtained from Janvier labs (Saint-Berthevin, France). All animals were housed under standard environmental conditions at ambient temperature of 25°C and cared with free access to water and food. For all experiments, mice were anaesthetized using a gaseous protocol (isoflurane / oxygen (2.5%/2.5%). Melanoma bearing mice were obtained by subcutaneous injection of $3 \cdot 10^5$ cells of human malignant melanoma A375 in the right flank or in the paw of nude mice (6–8 weeks old, 20–25g).

Quantitative biodistribution studies. 1 to 10 MBq of radiolabeled aptamer in a maximum volume of 100 μL were intravenously injected into mice bearing human melanoma tumors ($n = 3$ or 4 for each groups). Mice were sacrificed at defined time points: 30 min, 2 and 4 h after injection by cervical dislocation. Tissues of interest (blood, heart, lungs, spleen, kidneys, muscles, brain, and skin) were removed, weighted and radioactivity was counted for 5 min in a gamma scintillation counter (Wizard[®] gamma counter, Perkin Elmer, USA). Urine and feces were collected thanks to individual metabolic cage for housing animals and counts. Tissue distribution was expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g). Renal and hepatobiliary elimination were expressed as cumulated radioactivity under total injected activity. Tumor to muscle ratio (TMR) was calculated using the following formula: (%ID/g tumor) / (%ID/g muscle).

Blood half-life of radiolabeled aptamer. After i.v. injection of 1–2 MBq of radiolabeled aptamer, blood samples were removed at different time intervals: 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min and 1 hour and were weighted and counted for 5 min in a gamma counter. Data points were fitted to an exponential decay function.

Imaging protocol

Ex vivo planar scintigraphic imaging was performed on posterior paw being removed and positioned over the collimator of a dedicated small animal Nano-SPECT-CT system (BIOSCAN™, Washington DC, USA) at 1 hour after i.v. injection of radiolabeled ¹¹¹In-aptamer. The acquisition was performed during 10 minutes with two 15% windows centered on the two peaks 171 keV and 245 keV of indium 111.

***In vivo* and *ex vivo* fluorescence imaging.** Optical imaging was performed thanks to a back-thinned CCD-cooled camera (ORCAiBT-512G, Hamamatsu photonics, Massy, France) using a colored glass long-pass RG 665 filter (Melles Griot, Voisins les Bretonneaux, France), which cuts off all excitation light. Dorsal images were acquired 1h after i.v. injection of 100 μL of Cy5-F3B-aptamer or Cy5-control-sequence (1 to 5 nmol) into mice bearing human melanoma tumors. Mice were sacrificed at 1h post injection and tissues of interest (kidneys, liver, brain, spleen, heart, lungs bone, skin muscle, digestive tract and tumor) were imaged.

Immunohistochemical analysis. Patients samples used in these studies were obtained after written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and stored at the “CRB Cancer des Hôpitaux de Toulouse” collection. According to the French law, CRB Cancer collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-463) and a transfer agreement (AC-2008-820) was obtained after approbation by ethical committees (“Cancéropole Grand Sud Ouest”). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés).

Different types of well-characterized tumors were formalin-fixed and paraffin-embedded (Single Spread Melanoma, Nodular Melanoma, Acral lentiginous melanoma, Lentigo Malignant Melanoma (Dubreuilh’s melanoma), nodes/metastases). Immunohistochemical hMMP-9 detection was performed on serial sections in order to validate radiolabeling analysis, using a purified anti-hMMP-9 mouse monoclonal antibody (ab58803, Abcam). Appropriate positive and negative controls omitting the primary antibody have been included with every slide run.

Representative paraffin embedded 5 μm thick sections were dewaxed with xylene, rehydrated through a graded alcohol series, and washed with distilled water. A blocking step is needed in order to block endogenous peroxidase activity. Moreover, antigen-unmasking procedure was applied to achieve optimum staining.

After washing with TBS, the slides were saturated, and then incubated with the hMMP-9 antibody (ab58803, 1:300) overnight in humidified atmosphere at room temperature. Sections were washed twice with TBS tween 1%, and ImmPRESS peroxidase Reagent kit (rabbit anti-mouse antibody, ImmPRESS™, Vector®) was then applied as the secondary antibody in moist chamber for 30 min. Tissue sections were stained with AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole, ab 64252, Abcam, Cambridge) for 15 min and counterstained with hematoxylin for examination. Immunoreactivity was evaluated in the cell cytoplasm, cytoplasmic membrane, and in the extracellular matrix.

Radiolabeling of tumor tissue sections. As for immunohistochemical analysis, binding studies were performed using tumor sections, but incubated in the presence of either ¹¹¹In-DOTA-F3B aptamer or ¹¹¹In-DOTA-control sequence. 5 μm thick slices were deparaffinised and prepared as previously described.

These slices were incubated with ¹¹¹In-DOTA-F3B aptamer and adjacent section with ¹¹¹In-DOTA-control-sequence for 60 min at room temperature (15 kBq/40 μL). Unfixed radioligand was removed with PBS-Tween 0.05% and slices were washed in distilled water. Radioactivity was finally evaluated using a micro-imager 2000 (Biospace Mesures, Paris, France).

Results

Characteristics of hMMP-9 aptamer and specificity assays

The solid phase synthesis of oligonucleotides allows the controlled incorporation of appending group anywhere into the aptamer sequence through phosphoramidite chemistry. We opted for the 5' modification of aptamer, with the display of a reactive amino group, used for conjugation with N-hydroxysuccinimide ester activated labels. This amine function is away from the oligonucleotide part through the incorporation during synthesis of various spacers: a dimer of 2'-deoxy-thymidine or a hexaethyleneglycol group. The first spacer was used in the case of cyanine-5 incorporation, whereas the second spacer was used for DOTA ligation. Beside biodistribution modulation problems, we had to firstly confirm that 5' appending groups are not disrupting the F3B-MMP-9 complex formation efficiency. For this purpose, we settled a competition assay, monitored by surface plasmon resonance and electrophoretic mobility shift assay. Results are reported on Fig 1. A biotinylated F3B variant was loaded on the streptavidin sensor chip. This variant was able to detect its target at a usual K_D of 10 nM. The pre-incubation of the protein (50 nM) with F3B labelled either with cyanine-5 or DOTA group (200 nM) led to the abolition of complex formation on sensor chip. This result was not observed when the control oligonucleotide was used for pre-incubation. It confirms that variants, F3B-Cy5 and F3B-DOTA, preserve three-dimensional features of the aptamer and that the appending groups doesn't interfere with the recognition region. As a second control, an electrophoretic mobility shift assay was performed. It clearly demonstrates the specificity of the aptamer, as F3B was able to displace the F3B-Cy5-MMP9 complex whereas the competition with the control did not abolish the complex formation.

Radiolabelling and stability

After steric exclusion chromatography purification, radiolabeled aptamer were obtained with radiochemical purity (RCP) exceeding 98% and 96% for technetium 99m and indium 111 respectively. Radiochemical yields were 70% for ^{99m}Tc -MAG-aptamer and 15–20% for ^{111}In -DOTA-aptamer. For both radionuclides at 4 hours after incubation at 37°C in phosphate buffer saline pH 7.4, RCP purity was still greater than 95% indicating a suitable kinetic stability to perform *in vitro* and *in vivo* experiments.

Biodistribution of ^{99m}Tc -MAG-F3B and ^{99m}Tc -MAG-control

Biodistribution studies were performed in A375 melanoma bearing mice at 30 min, 1 h and 2 h post injection of radiolabeled oligonucleotides and are presented in Fig 2. After i.v. injection of ^{99m}Tc -aptamer, high level of radioactivity were observed in kidneys and bladder with more than $48.0 \pm 8.8\%$ ID and $60.6 \pm 7.7\%$ ID eliminated through renal excretion for ^{99m}Tc -MAG-F3B and ^{99m}Tc -MAG-control, respectively. High levels of radioactivity were also observed in digestive tract and liver with value of $7.7 \pm 1.6\%$ ID/g and $13.5 \pm 1.6\%$ ID/g at 30 min post injection and $24.4 \pm 8.0\%$ ID/g and $5.7 \pm 2.7\%$ ID/g at 2h post injection for ^{99m}Tc -MAG-F3B compared to $7.5 \pm 3.6\%$ ID/g and $12.5 \pm 1.7\%$ ID/g at 30 min post injection and $18.5 \pm 3.0\%$ ID/g and $6.0 \pm 0.8\%$ ID/g at 2 h post injection for ^{99m}Tc -MAG-control indicating also an hepatobiliary clearance of the ^{99m}Tc -aptamers. No significant accumulation in other organs was observed for both ^{99m}Tc -oligonucleotides at any time. The highest tumor uptake was observed at 1h post injection for the aptamer derivatives with values of $1.8 \pm 1.2\%$ ID/g which was significantly higher (Student *t* test, $P < 0.05$) than for the control ones ($0.15 \pm 0.03\%$ ID/g). The tumor to muscle ratio (TMR) value for ^{99m}Tc -MAG-F3B was 7.6 at 1h post injection respectively compared to 4.4 for the ^{99m}Tc -MAG-control.

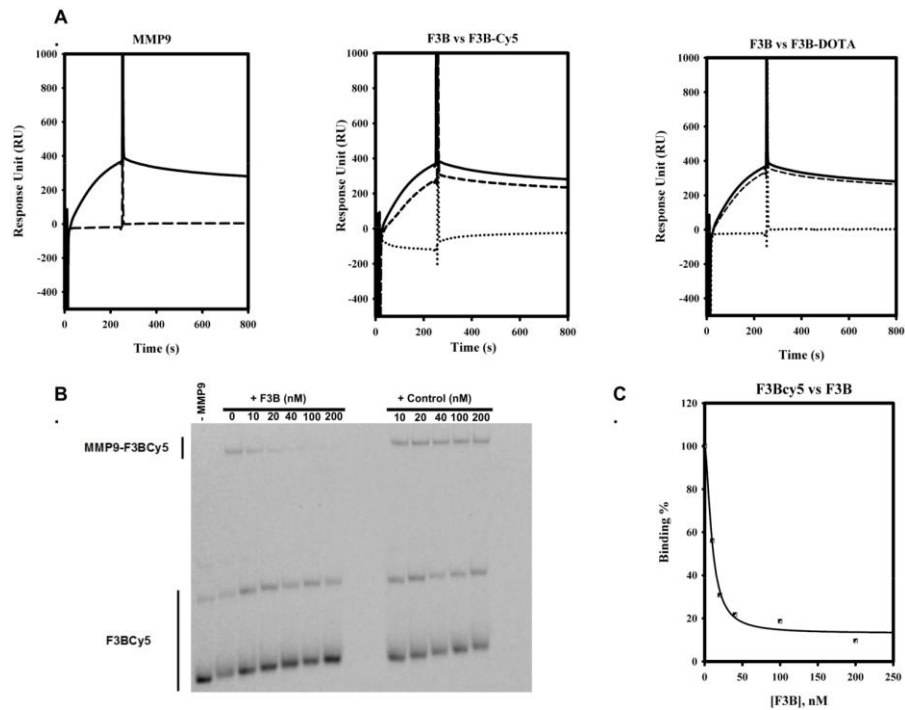


Fig 1. A. Surface Plasmon Resonance assay. Left Panel. MMP-9 (50 nM) was injected at 20 μ L/mn on F3B-immobilized channel (solid line) or Control-immobilized channel (dashed lines), MMP-9 forms a complex only in presence of immobilized F3B. Central and right panels: MMP-9 (50 nM) was injected on F3B-immobilized channel at 20 μ L/mn alone (solid lines) or after pre-incubation with control conjugates (200 nM, dashed lines) or F3B conjugates (200 nM, dot lines). Pre-incubation with control conjugates (central panel: Cy5, right panel: DOTA) did not abolish complex formation. Whereas pre-incubation with F3B conjugates (central panel: Cy5, right panel: DOTA) led to complex abolition. B. Electrophoretic Mobility Shift Assay. The preformed F3B-Cy5-MMP9 complex was allowed to compete with increasing concentration of competitor (F3B or control). The incubation with F3B competitor led to disappearance of F3B-Cy5-MMP9 shift band whereas incubation with the control did not abolish the F3BCy5-MMP9 complex formation. C. Electrophoretic Mobility Shift Assay. Binding curve of F3B for MMP9, as an integration of F3B-Cy5-MMP9 band intensity. A K_D of 15 μ M was gathered from the curve.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g001

Biodistribution of ^{111}In -DOTA-F3B and ^{111}In -DOTA-control

In order to evaluate the influence of the chelator on the aptamer biodistribution and the tumor targeting, biodistribution studies were performed at 30 min, 1 h and 2 h post injection of ^{111}In -DOTA-F3B and ^{111}In -DOTA-control. The results are presented in Fig 3. Both aptamers were rapidly cleared from the blood pool (average blood half-life: 11 min) and demonstrated low uptake in normal organs and tissues except from kidneys and liver. The uptake of radiolabeled DOTA aptamers in the digest tract was very low, with value of $0.9 \pm 0.6\%$ ID/g and $0.7 \pm 0.1\%$ ID/g at 30 min and 1 h post injection, respectively for ^{111}In -DOTA-F3B and $0.6 \pm 0.2\%$ ID/g and $0.6 \pm 0.2\%$ ID/g for ^{111}In -DOTA-control at 30 min and 1 h post injection, respectively. Tumor uptake was significantly (student *t* test, $p < 0.05$) higher for ^{111}In -DOTA-F3B with values of $2.0 \pm 1.1\%$ ID/g at 1 h post injection than for the ^{111}In -DOTA-control ($0.7 \pm 0.2\%$ ID/g). TMR were 4.0 at 1 h post injection for ^{111}In -DOTA-F3B and 0.3 for ^{111}In -DOTA-control, respectively.

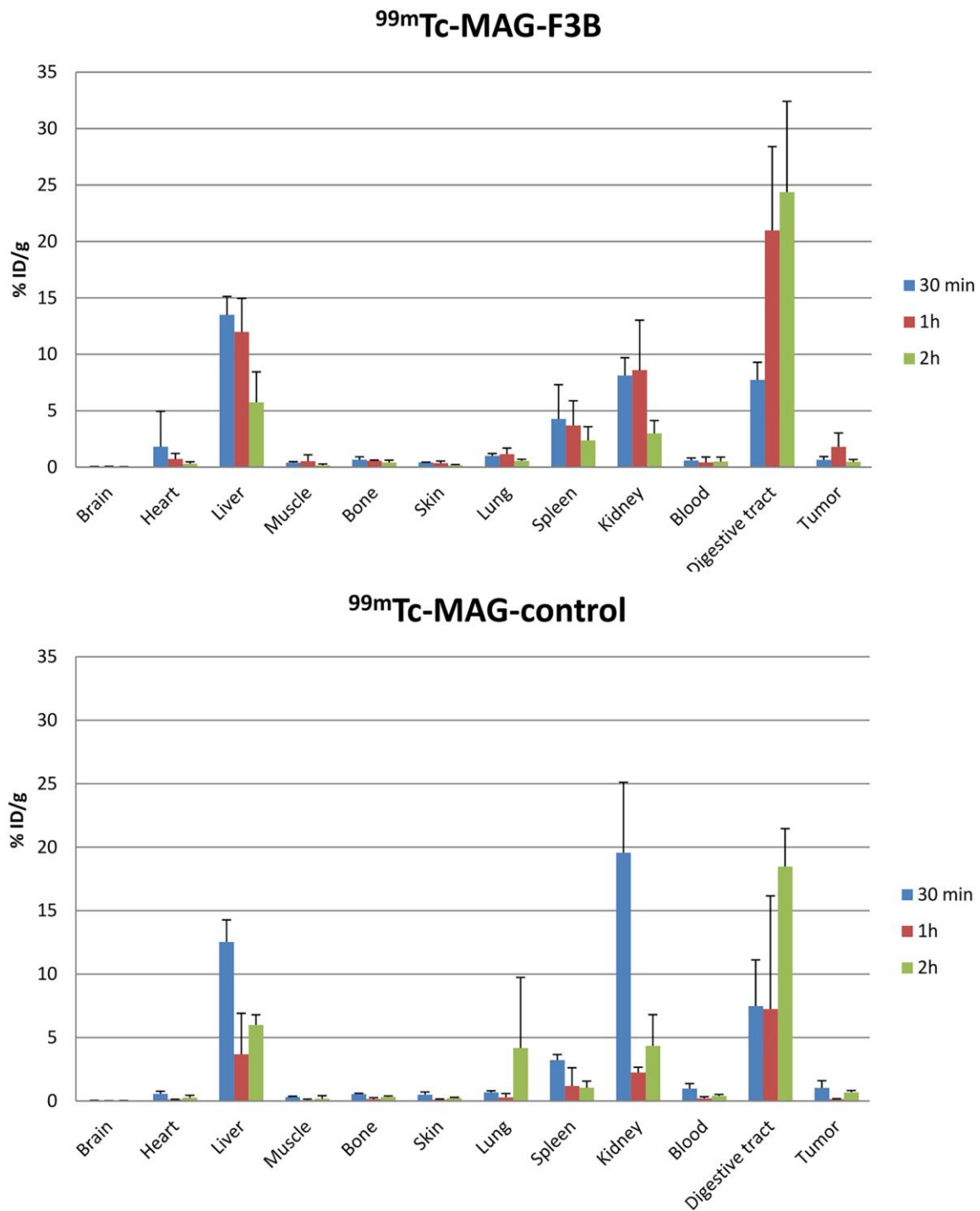


Fig 2. Quantitative biodistribution of ^{99m}Tc-MAG-aptamer and ^{99m}Tc-MAG-control aptamer as function of post i.v. injection delay expressed as % of injected dose per gram of tissue.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g002

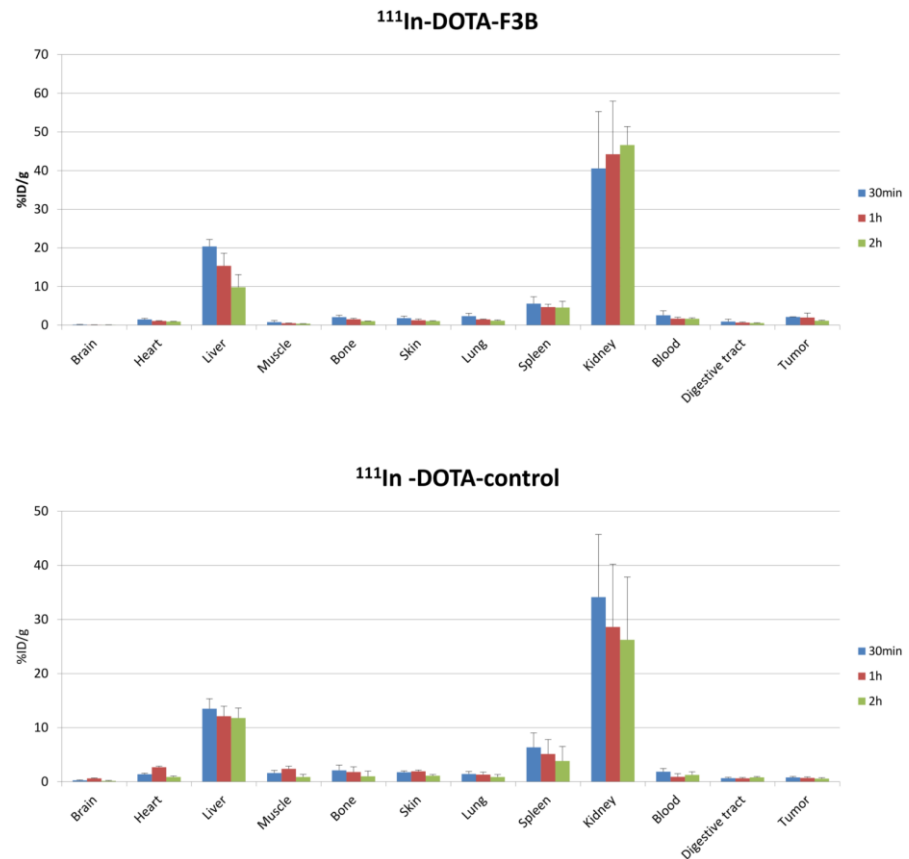


Fig 3. Quantitative biodistribution of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer as function of post i.v. injection delay expressed as % of injected dose per gram of tissue.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g003

Imaging studies

In vivo fluorescent images acquired 1 h after i.v. injection of Cy5-F3B or Cy5-control-sequence into mice bearing human melanoma tumors are presented in Fig 4. Fluorescence staining allowed visualizing the kidneys and the liver and identifying the tumor with Cy5-F3B. Fluorescence imaging of the dissected organs and tumor tissues acquired 1 h after i.v. injection of Cy5-F3B-aptamer revealed well the highest fluorescent organs (i.e.: liver and kidneys) and revealed a moderate signal in the tumor. Such difference in tumor accumulation between F3B and its control has been confirmed by *ex vivo* scintigraphic images performed at 1 h post injection (Fig 5).

Immunohistochemistry and autoradiography

MMP-9 expression was first investigated in several human tumors from skin by immunohistochemistry using a specific hMMP-9 antibody. Healthy skin was used as MMP-9 negative control. The antibody was able to target active hMMP-9 (83 kDa) and pro-hMMP-9 (92 kDa). Immunohistochemical study revealed that hMMP-9 was overexpressed in melanomas. Strong reactivity was mainly observed in the cytoplasm of numerous tumor cells (Fig 6E). Immunopositivity was also present in the endothelial cells of blood vessels in the tumor environment and

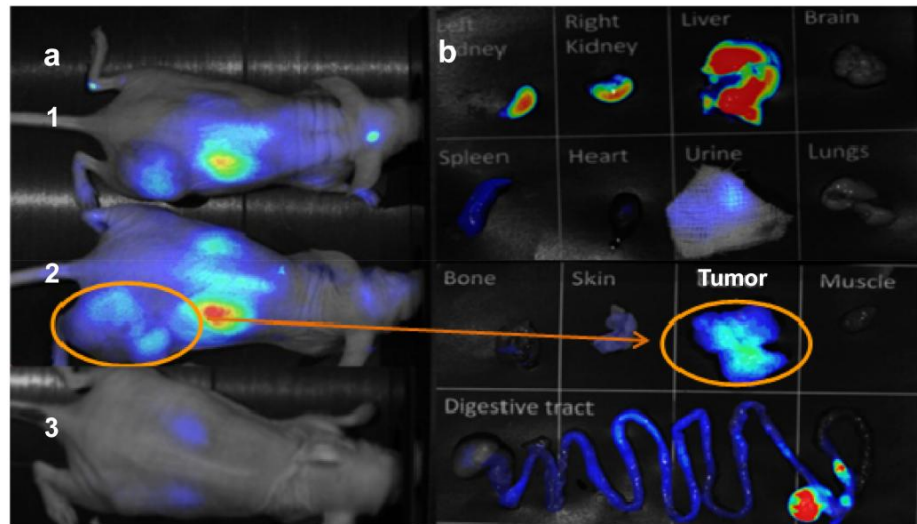


Fig 4. (A) Ventral planar fluorescence reflectance images acquired at 1h post injection of Cy5-F3B-aptamer (1, 2) or Cy5-control-sequence (3) into mice bearing human melanoma tumors. (B) Fluorescence reflectance imaging of organs after dissection of mice 2.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g004

disturbing background was also observed in epidermis and in sebaceous glands (Fig 6D). As shown in Fig 6, the hMMP-9 expression, monitored by immunohistochemical analysis, showed an important staining in metastasis nodes whereas no immunoreactivity was detected either in conjunctive tissue or in healthy lymphocytes.

For the others primary tumors explored (superficial spread melanoma (pT1b), lentiginous malignant melanoma (pT1a), nodular melanoma (pT4b,N3M1), nodes/metastases), hMMP-9 immunostaining showed a variable but positive expression and the observation was easier in case of infiltrative tumors. The labelling of the adjacent slices of melanoma using ^{111}In -DOTA-F3B or control aptamer tended to confirm the results previously obtained in

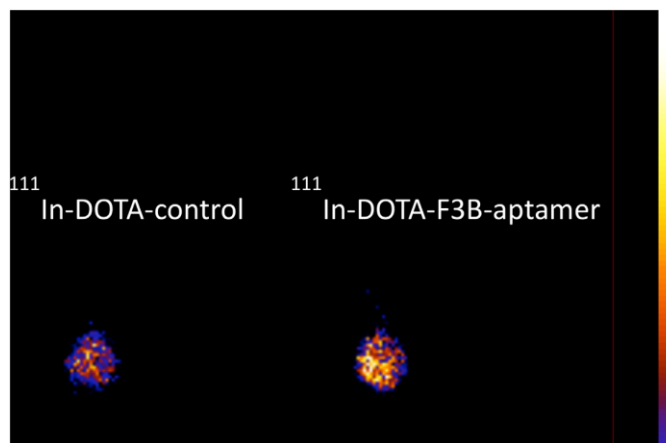


Fig 5. Ex vivo scintigraphic planar image of posterior paw at 1h after i.v. injection of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g005

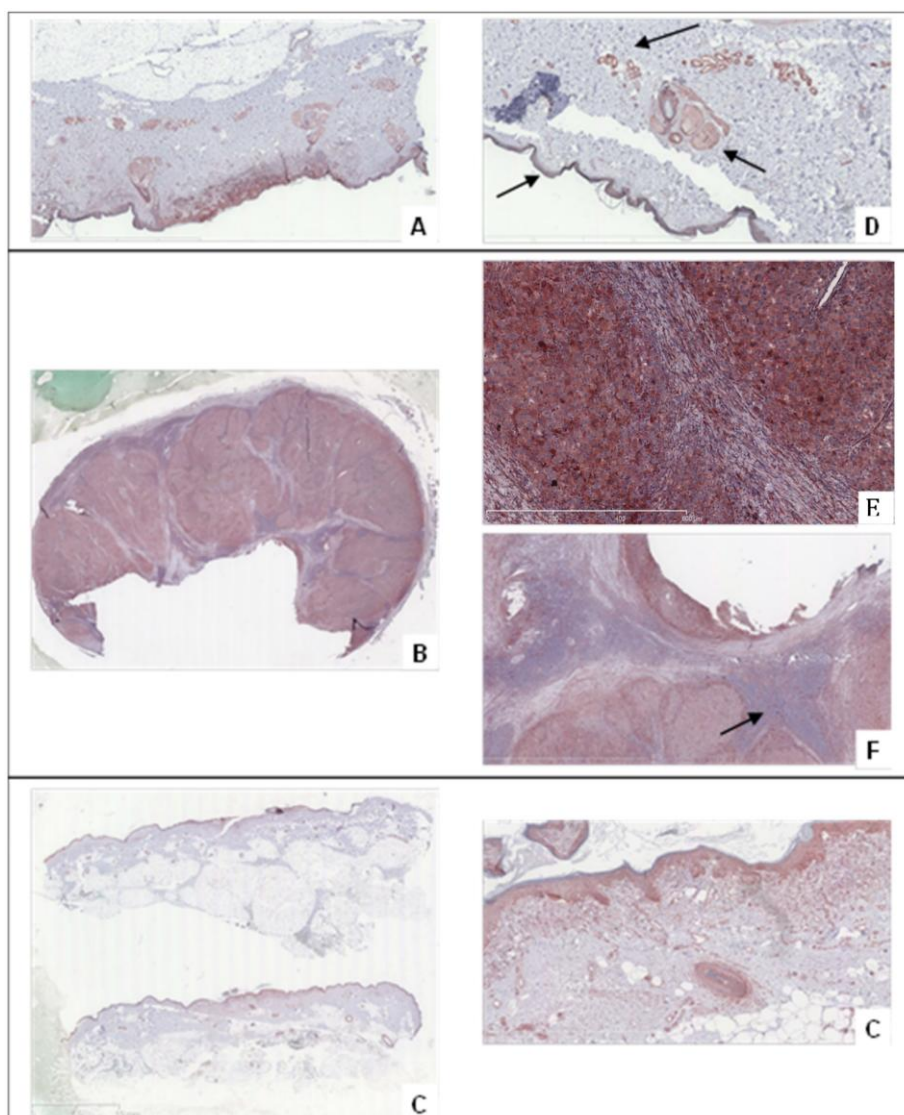


Fig 6. Immunostaining using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody. The antibody ab58803 localizing area of high expression of the integrin in respectively (A) Superficial Spread Melanoma, (B) Metastatic nodes, (C) Lentigo Malignant Melanoma. (D) Background in the immunohistochemical analysis of Superficial Spread Melanoma with staining of epidermis, endothelial cells and sebaceous glands. Immunohistochemical detection of hMMP-9 using ab58803 antibody in a mostly metastatic node, with specific cytoplasmic immunoreactivity in tumor cells (E) and negative results for conjunctive tissue and normal lymphocytes (F).

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g006

immunostaining. Micro-imager analysis showed a fair agreement with the interaction of the h-MMP-9 monoclonal antibody. The radiolabeled ^{111}In -DOTA-F3B aptamer induced a strong signal compare to ^{111}In -DOTA-control (Fig 7). One can notice that the difference was weaker for low-grade melanomas. Moreover, in accordance with immunohistochemical analysis, the highest signal was obtained with nodes/metastases. The merger of the obtained images revealed a good colocalization on this sample of nodular melanoma between the binding of the anti-

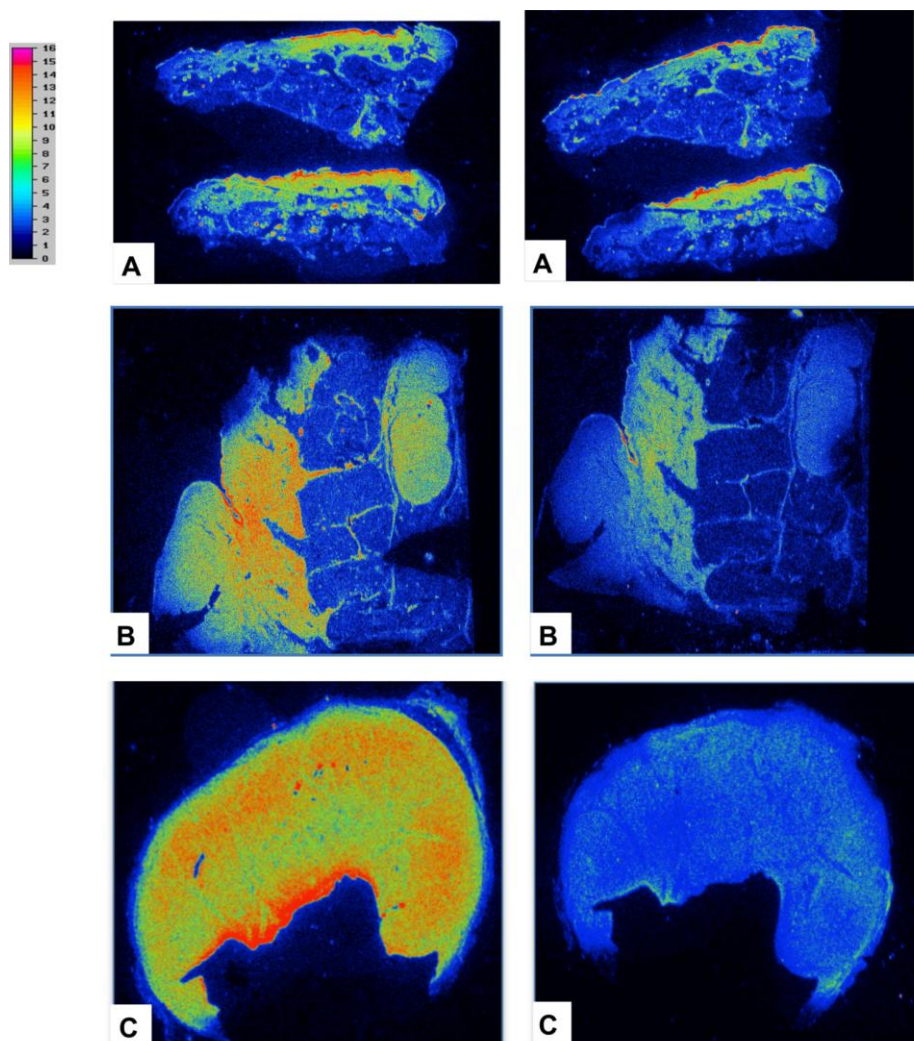


Fig 7. Comparison of the results obtained by radiolabeling of representative tumor tissue sections with ^{111}In -DOTA-F3B aptamer (left image) and ^{111}In -DOTA-control sequence (right image). The difference of activity seems to increase in a tumor grade-dependent manner. (A) Lentigo malignant melanoma, (B) Nodular melanoma, (C) Mostly metastatic node.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g007

hMMP-9 antibody and the labeling of the tracer (Fig 8). So binding intensities seemed to well correlate with the amount of hMMP-9 detected by immunohistochemistry.

Discussion

In the field of diagnostic imaging, aptamers have shown great promise as recognition units for tumor targeting [27; 29; 37]. Due to the advantage of their structure and properties (i.e. small size, non-immunogenic, similar binding affinity than antibodies), aptamers binds to their targets with high affinity and specificity. Up to date, limited studies have been performed for *in vivo* tumor targeting using an aptamer labelled with a SPECT radionuclide. In a previous study, our group has demonstrated that radiolabeled F3B aptamer was able to target *in vitro*

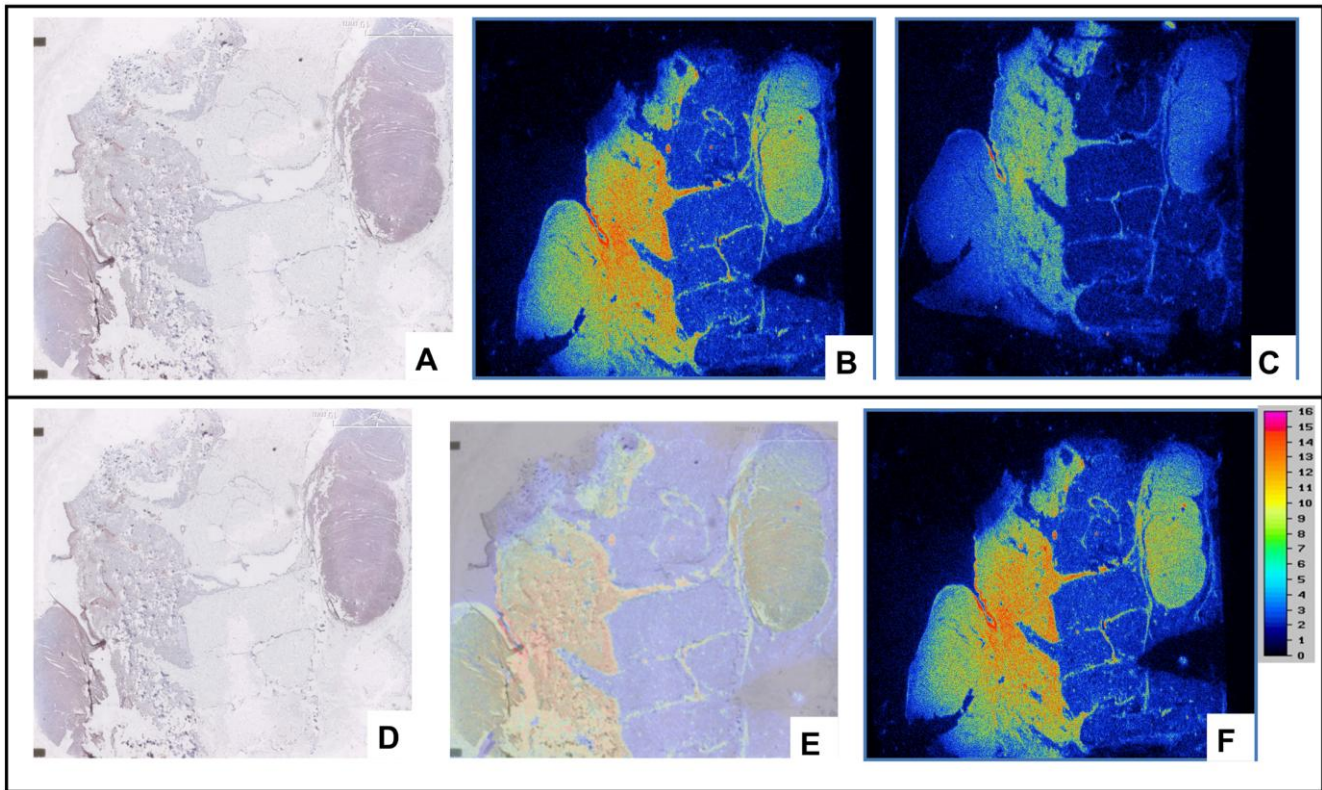


Fig 8. (A) Immunostaining of nodular melanoma using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody ab58803. Radiolabeling of adjacent tissue sections of nodular melanoma with ^{111}In -F3B-DOTA (B), and ^{111}In -DOTA-control sequence (C). Comparison of the results obtained by radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B and by immunostaining. The results of immunohistochemical images corresponded with area with high activity. (D) Immunostaining of nodular melanoma with ab58803 murin monoclonal antibody anti-human MMP-9. It's possible to identify the primitive nodular melanoma and an intrahypodermic node (E) Merged Images. (F) Radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B.

doi:10.1371/journal.pone.0149387.g008

hMMP-9 protein, a tumor biomarker over-expressed in numerous various malignant tumor. In this study, we go a step further trying to evaluate *ex vivo* and *in vivo* melanoma tumor targeting using fluorescent or isotope labelled specific aptamer directed against hMMP-9 protein.

Due to the instability of small oligonucleotides in biological fluids, a specific aptamer has been truncated down to 36 nucleotides by substitution of RNA residues by 2'-O-methyl derivatives to increase Rnase/nuclease resistance in order to be able to perform *in vivo* studies.

First of all, F3B-DOTA and F3B-Cy5 affinity to hMMP-9 were evaluated using surface plasmon resonance experiments. Functionalized aptamer remained able to bind to hMMP-9 and its pro-form with a strong avidity since competition experiments performed with unmodified aptamer F3B immobilized on the chip in the presence of F3B-DOTA or F3B-Cy5 conjugates with MMP-9 lead to abolish the SPR signal. When optical tagged, the intra-venous injection of Cy5-F3B-aptamer in mice bearing melanoma increased fluorescence signal inside the tumor. This demonstrates an active targeting to hMMP-9 since Cy5-control-sequence did not allow us to localize the tumor. However, since penetration of near infrared light in tissues is limited to a few centimeters [38] with low spatial resolution [39] and limited ability to perform *in vivo* quantitative biodistribution, precise biodistribution of specific aptamer directed against hMMP9 and control aptamer was performed thanks to the immobilization of technetium 99m

inside a chelate (MAG3). The use of technetium 99m isotope for radiolabeling aptamer has several advantages including a suitable half-life, appropriate gamma photon energy, availability and low cost. In this study, we efficiently labelled ^{99m}Tc -MAG3-aptamer with high radiochemical purity and yield. MAG3 chelator is of particular interest as a bifunctional technetium chelator because it allows forming stable ^{99m}TcO core efficiently and rapidly and reduces serum proteins binding [40]. Due to their small size, blood clearance of both aptamers was very fast with a rapid diffusion leading to a maximal tumor uptake of 1.8%ID/g at 1h with a tumor to blood ratio of 9 for ^{99m}Tc -MAG-F3B-aptamer. Nevertheless, accumulation and retention in digestive tract at different time points of both ^{99m}Tc -MAG3-aptamer were very high (more than 18%ID/g), as frequently observed in previous reports [37; 41]. This important uptake was probably due to the lipophilicity of the radiolabeled compounds [42]. In such context, the detection of melanoma tumor and their metastases would be particularly difficult in the digestive and abdominal region leading us to envisage the use of a more hydrophilic and anionic chelate (i.e. DOTA) which is able to complex a wide variety of imaging or therapeutic radiometals including indium 111 which could label DOTA at high radiochemical purity in mild conditions. In contrast to ^{99m}Tc -MAG3-aptamer, the use of DOTA chelator conjugates to the aptamer decrease dramatically the digestive tract uptake (< 2% ID/g at any time points) for ^{111}In -DOTA-F3B aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer. The biodistribution study of ^{111}In -DOTA-F3B revealed a slightly tumor uptake at 30 min and 1h post injection compared to the ^{99m}Tc -MAG-F3B-aptamer. These results support previous works confirming that various chelators could significantly affect the *in vitro* and *in vivo* biodistribution of the radiolabeled target.

The highest A375 human melanoma tumor uptake of ^{111}In -DOTA-F3B aptamer compared to the ^{111}In -DOTA-control-sequence was confirmed *ex vivo* by autoradiography and by *scintigraphic images*. Nevertheless, even if human tumor cell lines transplants in athymic mice are widely used for evaluating the targeting efficiency of a potential probe, the murine xenograft model has some limitations for representing the physiopathology and many aspects of human real cancer. In such context, *ex vivo* imaging of human slice of various grade of melanoma tissues have been performed using ^{111}In -DOTA-aptamer and compared to hMMP-9 expression by immunostaining. This is an important step to obtain a preliminary indication of the relevant use of indium 111 labelled hMMP-9 aptamer on clinical neoplasms. First of all, our results confirmed the over expression of hMMP-9 in melanoma tumors and were well correlated with the binding intensities of ^{111}In -F3B-DOTA even if the anti-hMMP-9 antibody used for immunostaining was raised against the mouse MMP-9 with lower specificity compared to the aptamer F3B. Moreover, hMMP-9 expression and ^{111}In -F3B-DOTA binding corroborated to the grade of malignancy whereas the radiolabeled control sequence induced a weaker signal confirming the binding specificity of ^{111}In -DOTA-F3B to its target. The presence of DOTA, which is known to be a strong chelator for a variety of beta- or alpha metals such as Lutetium 177, Yttrium 90 or Bismuth 213 allows us to envisage their use in radionuclide therapy. To reach this goal, we are currently investigating the use of a dendritic structure bearing 2 F3B aptamer since our group has recently demonstrated [43] that multivalency on a single dendron structure could highly increase tumor targeting thanks to their cooperative effect [44].

Acknowledgments

This study—Imelapt—was supported by a public grant from the French Agence Nationale de la Recherche within the context of the Investments for the Future Program, referenced ANR-10-LABX-57 and named TRAIL.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DK FD LA PF MJ JJT. Performed the experiments: DK FD LA AH OP CSB EC PB JT JS. Analyzed the data: DK FD LA AH OP JS CSB EC PB JT PF MJ JJT. Contributed reagents/materials/analysis tools: DK FD LA AH OP JS CSB EC PB JT. Wrote the paper: DK FD LA PF MJ JJT.

References

1. Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabuliene E, Reim D, Sarbia M et al. Noninvasive visualization of the activated alphavbeta3 integrin in cancer patients by positron emission tomography and [18F]Galacto-RGD. *PLoS* 2005; 2(3):e70.
2. Forget MA, Desrosiers RR, and Béliveau R. (1999). Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 77:465–480. PMID: [10535707](#)
3. Merdad A, Karim S, Schulten HJ, Dallol A, Buhmeida A, Al-Thubaity F et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 2014; 34(3):1355–66. PMID: [24596383](#)
4. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(3):337–44. PMID: [10951266](#)
5. Chen Y, Chen Y, Huang L, Yu J. Evaluation of heparanase and matrix metalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma. *J Dermatol.* 2012; 39(4):339–43. doi: [10.1111/j.1346-8138.2011.01441.x](#) PMID: [22150440](#)
6. Finn L, Markovic SN, and Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med.* 2012; 10, 23. doi: [10.1186/1741-7015-10-23](#) PMID: [22385436](#)
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990; 249(4968): 505–10. PMID: [2200121](#)
8. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990; 346(6287): 818–22. PMID: [1697402](#)
9. Robertson DL, Joyce GF. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature.* 1990; 344(6265):467–8. PMID: [1690861](#)
10. Nimjee SM, Rusconi CP and Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 2005; 56:555–583. PMID: [15660527](#)
11. Bunka D,H; Stockley PG. Aptamer Come of Age-at last. *Nat.Rev. Microbiol.* 2006; 4: 558–596.
12. Lee SJ, Kwon YS, Lee J-e, Choi EJ, Lee CH, Song JY et al. Detection of vr-2332 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type ii using an aptamer-based sandwich-type assay. *Anal Chem.* 2012; 85: 66–74. doi: [10.1021/ac3026866](#) PMID: [23198789](#)
13. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX—a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007; (4:):381–403. PMID: [17627883](#)
14. Shigdar S, Macdonald J, O'Connor M, Wang T, Xiang D, Al Shamaileh H et al. Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. *Sensors(Basel).* 2013; 13(10):13624–37.
15. Pestourie C, Tavitian B, and Duconge F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie* 2005; 87:921–930. PMID: [15963620](#)
16. Wang J, and Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr. Med. Chem* 2011; 18:4107–4116. PMID: [21838694](#)
17. Tan W, Donovan MJ, and Jiang J. Aptamers from Cell-Based Selection for Bioanalytical Applications. *Chem Rev.* 2013; 113(4): 2842–62. doi: [10.1021/cr300468w](#) PMID: [23509854](#)
18. Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF et al. Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: the next generation of cancer medicine. *Theranostics.* 2015; 5(1): 23–42. doi: [10.7150/thno.10202](#) PMID: [25553096](#)
19. Lao YH, Phua KKL, and Leong KW. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS Nano.* 2015; 9(3): 2235–54. doi: [10.1021/nn507494p](#) PMID: [25731717](#)
20. Sun H and Zu Y. Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small.* 2015; 11(20):2352–64. doi: [10.1002/smll.201403073](#) PMID: [25677591](#)
21. Dassie JP and Giangrande P.H. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. *Ther Deliv.* 2013; 4(12):1527–46. doi: [10.4155/tde.13.118](#) PMID: [24304250](#)

22. Kruspe S, Mittelberger F, Szameit K, Szameit K, and Hahn U. Aptamers as drug delivery vehicles. *ChemMedChem* 2014; 9: 1998–2011. doi: [10.1002/cmdc.201402163](https://doi.org/10.1002/cmdc.201402163) PMID: [25130604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25130604/)
23. Meyer M, Scheper T, and Walter JG. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97:7097–7109. doi: [10.1007/s00253-013-5070-z](https://doi.org/10.1007/s00253-013-5070-z) PMID: [23838792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23838792/)
24. Shum KT, Zhou J, and Rossi JJ. Nucleic Acid Aptamers as Potential Therapeutic and Diagnostic Agents for Lymphoma. *J Cancer Ther.* 2013; 4(4):872–890. PMID: [25057429](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057429/)
25. Ozalp VC, Kavruk M, Dilek O, and Bayrac AT. Aptamers: molecular tools for medical diagnosis. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(12):1125–37. PMID: [25866272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25866272/)
26. Zhu G, Ye M, Donovan MJ, Song E, Zhao Z, Tan W. Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy. *Chem Commun (Camb).* 2012; 48(85):10472–80.
27. Noaparast Z, Hosseinimehr SJ, Piramoon M, Abedi SM. Tumor targeting with a (99m)Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells. *J Drug Target.* 2015; 12:1–9.
28. Jacobson O, Yan X, Niu G, Ma Y, Szajek LP, Shen B, Kiesewetter DO et al. PET Imaging of Tenascin-C with a Radiolabeled Single-Stranded DNA Aptamer. *J Nucl Med.* 2015; 56(4):616–21. doi: [10.2967/jnumed.114.149484](https://doi.org/10.2967/jnumed.114.149484) PMID: [25698784](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25698784/)
29. Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, and Richards-Kortum R. Aptamer-Targeted Gold Nanoparticles As Molecular-Specific Contrast Agents for Reflectance Imaging. *Bioconjug. Chem.* 2008; 9:1309–1312.
30. Zhang C, Ji X, Zhang Y, Zhou G, Ke X, Wang H et al. One-pot synthesized aptamer-functionalized CdTe:Zn²⁺ quantum dots for tumor-targeted fluorescence imaging in vitro and in vivo. *Anal Chem.* 2013; 85(12):5843–9. doi: [10.1021/ac400606e](https://doi.org/10.1021/ac400606e) PMID: [23682757](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23682757/)
31. Chen H, Zhao J, Zhang M, Yang H, Ma Y, Gu Y. MUC1 aptamer-based near-infrared fluorescence probes for tumor imaging. *Mol Imaging Biol.* 2015; 17(1):38–48. doi: [10.1007/s11307-014-0763-y](https://doi.org/10.1007/s11307-014-0763-y) PMID: [25005106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25005106/)
32. Cibiel A, Quang NN, Gombert K, Thézé B, Garofalakis A, Ducongé F. From ugly duckling to swan: unexpected identification from cell-SELEX of an anti-Annexin A2 aptamer targeting tumors. *PLoS One.* 2014; 9(1):e87002. doi: [10.1371/journal.pone.0087002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087002) PMID: [24489826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24489826/)
33. Da Rocha Gomes S, Miguel J, Eimer S, Ries C, Dausse E et al. (99m)Tc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloproteinase-9. *Bioconjug Chem.* 2012; 23(11):2192–200. doi: [10.1021/bc300146c](https://doi.org/10.1021/bc300146c) PMID: [23043415](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23043415/)
34. Yu MK, Kim D, Lee I-H, et So J-S, Jeong YY, Jon S al. Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small.* 2011; 7:2241–9. doi: [10.1002/sml.201100472](https://doi.org/10.1002/sml.201100472) PMID: [21648076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21648076/)
35. Shi H, Tang Z, Kim Y, Nie H, Huang YF, He X et al. In vivo fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-selex. *Chem-Asian J.* 2010; 5:2209–13. doi: [10.1002/asia.201000242](https://doi.org/10.1002/asia.201000242) PMID: [20806314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20806314/)
36. Tavitian B, Ducongé F, Boisgard R, Dollé F. In vivo imaging of oligonucleotidic aptamers. *Methods Mol Biol.* 2009; 535:241–59. doi: [10.1007/978-1-59745-557-2_15](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-557-2_15) PMID: [19377991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19377991/)
37. Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang Y-F, Lynott CK, Heil J et al. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med.* 2006; 47:668–78 PMID: [16595502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16595502/)
38. Hwang DW, Ko HY, Kim SK, Kim SK, Kim D, Lee DS et al. Development of a quadruple imaging modality by using nanoparticles. *Chemistry* 2009; 15:9387–9393. doi: [10.1002/chem.200900344](https://doi.org/10.1002/chem.200900344) PMID: [19658128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19658128/)
39. Smith AM, and Nie S. Next-generation quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27:732–733. doi: [10.1038/nbt0809-732](https://doi.org/10.1038/nbt0809-732) PMID: [19668181](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19668181/)
40. Winnard P, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA. *Nucl. Med. Biol.* 1997; 24:425–32. PMID: [9290078](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9290078/)
41. Shi J, Kim YS, Chakraborty S, Jia B, Wang F, Liu S. 2-Mercaptoacetylglucylglycyl (MAG2) as a bifunctional chelator for 99mTc-labeling of cyclic RGD dimers: effect of technetium chelate on tumor uptake and pharmacokinetics. *Bioconjug Chem.* 2009 Aug 19; 20(8):1559–68. doi: [10.1021/bc9001739](https://doi.org/10.1021/bc9001739) PMID: [19603780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19603780/)
42. Okarvi SM, Jammaz IA. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled folate and methotrexate conjugates as tumor imaging agents. *Cancer Biother Radiopharm.* 2006 Feb; 21(1):49–60. PMID: [16480331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16480331/)
43. Parat A, Kryza D, Degoul F, Taleb J, Viallard C, Janier M et al. Radiolabeled dendritic probes as tools for high in vivo tumor targeting: application to melanoma. *J. Mater. Chem. B* 2015; 3:2560–2571.
44. Rolland O, Turrin CO, Caminade AM, and Majoral JP. Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* 2009; 33:1809–1824.

D. Modification l'aptamère F3B avec une chaîne PEG₂₀₀₀₀

Notre aptamère a une bonne affinité envers leur molécule cible (hMMP-9, 20 nM). Comme présenté précédemment, l'aptamère F3B présente une clairance rénale et hépatique trop rapide. Nous envisageons ici de diminuer la clairance de l'aptamère F3B. Donc, nous avons choisi une chaîne PEG 20000 Da pour la conjuguer sur F3B à l'extrémité 5' par la réaction chimie click, par la suite, un ligand DOTA sera fixé par un couplage peptidique (Figure 3.13). Cette nouvelle sonde devant permettre de favoriser l'accumulation et la rétention spécifique au niveau des tumeurs ainsi que d'améliorer la détection (augmentation de la sensibilité avec la diminution du k_{off}) [154].

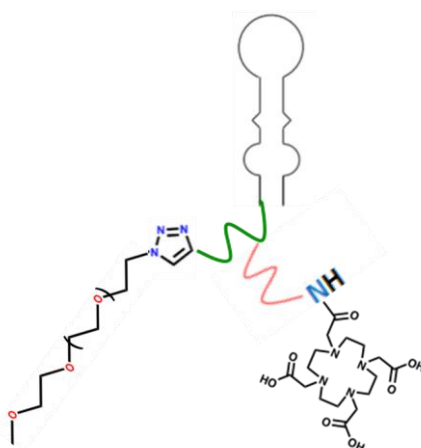


Figure 3.13. Plateforme PEG₂₀₀₀₀-aptamère F3B-DOTA

D.1. Stratégie générale de synthèse

Nous utilisons l'aptamère F3B porte une fonction amine en 5' et un alcyne en position 5 d'une thymine modifiée. Cette stratégie consiste à introduire en première lieu le PEG₂₀₀₀₀ parce que la fixation de PEG₂₀₀₀₀-N₃ sur F3B-alcyne-NH₂ via la réaction de Huisgen impliquera alors l'utilisation de cuivre. Le ligand DOTA étant déjà introduit, il y a un risque que celui-ci gêne la réaction de couplage puis que le cuivre ne puisse pas être retiré du ligand.

D.2. Stratégie de synthèse détaillée

La première réaction de Huisgen a donc été réalisée en utilisant 1.5 équivalents du PEG₂₀₀₀₀-N₃ et un équivalent de l'aptamère F3B-espaceur HEG-alcyne-NH₂ en présence de CuSO₄, du NaAsc et du TBTA. Après agitation à 45°C sur 72h, le composé PEG₂₀₀₀₀-F3B-NH₂ (Schéma 3.1) a été obtenu avec un faible rendement [226]. On a refait cette manipulation en utilisant les conditions précédemment optimisées pour le couplage biotine-dendron-2F3B (activation sous microondes avec un chauffage à 60°C pendant 45 min à 100W) [273]. Les oligonucléotides ont été purifiés par CLHP et ont été quantifiés par Nanodrop. Le DOTA-NHS ester réagit avec la fonction NH₂ du composé PEG₂₀₀₀₀-F3B-NH₂ par un couplage peptidique dans un tampon de couplage à pH 8.3 (Schéma 3.1). L'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF n'a confirmé aucun produit dans l'échantillon.

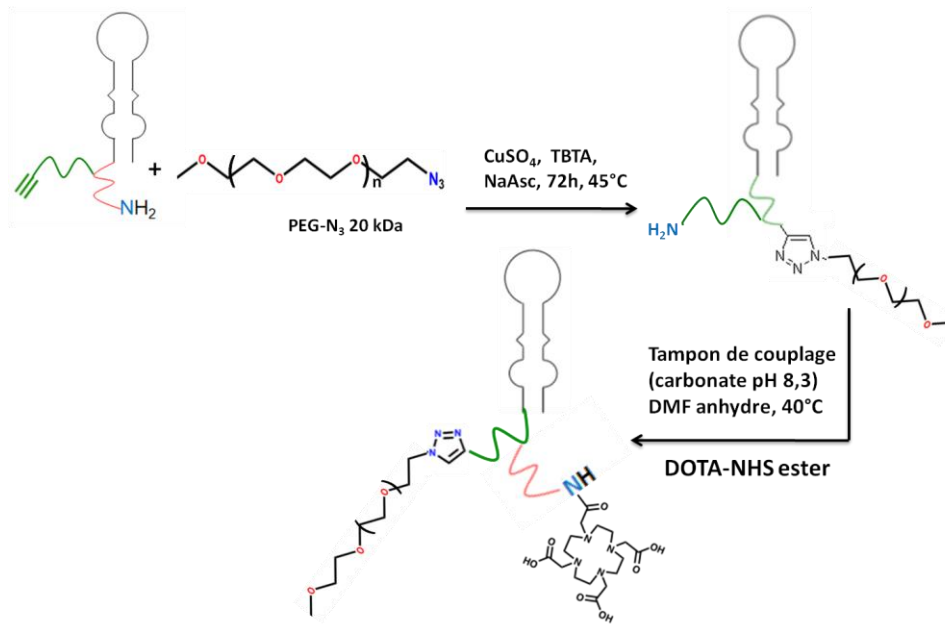


Schéma 3.1. Stratégie de synthèse de la plateforme PEG₂₀₀₀₀-aptamère F3B-DOTA

Il a alors été choisi de tester la réaction sur billes CPG-NH-Aptamère F3B-NH₂. Dans un premier temps, le DOTA-NHS ester sera attaché sur les billes en 5' par un couplage peptidique puis dans un deuxième temps, après le clivage des billes par NH₄OH, le PEG₂₀₀₀₀-NHS ester sera introduit sur le H₂N-aptamère F3B-DOTA en 3' (Schéma 3.2) pour obtenir la sonde finale. Synthèse est en cours.

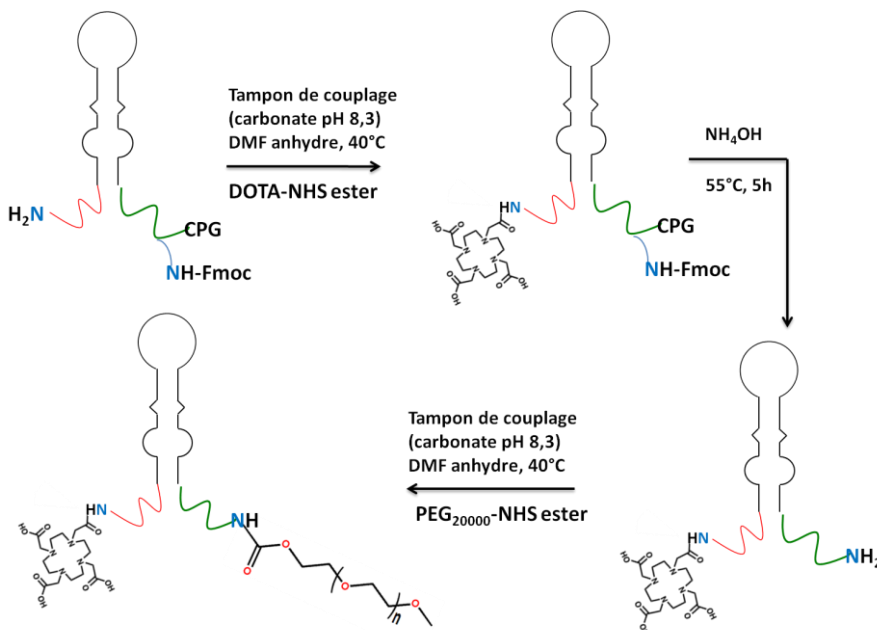


Schéma 3.2. Stratégie de synthèse de la plateforme PEG₂₀₀₀₀-aptamère F3B-DOTA

La sonde PEG₂₀₀₀₀-aptamère F3B-DOTA serait intéressante selon la taille de la molécule qui serait augmentée et donc sa relaxivité améliorée par augmentation de son temps *in vivo*.

CHAPITRE IV :

SONDE MULTIMERIQUES ET

MULTIFONCTIONNELLES DE F3B

Comme mentionné précédemment, afin de pouvoir utiliser les aptamères *in vivo*, il est nécessaire d'augmenter leur temps de résidence dans l'organisme. La plupart des aptamères ont un poids moléculaire compris entre 5 et 20 kDa et sont donc sensibles à l'excrétion rénale. Par exemple, un aptamère court, résistant aux nucléases, présente *in vivo* une demi-vie inférieure à 10 min [248]. La filtration rénale peut être surmontée en augmentant le poids moléculaire de l'aptamère. Pour cela, les aptamères peuvent être conjugués à des polyéthylènes glycol (PEG) [195], à une molécule de cholestérol [249], à un système biotine-streptavidine [250] ou encore à des liposomes [251] (Figure 4.1).

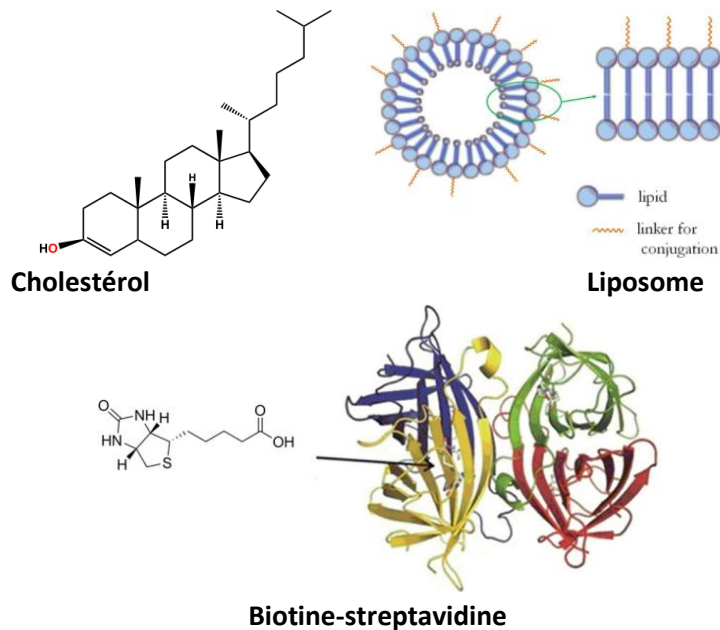


Figure 4.1. Les modifications aptamères qui peuvent être introduites pour empêcher la filtration rénale, y compris la conjugaison au PEG, le cholestérol, la biotine-streptavidine ou des liposomes [117]

Les aptamères peuvent également être conjugués à des nanoparticules [252-255] (Figure 4.2C).

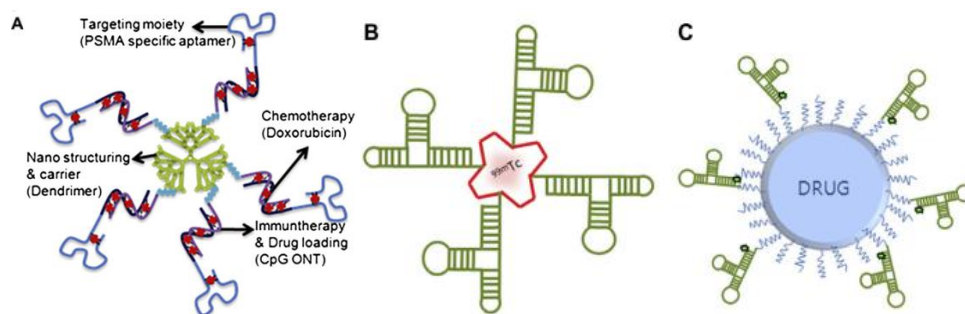


Figure 4.2. **A.** Représentation schématique de bioconjugaison du Dox@Apt.dON'T-DEN pour cible chimio-immunothérapie. **B.** Quatre aptamères Muc-1 ont été fixés aux quatre bras d'un DOTA pour former une sonde multimérique pour l'imagerie de tumeurs Muc-1 positives. **C.** Nanoparticule (TCL-SPION) modifiée en surface avec des polymères et attachée avec un aptamère fluorescent A10-PSMA pour l'imagerie et/ou la thérapie du cancer de la prostate [256]

Les modifications de surface de nanoparticules par des anticorps, des aptamères, des peptides ou encore des petites molécules sont particulièrement intéressantes. Elles permettent une liaison à des antigènes présents sur des cellules ou des tissus cibles et ont permis d'aboutir au développement de méthodes d'imagerie sensibles et spécifiques pour des applications *in vitro* et *in vivo*. On peut citer comme exemple les nanoparticules MFR-AS1411 composées de ferrite de cobalt magnétique dans le noyau central et de rhodamine B. De plus, un motif PEG (1x10⁴/nanoparticule) et un aptamère (aptamère AS1411), permettant un ciblage, sont présents sur la nanoparticule (Schéma 4.1) [253]. Cette particule permet ainsi l'imagerie ciblée de tumeurs, suivant deux modalités : l'IRM et la fluorescence.

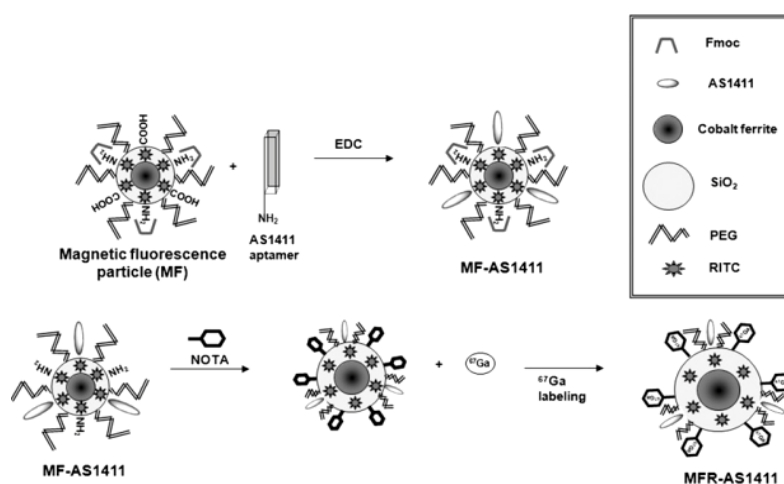


Schéma 4.1. Préparation de la nanoparticule MFR-AS1411

Cependant, l'utilisation des nanoparticules *in vivo* est largement controversée de par leur toxicité intrinsèque. En effet, elles sont souvent composées de métaux lourds et leur dégradation peut entraîner une accumulation de résidus dans les tissus.

Une autre façon d'augmenter le poids moléculaire d'un aptamère est la formation de multimères (Figure 4. 2A, 2B) [105, 257, 258]. Dans ce contexte, Borbas et al. ont observé que en comparaison au dérivé monomérique les aptamères tétramériques présentaient de meilleures propriétés pharmacocinétiques figure 4.2B [257]. Dans la littérature, les aptamères multimériques présentent une plus grande affinité, une meilleure stabilité conformationnelle ainsi qu'une meilleure résistance aux nucléases [114]. Par exemple, Kim et al. ont montré que l'assemblage de deux aptamères différents (15 nucléotides et 27 nucléotides) se liant à la thrombine amène une efficacité d'inhibition 16,6 fois meilleure en comparaison à la version monomérique. Par ailleurs, le taux k_{off} est plus rapide environ 50 fois [259]. Cependant, les aptamères multimériques présentent une haute masse moléculaire ainsi qu'une gêne stérique importante. C'est pourquoi leur activité n'est pas proportionnelle au nombre de monomères [260].

Dans le cadre de notre projet, afin d'augmenter le poids moléculaire de l'aptamère et ainsi augmenter le temps de résidence des aptamères dans l'organisme, nous avons choisi d'utiliser un dendron de deux bras afin de pouvoir introduire deux aptamères différents (F3B

et 11F46A) (Figure 4.3). Ce système de « pince » bifonctionnel, utilisant deux aptamères différents dirigés contre la protéine hMMP-9, devrait permettre d'améliorer le K_D par modification des composantes k_{on} et k_{off} , sachant que les aptamères F3B et 11F46A n'interagissent pas avec la même partie de la protéine. La synthèse de plateformes dimériques et/ ou multifonctionnelles (Figure 4.3) a également été envisagée soit par introduction de deux copies d'un même aptamère sur le dendron par chimie « click » soit par introduction d'un marqueur fluorescent et/ou d'un ligand de radioélément.

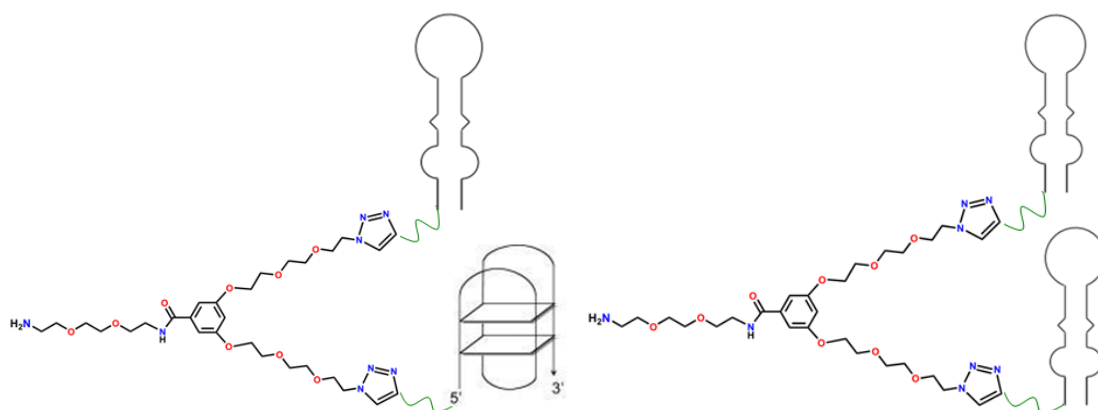


Figure 4.3. H₂N-dendron-F3B-11F46A (à gauche), H₂N-dendron-2F3B (à droite)

Le dendron au cœur doit comporter une fonction amine afin de permettre le couplage des différents ligands tels que la biotine, le DOTA, le NOTA, la Cy5 ou l'ATTO 590 par liaison amide.

A. Travaux en collaboration sur l'Imagerie Photonique *In Vivo* à l'aide de conjugués Aptamère-Nanoparticule

Ce projet consiste à développer une sonde nanoparticule-aptamère pour l'imagerie de fluorescence, cette sonde est composée des nanoparticules de silice fluorescentes doublement marquées et recouverte de l'agent de ciblage, l'aptamère F3B pour la détection de tumeurs *in vivo* chez la souris, et d'évaluer sa capacité à détecter par imagerie l'expression de l'hMMP-9 dans des tumeurs humaines xénotransplantées. La stratégie de greffage de surface de silice par des macromolécules de POE hétérobifonctionnelles permettant d'atteindre de hautes densités de greffage (Figure 3, projet de thèse). La modification de la surface des nanoparticules est souvent réalisée pour modifier ses propriétés de surface et donc son profil ADME (Administration, Distribution, Métabolisation et Élimination). Ces macromolécules de POE rendent ce système plus efficace en éliminant les interactions non spécifiques dans le cadre de l'extraction magnétique, et augmente la propriété de furtivité des nanoparticules vis-à-vis du système immunitaire dans le cadre du marquage de tumeurs. Le choix du système de marquage porte sur des nanoparticules de silice qui renfermeront des fluorophores (le DyLight 680) dans le proche infrarouge au sein même de la matrice

transparente. Ces macromolécules de POE jouent non seulement le rôle de stabilisateur stérique des dispersions colloïdales dans les différents milieux biologiques mais également de bras espaceurs afin de réaliser le couplage de l'aptamère avec la nanoparticule. Ce projet est en collaboration avec : M. Couillaud Franck (RMSB, CNRS, UMR 5536, CHU de Bordeaux) et M. Mornet Stéphane (ICMCB, ISM, CNRS, UPR 9048, Université de Bordeaux).

A.1. Discussion

L'aptamère F3B et de son contrôle, sont synthétisée en incluant ainsi une fonction thiol 5' terminale (Figure 4.4) pour autoriser une chimie-click avec les fonctions maléimide portées par les extrémités des chaînes de la nanoparticule. Par la suite, ces conjugués sont caractérisés par spectrométrie de masse MALDI-ToF (mode positif, Figure 5.4).

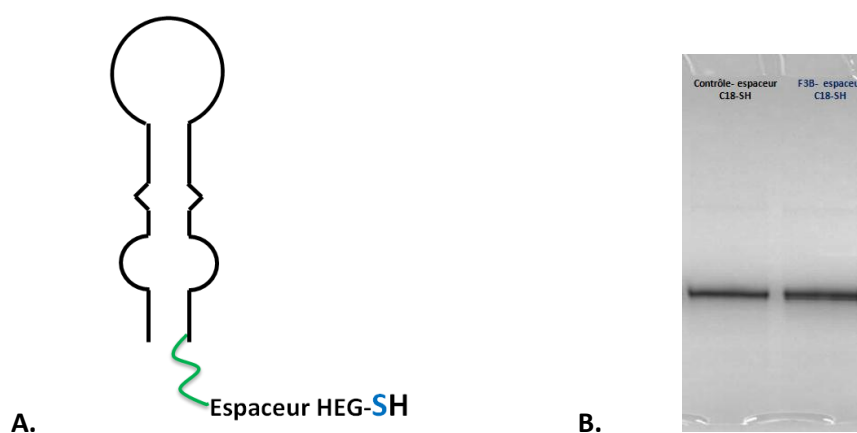


Figure 4.4. A) Structure de l'aptamère F3B-espaceur HEG-SH. B) Gel natif après la purification de F3B-espaceur HEG-SH (à gauche) et son contrôle-espaceur HEG-SH (à droite)

Le diamètre du cœur hybride de la nanoparticule est de l'ordre de 15 nm, entourée de la couronne polymère d'épaisseur hydrodynamique de l'ordre de 5 nm pour atteindre après greffage de l'aptamère un volume hydrodynamique de l'ordre de 40 nm, taille qui permet d'atteindre efficacement les tumeurs cérébrales.

A.2. Perspectives sur le projet

Les nanoparticules cœur-couronne ainsi formées seront caractérisées aux différentes étapes d'élaboration (notamment la densité de fonctions chimiques de surface et le taux de greffage en macromolécules de POE) au moyen de différents outils physico-chimiques et analytiques, (ATG, DRIFT, spotentiel zêta, pectroscopie de fluorescence, spectroscopie UV...) et les tailles réelles et hydrodynamiques déterminées par MET et DLS. Le taux de greffage en aptamères sera déterminé par spectroscopie UV; le gain en affinité pour hMMP-9 sera évalué par SPR pour différents taux de greffage. La lignée U87 Tet-On-hMMP9-lucF obtenue sera caractérisée *in vitro* pour sa capacité à produire l'hMMP-9 en fonction de la concentration de doxycycline dans le milieu de culture. L'expression d'hMMP-9 sera évaluée par western blot et l'activité enzymatique évaluée par zymogramme. L'expression de l'hMMP-9 sera corrélée à l'expression de la LucF. La lignée sera ensuite injectée à des souris

immunodéficientes (NOG) afin de générer des tumeurs expérimentales soit sous-cutanées, soit intracérébrales. Une première série d'expérience consistera à tester chez des souris porteuses de tumeurs la biodistribution et la pharmacocinétique des nanoparticules par imagerie de fluorescence *in vivo*. Nous déterminerons la persistance dans la circulation, les voies de dégradation et une probable accumulation au niveau des tumeurs par EPR. La tomographie moléculaire de fluorescence (FMT) permettra une quantification des nanoparticules dans les différents compartiments. Nous comparerons le comportement des nanoparticules non-fonctionnalisées à celles des nanoparticules fonctionnalisées par l'aptamère F3B ou son contrôle. Dans une seconde phase, l'expression de l'hMMP-9 par les tumeurs sera modulée par doxycycline afin de déterminer les conséquences sur l'accumulation des nanoparticules dans la tumeur et son environnement.

B. Sonde multimériques et multifonctionnelles

B.1. Synthèse d'une plateforme Biotine-dendron-2F3B

Il a donc été envisagé de synthétiser une sonde multi-aptamère (Figure 4.5) en utilisant un dendron disubstitué porteur deux copies de l'aptamère F3B afin d'améliorer l'affinité pour la cible [239, 240]. Afin de garantir une bonne utilisation de l'aptamère *in vivo* il est nécessaire d'augmenter sont temps de résidence dans l'organisme. C'est pourquoi nous avons envisagé de greffer un polyéthylène glycol [122, 261]. Un témoin triéthylène glycol a été préparé (Composé **2**), la fixation de deux copies de F3B sur un dendron devrait permettre d'augmenter l'affinité de la sonde pour la cible.

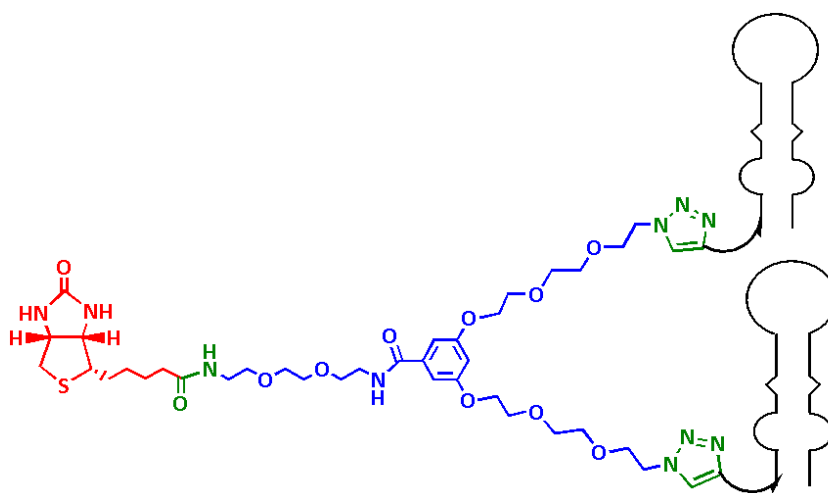


Figure 4.5. Plateforme Biotine-dendron-2F3B

B.1.1. Stratégie générale de synthèse

En vue de l'obtention de cette sonde Biotine-dendron-2F3B (Composé 10, Figure 4.5), un dendron disubstitué porteur de deux groupements azotures pour fixer deux copies de

F3B. Par ailleurs ce dendron est également porteur d'un groupement amine pour fixer dans un premier temps une biotine afin de déterminer l'affinité K_d de cette nouvelle sonde par des études physicochimique par SPR. En effet, la biotine est connue pour interagir fortement avec la streptavidine (K_d de l'ordre de 10^{-15} M), ce qui en fait une molécule de choix pour la fixation d'oligonucléotides sur des biopuces. La chaîne carbonée de la biotine et la chaîne triéthylène glycole sur le dendron permettent d'éloigner le groupe biotine de l'oligonucléotide, et ainsi d'optimiser la fixation sur des biopuces en limitant la gêne stérique [262]. Dans un second temps un ligand DOTA sera fixé sur le dendron par liaison amide afin de permettre la chélation d' ^{111}In et ainsi de pouvoir visualiser ce traceur en TEMP.

La présence de groupements azotures sur un acide nucléique est en effet incompatible avec la synthèse automatisée des oligonucléotides. Le phosphore (III) réagit avec les azotures pour former un iminophosphorane hydrolysable en amine primaire, comme décrit par Staudinger (Schéma 4.2) [263, 264].

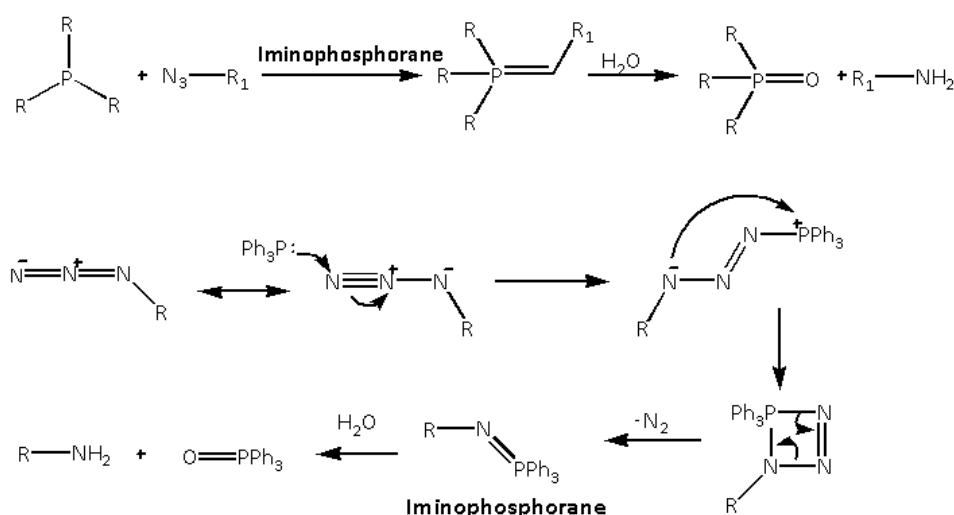


Schéma 4.2. Mécanisme de la réaction de Staudinger, entre un azoture et une phosphine (III)

Nous avons donc préparé des oligonucléotides porteurs d'un groupe alcyne. L'introduction de ce groupe alcyne en 5' de l'oligonucléotide a été faite par un phosphoramidite présentant un alcyne en position 5 d'une thymine modifiée. La fonction azoture a alors été placée sur le dendron-biotine (Composé 8) (Schéma 4.3).

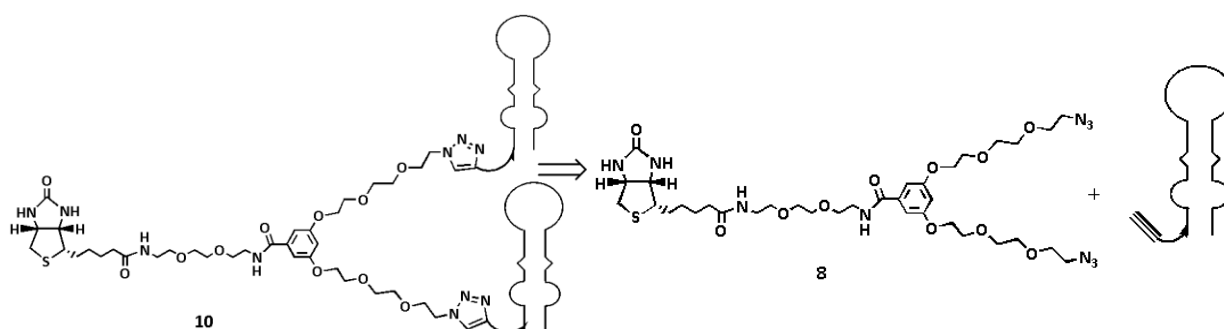


Schéma 4.3. Stratégie de synthèse de la plateforme Biotine-dendron-2F3B

Le méthyle-3,5-dihydroxybenzoate présente deux fonctions hydroxyles et une fonction acide carboxylique protégée sous forme d'ester et semble donc être un réactif de choix pour la synthèse du dendron. La stratégie envisagée a été d'introduire un bras triéthylèneglycol activé modifié par une fonction azoture. La fonction acide carboxylique protégée sera hydrolysée pour générer l'acide carboxylique en vue d'introduire un bras espaceur 2,2'-(éthylène-dioxy)bis(éthylamine) par couplage peptidique. Enfin, la fonction amine va réagir avec la biotine activée pour donner le dendron final (Schéma 4.4).

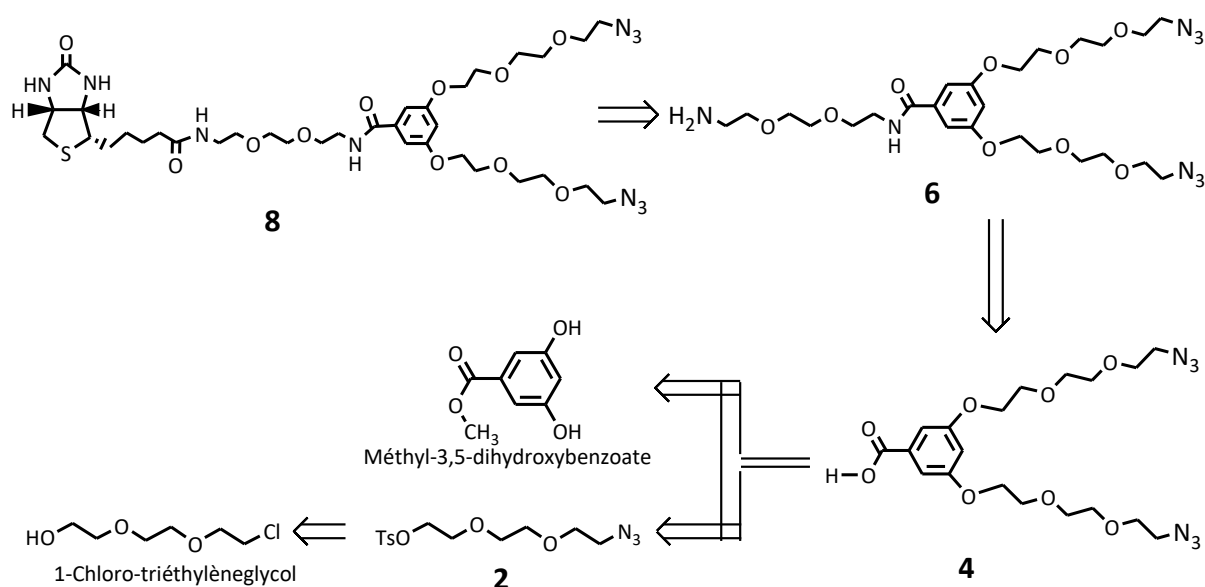


Schéma 4.4. Stratégie pour la synthèse de la plateforme Biotine-dendron-2N₃

B.1.2. Stratégie de synthèse détaillée

La première étape de synthèse consiste à introduire un groupe azoture (groupement indispensable au couplage futur avec l'aptamère par la réaction de Huisgen) sur le bras espaceur triéthylèneglycol, par substitution nucléophile de l'azoture de sodium sur le 1-chloro-triéthylèneglycol commercial, dans du DMF. L'azoture de triéthylène glycol (Composé 1, Schéma 4.5) a été obtenu avec un rendement de 97% [265, 266].

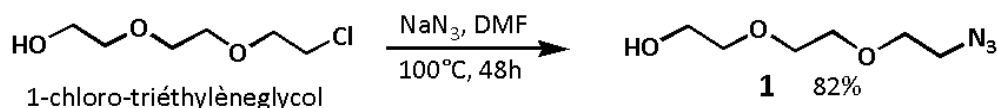


Schéma 4.5. Synthèse du triéthylène glycol azoture, composé 1

La fonction hydroxyle du composé 1 est ensuite activée sous forme de groupement tosylate (Composé 2, Schéma 4.6) [267, 268] par réaction du chlorure de tosylate sur le composé 1. La fonction hydroxyle a été remplacée par un groupement Ts-O⁻ qui est un meilleur groupe partant afin de réaliser une substitution nucléophile avec un rendement de 82.01%.

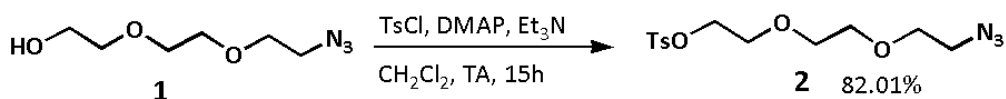


Schéma 4.6. Synthèse du triéthylène glycol tosylé -azoture, composé 2

La fixation des deux bras espaceurs sur le cœur du dendron est obtenue par substitution du composé 2 sur le méthyle-3,5-dihydroxybenzoate en présence de carbonate de potassium. Le dendron-azoture G1 (Composé 3, Schéma 4.7) a été obtenu avec un rendement de 87% [265, 267, 268].

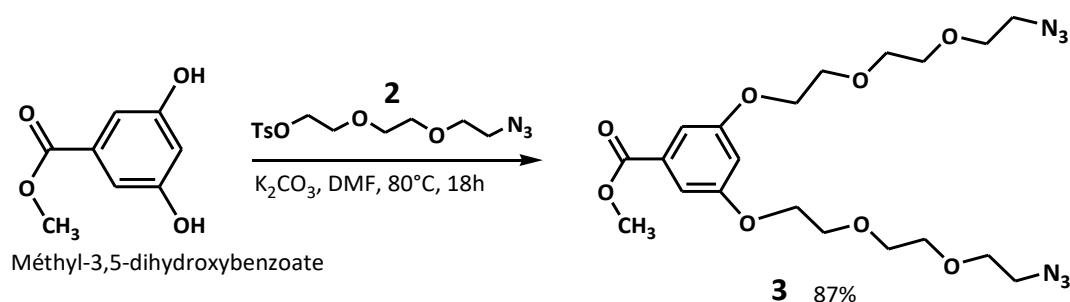


Schéma 4.7. Synthèse du composé 3 par couplage entre le méthyle-3,5-dihydroxybenzoate et le composé 2

La fonction ester du composé **3** est ensuite hydrolysée en milieu basique par une solution de KOH (1M) avec un rendement total, pour générer l'acide carboxylique (Composé 4, Schéma 4.8) [265, 267]. L'excès de base KOH a été facilement éliminé par l'addition de résine acide jusqu'à pH = 1-2. La résine est éliminée par simple filtration, le filtrat est alors évaporé sous pression réduite. L'acide carboxylique du composé **4** est activé par la suite sous forme d'ester succinimide avec un rendement total (Composé 5, Schéma 4.8) par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), introduit en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DMF [269, 270]. Tout d'abord, l'acide réagit avec le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) pour former un intermédiaire. L'addition d'un auxiliaire nucléophile (NHS) permet de former l'ester activé correspondant et la dicyclohexylurée (DCU) formé, insoluble dans les solvants organiques est donc éliminée par simple filtration. L'ester de *N*-hydroxysuccinimide s'hydrolyse très facilement que ce soit en solution ou sur une surface. Cette hydrolyse est d'autant plus rapide que le pH est élevé.

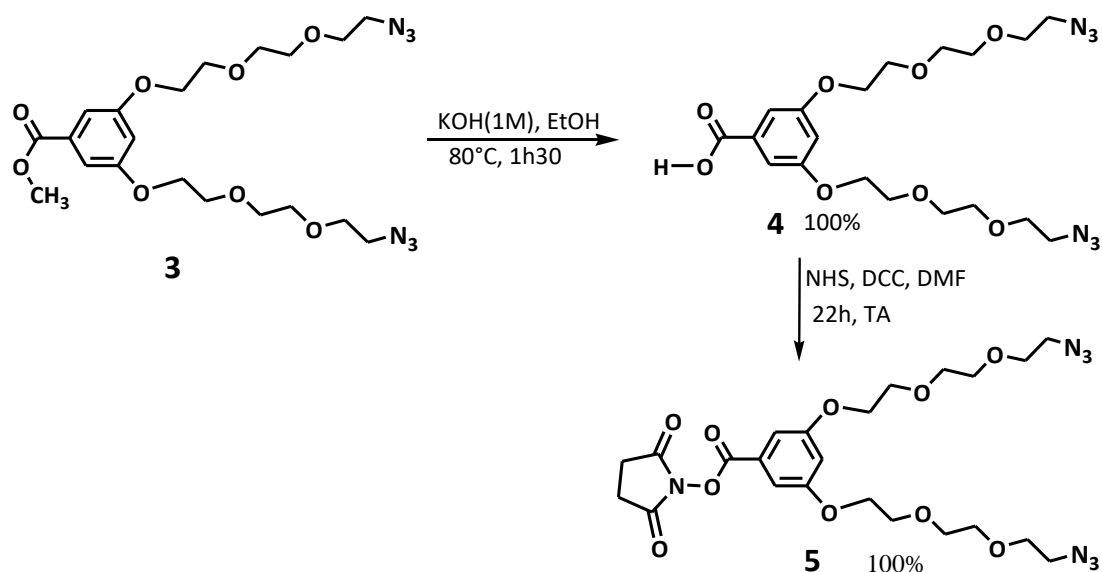


Schéma 4.8. Déprotection d'ester composé 3. Activé l'acide carboxylique composé 4

Le composé 6 est obtenu par couplage peptidique entre le composé 5 et le 2,2'-(éthylène-dioxy)bis(éthylamine) disponible commercialement en présence de triéthylamine dans le dioxane. Après purification sur une colonne de silice le composé 6 a été obtenu avec un rendement de 81% (Schéma 4.9). Ce couplage a été confirmé par RMN et par spectrométrie de masse SM-ESI (Figure 5.14) [271].

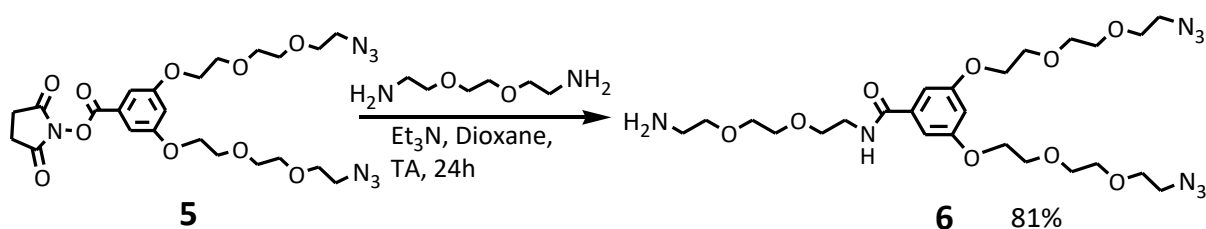


Schéma 4.9. Synthèse du dendron multifonctionnelle, composé 6

L'étape suivante consiste à réaliser un couplage peptidique entre la biotine activée 7 et le dendron comportant deux fonctions azoture et une fonction amine 6. Il est nécessaire dans un premier temps d'activer la fonction acide de la biotine en formant l'ester activé NHS. Le dérivé NHS de la biotine est disponible commercialement, néanmoins son prix reste très élevé. Il a donc été choisi de le synthétiser par réaction entre la biotine et le NHS en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DMF (Schéma 4.10). Après simple précipitation dans l'éther diéthylique, la biotine activée (Composé 7) a été obtenue avec un rendement de 93% [270, 272].

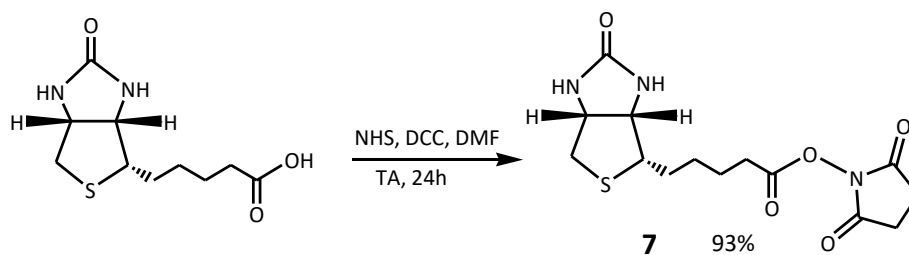


Schéma 4.10. Synthèse du dérivé NHS de la biotine, composé 7

La biotine-dendron-2N₃ **8** est obtenue par couplage peptidique entre les deux composés **6** et **7** en présence de triéthylamine dans le DMF. Après purification sur une colonne de silice le produit **8** est isolé avec un rendement de 62 % (Schéma 4.11). Ce couplage est confirmé par RMN (Figure 5.15, 5.16) et par spectromètre de masse SM-ESI (Figure 5.17).

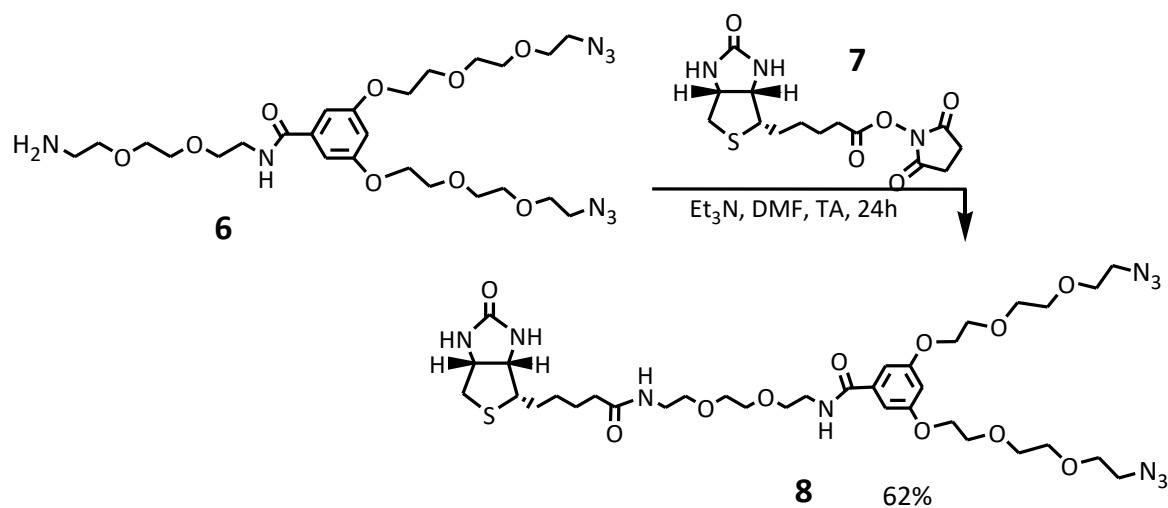


Schéma 4.11. Couplage du dendron, composé 6, et de la biotine-NHS ester, composé 7

Le Biotine-dendron-2N₃ **8** a ainsi pu être synthétisée avec succès en 8 étapes. Il est maintenant possible d'utiliser ce composé pour coupler des aptamères présentant entre autres des fonctions alcynes.

La réaction de Huisgen entre le composé **8** et l'aptamère F3B- alcyne-NH₂ (en solution) a été testée en utilisant du CuCl comme catalyseur, du NaAsc et du TBTA. En effet, les catalyseurs au cuivre (I) sont instables et peuvent s'oxyder en cuivre (II) facilement. Malheureusement cette réaction n'a pas conduit à la formation du composé biotine-dendron-2F3B [226]. Des analyses du brut réactionnel par CLHP et par spectrométrie de masse ont montré seulement la présence des produits de départ et le monomère biotine-dendron (1N₃)-F3B. Il a été choisi de chauffer le brut réactionnel sous microondes (2 cycles, avec un chauffage à 60°C pendant 45 min à 100W). L'analyse du brut réactionnel par CLHP a révélé une nouvelle fois uniquement la présence des produits de départ et le monomère biotine-dendron (N₃)-F3B. Nous avons pensé que la concentration des réactifs en solution et les nombres d'équivalents sont très dilués, donc, il a alors été choisi de tester la réaction sur billes (CPG). La réaction de Huisgen entre le composé **8** et le CPG-F3B-HEG-alcyne (support solide) a été

réalisée sous microondes et a conduit à l'obtention du produit **9** (Schéma 4.12) [273]. Un mélange $\text{CuSO}_4/\text{NaAsc}$ a été utilisé afin de réduire le Cu^{2+} au Cu^+ qui permet de catalyser la réaction. Par ailleurs, le TBTA a également été utilisé afin de chélater le cuivre (I) [274]. Enfin, de nombreux lavages avec de l'EDTA a permis d'éliminer au maximum le cuivre en fin de réaction.

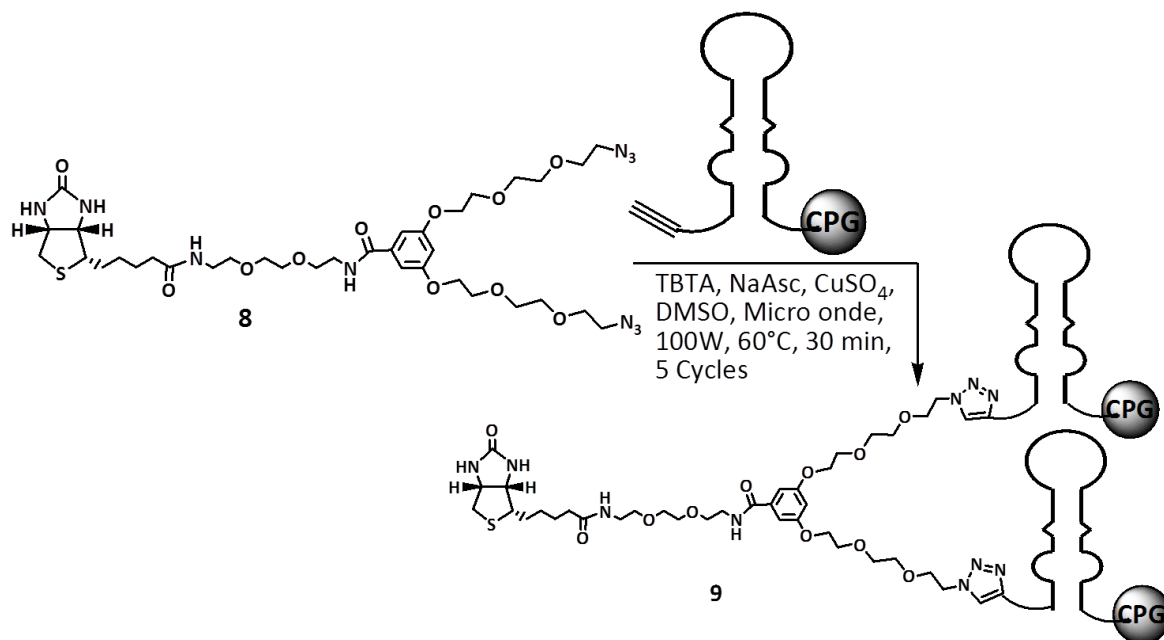


Schéma 4.12. Couplage du dendron, composé **8**, et de CPG-F3B-alcyne par réaction de Huisgen dans la microonde

Par la suite les oligonucléotides ont été déprotégés par une solution de NH_4OH [226] et ont été purifiés sur gel d'acrylamide 10% (Figure 4.6) puis dialysés (citrate d'ammonium 0,1M, 4h). Les oligonucléotides purifiés ont été quantifiés par Nanodrop. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.18) a confirmé qu'il s'agissait du produit attendu c'est-à-dire la biotine-dendron-2F3B (Composé **10**, Schéma 4.13).

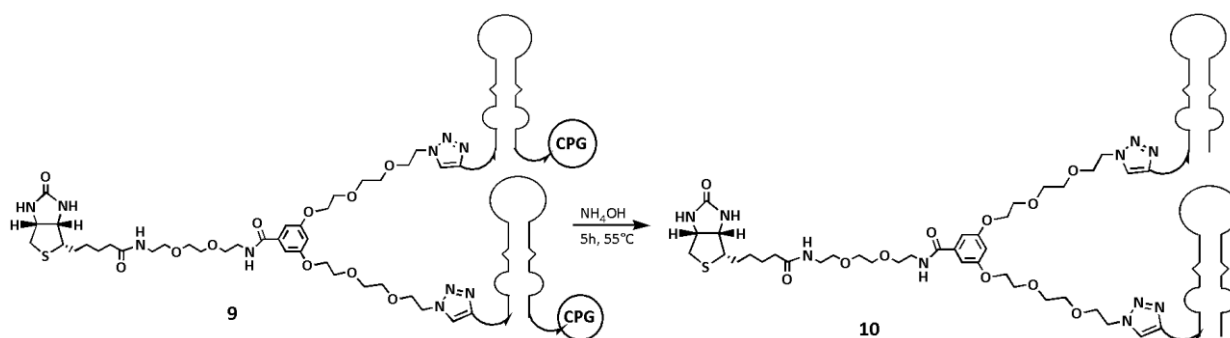


Schéma 4.13. Déprotection de la sonde final, composé **10**

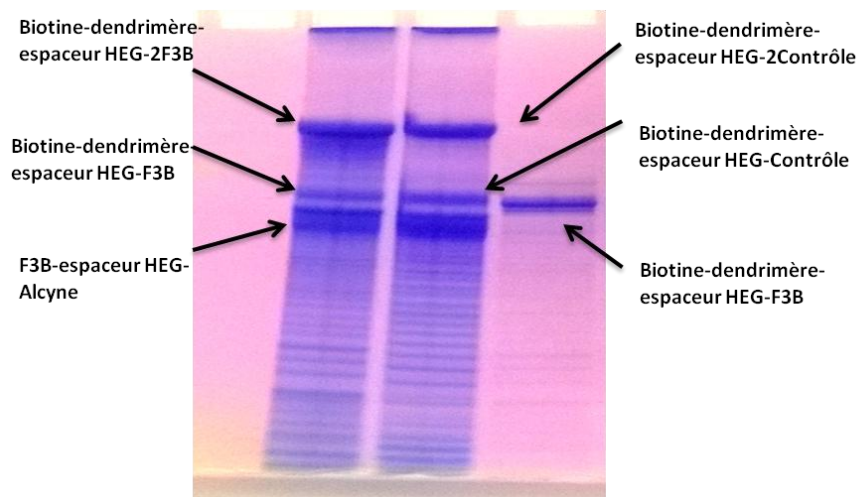


Figure 4.6. Gel PAGE dénaturant avant la purification de Biotine-dendron- espaceur HEG-2F3B et Biotine-dendron- espaceur HEG-2Contrôle

B.2. Résultat de SPR de la plateforme Biotine-dendron-2F3B [D(F3B- espaceur HEG)₂]

L'objectif a ensuite été de déterminer l'affinité de D(F3B- espaceur HEG)₂ [D : dendron] par rapport à l'aptamère F3B- espaceur HEG en utilisant la résonance plasmonique de surface (SPR, appareil Biacore®).

Les immobilisations des aptamères F3B- espaceur HEG, de son contrôle- espaceur HEG et D(F3B- espaceur HEG)₂ ont été réalisées sur une puce de streptavidine. Pour cela, nous avons préparé les molécules suivantes : F3B- espaceur HEG-Biotine, Contrôle-espaceur HEG-Biotine et D(F3B- espaceur HEG)₂-Biotine (Figure 4.7).

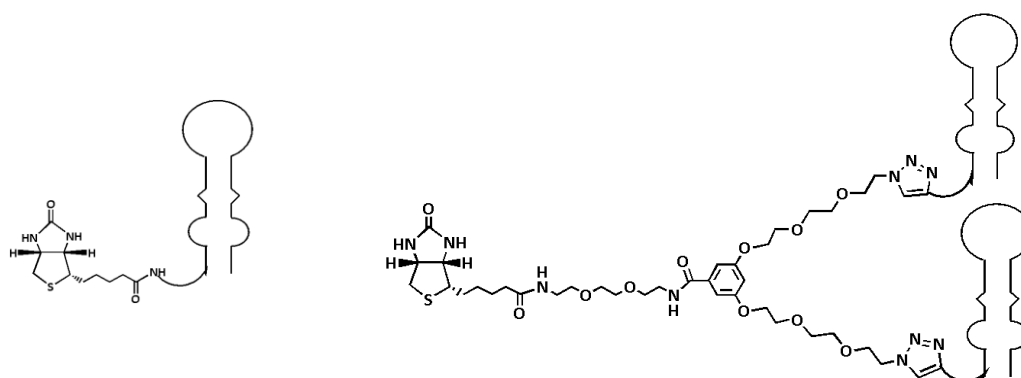


Figure 4.7. Les aptamères modifiés, F3B- espaceur HEG- Biotine (à gauche) et D(F3B- espaceur HEG)₂- Biotine (à droite)

Les immobilisations de ces trois aptamères ont été réalisées à 23°C. Un volume de 30 µl de F3B- espaceur HEG-Biotine et de son Contrôle- espaceur HEG-Biotine et de 15 µl de D(F3B-

espaceur HEG)₂-Biotine est injecté à une concentration de 100 nM à 20 µl/min (mode Quickinject), avec le tampon de course PBS 1X.

Le Contrôle- espaceur HEG-biotine est immobilisé sur la piste fc1, l'aptamère F3B- espaceur HEG-biotine est immobilisé sur la piste fc2 et l'aptamère D(F3B- espaceur HEG)₂-Biotine est immobilisé sur la piste fc3 (Figure 4.8). Il a donc été fixé en moyenne, 618 RU de Contrôle- espaceur HEG, 669.7 RU de F3B- espaceur HEG et 638.6 RU de D(F3B- espaceur HEG)₂.

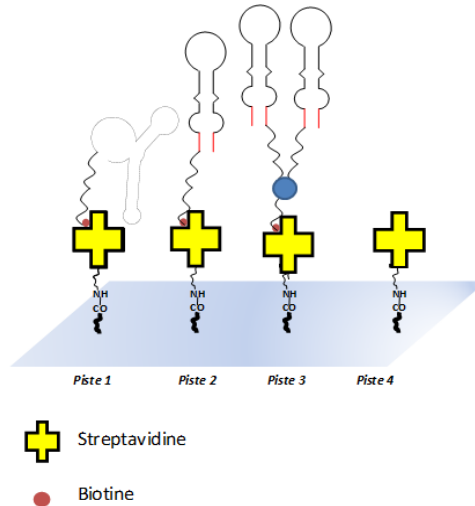


Figure 4.8. Schéma résume la distribution des aptamères à la surface de la biopuce SAD sur les trois pistes, Piste 1 : Contrôle-HEG-Biotine, Piste 2 : F3B-HEG-Biotine, Piste 3 : Dendron-(F3B-HEG)-Biotine et Piste 4 : Streptavidine

Les aptamères ont été incubés sur le puce de streptavidine, à une concentration de 100 nM, en présence de concentration croissante de l'hMMP-9 (5, 10, 20, 40 et 80 nM) qui ont été injectés dans le tampon de course à un débit de 20 µl/min sur les trois pistes.

Les constantes d'affinité K_d de F3B- espaceur HEG et D(F3B- espaceur HEG)₂ ont été calculées à partir des courbes d'interaction obtenues figure 4.9 et figure 4.10 respectivement. L'affinité moyenne de l'aptamère D(F3B- espaceur HEG)₂ a été estimée à 42 nM et l'affinité moyenne de l'aptamère F3B- espaceur HEG a été estimée quant à elle à 33 nM.

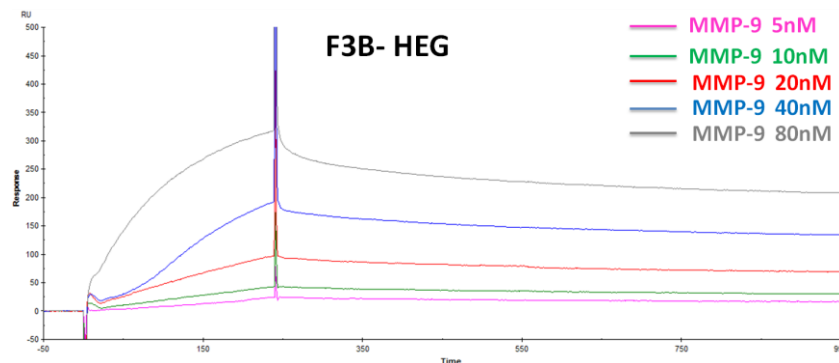


Figure 4.9. Courbe de l'affinité de F3B- espaceur HEG, en présence de concentration croissante d'hMMP-9

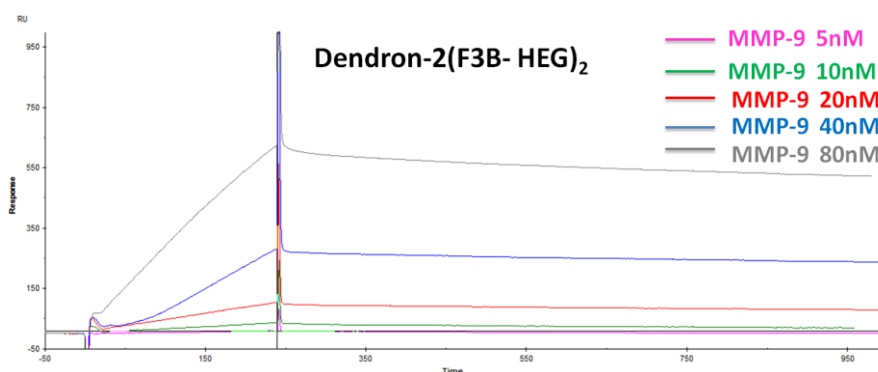


Figure 4.10. Courbe de l’affinité de D(F3B- espaceur HEG)₂, en présence de concentration croissante d’hMMP-9

On a remarqué que l’affinité de D(F3B- espaceur HEG)₂ est très proche de l’affinité de F3B- espaceur HEG, c’est-à-dire que l’affinité de deux copies de F3B n’est pas améliorée donc chaque copie de F3B sur le dendron fait la reconnaissance de l’hMMP-9 toute seule. Afin de vérifier ce résultat, les courbes de F3B- espaceur HEG et de D(F3B- espaceur HEG)₂ à la concentration 40 nM de hMMP-9 ont été comparées. La vitesse d’association de F3B- espaceur HEG ($k_{on} = 9.41 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$) (Figure 4.11A) est plus rapide que celle de D(F3B- espaceur HEG)₂ ($k_{on} = 1.35 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$) (Figure 4.11B). Mais la vitesse de dissociation ($k_{off} = 4.3 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$) de F3B- espaceur HEG est plus lente que la vitesse de dissociation de D(F3B- espaceur HEG)₂ ($k_{off} = 59.7 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$). Il a été calculé un $K_d = 45.7 \text{ nM}$ pour F3B- espaceur HEG et un $K_d = 44.2 \text{ nM}$ pour D(F3B- espaceur HEG)₂.

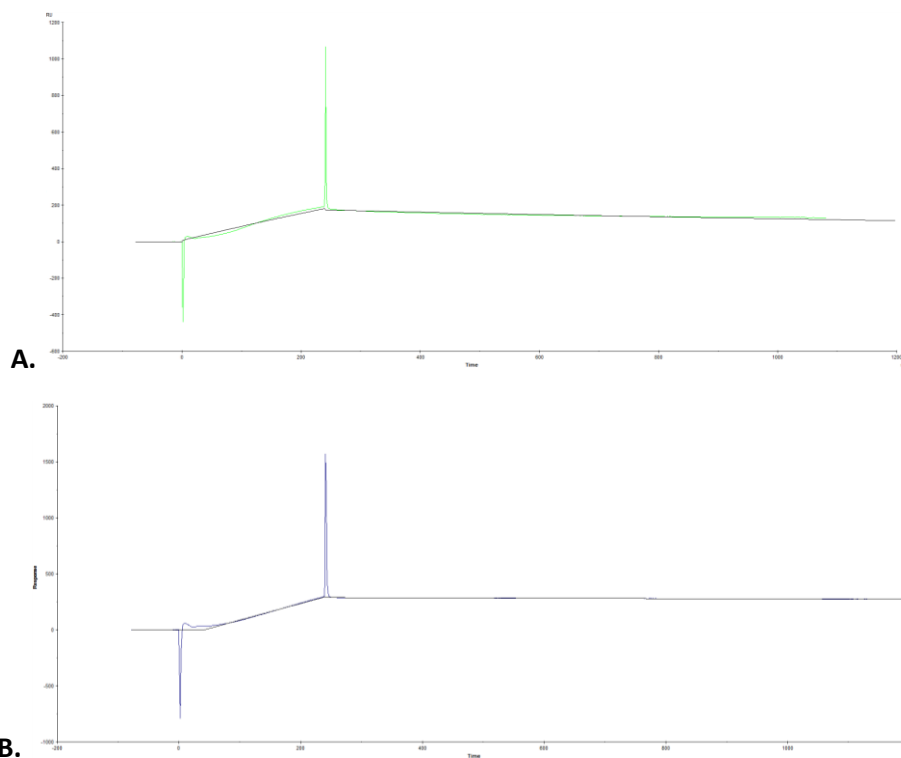


Figure 4.11. A. Le profil de fixation d’hMMP-9 40nM sur F3B- espaceur HEG. B. Le profil de fixation d’hMMP-9 40nM sur D(F3B- espaceur HEG)₂

On pense qu'une haute masse moléculaire ainsi qu'une gêne stérique et une concentration plus élevée de la sonde Biotine-dendron-2F3B sur la puce empêchant un bon k_{on} et le k_{off} n'est pas plus amélioré [260]. C'est peut être la longueur de l'espaceur sur le dendron et sur l'extrémité 5' ne sont pas assez longue [239, 240]. Donc, Il est très intéressant de refaire cette manipulation en immobilisant moins de concentration de la sonde.

B.3. Synthèse d'une plateforme dendron-2F3B-2DOTA

Les résultats de SPR laissent supposer que l'analyse sur la biopuce n'est peut être pas optimale pour l'étude du dimère. Son organisation en solution peut être différente et son efficacité de reconnaissance améliorée. C'est pourquoi nous avons tout de même envisagé de préparer un dimère de F3B pour une étude *in vivo*. Nous envisageons ici de synthétiser une sonde sur laquelle serait attaché un ligand de type DOTA (Figure 4.12), chélateur de ^{111}In pour une utilisation en imagerie TEMP.

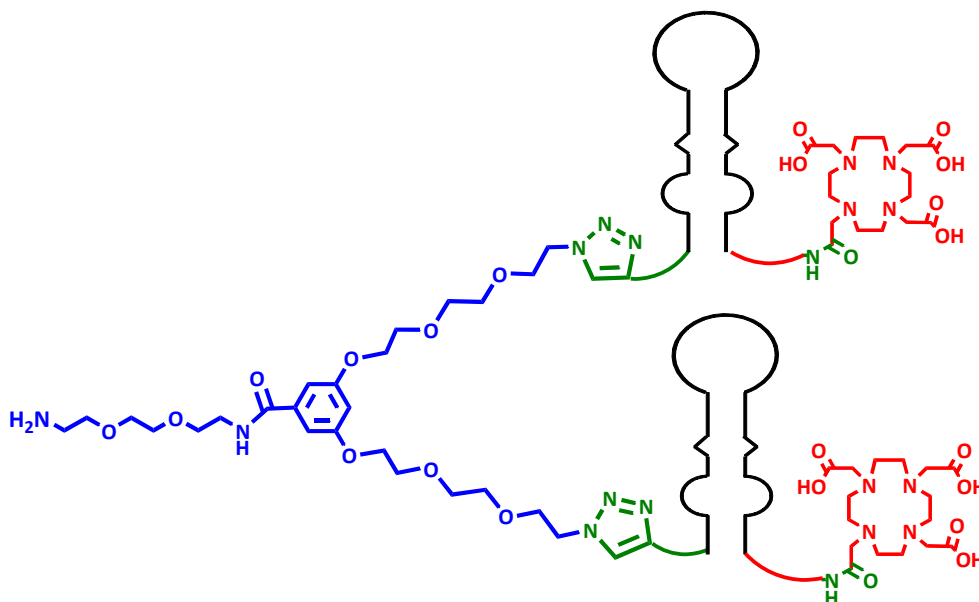


Figure 4.12. Plateforme dendron-2F3B-2DOTA

B.3.1. Stratégie générale de synthèse

En vue de l'obtention de cette sonde (Composé 14), la synthèse en parallèle des deux partenaires de la réaction de Huisgen a été réalisée. Le dendron-2N3 (Composé 8) porte une fonction amine qui sera protégé par un groupement MMTr-Cl. Par la suite ce dendron (Composé 11) sera couplé sur le support solide d'aptamère F3B-espaceur HEG-alcyne-CPG (Composé 12). Puis un traitement basique par une solution de NH_4OH permettra d'éliminer les deux groupements protecteurs le CPG et le Fmoc (Composé 13). Enfin, le DOTA sera introduit par couplage peptidique sur la fonction amine en vue de l'obtention de la plateforme finale (Composé 14, Schéma 4.14).

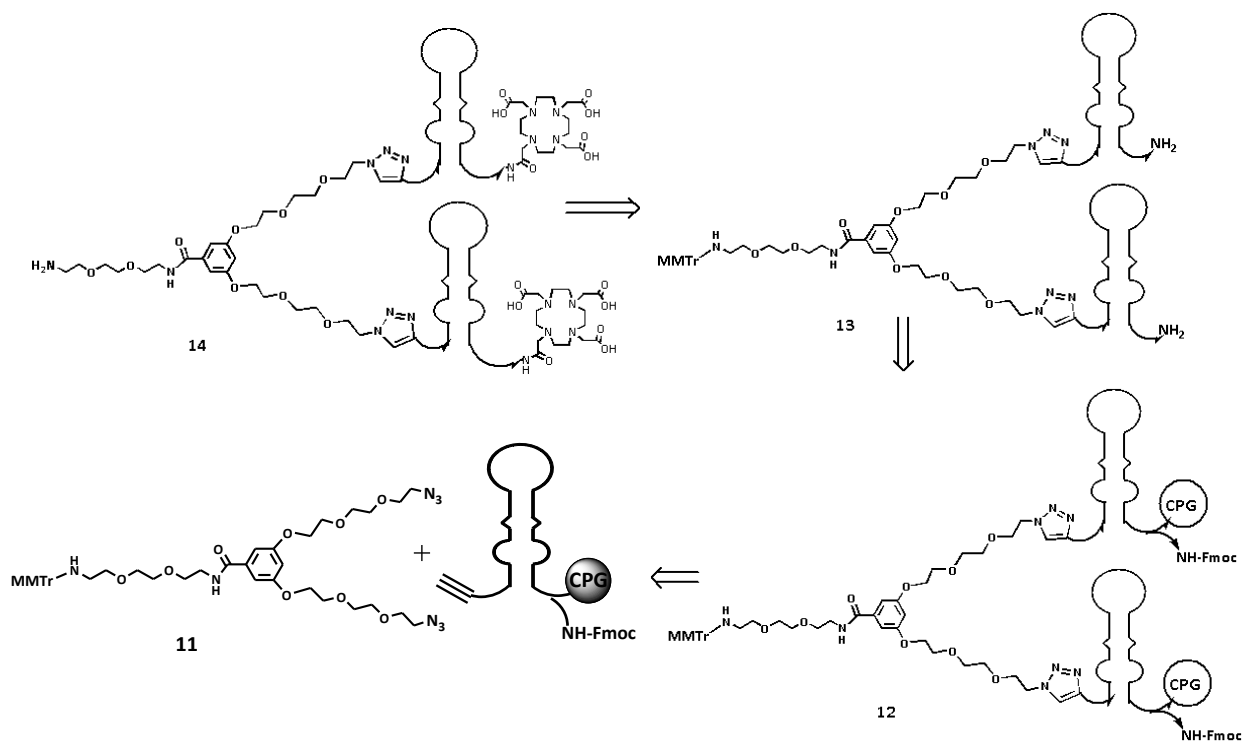


Schéma 4.14. Stratégie de synthèse de la plateforme dendron-2F3B-2DOTA

Nous aurions pu choisir d'utiliser le point focal pour coupler un groupe DOTA. Mais cette étape de couplage est incompatible avec la chimie au cuivre du couplage des aptamères et aurait donc dû arriver après couplage de F3B et purification du dimère formé. La fixation du DOTA au point focal aurait été délicate, par gêne stérique et difficulté d'analyse en Masse de l'efficacité de la réaction.

De plus, nous gardons ainsi si nécessaire la possibilité d'une amélioration de la persistance de la sonde dans l'organisme, par greffage d'une chaîne PEG au point focal.

B.3.2. Stratégie de synthèse détaillée

La première étape de synthèse a consisté à protéger la fonction amine sur le dendron **6** par le groupement MMTr-Cl pour obtenir le produit **11** (Schéma 4.15) avec un rendement de 75%. Il est nécessaire de protéger cette fonction amine par le groupement MMTr-Cl afin d'éviter lors de l'étape ultérieure de couplage du DOTA-NHS ester d'une réaction sur cette position. De plus, ce groupement est stable dans le milieu basique, donc compatible avec la déprotection de l'oligonucléotide.

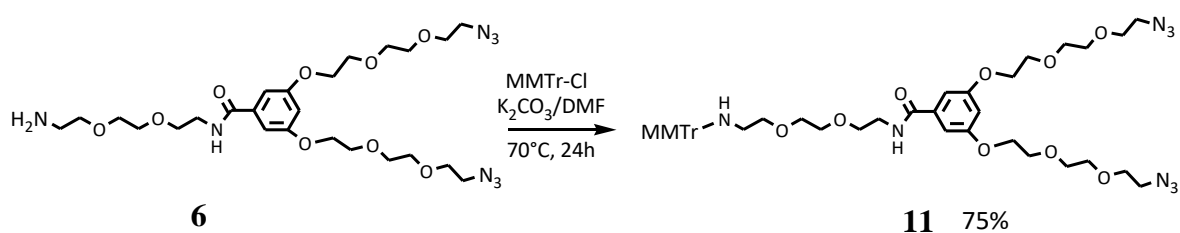


Schéma 4.15. Synthèse du MMTr-dendron-2N3, composé 11

L'étape suivante a consisté à coupler le composé **11** avec l'aptamère F3B-HEG-alcyne-CPG (NH-Fmoc) (support solide) par la réaction de Huisgen en utilisant les conditions précédemment optimisées pour le couplage biotine-dendron-2F3B (activation sous microondes avec un chauffage à 60°C pendant 45 min à 100W). Ce couplage a conduit au composé **12** (Schéma 4.16) [273].

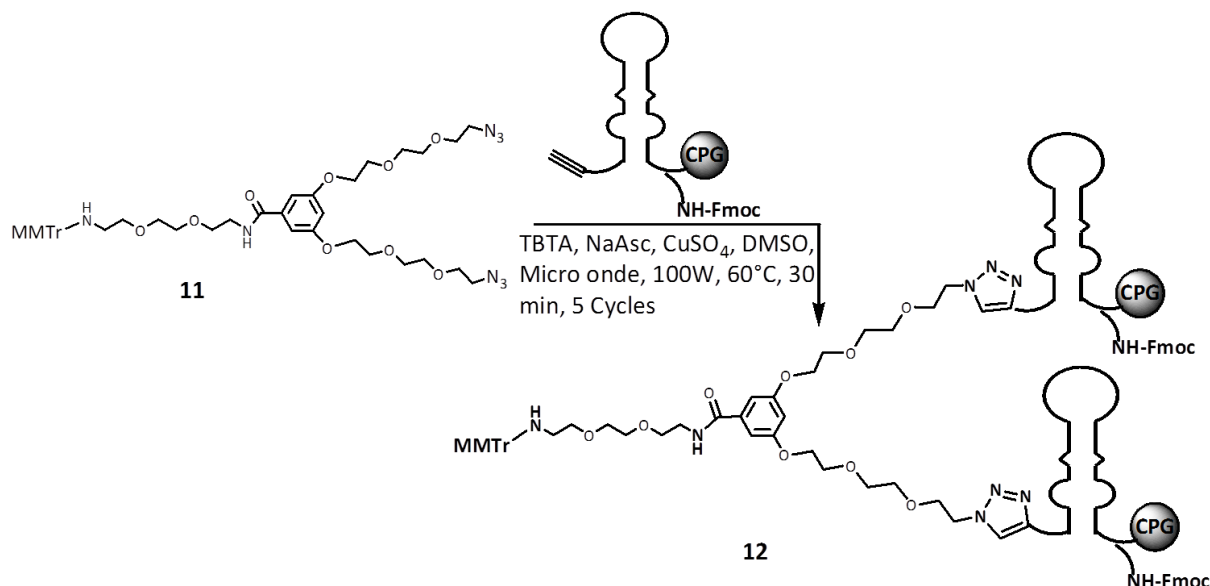


Schéma 4.16. Couplage du dendron, composé 11, et de CPG-F3B-alcyne par réaction de Huisgen dans la microonde

Par la suite les oligonucléotides ont été déprotégés en milieu basique (NH₄OH) [226] pour éliminer le CPG et le groupement Fmoc et ont été purifiés sur gel d'acrylamide 6% (Figure 4.13). Les oligonucléotides purifiés ont été quantifiés par Nanodrop et une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.19) a confirmé qu'il s'agissait du produit attendu composé 13 (Schéma 4.17).

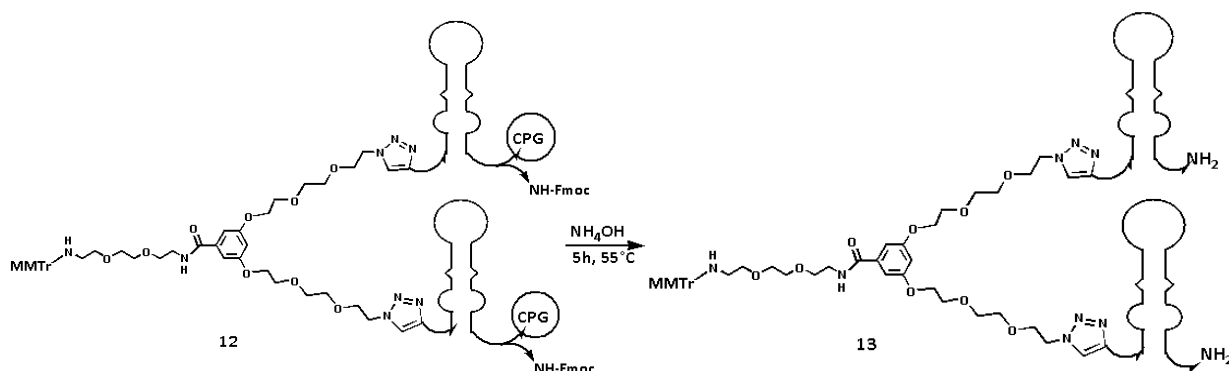


Schéma 4.17. Déprotection du composé 13

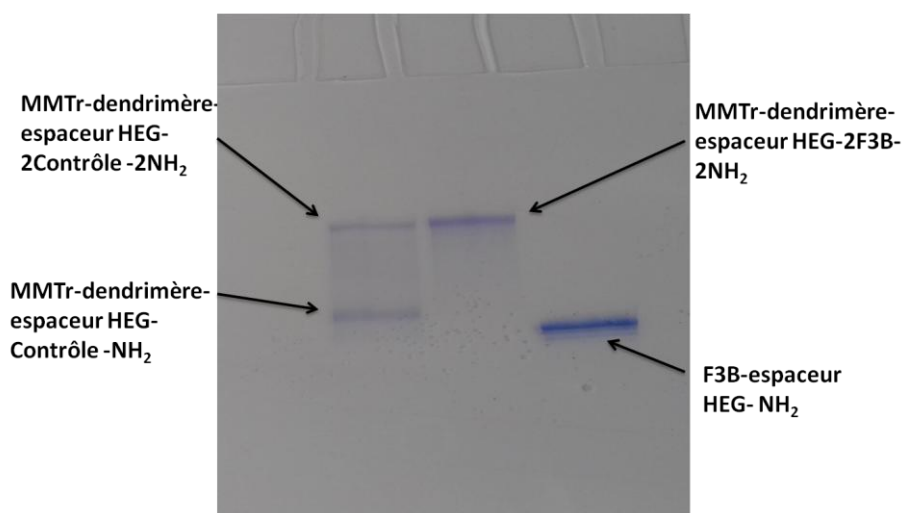


Figure 4.13. Gel PAGE dénaturant après la purification de MMTr-HN-dendron-espacer HEG-2F3B-2NH₂ et MMTr-HN-dendron-espacer HEG-2Contrôle-2NH₂

La Plateforme H₂N-dendron-2F3B-2DOTA (Composé **14**, Schéma 4.18) a été obtenue par couplage peptidique entre le ligand DOTA-NHS ester et le composé **13**. La déprotection du groupement MMTr sur le dendron a été réalisée par l'acide acétique 80%. La sonde a été purifiée sur gel d'acrylamide 6% et a été quantifiée par Nanodrop avec un rendement de 46 % pour H₂N-dendron- espacer HEG-2F3B-2DOTA et 60 % pour son contrôle. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF a confirmé que le produit formé était bien le composé H₂N-dendron- espacer HEG-2F3B-2DOTA (Figure 5.20).

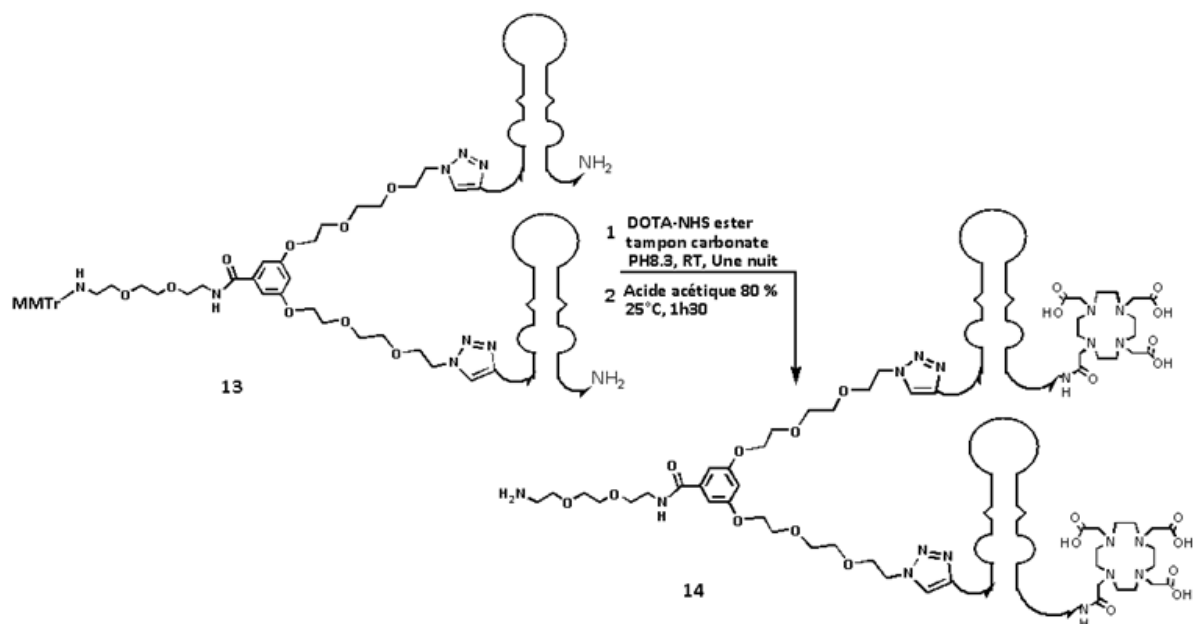


Schéma 4.18. La sonde final H₂N-dendron- espacer HEG-2F3B-2DOTA, composé 14

Cette sonde (Composé **14**) est en cours d'étude *in vivo* dans le cadre du projet immelapt en collaboration avec : Pr. JANIER Marc et Dr. KRYZA David (LAGEP UMR 5007 CNRS, Université de Lyon 1).

B.4. Synthèse d'une plateforme dendron-F3B-11F46A

Nous envisageons ici de synthétiser une sonde multi-aptamères c'est-à-dire une sonde sur laquelle seraient attachés deux aptamères différents (F3B et 11F46A) dirigés contre la protéine hMMP-9 (Figure 4.14). On rappelle que les aptamères F3B et 11F46A n'interagissent pas avec la même partie de la protéine hMMP-9. En effet, chacun reconnaît un site spécifique de cette protéine. On vise également ici une amélioration du K_d par modification des composantes k_{on} et k_{off} de la constante. Il est espéré qu'en combinant deux aptamères différents les résultats montreront un K_d inférieur à celui de l'aptamère F3B.

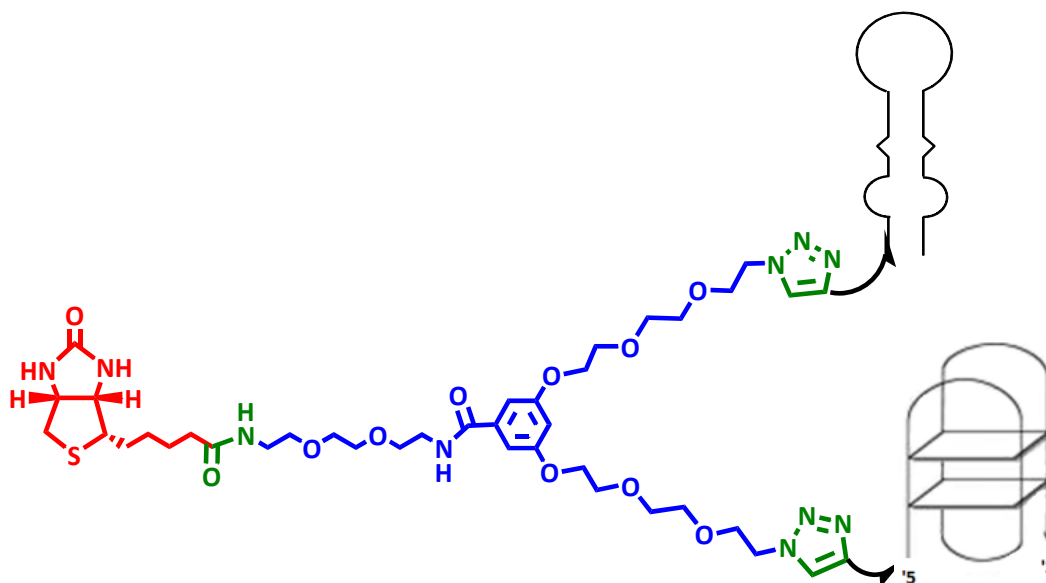


Figure 4.14. Plateforme biotine-dendron-F3B-11F46A

Il a été choisi d'utiliser le dendron précédemment utilisé porteur de deux fonctions azotures permettant l'introduction des aptamères par chimie « click ». La fonction amine permet l'introduction dans un premier temps d'une molécule de biotine afin de déterminer l'affinité K_d par des études physicochimique réalisées par SPR. Dans un second temps, un marqueur (variable selon le type d'imagerie souhaité) pourra être introduit sur cette fonction.

B.4.1. Stratégie générale de synthèse

L'aptamère F3B-espaceur HEG-alcyne sera fixé sur un seul site de la biotine-dendron- $2N_3$ (Composé 8) en jouant sur le nombre d'équivalents des deux réactifs. En effet, le composé **8** sera introduit en large excès afin d'obtenir le dendron monosubstitué (Composé 15). Par la suite, le deuxième aptamère pourra être introduit sur la seconde fonction azoture (Schéma 4.19).

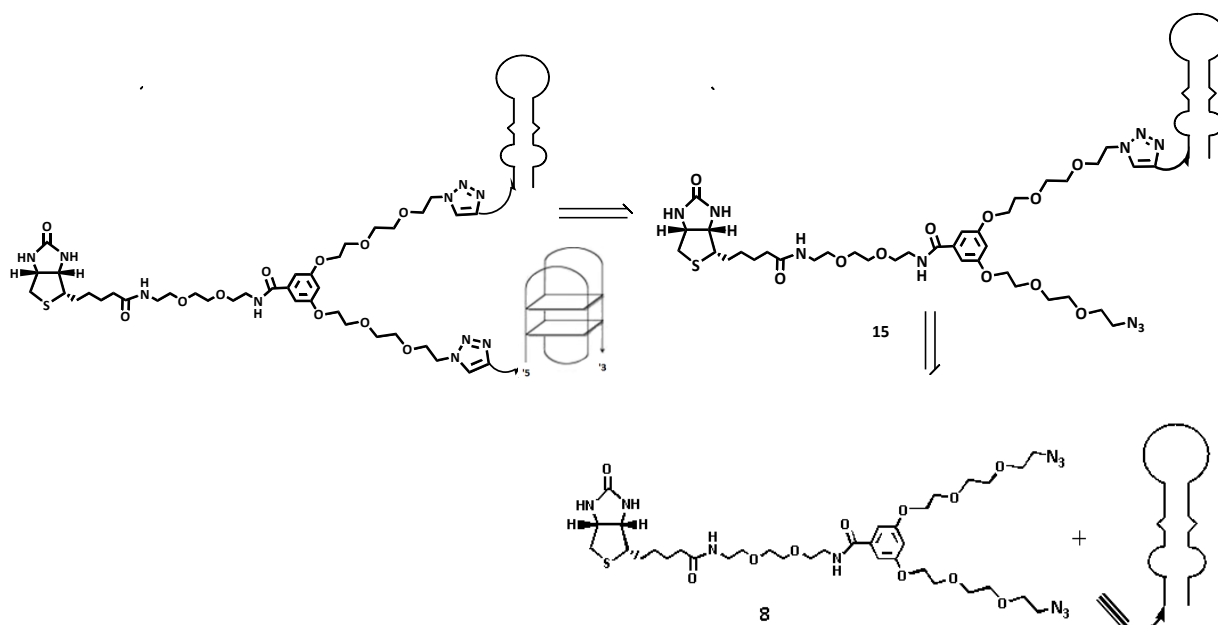


Schéma 4.19. Stratégie de synthèse de la plateforme biotine-dendron-F3B-11F46A

B.4.2. Stratégie de synthèse détaillée

La première réaction de Huisgen a donc été réalisée en utilisant 10 équivalents du composé **10** et un équivalent de l'aptamère F3B-espacer HEG-alcyne en présence de CuBr, du NaAsc et de TBTA. Après agitation à 45°C sur une nuit, le composé biotine-dendron-N₃-F3B (Composé **15**, Schéma 4.20) a été obtenu [226]. Les oligonucléotides ont été purifiés par CLHP et ont été quantifiés par Nanodrop. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.21) a confirmé que le produit formé était bien le composé **15**.

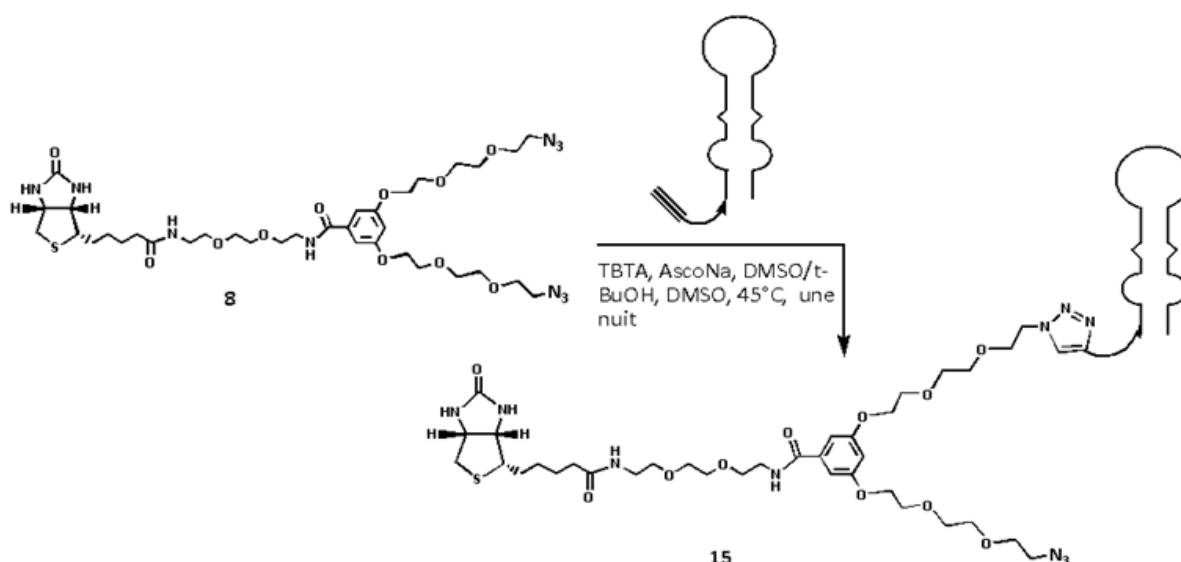


Schéma 4.20. Couplage du dendron, composé 8, et de F3B-HEG-alcyne par réaction de Huisgen

L'inconvénient de cette synthèse est l'utilisation en large excès (10 eq) de l'aptamère 11F46A-espacer HEG-alcyne dont le prix est très élevé. Afin de réduire le coût de cette

synthèse il a été envisagé d'autres solutions telles que le développement d'une nouvelle plateforme biotine-11F46A-F3B (Oligonucléotide complémentaire) (Figure 4.15).

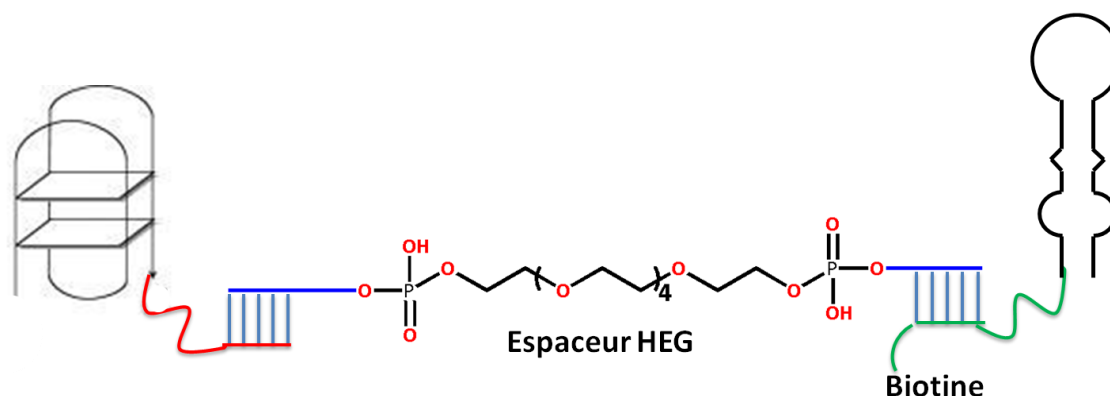


Figure 4.15. Plateforme biotine- F3B-espaceur HEG- 11F46A

La stratégie séquence complémentaire [275] ici de synthétiser les deux aptamères (11F46A, F3B), chaque aptamère porte sur l'extrémité 5' un bras espaceur HEG et des séquences A ou T, l'aptamère F3B porte de plus, sur l'extrémité 5' une biotine. Les séquences sur l'extrémité 5' de chaque aptamère doivent être complémentaires de celle-ci sur les extrémités sur le bras espaceur HEG de cœur. Une fois les deux synthèses se sont prêtes, la dernière étape de cette sonde sera de coupler les deux synthèses sur le bras espaceur de cœur, un après l'autre, en solution de tampon PBS (1x) pour obtenir la sonde finale biotine-11F46A-F3B. Les brins des deux aptamères vont se réapparier, c'est-à-dire que les deux brins qui sont complémentaires vont se ré-hybrider pour conformer une nouvelle molécule stable. En effet, cette stabilisation est principalement due aux interactions d'empilement des hétérocycles des bases azotées [276]. Par la suite, des études physico-chimiques par SPR seront réalisées pour déterminer l'affinité de cette sonde.

De plus, sur la même méthode on a la possibilité d'introduire une modification permettant d'avoir jusqu'à 3 copies de chaque aptamère en utilisant une autre phosphoramidite (Figure 4.16).

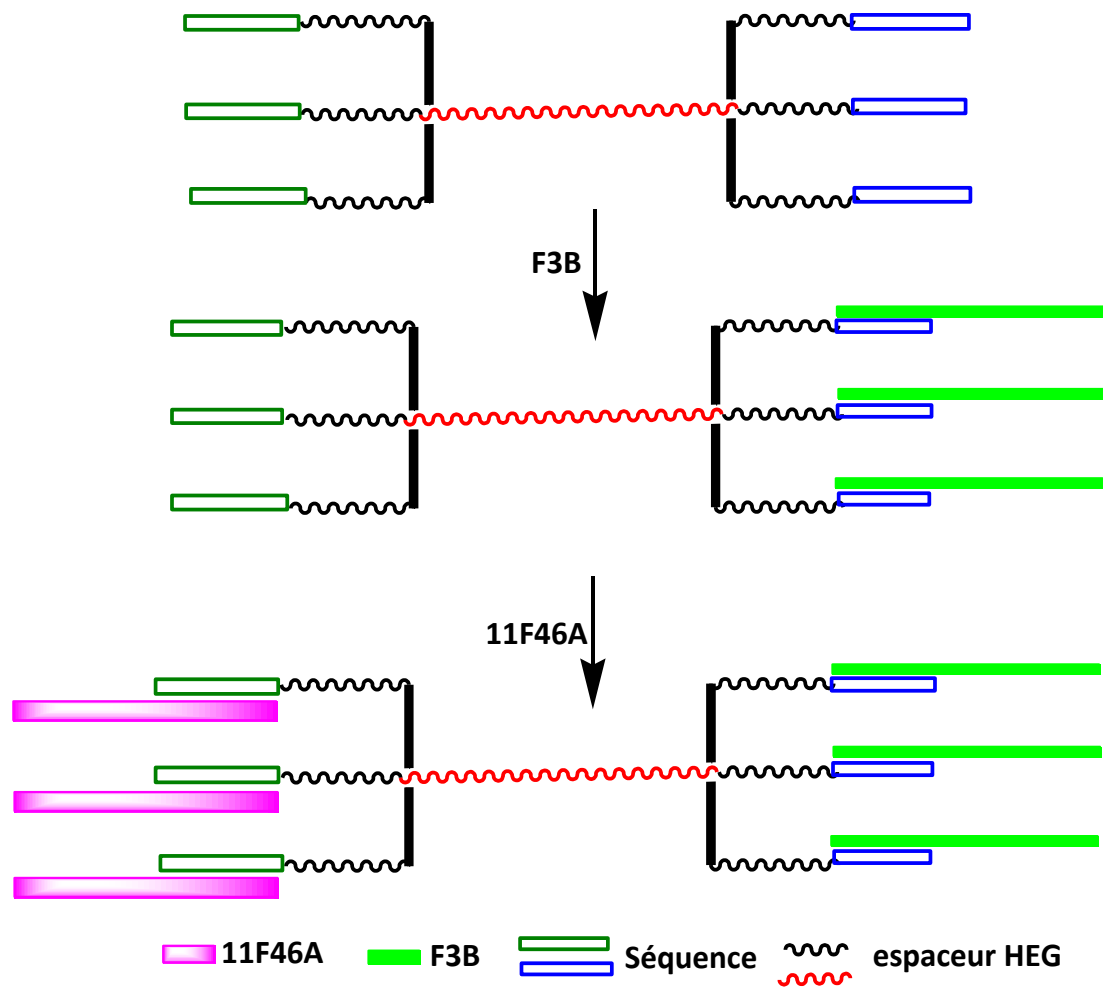


Figure 4.16. Stratégie de synthèse une plateforme multi-aptamère 3F3B-espaceur HEG-3(11F46A)

B.5. Synthèse d'une sonde tétramérique bifonctionnelle H₂N-dendrimère Janus -2F3B-2(11F46A)

Nous proposons de synthétiser une plateforme permettant la fixation de deux copies de chaque aptamère à disposition, F3B et 11F46A, afin d'obtenir une sonde tétramérique bifonctionnelle. Cette sonde sera combinée à un marqueur qui peut être varié suivant le type d'imagerie que nous voulons utiliser (Figure 4.17).

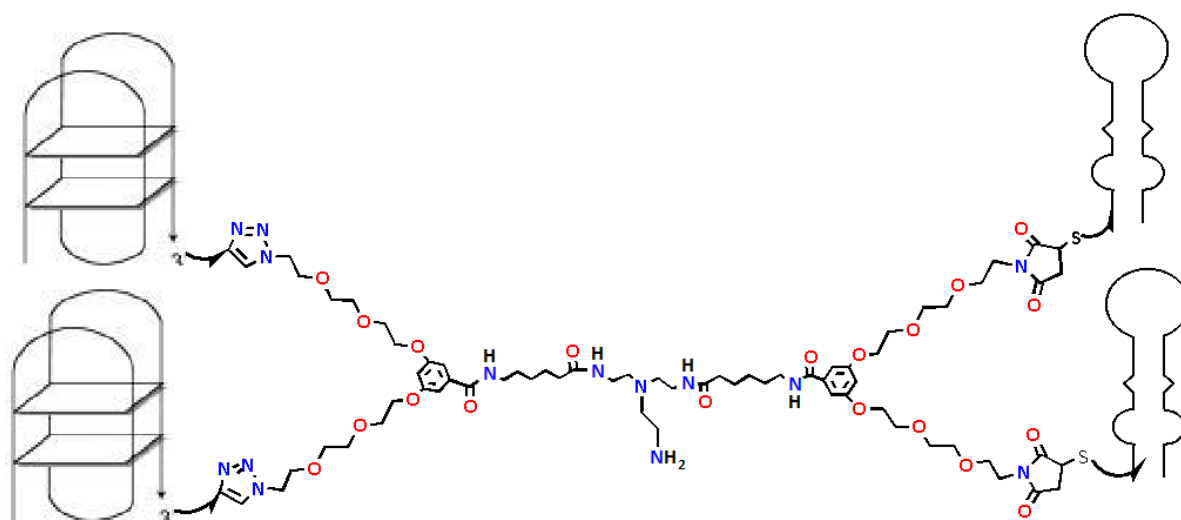


Figure 4.17. La sonde H₂N-dendrimère Janus -2F3B-2(11F46A)

L'échafaudage proposé comporte trois points d'ancrage, utilisables de façon séquentielle (Schéma 4.21). F3B et 11F46A seront fixés de part et d'autre du dendrimère grâce à deux réactions de chimie-click orthogonale, alors que la position centrale amino servira à fixer un agent d'imagerie telles que DOTA, NOTA ou Cy5.... Ces deux aptamères ayant une affinité forte pour la protéine hMMP-9, nous allons pouvoir nous servir de ce complexe comme d'un système de pince sur hMMP-9. De ce fait, cela nous permet d'augmenter l'affinité et par voie de conséquence le temps d'interaction entre notre complexe aptamère/marqueur et sa molécule cible.

B.5.1. Stratégie générale de synthèse

La stratégie adoptée pour synthétiser ce dendrimère a été dans un premier temps d'effectuer la synthèse du « cœur » de la molécule qui est un dendron à trois bras espaceurs. Dans un second temps, la synthèse des échafaudages qui possèdent également trois bras espaceurs sur lesquels les F3B et 11F46A ont été couplés. A la suite de l'analyse et la caractérisation des molécules obtenues, nous avons procédé à l'assemblage de ces synthons pour arriver à un seul dendrimère final (Schéma 4.21).

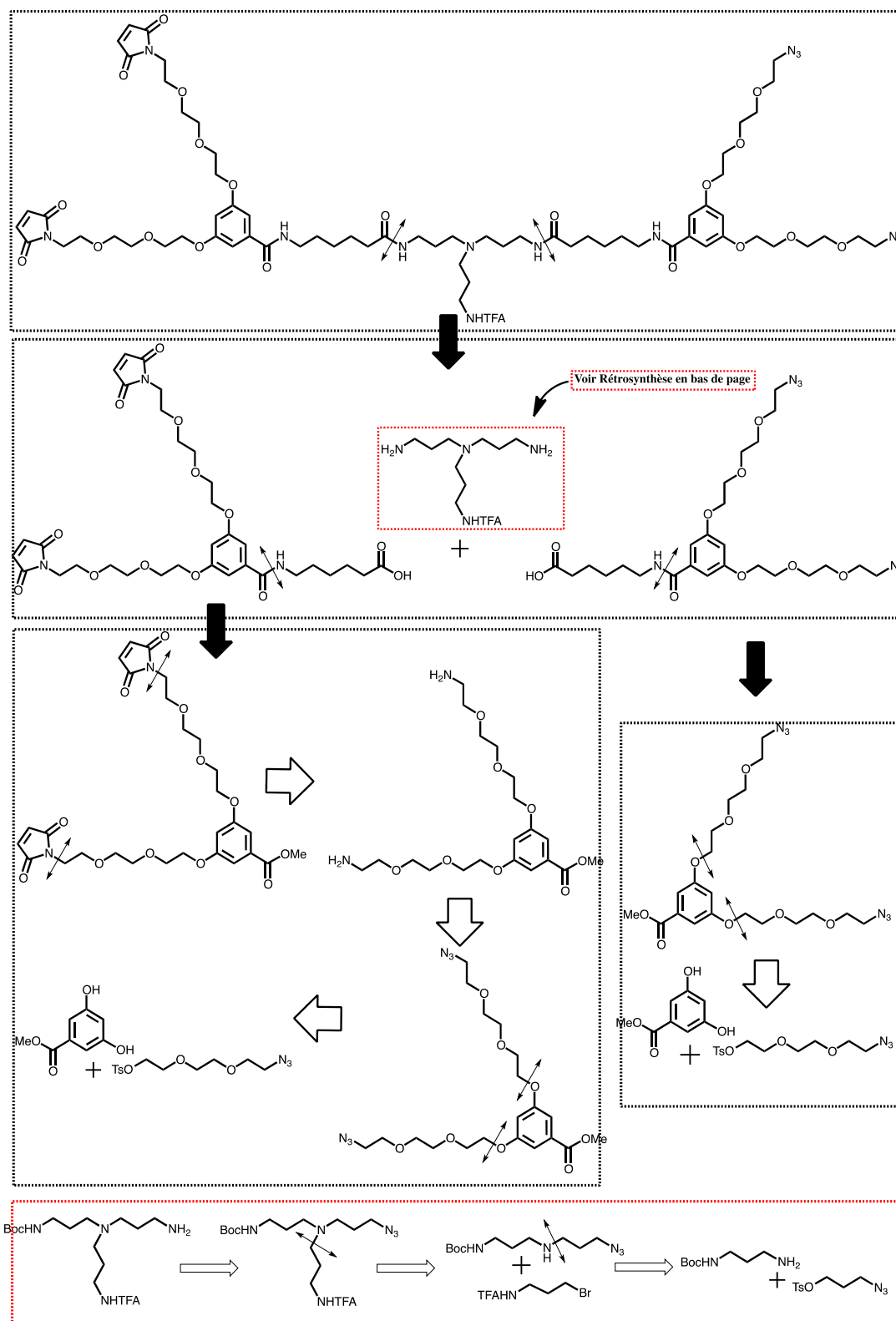


Schéma 4.21. Rétro synthèse générale de la sonde H₂N-dendrimère Janus -2F3B-2(11F46A)

B.5.2. Stratégie de synthèse détaillée

Le schéma 4.21 représente la synthèse générale du cœur tri-amino du dendrimère. Au bout de chacun de ces trois bras, nous aurons une amine primaire nous permettant d'y

attacher les deux autres parties du dendrimère final qui nous servent à accrocher les aptamères F3B et 11F46A. Nous avons choisi des protections orthogonales des amines, afin d'autoriser une introduction séquentielle des groupements sur les fonctions amines. Pour obtenir ces protections orthogonales, nous sommes partis de trois propylamines modifiées, assemblées séquentiellement pour conduire à l'échafaudage centré sur une amine tertiaire. Ce cœur à trois bras est obtenu par le couplage de trois « bras » qui sont respectivement les composés **17**, **18** et **19**.

La première étape de synthèse consiste à introduire un groupe azoture sur le bras espaceur bromopropanol, par substitution nucléophile de l'azoture de sodium sur le 3-bromopropan-1-ol commercial, dans du DMF. L'azoture de propanol-1 (Composé **16**, Schéma 4.22) a été obtenu avec un rendement de 69% [277].

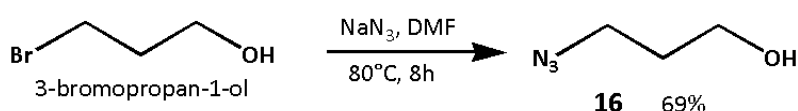


Schéma 4.22. Synthèse du 3-azoturepropan-1-ol, composé 16

La fonction hydroxyle du composé **16** est ensuite activée sous forme de groupement tosylé (Composé **17**, Schéma 4.23) [277] par réaction du chlorure de tosylé sur le composé **16**. La fonction hydroxyle a été remplacée par un groupement Ts-O⁻ qui est un meilleur groupe partant qu'un alcool afin de réaliser une substitution nucléophile avec un rendement de 28%.

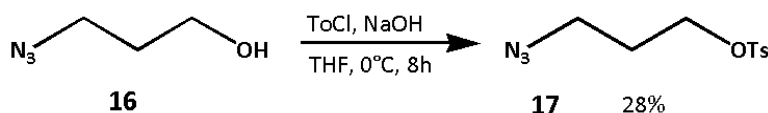


Schéma 4.23. Synthèse du propanglycol tosylé -azoture, composé 17

Le composé **18** est obtenu en une seule étape à partir du 1,3-diaminopropane commercial avec un rendement de 94% (Schéma 4.24) [278], la monosubstitution étant obtenue en jouant sur le nombre d'équivalents, l'ordre d'introduction des réactifs et le facteur de dilution. L'amine protégée par un Boc sera déprotégée par un traitement en milieu acide, au moment de l'incorporation des benzoates.

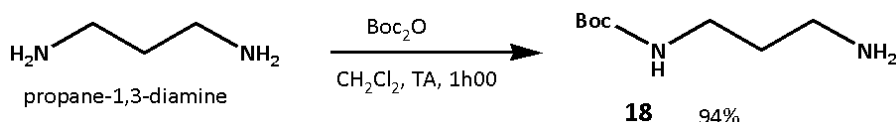


Schéma 4.24. Synthèse du tert-butyl 3-aminopropylcarbamate, composé 18

Le composé **19**, est obtenu en une étape à partir du 3-bromopropan-1-amine commercial avec un rendement de 80% (Schéma 4.25) [279]. L'amine est protégée par un groupement TFA. Cette amine constituera la 3^{ème} extrémité du dendrimère à 3 bras. Cette dernière

pourra être déprotégée à la demande en milieu basique avec du méthanol et de la potasse par exemple.

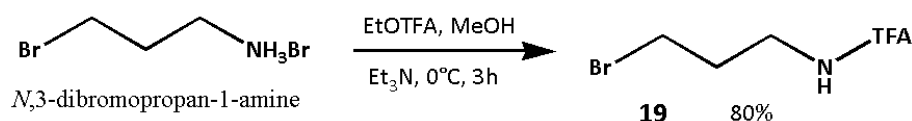


Schéma 4.25. Synthèse du N-(3-bromopropyl)-2,2,2-trifluoroacetamide, composé 19

Les composés **20** et **21** sont ensuite obtenus par substitutions nucléophiles en couplant les 3 bras espaceurs obtenus auparavant (Schéma 4.26) [271, 280]. Le composé **21** est confirmé par spectromètre de masse SM-ESI (Figure 5.22). Les bras espaceurs sont couplés un à un afin d'obtenir notre dendron à 3 bras espaceurs avec une amine tertiaire en guise de point de ramification [281]. Les extrémités de cette molécule sont respectivement NH-Boc, NH-TFA et N_3 . Nous avons bien une protection orthogonale des amines puisque le Boc et le TFA ne s'éliminent pas de la même façon. Enfin, la fonction azoture peut être réduite en amine primaire via la réaction spécifique de Staudinger [282] pour obtenir le produit **22**. Cette amine sera la 1^{ère} à réagir lors du couplage avec les deux autres dendrons en vue de l'obtention du dendron final. Les composés **20**, **21** et **22** sont obtenus avec un rendement de 47%, 37% et 73% respectivement.

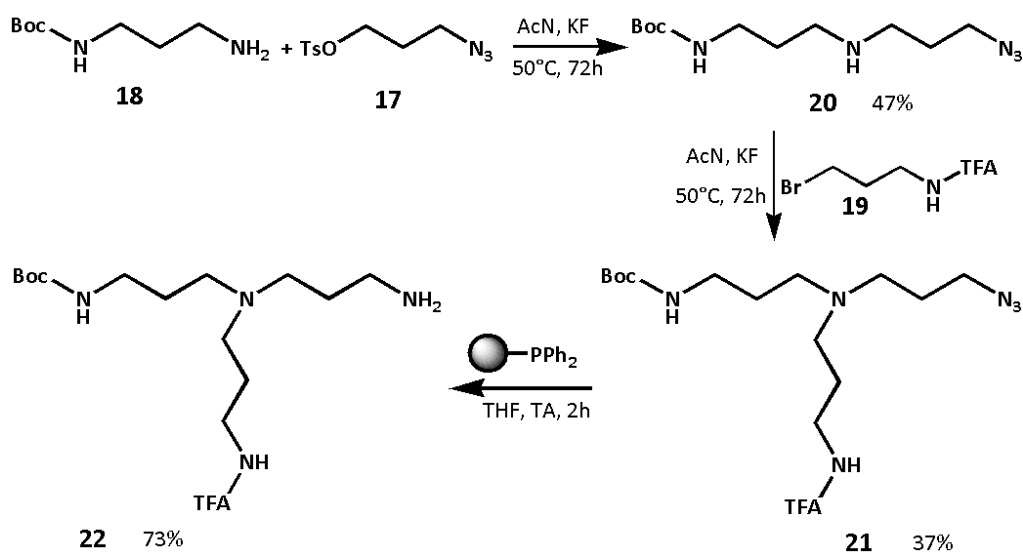


Schéma 4.26. Synthèse du cœur de dendron, composé 22

Le schéma 4.21 représente de synthèse générale du dendrimère à cœur benzoate, qui sera couplé au support tri-amino et qui nous permettra d'attacher 11F46A-alcyne grâce à ses deux bras aux terminaisons azoture. La synthèse du composé **23** s'effectue en une étape. La fonction d'ester de succinimide du composé **5** à former une liaison amide par réaction avec l'acide aminocaproïque commercial, conduisant au composé **23** avec un rendement de 50.2% (Schéma 4.27) [270].

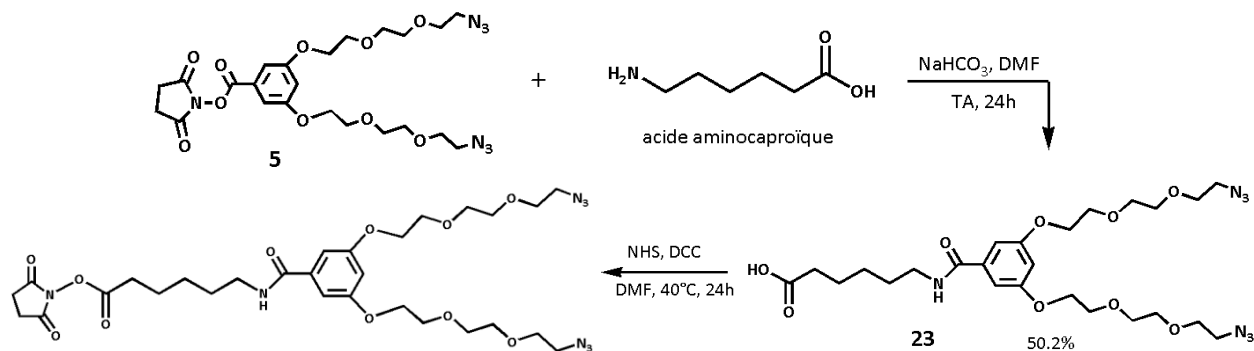


Schéma 4.27. Synthèse du dendron à 3 bras cœur benzoate terminaison azoture

La suite de la synthèse de ce composé **23** n'a pas pu être réalisée parce que la fonctionne acide carboxyle est plus stable par rapport la fonctionne NHS ester. Il nous restera à activer une nouvelle fois le OH du carboxyle [271] afin de terminer la synthèse de ce dendron et coupler ce dernier au dendron cœur tri-amino par liaison amide.

La synthèse de dendron à cœur benzoate terminaison maléimide n'a pas pu être terminée (Schéma 4.21). Ce dendron qui sera couplé au support tri-amino et qui nous permettra d'attacher F3B-espaceur HEG-SH grâce à ses deux bras aux terminaisons maléimide. On a commencé, dans la première étape, à générer les groupes maléimide par substitution nucléophile entre deux produit commerciaux 1H-pyrrole-2,5-dione et méthyle chloroformate en présence 4-méthylmorpholine, conduisant au composé **24** avec un rendement de 41.2% (Schéma 4.28) [283, 284].

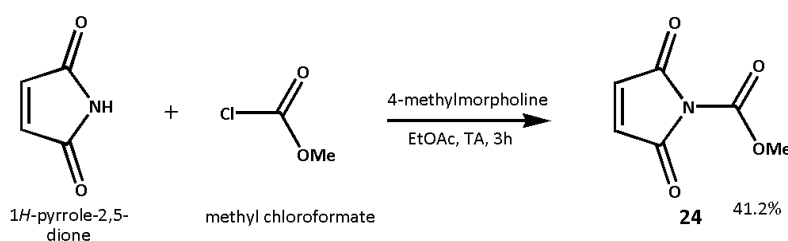


Schéma 4.28. Synthèse du composé 24

En parallèle, les fonctions azoture de composé **4** peuvent être réduites en amine primaire via la réaction spécifique de Staudinger [282] en utilisant la résine de tri-phenilphosphine pour obtenir le produit **25** avec un rendement de 97% (Schéma 4.29).

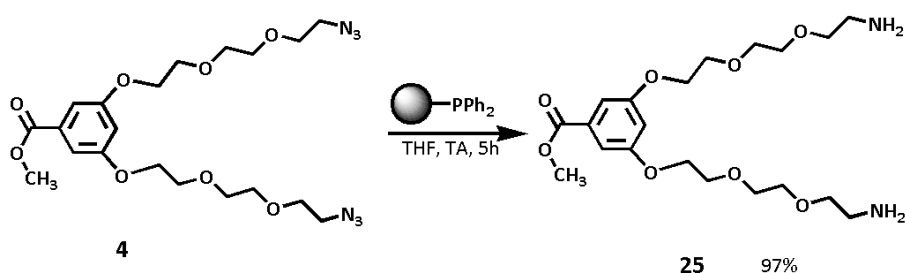


Schéma 4.29. Synthèse du composé 25

La suite de la synthèse sera le couplage entre les composés **24** et **25** afin d'obtenir le dendron à terminaison maléimide [284]. En suite, La fonction ester de ce composé sera hydrolysée en milieu basique par une solution de KOH (1M), pour générer l'acide carboxylique [265, 267]. L'acide carboxylique sera activé par la suite sous forme d'ester succinimide par le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), introduit en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DMF [269, 270]. La fonction d'ester de succinimide va former une liaison amide par la réaction avec l'espaceur acide aminocaproïque commercial, conduisant au dendron à cœur benzoate terminaison maléimide [270]. Une nouvelle activation du carboxyle de cœur permettra alors le couplage du synthon sur le cœur triamino (Schéma 4.30).

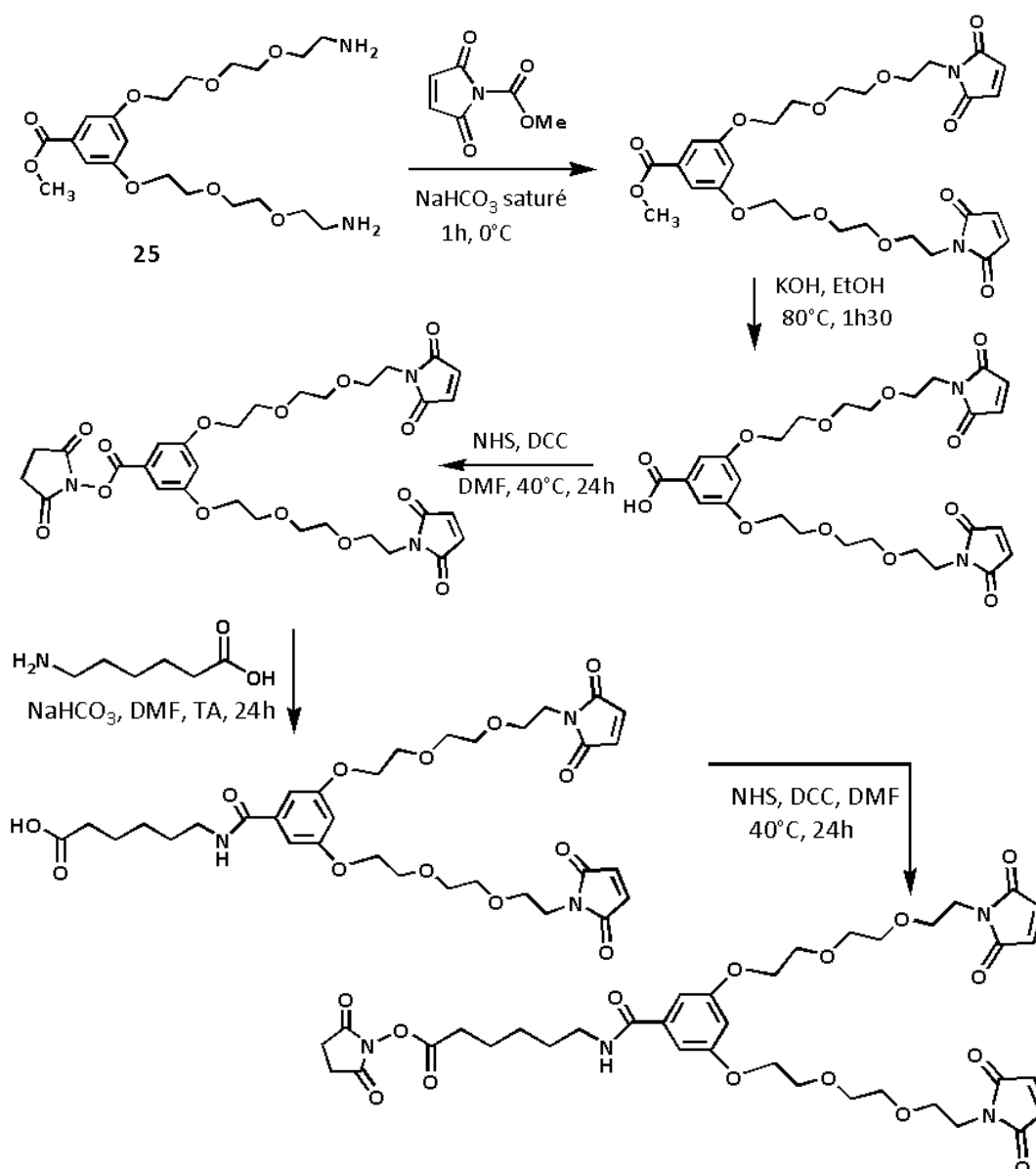


Schéma 4.30. Synthèse du dendron à 3 bras cœur benzoate terminaison maléimide

B.5.3. Couplage des 3 dendrons (perspective)

La schéma 4.31 montre de quelle façon les deux dendrons aux terminaisons azoture et maléimide sont couplés au dendron cœur tri-amino afin d'obtenir le dendrimère final. Le marqueur prendra donc la place du TFA qui nous reste à éliminer, F3B-SH sera couplé aux maléimide et 11F46A-alcyne sera quant à lui coupler aux azotures.

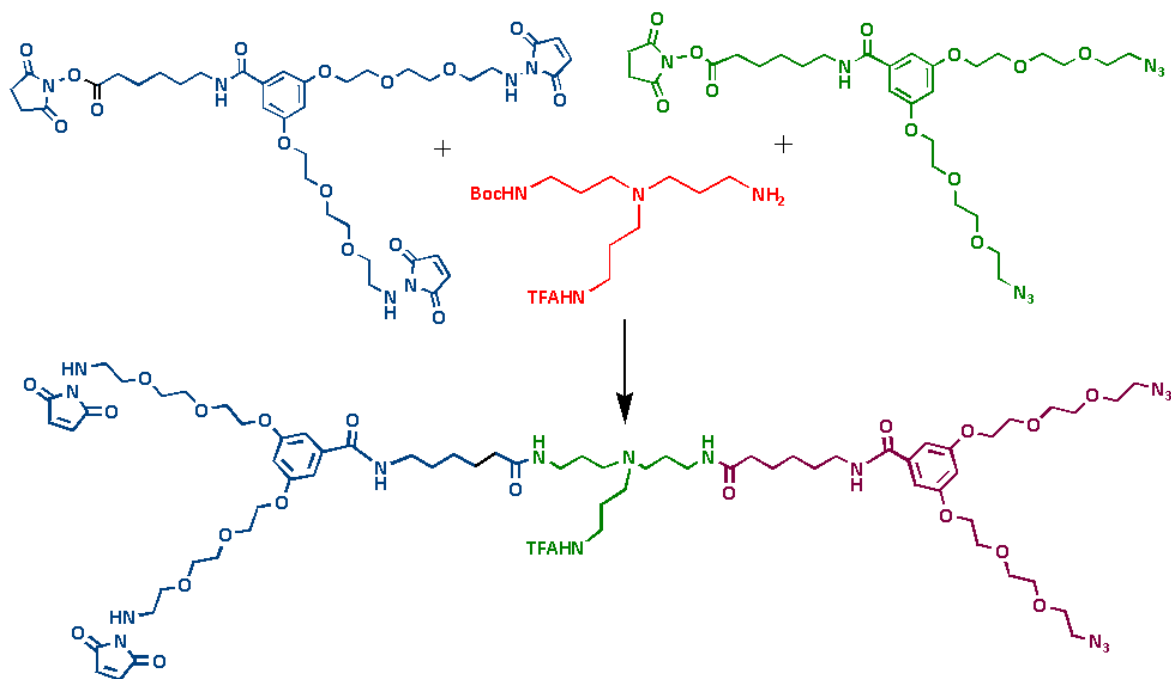


Schéma 4.31. Obtention du dendrimère final

B.6. Synthèse d'une plateforme biotine-dendrimère PAMAM-nF3B-nDOTA

Dans le même motif, afin d'améliorer l'affinité pour la molécule cible on se propose d'utiliser le dendrimère PAMAM-COOH (1.5G) sur laquelle 16 bras espaceur porteurs d'un groupement carboxylate qui seront activés sous forme NHS ester présents pour coupler 4 copies de l'aptamère DOTA-F3B-NH₂ (Figure 4.18).

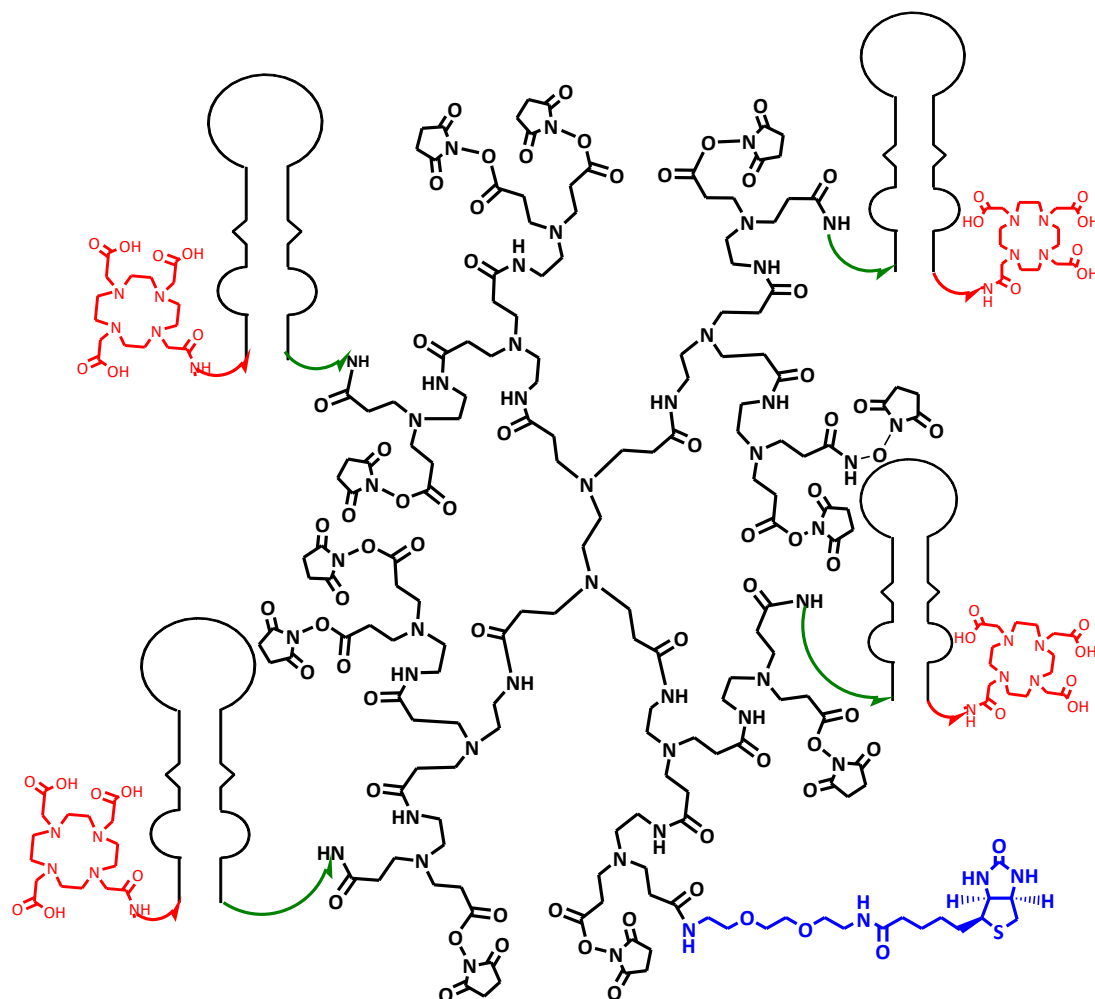


Figure 4.18. Plateforme multi-aptamères : biotine-dendrimer PAMAM-4F3B-4DOTA

B.6.1. Stratégie générale de synthèse

Dans un premier temps, une molécule de biotine-NH₂ sera greffée sur un seul site de la dendrimer PAMAM-16NHS (Composé **30**) en jouant sur le nombre d'équivalents des deux réactifs afin d'obtenir PAMAM (15NHS)-Biotine (Composé **31**). Ce composé permet de réaliser les études physico-chimiques par SPR puis dans un second temps l'aptamère DOTA-F3B-NH₂ sera greffé en jouant sur le nombre d'équivalents des deux réactifs (c'est-à-dire le composé **31** et DOTA-F3B-NH₂). Ainsi, une sonde multimérique et multifonctionnelle sera obtenue (Figure 4.17). Cette nouvelle sonde devant permettre de favoriser l'accumulation et la rétention spécifique au niveau des tumeurs ainsi que d'améliorer la détection (augmentation de la sensibilité avec la diminution du k_{off}). Le ligand DOTA fixé sur l'aptamère F3B permet la chélation d'¹¹¹In et ainsi de pouvoir visualiser ce traceur en TEMP.

Les oligonucléotides porteurs d'un ligand DOTA en position 5' et une fonction amine en position 3' ont été préparés en parallèle du composé dendrimer PAMAM-biotine porteur des fonctions NHS ester (Composé **31**). Le dendrimer PAMAM-16COOH a été choisi comme réactif initial de cette synthèse afin de fixer plusieurs copies de l'aptamère F3B-DOTA. La stratégie envisagée a été de préparer un bras espaceur triéthylène glycol porteur d'une

fonction azoture et une fonction amine (Composé **27**) afin de permettre un couplage peptidique la biotine active sous forme NHS ester (Composé **7**) pour obtenir le composé **28**. La fonction azoture de composé **28** sera réduite en fonction amine primaire en utilisant la triphénylphosphine sur support solide afin d'obtenir le composé **29**. Les fonctions acide carboxylique du dendrimère commercial PAMAMA-16COOH seront activer sous forme NHS ester (Composé **30**). En jouant sur le nombre d'équivalents des deux réactifs composé **29** et composé **30** afin d'obtenir le dendrimère PAMAM (15NHS)-Biotine (Composé **31**). Par la suite, l'aptamère DOTA-F3B-NH₂ sera greffé sur le composé **31** pour donner la sonde finale. La voie de rétro synthèse utilisée pour former la plateforme Biotine-dendrimère PAMAM-4F3B-4DOTA est présenté dans les schémas 4.32 et 4.33 :

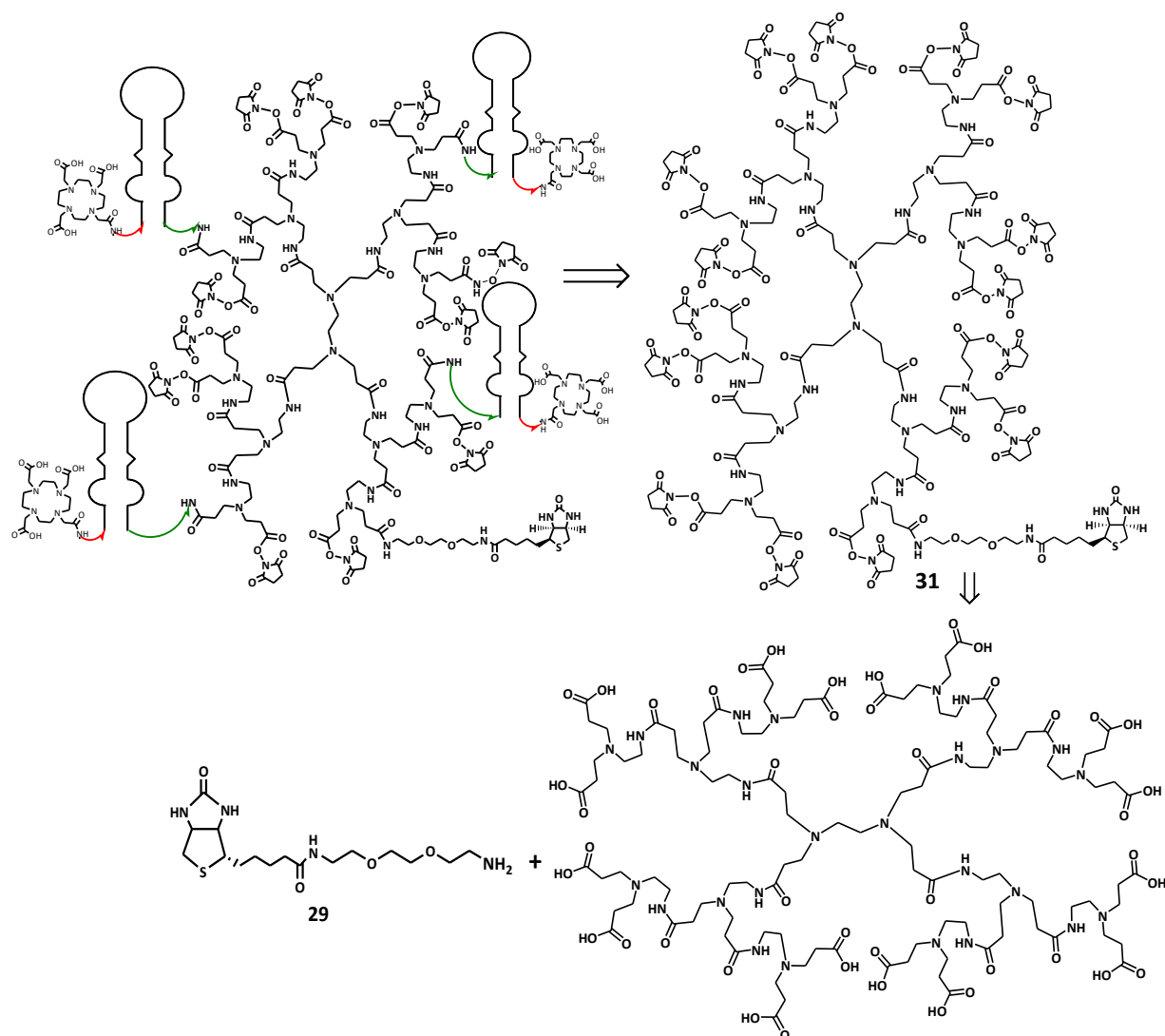
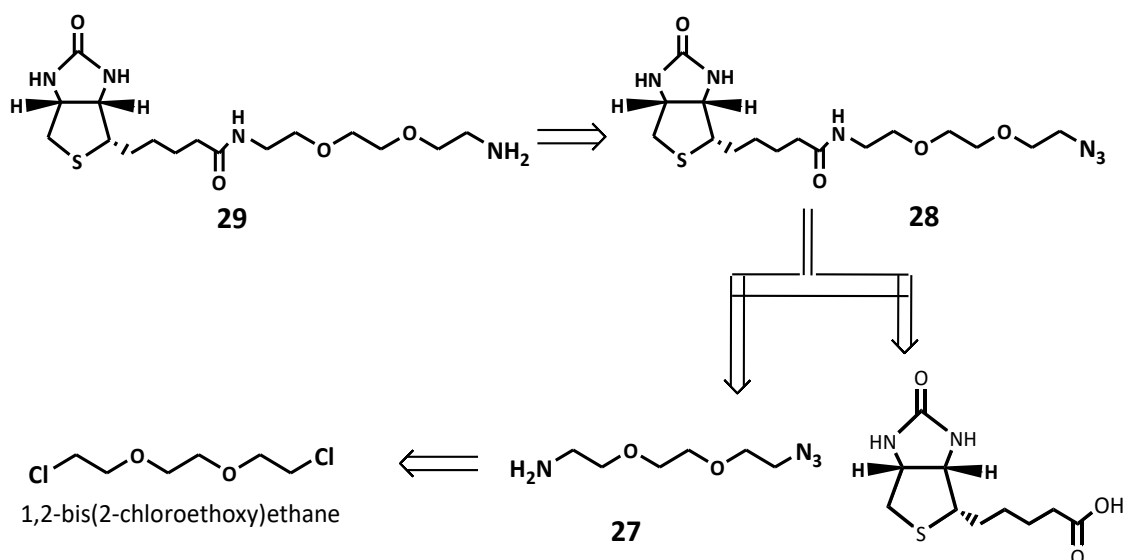


Schéma 4.32. Stratégie de synthèse de la plateforme biotine-dendrimère PAMAM-4F3B-4DOTA

Schéma 4.33. Stratégie de synthèse de la plateforme biotine-bras espaceur-NH₂

B.6.2. Stratégie de synthèse détaillée

La première étape de synthèse consiste à introduire deux groupes azoture sur le bras espaceur triéthylène glycol, par substitution nucléophile de l'azoture de sodium sur le di-chloro-triéthylène glycol commercial, dans du DMF/H₂O 9/1 v/v. Le di-azoture de triéthylène glycol (Composé **26**, Schéma 4.34) a été obtenu avec un rendement de 80% [282].

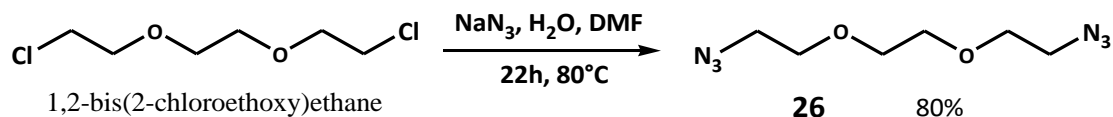


Schéma 4.34. Synthèse du triéthylène glycol azoture, composé 26

L'un de deux fonctions azoture du composé **26** est ensuite réduite en fonction amine primaire en milieu acide HCl (1N) (Composé **27**, Schéma 4.35) avec un rendement de 70% [282].

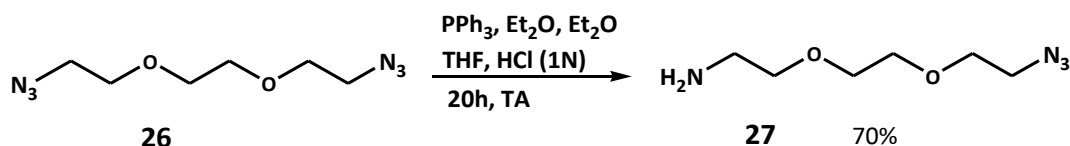


Schéma 4.35. Synthèse de l'amine-triéthylène glycol azoture, composé 27

Il est à noter que la préparation de composé **27**, par dissymétrisation de l'azoture, est une étape délicate, à cause du réactif de la réaction de Staudinger, PPh₃, et de son produit PPh₃=O. En fait, le milieu acide ici HCl a aidé à l'obtention d'une seule fonction amine selon le mécanisme réactionnel suivant (Schéma 4.36) :

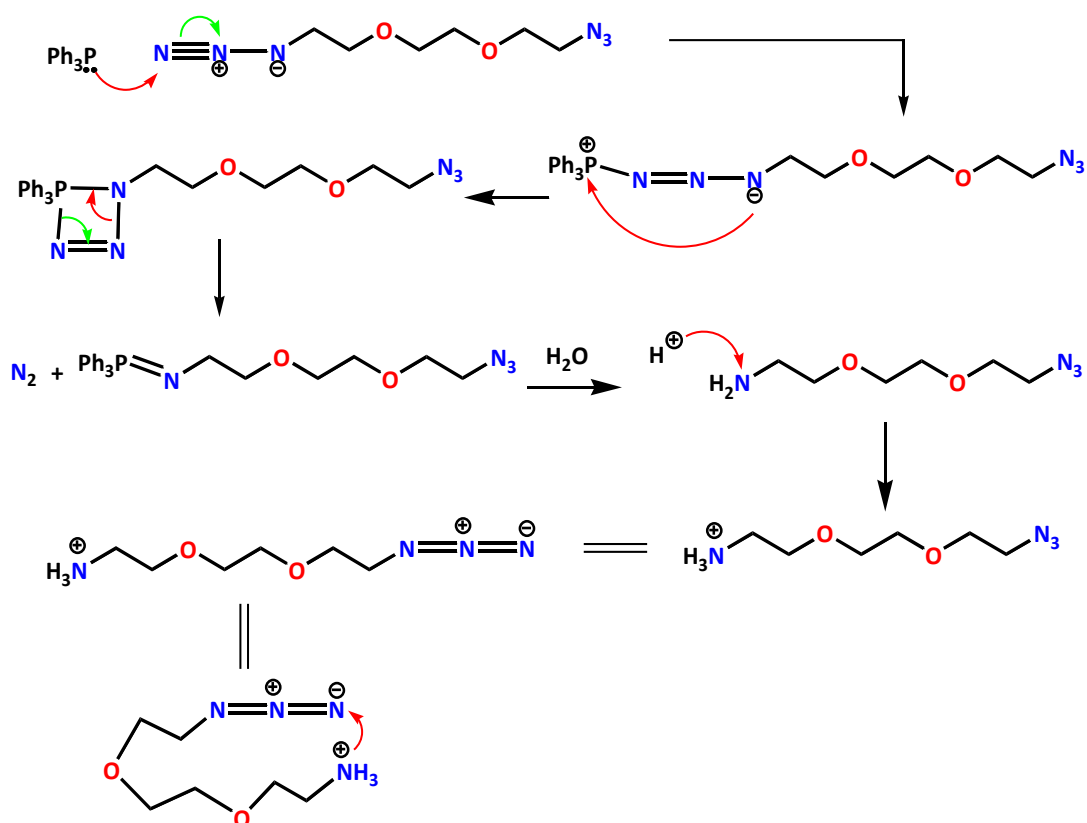


Schéma 4.36. Mécanisme réactionnel de formation de l'amine-triéthylène glycol azoture, composé 27

La biotine-bras espaceur triéthylèneglycol- N_3 (Composé **28**) est obtenue par couplage peptidique entre les composés **7** et **27** en présence de triéthylamine dans le DMF [270, 272]. Après purification sur une colonne de silice le produit **28** a été isolé avec un rendement de 64 % (Schéma 4.37).

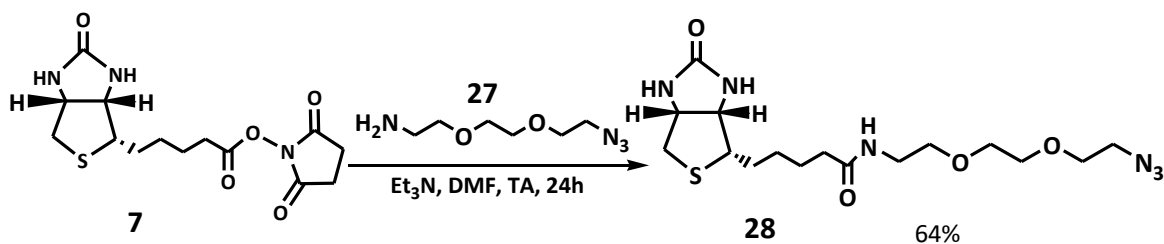


Schéma 4.37. Synthèse de la biotine-bras espaceur triéthylèneglycol- N_3 , composé 28

La fonction azoture du composé **28** est ensuite réduite sous forme de groupement amine primaire (Composé **29**, Schéma 4.38) avec un rendement de 98.3% [272, 281] en utilisant résine de PPh_3 . Ce couplage a été confirmé par spectrométrie de masse SM-ESI (Figure 5.23).

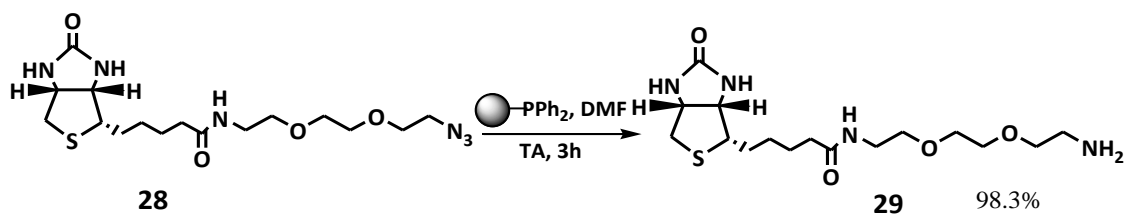


Schéma 4.38. Synthèse du composé 29

L'activation des fonctions carboxylique de dendrimère PAMAM-16COOH commercial sous forme d'ester succinimide est obtenue avec un rendement de 93.1% (Composé **30**, Schéma 4.39) par un excès le *N*-hydroxysuccinimide (NHS), introduit en présence de *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) dans le DMF [269, 270].

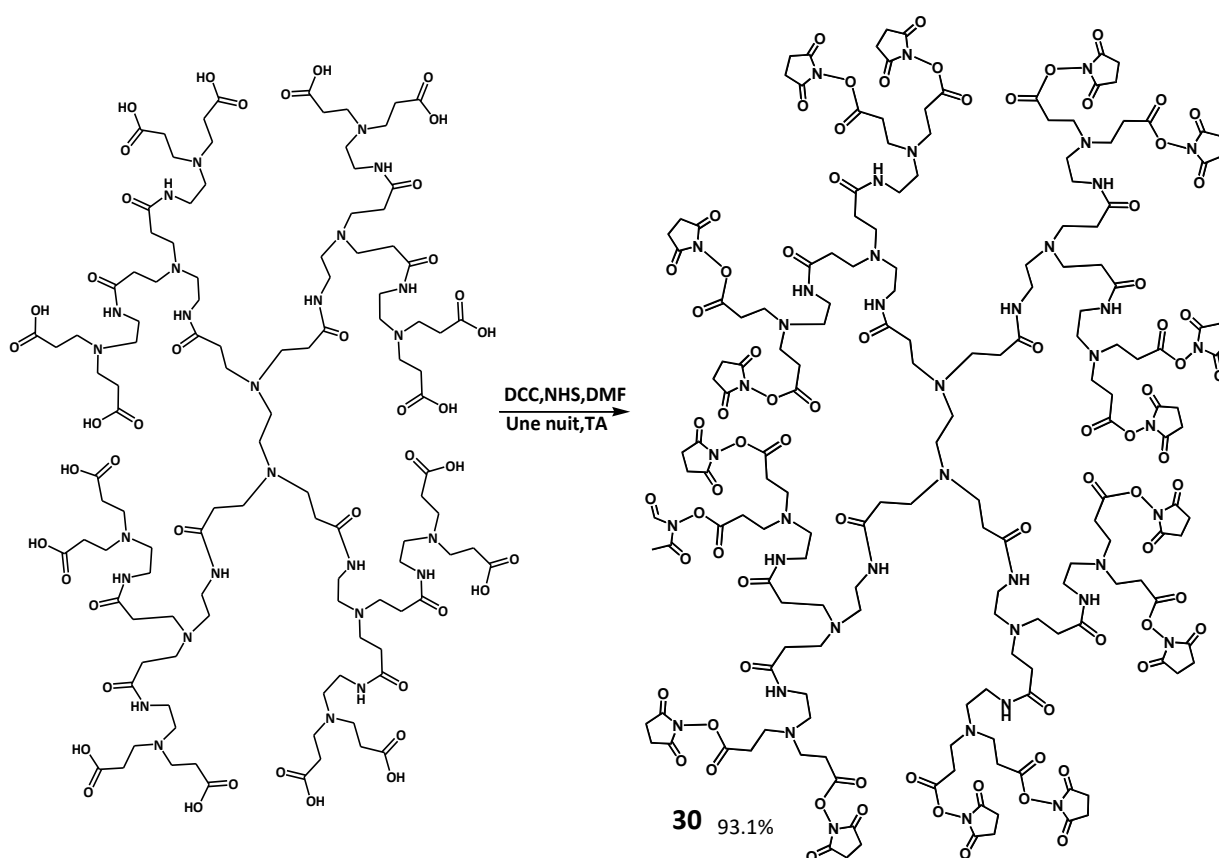


Schéma 4.39. Synthèse du composé 30

La fixation d'une seule molécule biotine-NH₂ (Composé **29**) sur le dendrimère PAMAM-16NHS (Composé **30**) est faite en utilisant un équivalent de chaque réactif pour obtenir le produit dendrimère PAMAM (15NHS)-Biotine (Composé **31**, Schéma 4.40) avec un rendement de 89.76% [270, 272], ce couplage a été confirmé par une CCM avec un révélateur chimique spécifique de la biotine (Révélateur Biotine/Indole).

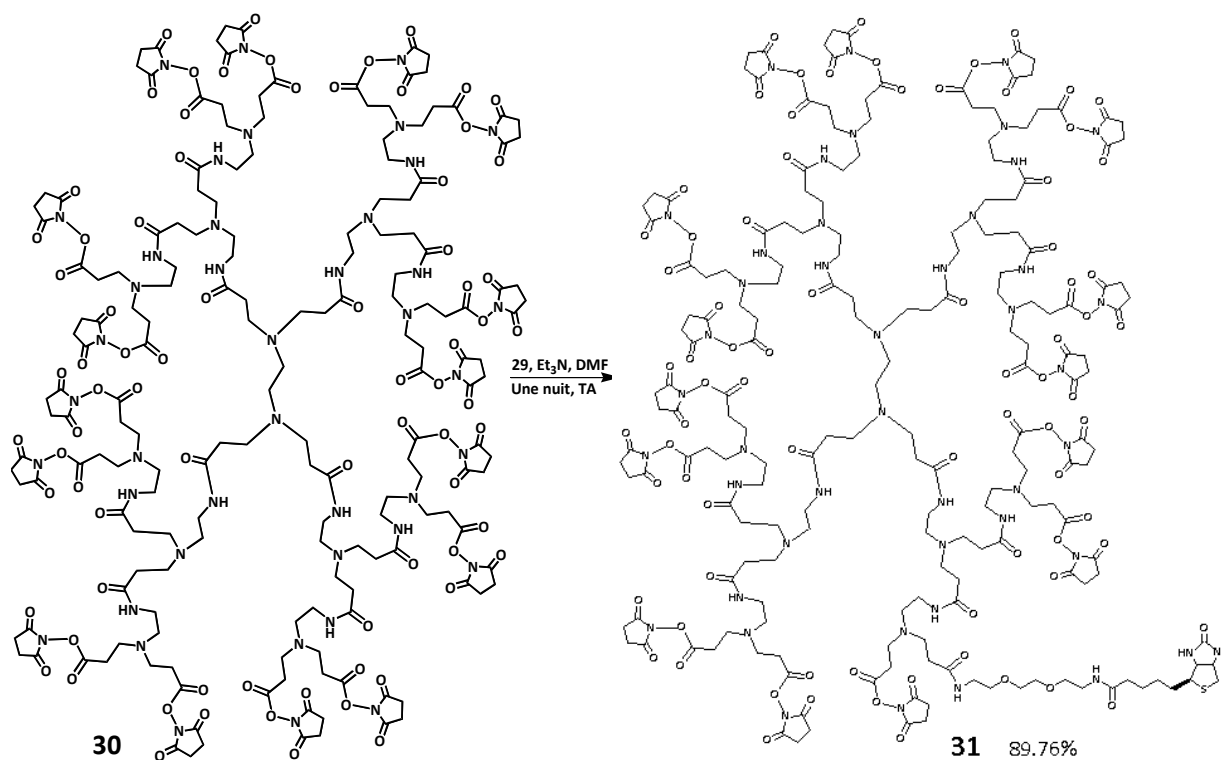


Schéma 4.40. Synthèse du composé 31

La dernière étape de cette sonde sera de greffer 4 copies de l'aptamère DOTA-F3B-NH₂ sur le composé **31** en jouant sur le nombre d'équivalents des deux réactifs. Une fois cette sonde obtenue, des études physico-chimiques par SPR seront réalisées, par la suite le ligand DOTA sur la même sonde permettra la chélation d'¹¹¹In et ainsi de pouvoir visualiser ce traceur en TEMP sur des souris xéno greffées.

Conclusions Générale et perspectives

L'objectif principal de cette thèse a consisté en la synthèse de sondes utilisables en imagerie biomédicale porteuses d'aptamères pour la détection de la métalloprotéase matricielle hMMP-9 des tumeurs. Cette protéine est fortement surexprimée dans ces cancers; elle est impliquée dans l'invasion tumorale, en dégradant la matrice extracellulaire, permettant ainsi la migration des tumeurs. L'aptamère anti hMMP-9 a été développé au sein de notre laboratoire INSERM U1212 (ex-U869) [236]. Après des essais concluants de détection de la protéine sur des coupes de tumeurs, il a été intéressant de transformer cet aptamère en une sonde pour l'imagerie biomédicale. Différentes approches ont alors été suivies : une approche monomère c'est-à-dire la synthèse d'une molécule porteuse de seulement une copie de l'aptamère F3B (Chapitre III), une approche multimériques c'est-à-dire la synthèse de dendrimères/dendrons portant plusieurs copies de l'aptamère F3B (Chapitre IV) et une approche multimériques et multifonctionnelles c'est-à-dire la synthèse de dendrimères/dendrons portant deux aptamères différents (F3B, 11F46A) ciblant les hMMP-9 (Chapitre IV). La caractérisation de ces sondes *in vitro* et *in vivo* sur un modèle animal a nécessité l'usage de modèles tumoraux pour lesquels l'hMMP-9 est surexprimée. Le mélanome et le glioblastome malins ont donc été sélectionnés pour fournir les supports cellulaires et tissulaires nécessaires à ce projet.

La première approche a été suivie en synthétisant dans un premier temps, des aptamères modifiés utilisables en imagerie, liés à une fonction amine sur l'extrémité 5' en vue de l'introduction dans un second temps, d'un ligand porteur d'une fonction NHS ester telles que MAG₃-NHS ester, DOTA-NHS ester ou Cy5-NHS ester par liaison peptidique. Le couplage de diverses biomolécules sur cette plateforme a permis de valider la méthode de bioconjugaison et ainsi d'obtenir un ensemble de précurseurs pouvant être marqués et utilisés par différentes modalités d'imagerie afin de détecter les hMMP-9 surexprimés dans un certain type de tumeurs. L'affinité des nouveaux conjugués (DOTA, Cy5) pour l'hMMP-9 a été évaluée par SPR. Il a ainsi été démontré que l'efficacité de l'aptamère pour la détection de sa molécule cible était conservée. Le dérivé F3B-DOTA a été marqué à l'¹¹¹In pour permettre une imagerie en TEMP. Ce radiotracer a présenté une forte affinité pour les hMMP-9 et a permis de les détecter efficacement. Il convient de poursuivre l'étude de la dosimétrie liée à l'usage de ce traceur afin de permettre l'élaboration d'essais cliniques. En parallèle, le traceur F3B-Cy5 a été injecté chez des souris porteuses de mélanome. Une augmentation du signal de fluorescence à l'intérieur de la tumeur a ainsi pu être observée. Des études de biodistribution des conjugués F3B-DOTA et F3B-MAG₃ ont été réalisées sur des souris porteuses de mélanome, en collaboration avec le CHU de Lyon (éq. du Pr. Marc Janier) et des études *ex-vivo* sur des coupes de tumeurs ont été réalisées en collaboration avec le CHU de Bordeaux, (éq. du Pr. Philippe Fernandez). L'affinité de l'aptamère F3B-espacer HEG-ATTO a également été déterminée par polarisation de la fluorescence. En conclusion, ces traceurs monomériques nécessitent encore d'être améliorés et caractérisés mais constituent une piste intéressante pour l'imagerie de l'expression de marqueurs

tumoraux. Sur la même approche pour la sonde DOTA-F3B-PEG₂₀₀₀₀, nous avons synthétisé l'aptamère F3B porte une fonction amine et un alcyne, pour fixer le DOTA-NHS ester par un couplage peptidique et le PEG₂₀₀₀₀-N₃ par chimie «click». Malheureusement, le produit obtenu n'a pas confirmé par spectrométrie de masse. Donc, on est en trains de refaire cette manipulation avec une nouvelle stratégie (sur les billes). La chaîne PEG₂₀₀₀₀ devrait permettre d'augmenter le point moléculaire de la sonde, et donc d'améliorer sa biodistribution *in vivo*.

La deuxième approche présente l'avantage d'avoir sur une même molécule (dendrimère/dendron) plusieurs copies de l'aptamère F3B. Cela devrait permettre d'augmenter le point moléculaire de la sonde et d'améliorer l'affinité envers sa cible, et donc d'améliorer sa biodistribution *in vivo*. Nous avons synthétisé plusieurs dendrons portant deux ou trois bras espaceur fonctionnalisés par un groupement azoture avec de bons rendements. Ces dendrons ont ensuite pu être couplés aux aptamères par chimie «click». Le dendron porte également une fonction amine NH₂ utilisée dans un premier temps pour fixer une biotine, afin de déterminer l'affinité K_d de cette nouvelle sonde par SPR. Dans un deuxième temps un ligand de type DOTA sera fixé, pour permettre la chélation d'¹¹¹In afin de pouvoir visualiser ce traceur en TEMP. La synthèse d'une sonde dimérique de F3B a été réalisée. Une synthèse en solution a dans un premier temps été testée mais l'introduction de deux copies de F3B n'a pu être réalisée. Une synthèse sur support solide (CPG) a alors, dans un deuxième temps, été utilisée pour obtenir cette sonde dimérique afin de montrer par SPR qu'il est possible d'améliorer l'affinité de la sonde. Cependant, le résultat obtenu n'a pas été celui escompté. Ce résultat est attribué à une masse moléculaire trop élevée et des causes de gêne stérique [239, 240]. Il serait intéressant de refaire cette manipulation en immobilisant une concentration plus faible de la sonde sur la biopuce. Par la suite, un ligand de type DOTA a été fixé sur cette sonde afin de permettre la chélation d'¹¹¹In pour permettre une visualisation en TEMP du traceur. Une étude de biodistribution *in vivo* de cette sonde est en cours.

La troisième approche présente l'avantage d'avoir sur une même molécule (dendrimère/dendron) deux aptamères différents (F3B et 11F46A) dirigés contre la protéine hMMP-9 (sonde multimérique). La synthèse de cette plateforme a donné de bons résultats. L'inconvénient de la stratégie utilisée est son coût élevé. Il a donc été choisi de se tourner vers la stratégie séquence complémentaire. En parallèle sur la même approche, on a commencé à synthétiser une plateforme (dendrimère Janus) permettant la fixation de deux copies de chaque aptamère à disposition, F3B et 11F46A, afin d'obtenir une sonde tétramérique bifonctionnelle, il nous reste à réaliser le fragment 2 de ce dendron, en suite, nous allons procéder à l'assemblage de ces synthons pour arriver à un seul dendrimère final. Une fois ce dendrimère est obtenu, il sera intéressant de fixer les deux aptamères F3B-

alcyne et 11F46A-SH de part et d'autres du dendrimère grâce à deux réactions de chimie-click orthogonale, alors que la position centrale amino servira à fixer la biotine, en première temps, pour déterminer l'affinité de cette sonde en SPR. En suite, un agent d'imagerie pour les différents types d'imageries.

Enfin, afin d'obtenir des traceurs PAMAM-nF3B-nDOTA, seule l'étape de couplage le F3B-DOTA-NH₂ sur le dendrimère PAMAM-NHS reste à réaliser et caractérisation de cette sonde en SPR. La suite de cette étape sera de synthétiser le traceur PAMAM-nF3B-nDOTA, et il sera intéressant d'étudier leur biodistribution *in vivo*, des tests de toxicité pourraient être effectués, ce que nous n'avons pas eu le temps de faire.

CHAPITRE V :

PARTIE EXPERIMENTALE

A. Matériel et méthodes

A.1. Solvants et réactifs

Les manipulations ont été effectuées sous atmosphère inerte d'argon à l'aide d'une rampe à vide.

Les produits commerciaux utilisés proviennent, pour la plupart, des sociétés Sigma-Aldrich et Alfa Aesar ont été utilisés sans purification préalable. Dans les expériences nécessitant des solvants anhydres, triméthylamine, acétonitrile, sont distillés sur hydrure de calcium (CaH_2) sous argon et stockés sur tamis moléculaire à l'abri de la lumière.

Le N,N-diméthylformamide (DMF), le diméthylsulfoxyde (DMSO), le dichlorométhane (CH_2Cl_2), la pyridine (Py), la dioxine, tétrahydrofurane (THF), le N-méthylpyrrolidone (NMP), la toluène, l'éthanol absolu (EtOH), de qualité Synthèse, lorsqu'il est fourni par la société Sigma-Aldrich (anhydre), ainsi que les réactifs commerciaux sont utilisés sans purification préalable comme la diisopropyléthylamine (DIEA), *n*-butyllithium (*n*-BuLi), lithium bis(triméthylsilyl) amide (LiHMDS).

Les solvants deutérés CD_3OD , DMSO-d_6 , CDCl_3 , D_2O sont utilisés directement sans purification sous leurs forme commerciale. CDCl_3 est passé sur une colonne d'alumine avant utilisation, afin de neutraliser son acidité pour les produits sensibles à l'acide.

La température ambiante est comprise entre 20 et 27°C. Les réactions à basses températures sont réalisées dans un bain de glace (0°C). Les évaporations sont conduites sous pression réduite grâce à un évaporateur rotatif de marque Heidolph (Laborota 4000-efficient) où la pression réduite a été obtenue par l'utilisation d'une trompe d'eau, à des températures inférieures à 40°C et à 50°C pour le DMF.

Puce de streptavidine (SAD 200m Xantec, lot SC SAD 200m0114.a). hMMP-9 est obtenue auprès de la société Calbiochem (lot : D00171988). Black, 384 WELL, 127.0/85 MM, non Binding (Référence 381900, lot E13Ø7ØEA).

A.2. Techniques Chromatographiques

A.2.1. Chromatographies sur couche mince (CCM) :

La progression des réactions sont effectuées par chromatographie sur des feuilles couche mince en employant des plaques commerciales de silice sur aluminium Merck (silica gel 60 F₂₅₄). La révélation des plaques CCM se fait dans un premier temps sous UV 254 nm et 365 nm suivie (si nécessaire) la révélation chimique (I_2 , H_2SO_4 10%, Ninhydrine, PMA: Acide PhosphoMolybdique, KMnO_4 , Biotine/Indole, CAM: Cérium Ammonium Molybdate), suivie d'un chauffage en utilisant un séchoir à air chaud.

A.2.2. Chromatographies sur colonne:

Les séparations par chromatographies sur colonne ouverte ou chromatographies flash sont faites sur gel de silice 60 (43-60 μm) de Merck, poussée à l'air comprimé. Les solvants d'élution sont indiqués en rapport de volume et sont utilisés sans purification supplémentaire sous leurs formes commerciales.

A.2.3. Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN):

Résonance Magnétique Nucléaire ont été enregistrés sur un appareil Brüker Avance 300, fonctionnant à 300 Mhz en ^1H , 75 MHz en ^{13}C et 120 MHz en ^{31}P , à température ambiante à partir d'échantillons en solution dans des solvants appropriés. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en parties par millions (ppm) relativement au signal résiduel du solvant utilisé comme référence interne (CDCl_3 : δ 7,26 ppm; CD_3OD : δ 3,31 ppm; DMSO : δ 2,50 ppm) et Pour la RMN du carbone, les valeurs suivantes ont été employées: (CDCl_3 : δ 77,0 ppm; CD_3OD : δ 49,0 ppm; DMSO : δ 39,0 ppm). La présence de protons échangeables (alcools, amines) est confirmée par ajout de D_2O . Les constantes de couplage (n J) sont exprimées en Hertz (Hz). Les abréviations suivantes sont utilisées pour décrire la multiplicité des signaux : s : singulet; d : doublet; t : triplet; q : quadruplet; quint : quintuplet; m : multiplet; dd : doublet de doublet.

A.2.4. Spectres de masse (MS/ESI):

Les spectres de masse Haute Résolution sont effectuées par le Centre d'Etude Structurales et d'Analyses des Molécules Organique (CESAMO) à l'Université Bordeaux ou ils sont effectuées par l'Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB) PESSAC, en ionisation électrospray (ESI), en mode positif (+). Les solvants employés ont été le chloroforme, le méthanol et le dichlorométhane.

A.2.5. Stockage des produits chimiques :

Toutes les molécules chimiques sont séchées sous vide à l'aide d'une rampe à vide ou dans un dessiccateur contenant de l'anhydride phosphorique (P_2O_5). Ensuite, elles sont stockées sec dans le frigo à + 4°C.

A.2.6. Rendements :

Les rendements chimiques des produits isolés purs sont exprimés en pourcentages molaires (%) par rapport au produit de départ en défaut.

A.2.7. Révélateur chimique :

A.2.7.1. Révélateur Biotine/Indole, 300 ml : On dissout 1.5 g de diméthylaminocinnamaldehyde dans 150 ml de HCl 5 M et on ajoute 150 ml d'EtOH. Conservation au frigo.

A.2.7.2. Révélateur Ninhydrine : 300 mg ninhydrine, 5 ml 2,4,6-collidine, 5 ml acide acétique 96% et 95 ml isopropanol.

A.2.7.3. Révélateur KI/I₂, 200 ml : S₁ : 4 g de KI dans 25 ml d'eau Q, ajoute 1.27 g de I₂. Le volume est complété à 100 ml avec de l'eau milliq. S₂: 100 ml H₂SO₄ 10%. On ajoute S₂ sur S₁. Conservation au frigo à l'abri de la lumière.

A.3. Oligonucléotides

A.3.1. Synthèse

Les oligonucléotides utilisés sont synthétisés dans notre laboratoire, INSERM U869, Université de Bordeaux Segalen, France). Ils sont préparés selon la méthode aux phosphoramidites β-cyano-éthyle sur un synthétiseur Expedit 8909, à l'échelle de 1 μmol. Les billes de CPG (porosité 1000 Å) de la colonne sont fonctionnalisées avec le nucléotide (A, C, G ou T) correspondant à la position 3' terminale de l'oligonucléotide.

A.3.2. Déprotection des oligonucléotides

Après avoir fait chaque synthèse des oligonucléotides, il est nécessaire de cliver les oligonucléotides du support solide et aussi d'enlever les différents groupements protecteurs, Donc les supports solides portant les dérivés F3B et son Contrôle sont transférés dans deux tubes eppendorf 2 ml à bouchon vissé et incubés dans 1 ml d'ammoniaque concentrée 28-30%, sous agitation et à 55 °C pendant 5h. Le milieu est progressivement laissé refroidir à température ambiante 3 min. Chaque brut de déprotection a été transféré dans un nouveau tube eppendorf sous l'hotte et les billes sont rincées par de l'eau (3x250μL). Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speed-vac (SC110 A speed-vac plus), puis solubiliser dans 200μl d'eau milliq. Les échantillons sont filtrés à l'aide de filtres adaptables sur une syringe filtre (membrane 0.4 mm). Les oligonucléotides sont purifiés par CLHP sur une colonne HEG de phase inverse ou par PAGE 10-20%, (dénaturation sur gel de polyacrylamide), récupérés par électro élution (système BioRad) et dialysés (citrate d'ammonium 0,1M; 3h). Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par Nanodrop et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Il existe aussi d'autres étapes de déprotection à réaliser en fonction de la nature des oligonucléotides utilisées. Par exemple pour les ARNs, les hydroxyles en 2' sont protégés par un groupement terbutyldiméthylsilyle (TBDMS), donc la déprotection de ce groupe est réalisée par une solution de fluorure de tétrabutylamonium/triéthylamine (HF/TEA).

A.3.3. Déprotection le MMTr ou DMTr des oligonucléotides

A la suite de l'étape de Déprotection les oligonucléotides sur le support solide, un traitement acide par une solution aqueuse d'acide acétique 80 % 2h à 25°C, a permis la déprotection du groupement MMTr ou DMTr. Ensuite, les oligonucléotides ont été évaporés à sec par le Speed-vac.

A.3.4. Analyse et purification

Différents systèmes chromatographiques ont été utilisés à des fins analytiques et de purifications, les spectres CLHP, analytique et préparative, sont obtenus sur un appareil Hitachi, le système est composé d'une pompe, d'un injecteur, d'une colonne HEG et d'un détecteur UV (détection à 260 nm).

CLHP analytique sur une colonne C-18 (Macherey-Nagel, 100-5 HEG ec, 5 μ , 4.6 x 250 mm)

CLHP semi-préparative sur une colonne C-18 (Macherey-Nagel, 100-7 HEG ec, 10 μ , 10 x 250 mm).

A.3.4.1. Analyse par CLHP en phase inverse

Chaque oligonucléotide est analysé par CLHP analytique phase inverse sur une colonne HEG, cette technique a permis de séparer et donc de purifier des oligonucléotides de séquences et de tailles variées, en fonction de leur hydrophobicité. 2 μ l de l'échantillon diluée avec 20 μ l de l'eau Milliq sont injectés. L'éluion est réalisée à 25°C à l'aide d'un tampon TEAA 0,5 M pH 7,0 selon un gradient allant de 95% TEAA 0.1 M / 5% acétonitrile à 20% TEAA 0.1 M / 80% acétonitrile en 45 minutes avec un débit de 1 mL/min, Détection : UV à $\lambda = 260$ nm.

A.3.4.2. Purification par CLHP préparative en phase inverse

La totalité du volume contenant les oligonucléotides est injecté en CLHP préparative. Les fractions collectées sont contrôlées en CLHP analytique dans les mêmes conditions que précédemment avec un débit de 5 mL/min, Détection: UV à $\lambda = 260$ nm.

Les purifications sur colonne d'exclusion stérique sont réalisées sur une colonne G-25 SephadexTM en utilisant de l'eau milliq comme éluant.

A.3.4.3. Quantification des oligonucléotides par Nanodrop ND-1000

Les quantités d'oligonucléotides sont données en unités de DO (densité optique) mesurées à la longueur d'onde de 260 nm sur un appareil spectrophotomètre (Nanodrop ND-1000). En utilisant généralement des tampons l'eau MQ qui n'absorbent pas ou peu dans le domaine de longueurs d'onde étudiées 260 nm, PH neutre. Une unité de DO est la quantité d'oligonucléotide qui donne une absorbance de 1 quand elle est dissoute dans 1 mL de tampon et mesurée dans une cuve de trajet optique 1 cm. Cette unité découle de la loi de Beer-Lambert : $DO = \xi \cdot C \cdot L$ où DO: est l'absorbance, L: le trajet optique de la cuve (cm), C: la concentration de la solution analysée ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) et ξ le coefficient d'extinction molaire du composé en solution à une longueur d'onde précise ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

A.3.4.4. Stocks des oligonucléotides

Tous les stocks d'oligonucléotides sont conservés à -20°C dans de l'eau MQ pour éviter l'introduction d'ions non désirés, pouvant ainsi influencer la stabilité et la cinétique de

formation de certaines structures ou ils sont conservés sec après séché les oligonucléotides sur un appareil speed-vac.

A.3.4.5. Les spectres de masse

Les analyses de masse des oligonucléotides sont effectuées à Centre de Génomique Fonctionnelle (CGF) à l'Université de Bordeaux, Tout d'abord, les échantillons contiennent 1nmol dans 50µl d'eau MQ (20 µmol/L) ont été dialysé contre citrate d'ammonium puis analysés par spectrométrie de masse (MALDI-MS) en mode d'ionisation positif (+) ou négatif (-).

A.3.4.6. Stains All

Après la synthèse des aptamères, la taille et la qualité de synthèse des molécules ont été vérifiées par la technique de Stains All : les molécules sont séparées sur un gel de polyacrylamide 20 % dénaturant, et le gel est placé dans un bain de coloration contenant 0,017 % de (1-Ethyl-2[3-(1-Ethylnaphto[1,2d]Thiarolin-2-Ylidène)-2-méthylpropenyl]naphto-[1,2d]Thiarolium bromide) et 60% formamide pendant 15 min à l'obscurité. Le gel est décoloré à l'eau 20 min.

A.3.4.7. Purification des mélanges bruts des acides nucléiques par gel d'acrylamide

L'électrophorèse sur gel est utilisée pour séparer les macromolécules biologiques (comme l'ADN/ARN) en fonction de leur taille et de leur charge électrique, donc, la purification des oligonucléotides s'est effectuée par migration sur gel de polyacryl amide 10-20% en conditions dénaturantes (Urée 7M, TBE 1X) selon leur taille.

Le gel d'acrylamide est polymérisé par 1% d'ammonium persulfate (APS 10%) et 0,1% de TEMED (N,N,N',N'-Tetraméthylènediamine) par rapport de l'acrylamide. Une migration du gel 15 W pendant 45 min est effectuée avant le dépôt des échantillons afin de chauffer le gel et que la migration se fasse mieux. Les échantillons sont dilués dans un tampon de charge dénaturant et pouvant contenir éventuellement des marqueurs colorés (xylène-cyanol et bleu de bromophénol) afin de visualiser la vitesse de migration. Ils sont ensuite centrifugés puis, dénaturés 2 minutes à 95°C dans un bain à sec par la suite laissés 1 min dans la glace. Ils sont ensuite déposés sur gel. La migration se fait sur système d'électrophorèse, à 17W (pour un gel de 15 cm x 30 cm) et à 15W (pour un gel de 15 cm x 25 cm). Les oligonucléotides sont des molécules chargées négativement, si on les met à un endroit sur le gel et qu'on fait passer un courant dans le gel, elles migrent de la borne moins vers la borne plus. Au cours de cette migration, les brins d'ADN de petite taille migrent plus vite que les brins plus gros; le gel agit comme un tamis pour séparer les brins d'ADN en fonction de leur taille.

Après migration, une bande majoritaire d'ADN/ARN est révélée, par UV, puis la récupération des bandes d'intérêt. l'étape finale est l'extraction les oligonucléotides de gel d'acrylamide puis l'électroélution 1h par cellule (Model 422 Electro-Eluter) sur un membrane (membrane

cap, green, MW limit 3,500), puis le solvant est alors évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speed-vac, ensuite, l'échantillon est résolubilisé dans l'eau MQ et passé sur une colonne de G 25 Sephadex™.

A.3.4.8. Électrophorèse en gel d'agarose

L'agarose est un polymère utilisé sous forme de gel en biochimie et en biologie moléculaire au cours d'une méthode appelée électrophorèse en gel d'agarose. Cette méthode est utilisée en biochimie pour séparer les oligonucléotides (ADNs, ARNs) ou des protéines en fonction de leur poids moléculaire, préalable indispensable dans de multiples applications, notamment pour identifier des fragments d'ADN découpés par des enzymes, pour identifier un gène. Les molécules d'ADN linéaires migrent en fonction de leur longueur: La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme du nombre de paires de bases. En fonction de la concentration d'agarose on peut cibler la gamme de taille qu'on souhaite séparer. Le principe de l'électrophorèse en gel d'agarose est que l'acide nucléique libre migre vers la cathode à une certaine vitesse différente par rapport à la vitesse de migration de l'acide nucléique complexé.

A.3.4.8.1. Préparation du gel d'agarose 3% m/v

3 g d'agarose dans 100 ml de tampon TAE 0.5x, chauffé au four micro-onde (2 à 3 min). Attendre la dissolution de l'agarose : le gel devient translucide. Laisser refroidir jusqu'à 50-55 °C puis additionné 7µl de BET à 10 mg/mL. Couler les 100 ml de gel dans le plateau de moulage, disposé bien à plat et équipé de peignes. Ne jamais déposer de l'agarose à plus de 55 °C dans le plateau de moulage. Le peigne permet de marquer l'empreinte des puits de dépôt de l'ADN. Le gel ne doit pas atteindre le sommet des dents du peigne. Laisser le gel se solidifier 30-45 min à température ambiante. Retirer alors délicatement et bien verticalement les peignes.

Placer le gel dans la cuve à électrophorèses, les puits disposés côté cathode. Remplir la cuve avec le tampon TAE 0.5x jusqu'à ce que le gel soit recouvert de quelques mm de tampon. Le BET (Bromure d'éthidium: cancérigène et mutagène), fluorescent aux UV, se fixe sur l'ADN. Il permettra la lecture du gel sur la table à UV. Du fait de la planéité de sa structure, cette molécule possède la propriété de s'intercaler entre les paires de base des acides nucléiques, où sa fluorescence dans le visible est exaltée Elle est révélée par excitation sous illumination par UV courts. Le BET doit être manipulé avec d'extrêmes précautions car c'est un produit hautement mutagène.

Marqueur de Taille

2 µL Marqueur GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, 0.5 µg/µl. lot: 00118522. 2 µL de 6X DNA Loading Dye Thermo Scientific 6X DNA Loading Dye 1M. Lot: 00113401. 2 µL tampon de charge 5X préparé précédemment. 6 µL H₂O BM. Conserver à 4°C.

A.3.4.8.2. Protocole

- Placer les échantillons d'ADN pendant 3 min à 60-65°C.
- Les transférer sur de la glace pendant 2-3 min.

Ces deux opérations sont destinées à empêcher la ligation de fragments possédant éventuellement des extrémités cohésives.

Préparez les échantillons et un marqueur pour l'ADN génomique en procédant comme suit:

Échantillon		Marqueur	
eau	3 µl	eau	6 µl
tampon de chargement	2 µl	tampon de charge	2 µl
Échantillon	5 µl	λ DNA EcoR I / Hind III	2 µl
Total	10 µl	Total	10 µl

Charger 10 µl de chaque échantillon dans des puits consécutifs et placez le marqueur d'ADN adéquat dans le premier et le dernier puits. Mélanger le colorant de charge et l'ADN sur un morceau de parafilm et prélever le mélange avec une micropipette réglée sur le volume approprié en changeant de cône à chaque prélèvement. Remplir les puits en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette. Placer le support avec le gel chargé dans la cuve d'électrophorèse en positionnant les puits du côté de la cathode. Remplir la cuve de tampon TBE (réutilisable plusieurs fois) en versant délicatement et très lentement lorsque le gel commence à être recouvert pour éviter les fuites d'ADN vers le tampon. Fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension. Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge xylène cyanole a migré à l'intérieur du gel sur la distance voulue (environ 30-45 min à 100 V). Couper le courant et récupérer le gel dans son support. Positionner le gel sur une boîte d'éclairage UV et photographiez le gel. Jeter le gel dans la poubelle pour déchets solides à base de bromure d'éthidium.

A.3.4.9. Analyse SDS-PAGE de la protéine MMP-9

Les hMMPs-9 ont été obtenues auprès de la société Calbiochem (lot : D00137499). Elles sont commercialisées avec une pureté supérieure à 95%. Il est néanmoins nécessaire de le vérifier par SDS-PAGE.

Le tampon de charge et le tampon de migration contiennent du sodium dodécyl sulfate (SDS) qui est un détergent anionique. Ce détergent a deux fonctions. La première est de détruire la structure secondaire des protéines et la seconde d'imposer une densité de charge nette comparable à toutes les chaînes polypeptidiques permettant une migration des protéines en fonction de leur masse moléculaire. Le SDS possède une longue chaîne carbonée hydrophobe et un groupement polaire chargé négativement. C'est par sa chaîne aliphatique qu'il va se lier aux domaines hydrophobes des protéines et leur attribuer une charge négative.

Le gel est composé de 2 compartiments. Tout d'abord, le gel de tassement ou «stacking gel» est le gel dans lequel les protéines entrent dans l'acrylamide. Dans cette section du gel, les

protéines ne se séparent pas mais migrent ensemble en s'entassant en bande mince pour augmenter la résolution de la séparation. Un gel de tassement de polyacrylamide 5 % (30 % d'acrylamide/bisacrylamide (37,5 : 1)), composé de 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS dans un volume final de 10 ml, a été utilisé. Dans le second compartiment on trouve le gel de séparation ou « separating gel » dans lequel les protéines entassées dans le gel précédent peuvent être séparées les unes des autres. Un gel de séparation de polyacrylamide 10 % (30 % d'acrylamide/bisacrylamide (37,5 : 1)), composé de 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS dans un volume final de 20 ml a été utilisé. La migration a été réalisée dans un tampon Tris-glycine (25 mM Tris, 250 mM glycine, 0,1 % SDS). Une quantité de 100 ng pour chaque protéine a été déposée dans le gel et préalablement chauffée 3 min à 100 °C dans un tampon de charge comprenant 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glycérol, 200 mM DTT et 0,2 % bleu de bromophénol. Le marqueur Prestained Protein Marker, Broad Range (Biolabs) a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Il contient un mélange de 8 protéines purifiées dont le poids moléculaire varie de 6,5 à 175 kDa.

A.3.4.10. Immobilisation des oligonucléotides sur la puce streptavidine

Une puce SAD 200m (Xantec, lot SC SAD 200m0114.a) est utilisée sur l'appareil Biacore 3000. Les immobilisations de l'aptamère F3B et de son contrôle sont réalisées à 23°C. Un volume de 50 µl de chaque oligonucléotide est injecté à une concentration de 50 nM à 20 µl/min (mode Quickinject), avec le tampon de course PBS 1X. L'aptamère F3B-espaceur HEG-biotine est immobilisé sur la piste fc2. Le contrôle-espaceur HEG-biotine est immobilisé sur la piste fc3. L'aptamère F3B-dT-biotine est immobilisé sur la piste fc4 (Figure 3.5, chapitre III). Il a donc été fixé en moyenne, 598 RU de F3B-espaceur HEG, 620 RU de Contrôle-espaceur HEG et 721.3 RU de F3B-dT.

Pour chaque point, un volume de 80 µl est injecté sur les 4 pistes à 20 µl/min (mode Quickinject). Les oligonucléotides et la protéine sont préparés dans le tampon PBS 1X final. La régénération intervient après 10 minutes de dissociation. Deux solutions de régénération ont été utilisées: formamide/urée/EDTA (40%/3,6 M/30 mM) et 20 mM NaOH. Les solutions utilisées ont été préalablement filtrées sur des filtres 0,22 µm. La protéine hMMP-9 seule est injectée à une concentration de 50 nM, avant et après les tests de compétition (hMMP-9 endday).

A.3.5. Préparation des tampons :

A.3.5.1. Tampon de couplage (Tampon carbonate, 0.2 M, PH 8.3, 100ml): NaHCO₃ 2.1 g, NaCl 5.84 g, EDTA 37.2 mg dans 80 ml d'eau milliq. Le pH est ajusté à 8.3 par addition de NaOH 1N. Le volume est complété à 100 ml avec de l'eau milliq.

A.3.5.2. Tampon TEAA 0,5 M, PH 7, 1L : 800 ml de l'eau milliq, 27 ml d'AcOH, 70 ml de TEN (ET₃N) d'eau. Le pH est ajusté à 7 par addition d'AcOH. Le volume est complété à 1000 ml avec de l'eau milliq. Le tampon est filtré et conservé à 4°C.

A.3.5.3. Tampon citrate d'ammonium dibasique, 0,1 M, 500 ml: 11,309 g d'ammonium citrate dibasique, 400 ml de l'eau milliq. Après la solubilité, le volume est complété à 500 ml avec de l'eau milliq. Le tampon est filtré et conservé à 4°C.

A.3.5.4. Tampon de charge 5X pour gel agarose : 8 ml glycérol 99.5% (80% final). 1 ml TBE 5X (0.5X final). 10 ml H₂O BM. 1 point bleu de bromphénol. Conserver à 4°C.

B. Synthèse des dérivés de F3B et de 11F46A

B.1. Synthèse de F3B- espaceur HEG-NH₂

B.1.1. Purification :

Les synthèses sont purifiées par CLHP.

Temps min	0	33	38	43	45	50
A	95	70	0	0	95	95
B	5	30	100	100	5	5

B.1.2. Caractérisation, Spectrométrie de masse :

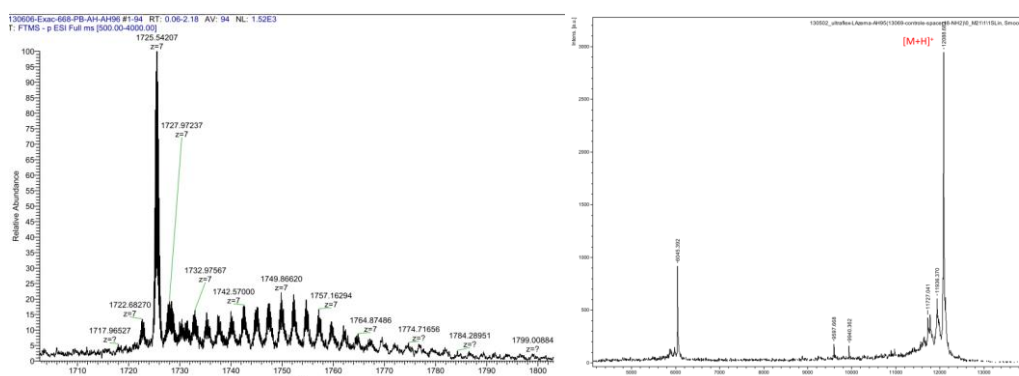


Figure 5.1. Spectrométrie de masse (ESI-MS, mode positif) de F3B- espaceur HEG -NH₂ (à gauche) et (Maldi-ToF, mode positif) de contrôle- espaceur HEG -NH₂ (à droite)

B.2. Synthèse de F3B- dT-NH₂

B.2.1. Purification :

Les synthèses sont purifiées par CLHP.

Temps min	0	25	32	37	42	45
A	90	78	0	0	90	90
B	10	22	100	100	10	10

B.2.2. Caractérisation, Spectrométrie de Masse :

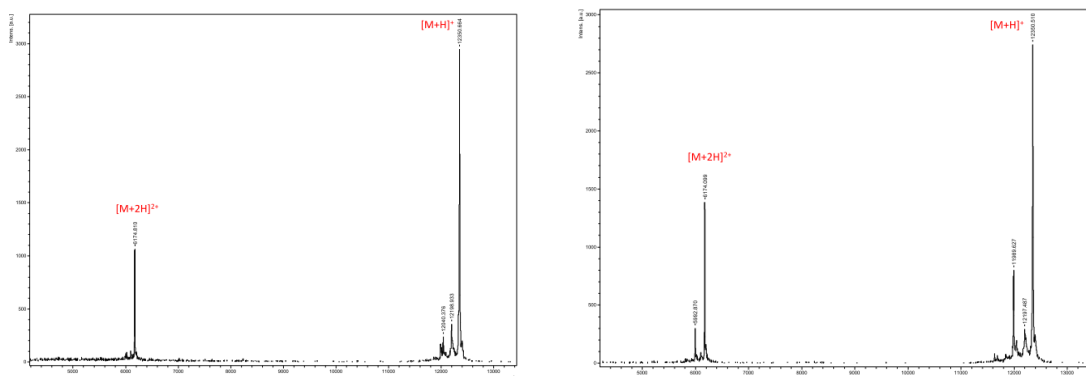


Figure 5.2. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de F3B- dT-NH₂ (à gauche) et de son contrôle- dT-NH₂ (à droite)

B.3. Synthèse de F3B- espaceur HEG-SH

B.3.1. Déprotection-Purification :

B.3.1.1. Déprotection du support solide :

Les supports solides portant les F3B-espaceur HEG-S-Tr et Contrôle- espaceur HEG-S-Tr sont transférés dans des tubes eppendorf et incubés dans 1 ml d'ammoniaque concentrée, sous agitation et à 55 °C pendant 5h. Les billes sont rincées à l'eau (3x250µL). Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite, puis reprises dans 200µl d'eau et filtrées (membrane 0.4 µm). Les oligonucléotides F3B-espaceur HEG-S-Tr et Contrôle-espaceur HEG-S-Tr sont purifiés par CLHP.

Temps min	0	38	43	48	50	55
A	95	78	0	0	95	95
B	5	22	100	100	5	5

B.3.1.2. Déprotection le Thiol-C6 :

Le groupe trityle utilisé pour protéger le thiol ne sotte pas en milieu acide et par conséquent ne peut pas être éliminé sur un synthétiseur d'ADN en utilisant la déprotection de l'acide normal. Aussi, le clivage de l'oligonucléotide du support et élimination des groupes protecteurs de bases sont réalisées dans les conditions normales. Le groupe Trityl qui protège le thiol doit être enlevé par oxydation avec du nitrate d'argent 0.2M, en excès étant précipité avec du dithiothréitol (DTT). Avant d'éliminer le groupe Trityl, il faut purifier les oligonucléotides après avoir fait la déprotection CPG. Solubiliser les oligonucléotides dans 0.1M triethylammonium acetate (TEAA) à concentration C= 300 µM. A=100 (absorption à 260nm). Ensuite, on ajoute 15% v/v de solution aqueuse Nitrate de silver AgNO₃ (1M), l'incubation est maintenue 30 min sous agitation à 800 rpm à 25°C. Apres, on ajoute 20% v/v de solution aqueuse de DiThioThréitol (DTT), on laisse la nouvelle solution sous agitation 5 min, 800 rpm à TA. Vortex, centrifugeuse afin de précipiter le complexe Silver-DTT, récupéré

le surnageant, Rancé la précipité par triéthylammonium acétate (TEAA 0.1M) 2 fois x 200µl. Le surnageant total est alors évaporé sous pression réduite, puis reprises dans 200µl d'eau et passer sur G25.

B.3.2. Gel électrophorèse :

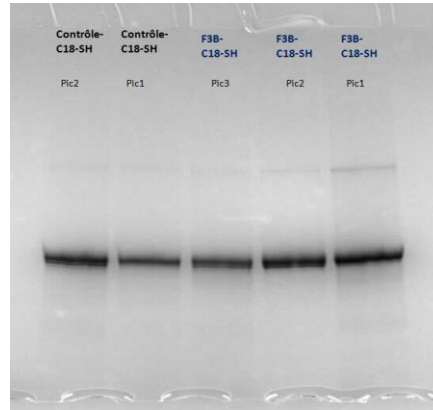


Figure 5.3. Gel PAGE dénaturant 20% après la purification

B.3.3. Caractérisation par spectrométrie de Masse :

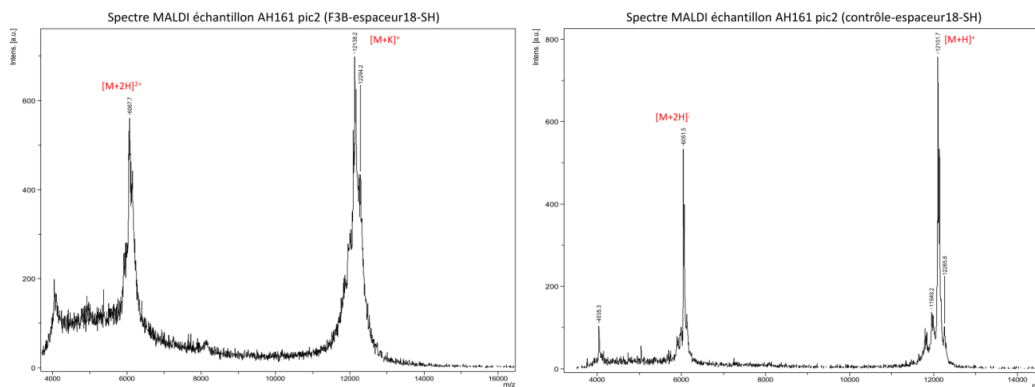


Figure 5.4. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de F3B-espaceur HEG- SH (à gauche) et de son contrôle-espaceur HEG- SH (à droite)

B.3.4. Stockage:

L'Oligonucléotide thiol libre doit être stocké sous une atmosphère inerte pour éviter l'oxydation dimérisation au disulfure.

B.4. F3B-espaceur HEG-alcyne

Purification par CLHP :

Les synthèses sont purifiées par CLHP.

Temps min	0	33	38	43	45	50
A	95	74	0	0	95	95
B	5	26	100	100	5	5

B.5. 11F46A-espaceur HEG-alcyne

B.5.1. Purification :

La synthèse est purifiée par gel acrylamide, puis vérifié par CLHP

Temps min	0	33	38	43	45	50
A	95	74	0	0	95	95
B	5	26	100	100	5	5

B.5.2. Caractérisation, Spectrométrie de masse :

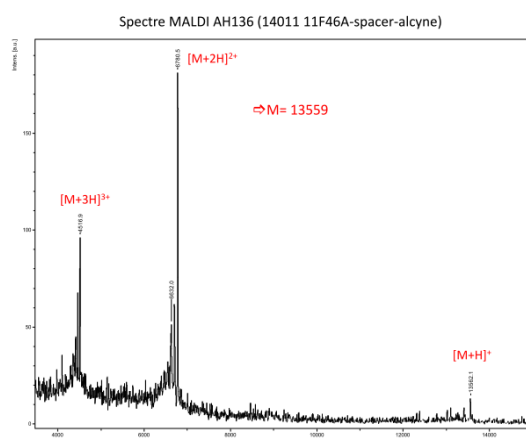


Figure 5.5. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de 11F46A- espaceur HEG – alcyne

B.6. Synthèse de F3B- espaceur HEG-DOTA

B.6.1. Synthèse :

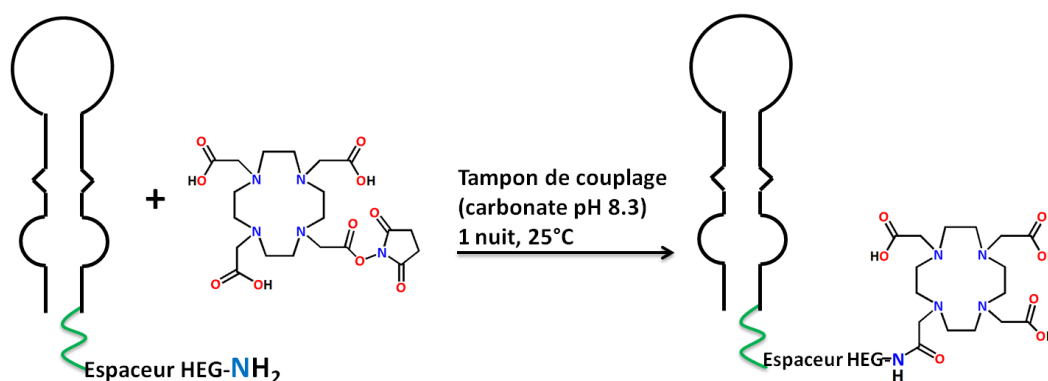


Schéma 5.1. Stratégie pour la synthèse de la plateforme F3B-espaceur HEG-DOTA

Couplage:

20 n.mol de F3B-espaceur HEG-NH₂ ou contrôle-espaceur HEG-NH₂ sont repris dans 50 μ l de tampon de couplage. On additionne une solution de DOTA-NHS ester (4 mg) dans 40 μ l de DMF en quatre fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 600 rpm à

B.7. Synthèse de F3B- dT-Cy5

B.7.1. Synthèse :

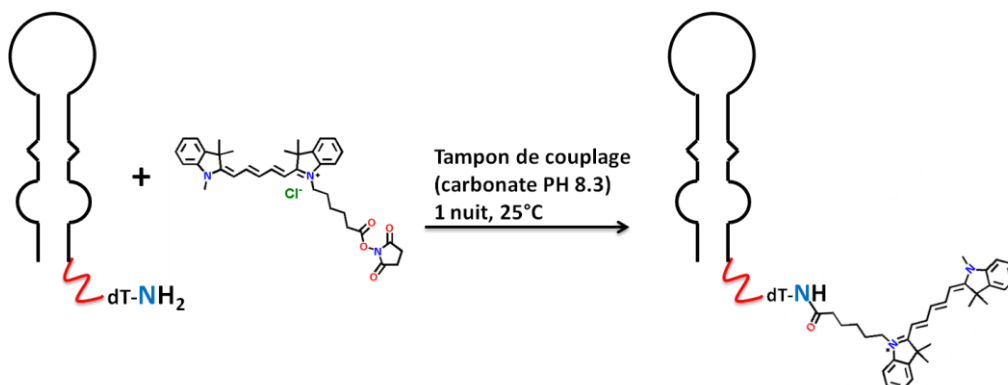


Schéma 5.2. Stratégie pour la synthèse de la plateforme F3B-dT-Cy5

Couplage :

20 nmol de F3B-dT-NH₂ ou control-dT-NH₂ sont repris dans 50 µl de tampon de couplage. On additionne une solution de Cyanine5-NHS ester (Batch: N0312PH9) (3 mg) dans 30 µl de DMF en trois fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 600 rpm à 25°C pendant 2h. Après la dernière addition, l'incubation est maintenue une nuit sous agitation à 600 rpm à 25°C. Le produit est injecté directement en CLHP pour purification. On mène 4 synthèses en parallèle. Les manips sont ensuite regroupées avant purification CLHP.

B.7.2. Purification :

Purification par CLHP.

Temps min	0	15	30	35	40
A	95	0	0	95	95
B	5	100	100	5	5

B.7.3. Caractérisation, Spectrométrie de masse :

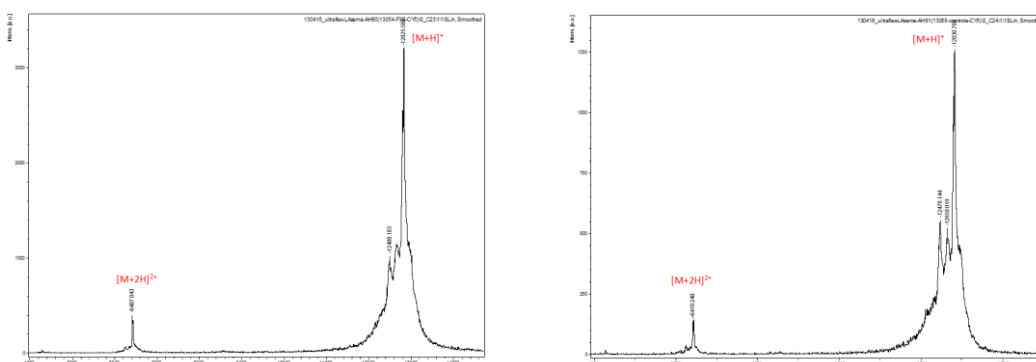


Figure 5.7. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de F3B- dT-Cy5 (à gauche) et de son contrôle- dT-Cy5 (à droite)

B.8. Synthèse de F3B- espaceur HEG-ATTO 590

B.8.1. Synthèse

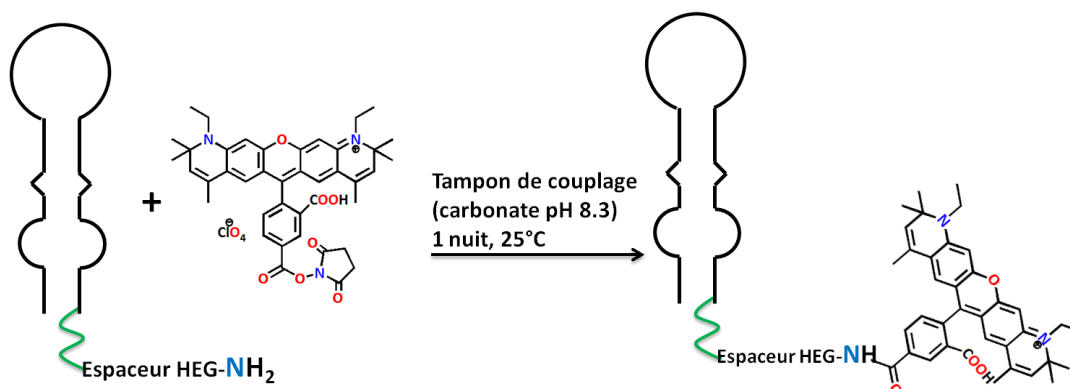


Schéma 5.3. Stratégie pour la synthèse de la plateforme F3B-espaceur HEG-ATTO 590

Couplage :

20 n.mol de F3B-espaceur HEG-NH₂ ou contrôle-espaceur HEG-NH₂ sont repris dans 50 µl de tampon de couplage. On additionne une solution de ATTO 590-NHS ester (1 mg) dans 30 µl de DMF anhydre en trois fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 600 rpm à 25°C pendant 2h. Après la dernière addition, l'incubation est maintenue une nuit sous agitation à 600 rpm à 25°C. Le produit est injecté directement en CLHP pour purification. On mène 3 synthèses en parallèle. Les manip sont ensuite regroupées avant purification CLHP.

B.8.2. Purification-Characterisation :

B.8.2.1. Purification par CLHP :

Temps min	0	33	38	43	45	50
A	95	70	0	0	95	95
B	5	30	100	100	5	5

B.8.2.2. Chromatogramme après purification :

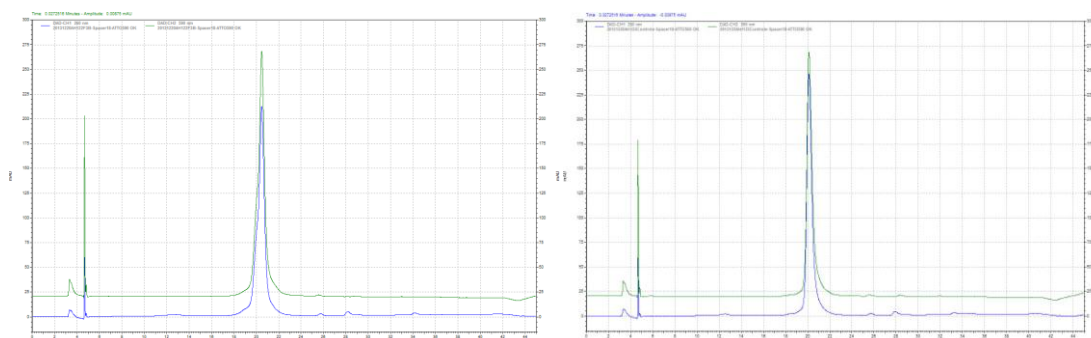


Figure 5.8. RP-CLHP F3B- espaceur HEG-ATTO 590, RP-CLHP Contrôle- espaceur HEG- ATTO 590. Profil bleu à 260 nm et profil vert à 590 nm

B.8.2.3. Gel électrophorèse

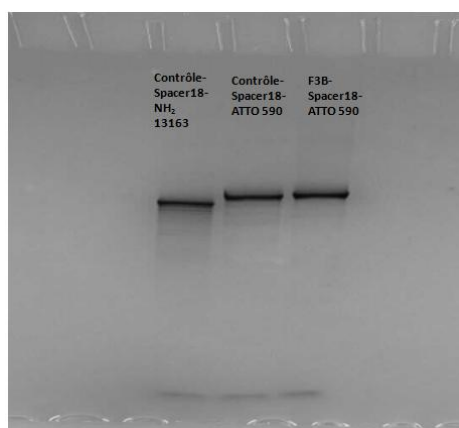


Figure 5.9. Gel PAGE dénaturant 20% après la purification. Le produit de départ (à gauche), contrôle - espaceur HEG- ATTO 590 (au milieu) et de F3B - espaceur HEG- ATTO 590 (à droite)

B.8.2.4. Spectrométrie de masse :

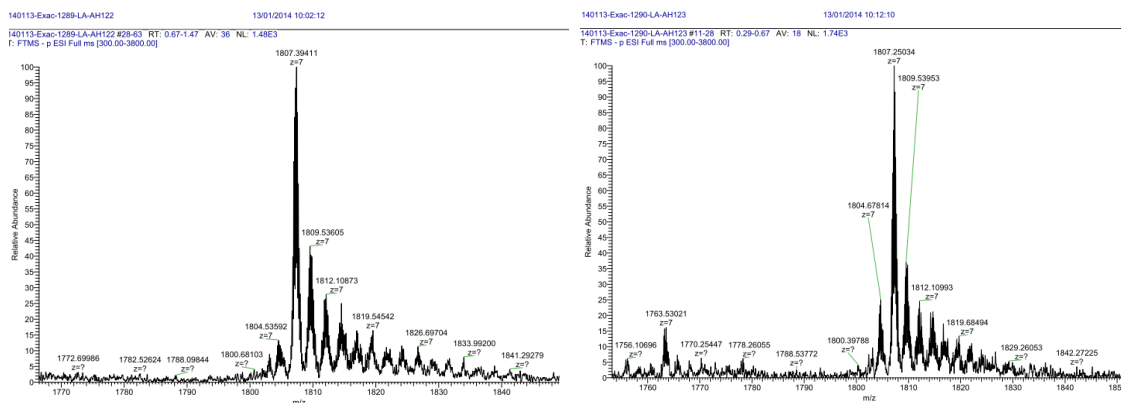


Figure 5.10. Spectrométrie de masse (ESI-MS, mode positif) de F3B- espaceur HEG- ATTO 590 (à gauche) et de son contrôle- espaceur HEG- ATTO 590 (à droite)

B.9. Synthèse de F3B- espaceur HEG-Biotine

B.9.1. Synthèse :

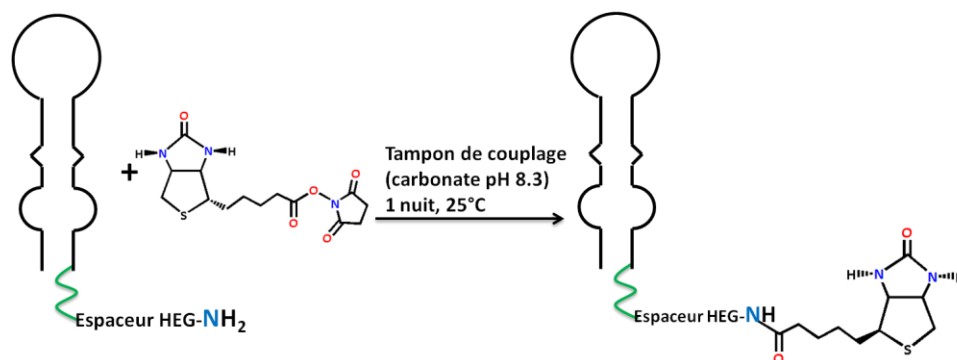


Schéma 5.4. Stratégie pour la synthèse de la plateforme F3B-espaceur HEG-Biotine

Couplage :

20 nmol de F3B-espaceur HEG-NH₂ ou control-espaceur HEG-NH₂ sont repris dans 60 µl de tampon de couplage. On additionne une solution de Biotine-NHS ester (4 mg) dans 40 µl de DMF en quatre fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 600 rpm à 40°C pendant 2h. Après la dernière addition, l'incubation est maintenue une nuit sous agitation à 600 rpm à 40°C. Le produit est injecté directement en CLHP pour purification.

B.9.2. Purification-Characterisation :

B.9.2.1. Purification par CLHP :

Temps min	0	33	37	42	45	50
A	95	74	0	0	95	95
B	5	26	100	100	5	5

B.9.2.2. Spectrométrie de masse :

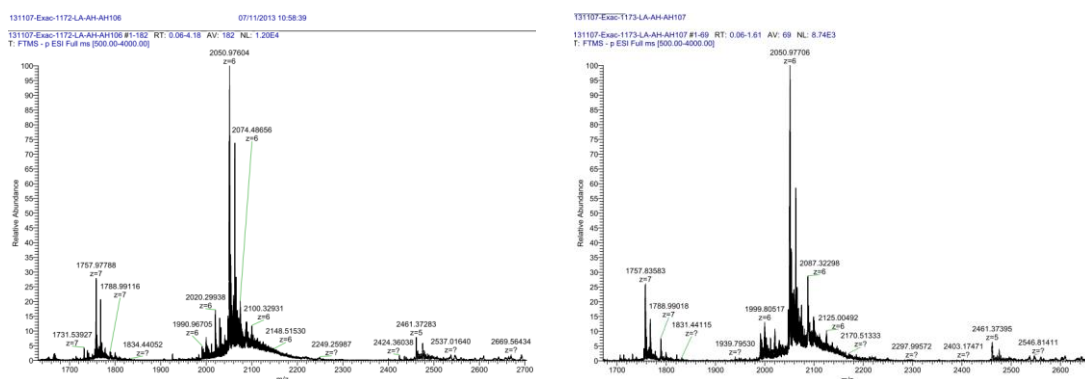


Figure 5.11. Spectrométrie de masse (ESI-MS, mode positif) de F3B- espaceur HEG- Biotine (à gauche) et de son contrôle- espaceur HEG- Biotine (à droite)

B.10. Synthèse de F3B- dT-Biotine

B.10.1. Synthèse :

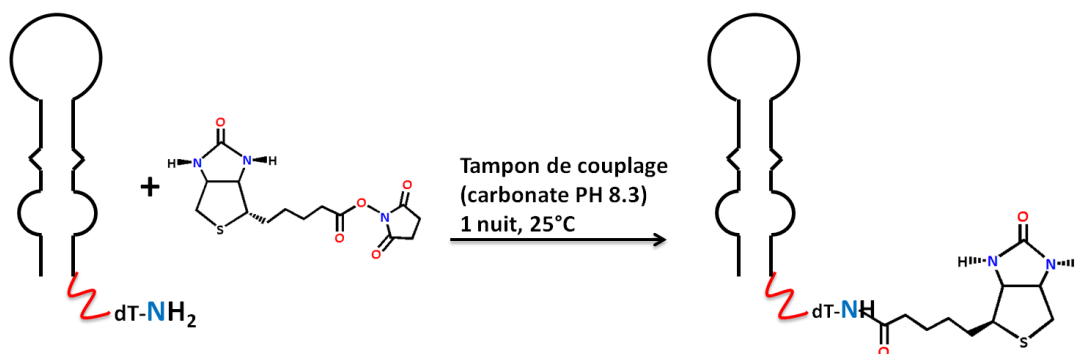


Schéma 5.5. Stratégie pour la synthèse de la plateforme F3B-dT-Biotine

Couplage :

25 nmol de F3B-dT-NH₂ ou control-dT-NH₂ sont repris dans 60 µl de tampon de couplage. On additionne une solution de Biotine-NHS ester (5 mg) dans 40 µl de DMF en quatre fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 600 rpm à 40°C pendant 2h. Après la dernière addition, l'incubation est maintenue une nuit sous agitation à 600 rpm à 40°C. Le produit est injecté directement en CLHP pour purification.

B.10.2. Purification-Characterisation :

B.10.2.1. Purification par CLHP :

Temps min	0	33	37	42	45	50
A	95	74	0	0	95	95
B	5	26	100	100	5	5

B.10.2.2. Spectrométrie de masse :

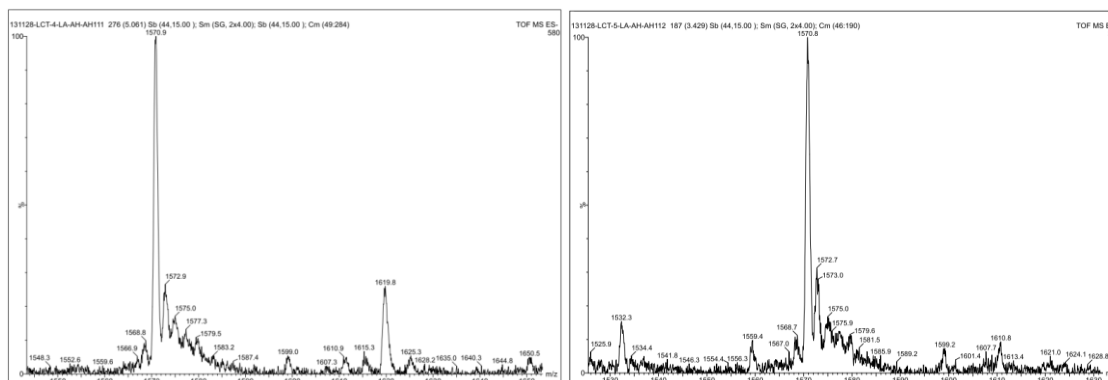


Figure 5.12. Spectrométrie de masse (ESI-MS, mode positif) de F3B- dT - Biotine (à gauche) et de son contrôle- dT - Biotine (à droite)

B.11. 11F46A- espaceur HEG-Biotine

B.11.1. 11F46A- espaceur HEG-Biotine-DMTr :

B.11.1.1. Purification par CLHP :

Temps min	0	33	38	43	45	50
A	95	74	0	0	95	95
B	5	26	100	100	5	5

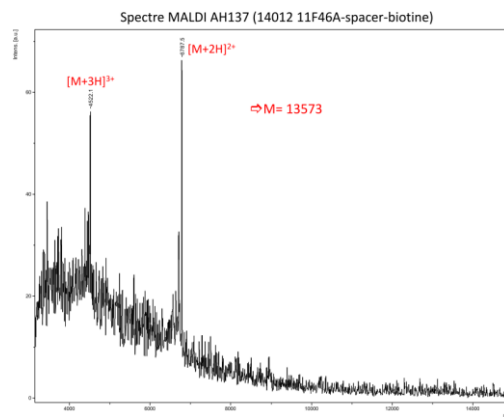
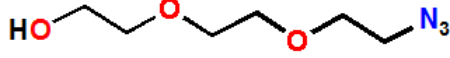
B.11.1.2. Caractérisation, Spectrométrie de masse :

Figure 5.13. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de 11F46A- espaceur HEG - Biotine

C. Synthèse des dérivés de dendron/dendrimère

Composé 1: 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy) éthanol.


<p>$C_6H_{13}N_3O_3$ MM = 175.19 g.mol⁻¹ Rf : 0.35 (EtOAc/CH₂Cl₂ = 5/5 v/v)</p>	
---	--

5 g de 2-(2-(2-chloroethoxy)ethoxy)éthanol (4.32 mL, 30 mmol) sont dissous dans 100 mL de DMF anhydre, 3 g d'azoture de sodium (45 mmol) sont ensuite ajoutés à la solution. Le mélange est alors agité 48 h à 100 °C. Après avoir observée la fin de la réaction par chromatographie sur couche mince (CH₂Cl₂/AcOEt 1/1 v/v). Le milieu réactionnel est progressivement laissé refroidir à température ambiante. Le DMF est éliminé sous pression réduite. Le résidu est repris dans 100 mL de DCM puis est successivement lavé par 3 fois 60 mL d'eau et une fois par 50 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. On obtient le composé **1** sous forme d'une huile jaune; m = 5.09 g, 97%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.73-3.58 (m, 8H, 4xCH₂O); 3.41-3.30 (m, 2H, CH₂OH); 3.58-3.51 (m, 2H, CH₂-N₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 72.5; 70.5; 70.3; 69.9; 61.5; 50.5.

Composé 2 : 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate

<p>$C_{13}H_{19}N_3O_5S$ MM = 329.372 g.mol⁻¹ Rf : 0.65 (M2/hexane = 5/5 v/v)</p>	
---	--

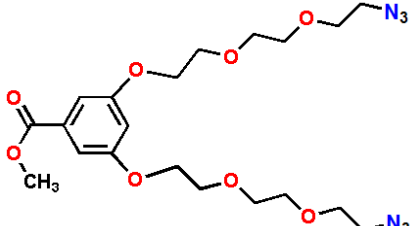
Sous d'argon inerte, on additionne à une solution d'azoture de triéthylglycol **1** (2 g, 11.41 mmol) dans du CH₂Cl₂ anhydre (60 mL), de la Et₃N distillé (11.14 mL, 79.91 mmol) et du DMAP (0.21 g, 1.71 mmol). A 0°C, on ajoute progressivement le TsCl (9.79 g, 51.37 mmol), en maintenant la température à 5°C. Après retour à température ambiante, le mélange est ensuite agité durant 18h à température ambiante. La réaction est suivie par Chromatographie sur Couche Mince (M2/hexane 1/1 v/v). Après disparition du composé de départ, la solution est filtrée et concentrée. Le mélange réactionnel est solubilisé dans 50 mL d'AcOEt puis transféré dans une ampoule à décanter et lavé par une fois 100 mL de NaHCO₃ et par deux fois 100 mL d'eau. Après élimination des produits secondaires, la solution est séchée par Na₂SO₄ et concentrée. On obtient, après purification par chromatographie

(éluant M2/Hexane 2/8 jusqu'à 4/6 v/v), le composé **2** sous forme d'une huile jaune-orangé; m = 3.08 g, 82.1%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.84-7.77 (s, 2H, 2xCH=C); 7.39-7.32 (s, 2H, 2xCH=C); 4.20-4.13 (m, 2H, CH_2O); 3.73-3.68 (m, 2H, CH_2O); 3.67-3.59 (m, 4H, 2x CH_2O); 3.42-3.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N}_3$); 2.49-2.43 (s, 3H, CH_3).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 144.5; 132.9; 129.8 (2C); 127.9 (2C); 70.8; 70.6; 70.1; 69.3; 68.8; 50.6; 21.7.

Composé 3 : methyl 3,5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate

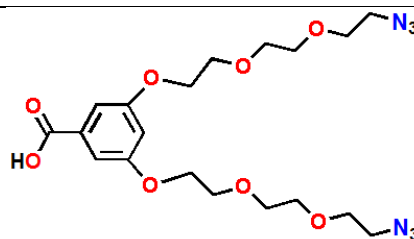
<p>$\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_8$ MM = 482.21 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ Rf : 0.55 (M2/Hexane = 5/5 v/v)</p>	
--	--

0.4 g de méthyl 3,5-dihydroxybenzoate (2.38 mmol), 1.47 g de carbonate de potassium (10.71 mmol), sont dissous dans 6 mL de DMF anhydre, une solution du **2** (2.35 g, 7.14 mmol) dans 3 mL du DMF anhydre à été additionné goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu est agité 18h à 80°C. La réaction à été suivi par chromatographie sur couche mince (M2/hexane 1/1 v/v). Le milieu réactionnel est progressivement laissé refroidir à température ambiante, puis filtré, le filtrat est alors éliminé sous pression réduite. Le résidu est donc repris dans 50 ml d'AcOEt, puis successivement lavé par trois fois 50 mL d'eau et une fois par 50 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. On obtient **3** après purification par chromatographie (éluant M2/Hexane 2/8 jusqu'à 5/5 v/v) sous forme visqueuse jaune; m = 0.94 g, 87%.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 7.22-7.18 (s, 2H, 2 x CH=C); 6.72-6.68 (s, 1H, CH=C); 4.18-4.12 (m, 4H, 2 x CH_2O); 3.91-3.84 (m, 7H, CH_3 , 2 x CH_2O); 3.77-3.64 (m, 12H, 6 x CH_2O); 3.42-3.36 (m, 4H, 2 x $\text{CH}_2\text{-N}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 166.7; 159.7 (2C); 131.8; 108 (2C); 106.8; 70.9 (2C); 70.7 (2C); 70.1 (2C); 69.7 (2C); 67.7 (2C); 52.2; 50.6 (2C).

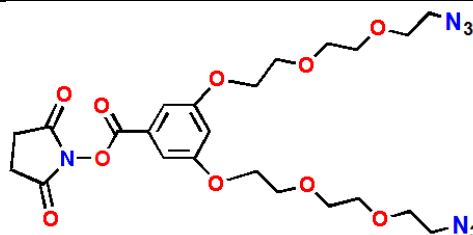
$^{13}\text{C NMR}$ (DEPT) (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) : 108 (2 C); 106.8; 70.9 (2C); 70.7 (2C); 70.1 (2C); 69.7 (2C); 67.7 (2C); 52.2; 50.6 (2C).

Composé 4 : 3,5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoic acid**C₁₉H₂₈N₆O₈****MM = 468.2 g.mol⁻¹****Rf : 0.15 (M2/MeOH = 9.5/ 0.5 v/v)**

On ajoute à une solution du composé **3** (0.8 g, 1.66 mmol) dans de l'éthanol (20 mL), du KOH (1M, 0.14 g, 2.48 mL, 2.49 mmol). Le mélange est ensuite porté à reflux (80°C) pendant 1h30. La réaction est suivie par CCM (M2/MeOH 9.5/0.5 v/v). Le milieu réactionnel est progressivement laissé refroidir à température ambiante, on ajoute 2 g de résine acide jusqu'à PH=1-2 et laissé 30 min sous agitation à température ambiante. La solution est alors filtrée sur célite. Le filtrat est alors éliminé sous pression réduite. On obtient le composé **4** sous forme d'une huile jaune-orangée. m = 0.77 g, 100%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.27-7.24 (s, 2H, CH=C); 6.76-6.73 (t, 1H, CH=C); 4.2-4.13 (t, 4H, 2xCH₂O); 3.92-3.85 (t, 4H, 2xCH₂O); 3.79-3.73 (m, 4H, 2xCH₂O); 3.73-3.67 (m, 8H, 4xCH₂O); 3.43-3.37 (t, 4H, 2xCH₂-N₃).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 171.1; 159.7 (2C); 131.1; 108.5 (2C); 107.6; 70.9 (2C); 70.7 (2C); 70.1 (2C); 69.7 (2C); 67.7 (2C); 50.5 (2C).

Composé 5 : 2, 5 - dioxopyrrolidin-1-yl 3, 5-bis (2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate**C₂₃H₃₁N₇O₁₀****MM = 565.21 g.mol⁻¹****Rf : 0.8 (M2/MeOH = 9.5/0.5 v/v)**

Sous d'argon inerte, on ajoute à une solution du composé **4** (0.250 g, 0.54 mmol) dans du DMF anhydre (8 mL), du NHS (0.09 g, 0.8 mmol) et du DCC (0.16 g, 0.8 mmol). La solution est ensuite laissée sous agitation magnétique 24h à température ambiante. Après avoir observée la fin de la réaction par CCM (M2/MeOH 9.5/0.5 v/v), le mélange est ensuite filtrée. Le filtrat est alors éliminé sous pression réduite. Puis rincée plusieurs fois avec CH₂Cl₂ jusqu'à élimination complète du DCU. On obtient le produit **5** sous forme d'huile jaune-orangée introduite directement sans purification ultérieure dans l'étape suivante, m= 0.3 g; 100%.

Composé 6 : (N-(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethyl-3,5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamide)

<p>$C_{25}H_{42}N_8O_9$</p> <p>MM = 598.31 g.mol⁻¹</p> <p>Rf : 0.25 (M2/MeOH = 9/1 Et₃N 1% v/v).</p>	
---	--

Sous atmosphère d'azote inerte, on additionne, à une solution de 2,2'-(éthylène-dioxy)bis(éthylamine) (0.47 g, 0.46 mL, 3.18 mmol) dans du Dioxane anhydre (5 mL), de l'Et₃N distillé (0.22 mL, 1.59 mmol), une solution du **5** (0.3 g, 0.53 mmol) dans 5 mL du Dioxane anhydre à été additionné goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu est agité une nuit à température ambiante. La réaction à été suivi par chromatographie sur couche mince (M2/MeOH/Et₃N 1% 9/1 v/v). Lendemain; la solution est alors évaporée à sec. le résidu est donc solubilisé dans 25 mL du CH₂Cl₂ et puis successivement lavé par trois fois 25 mL d'eau et une fois par 25 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. Le composé **6** est obtenu pur par chromatographie sur colonne flash (élution M₂/Hexane/Et₃N 1% 8 : 2 v/v jusqu'à M₂/MeOH/Et₃N 1% 9/1 v/v) après concentration sous forme d'une huileuse m=0.26 g, 81.04 %.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.10-7.02 (s, 1H, NH); 6.99-6.93 (d, 2H, 2xCH=C); 6.62-6.57 (s, 1H, 1xCH=C); 4.16-4.08 (t, 4H, 2xCH₂O); 3.87-3.80 (t, 4H, 2xCH₂O); 3.74-3.56 (m, 20H, 10xCH₂O); 3.52-3.46 (t, 2H, CH₂-NH₂); 3.40-3.33 (t, 4H, 2xCH₂-N₃); 2.88-2.79 (t, 2H, CH₂-NH); 2.17-2.06 (s, 2H, NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 166.75; 159.39 (2C); 136.2; 105.46 (2C); 104.12; 72.46; 70.36 (2C); 70.24 (2C); 69.8; 69.61 (3C); 69.37; 69.23 (2C); 67.18 (2C); 50.19 (2C); 41.06; 39.33.

MS (ESI) : calculer pour C₂₅H₄₂N₈O₉ : théorique 598.31 g.mol⁻¹; trouver 599.32 (M + H⁺), 1197.63 (2M + H⁺).

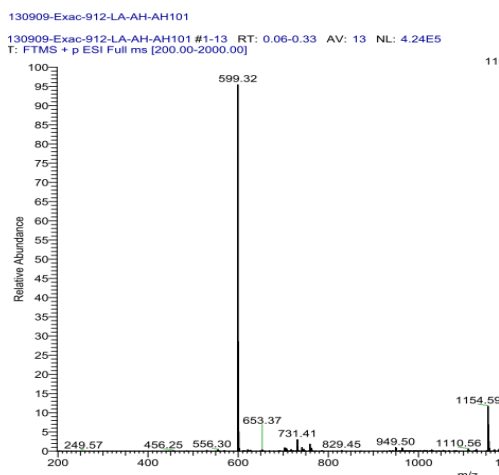


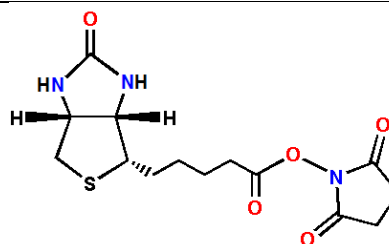
Figure 5.14. Spectromètre de masse MS (ESI) du composé 6

Composé 7: 2, 5-dioxopyrrolidin-1-yl 5-(4S)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl)pentanoate

C₁₄H₁₉N₃O₅S

MM = 341.1 g.mol⁻¹

Rf : 0.35 (M2/MeOH = 8/2 v/v)

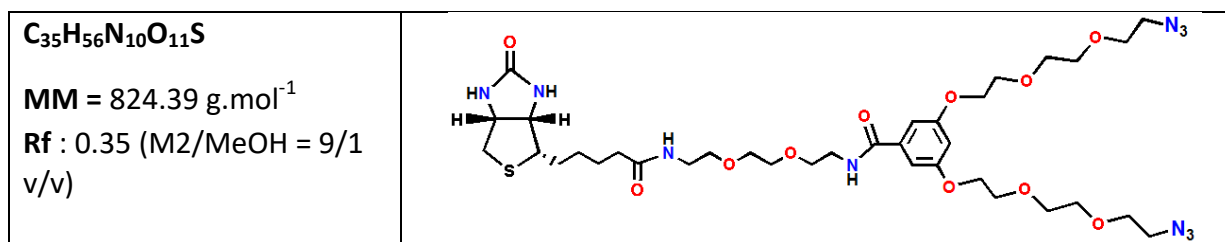


Sous d'argon inerte, on ajoute à une solution de biotine (1 g, 4.09 mmol), dans du DMF anhydre (10 mL), du NHS (0.68 g, 4.9 mmol) et du DCC (0.8 g, 4.09 mmol). La solution est ensuite laissée sous agitation magnétique à température ambiante. Après une nuit, le DCU précipite. La solution est alors filtrée puis concentrée, ensuite lavée par Et₂O (2 x 50 mL) et par de l'isopropanol (30 mL). Après séchage à sec avec P₂O₅, on obtient le composé **7** sous forme d'une poudre blanche introduite directement sans purification ultérieure dans l'étape suivante; m = 1.29 g, 93%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.41 (d, 2H, J = 19.3 Hz); 4.30 (m, 1H); 4.14 (m, 1H); 3.10 (m, 1H); 2.92-2.55 (m, 8H); 1.71-1.31 (m, 6H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 170.7; 163.1; 61.4; 59.6; 55.7; 33.8; 31.2; 30.4; 28.3; 24.9.

Composé 8 : 3, 5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy) ethoxy) ethoxy)-N-(2-(2-(2-(5-((4S)-2-oxohexahydro-1 H-thieno [3, 4-d]imidazol-4-yl) pentanamido) ethoxy) ethoxy) ethyl) benzamide



Sous atmosphère inerte d'argon, on ajoute à une solution du composé **6** (0.2 g, 0.51 mmol) dans 5 mL de DMF anhydre, Et₃N (0.14 mL, 1.01 mmol) et la biotine-NHS **7** (0.35 g, 1.01 mmol). Le mélange est mis sous agitation à température ambiante 24h. Après avoir observée la fin de la réaction par chromatographie sur couche mince (M2/MeOH 9/1 v/v). La solution est alors concentrée sous pression réduite. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne (éluant M2/MeOH 9.7/0.3 jusqu'à 8.5/1.5 v/v). Le composé **8** est obtenu après concentration sous forme huileuse; m = 0.26 g, 62.05%.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 7.05-7.01(s,2H, 2 x CH=C); 6.74-6.70(s,1H, 2 x CH=C); 4.52-4.45 (m, 1H, CH-N); 4.32-4.25 (m, 1H, CH-N); 4.20-4.13 (m, 4H, 2 x OCH₂); 3.90-3.83 (m, 4H, 2 x OCH₂); 3.70-3.61 (m, 20H, 10 x OCH₂); 3.60-3.52 (m, 4H, 2 x CH₂-N); 3.41-3.29 (m, 6H, CH-S, 2 x CH₂-N₃, CH₂-S); 3.22-3.13 (m, 1H, CH₂-S); 2.96-2.87 (m, 1H, CH₂-S); 2.24-2.14 (t, 2H, CH₂-CO); 1.79-1.50 (m, 4H, 2 x CH₂); 1.82-1.36 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ (ppm) : 174.5; 173.06; 167.96; 159.66 (2C); 135.82; 105.34 (2C); 104.01; 70 (2C); 69.73 (2C); 69.48 (2C); 69.46; 69.33 (2C); 68.97(2C); 68.79; 68.70; 67.12 (2C); 61.50; 59.75; 55.15; 49.93 (2C); 39.23; 39.10; 38.43; 34.90; 27.91; 27.65; 24.98.

MS (ESI) : calculer pour C₃₅H₅₆N₁₀O₁₁S : théorique 824.39 g.mol⁻¹; trouver 847.5 (M + Na⁺).

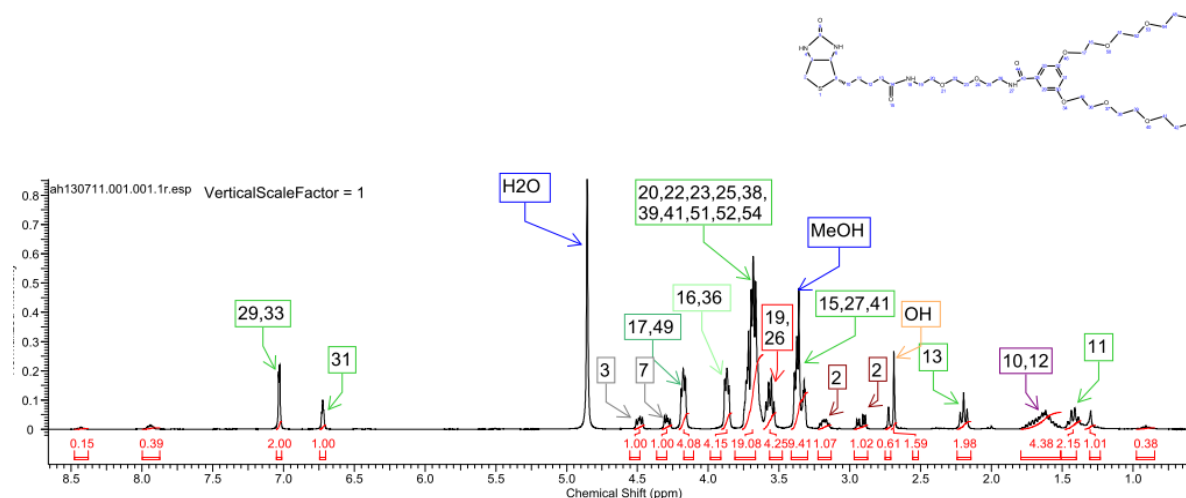


Figure 5.15. Spectromètre ¹H RMN du composé 8

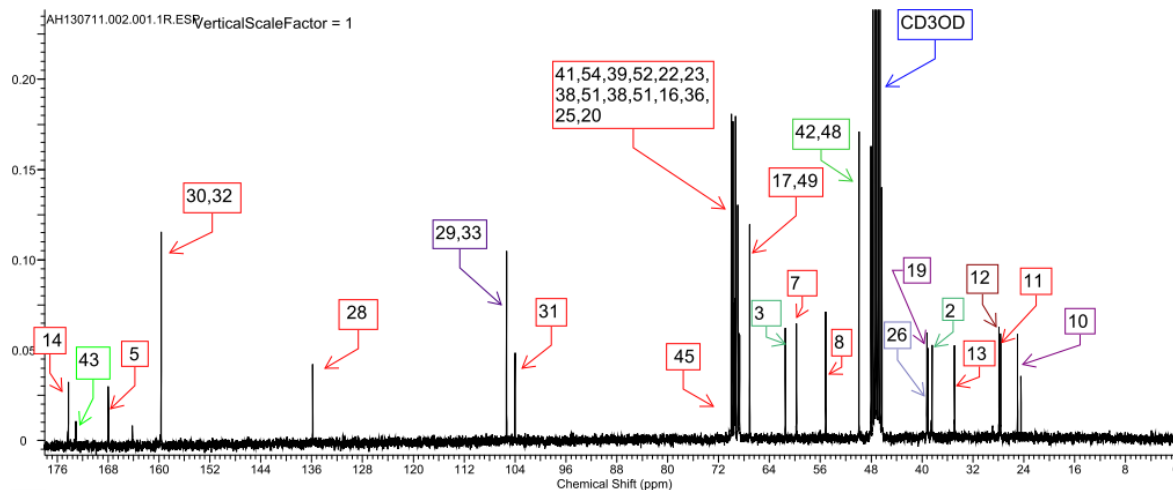


Figure 5.16. Spectromètre RMN ¹³C du composé 8

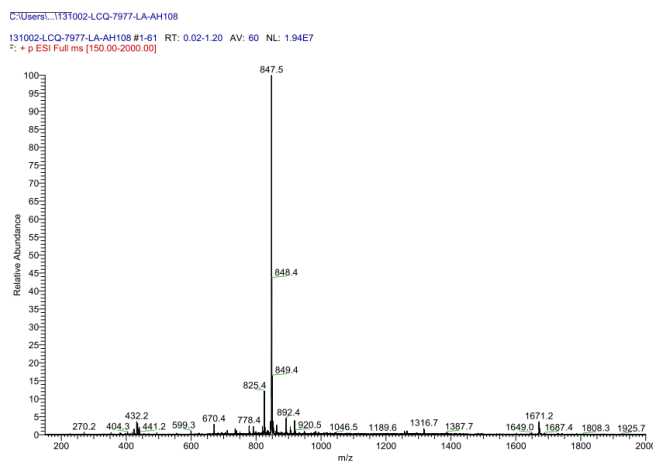
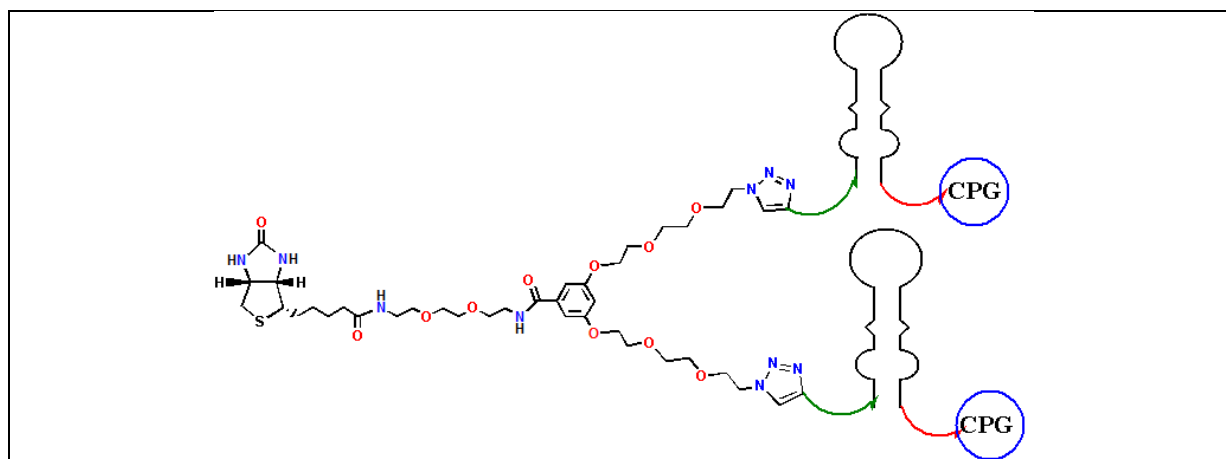


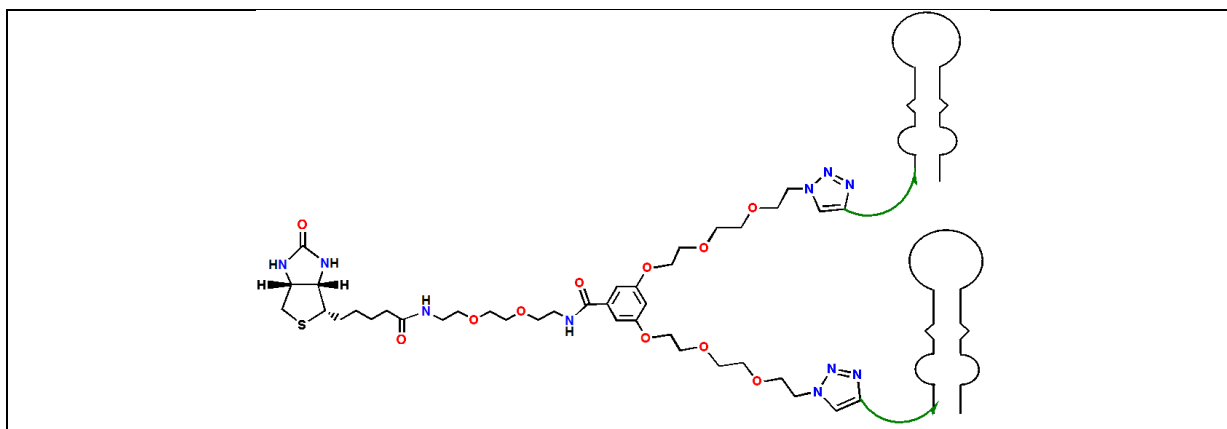
Figure 5.17. Spectromètre de masse MS (ESI) du composé 8

Composé 9: 3, 5-bis(2-(2-(2-triazole - espaceur HEG-F3B-CPG ethoxy) ethoxy) ethoxy)-N- (2-(2-(2-(5-((4S)-2-oxohexahydro-1 H-thieno [3, 4-d]imidazol-4-yl) pentanamido) ethoxy) ethoxy) ethyl) benzamide



Couplage en utilisation de micro-ondes. Une demi synthèse (500 nmol) de CPG-F3B- espaceur HEG- alcyne ou CPG-Contrôle- espaceur HEG- alcyne est repris dans 90 μl de tampon DMSO/t-BuOH (3/1 : v/v) dans une tube de microonde. On additionne une solution 100 μl de composé **8** (2 eq, de solution 10 mM dans DMSO anhydre), 150 μl de TBTA (30 eq, de solution 100 mM dans DMF anhydre), 35 μl du NaAsc (50 eq, de solution 1 M dans H₂O BM), dégazé le mélange réactionnel sous atmosphère inerte d'argon. On ajoute 125 μl de CuSO₄ (25 eq, de solution 100 mM dans H₂O BM). Le mélange est ensuite mis dans la microonde 100W à 45°C pendant 30 min. 5 Cycles dans la microonde, entre chaque cycle, le mélange réactionnel est dégazé et rajouté 10 μl du NaAsc. Le mélange réactionnel a ensuite été centrifugé pour éliminer le surnageant. Les billes ont été lavées avec 300 μl du DMF, 2 fois avec une solution d'EDTA 300 μl à 0,5 M PH8 et une fois avec de l'eau 300 μl pour obtenir le composé **9**.

Composé 10: 3, 5-bis(2-(2-(2-triazole - espaceur HEG-F3B ethoxy) ethoxy) ethoxy)-N- (2-(2-(2-(5-((4S)-2-oxohexahydro-1 H-thieno [3, 4-d]imidazol-4-yl) pentanamido) ethoxy) ethoxy) ethyl) benzamide



Les supports solides portant les Biotine-dendron- espaceur HEG-2F3B et Biotine-dendron- espaceur HEG-2Contrôle (composé **9**) sont transférés dans deux tubes eppendorf 2 ml à bouchon vissé et incubés dans 500 μl d'ammoniaque concentrée 28-30%, sous agitation à 55 °C pendant 5h. Le milieu est progressivement laissé refroidir à température ambiante 2 min. Chaque brut de déprotection a été transféré dans un nouveau tube eppendorf sous l'hotte et les billes sont rincées par de l'eau (4 x 200 μL). Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speed-vac. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par gel d'acrylamide 10 % pour obtenir le composé **10**. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par Nanodrop et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.18).

MALDI-TOF: calculer pour Biotine-dendron-2F3B : théorique 25425 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$; trouver 25395 ($\text{M} + \text{H}^+$), 50724 ($2\text{M} + \text{H}^+$).

MALDI-TOF: calculer pour Biotine-dendron-2Contrôle : théorique $25425 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; trouver $25407 (M + H^+)$, $50612 (2M + H^+)$, $75527 (3M + H^+)$ et $100787 (4M + H^+)$.

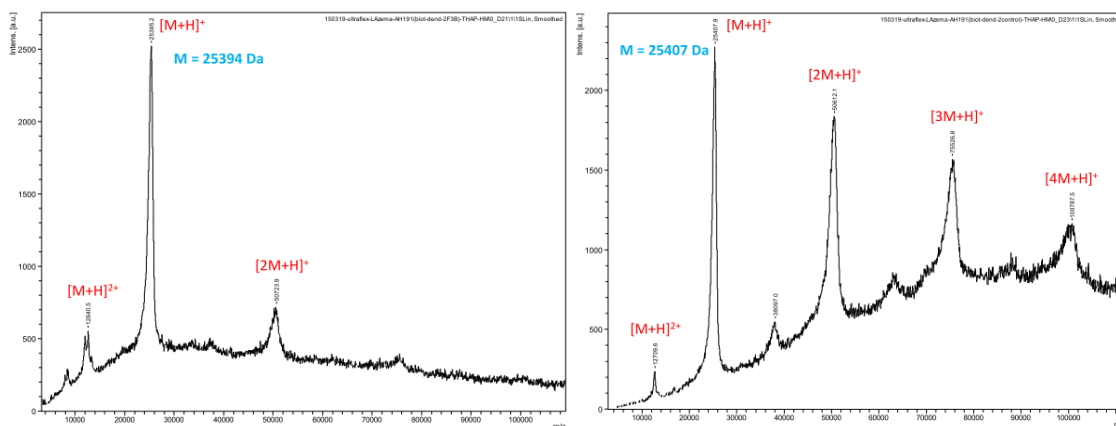
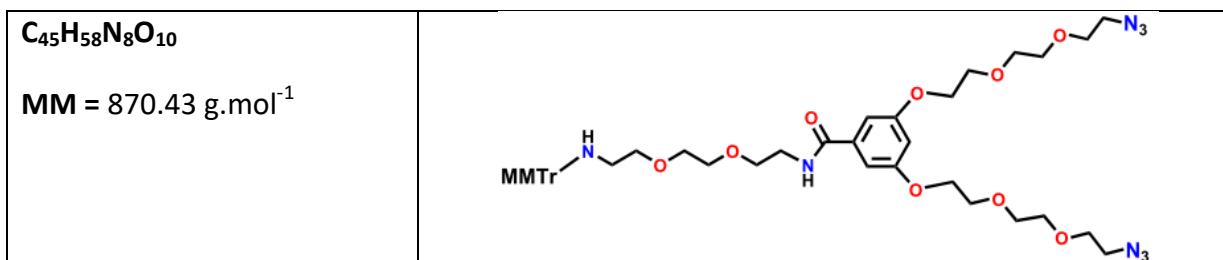
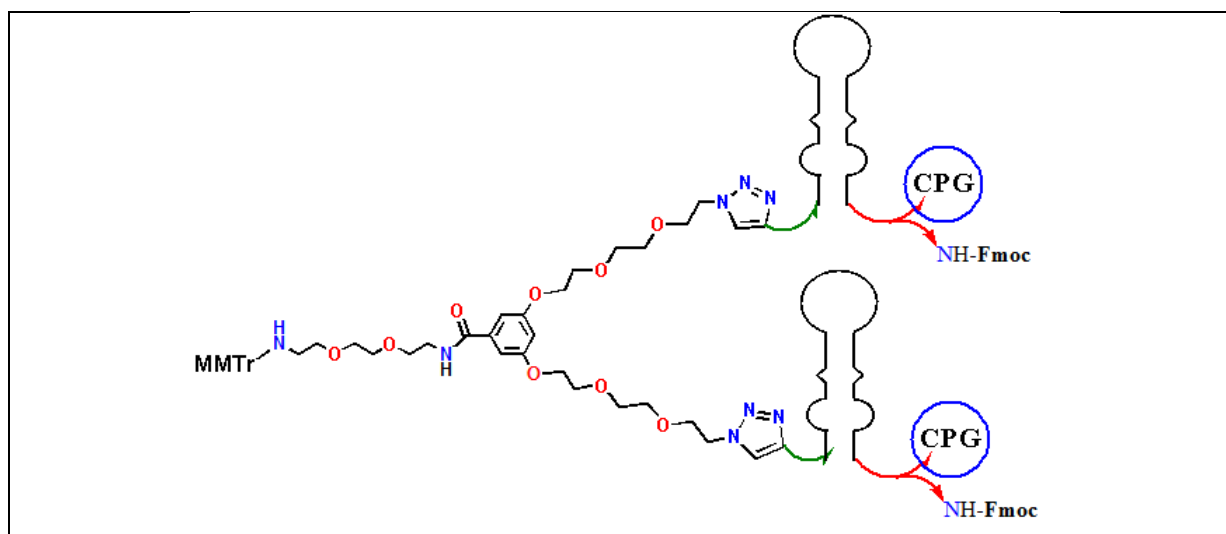


Figure 5.18. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de biotine-dendron- espacer HEG-2F3B (à gauche) et de son biotine-dendron- espacer HEG-2Contrôle (à droite)

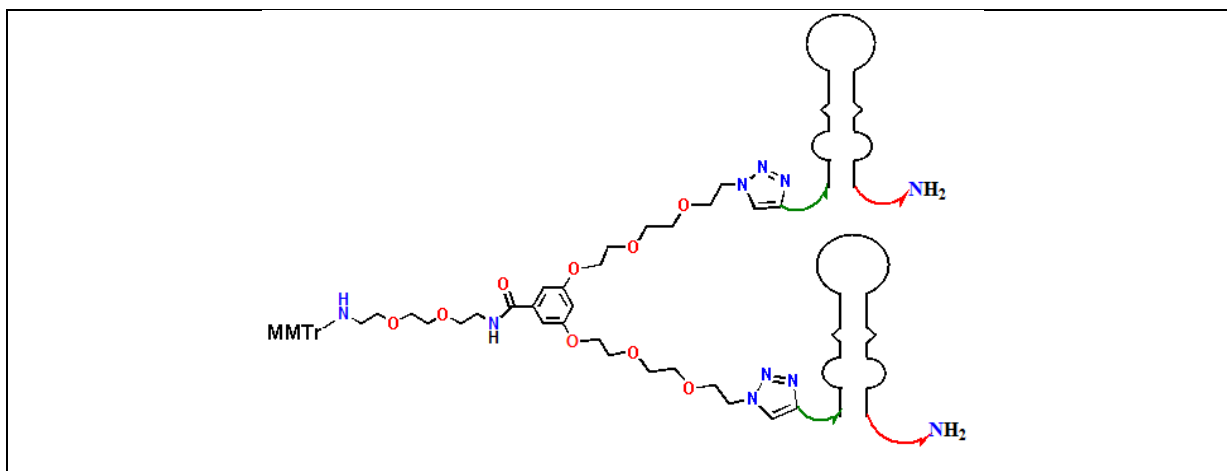
Composé 11: N-(2-(2-(2-((4-methoxyphenyl) diphenylmethylamino) ethoxy) ethoxy)ethyl) -3,5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamide



À une solution du composé **6** (0.4 g, 0.67 mmol) dans du DMF anhydre (10 ml), du K_2CO_3 (93 mg, 0.67 mmol), une solution du MMTr-Cl (0.25 g, 0.81 mmol) dans 5 ml du DMF anhydre a été additionnée goutte à goutte. Après, la solution est mise sous agitation 24h à 70°C . La réaction a été suivie par chromatographie sur couche mince (M2 : MeOH 9 : 1 v/v). Lendemain, la solution est alors éliminée sous vide. Le résidu est donc solubilisé dans 50 mL de CH_2Cl_2 , puis successivement lavé par trois fois 50 mL d'eau et une fois par 50 mL d'une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis le solvant est éliminé sous pression réduite. On obtient **11** après purification par chromatographie (éluant M2 jusqu'à M2/MeOH 9/1 v/v) sous forme d'une huile colorée; $m = 0.502 \text{ g}$, 75%.

Composé 12: MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2F3B-2NHFmoc-CPG

Couplage en utilisation de micro-ondes. Une demi-synthèse (500 nmol) d'alcyne- espaceur HEG-F3B-NHFmoc-CPG ou alcyne- espaceur HEG- Contrôle -NHFmoc-CPG est repris dans 100 μ l de tampon DMSO/t-BuOH (3:1) dans un tube de microonde. On additionne une solution 100 μ l de composé **11** (2 eq, de solution 10 mM dans DMSO anhydre), dégazé le mélange réactionnel sous atmosphère inerte d'argon, 150 μ l de TBTA (30 eq, de solution 100 mM dans DMSO/t-BuOH (3:1)), dégazé le mélange réactionnel sous atmosphère inerte d'argon, 35 μ l du NaAsc (50 eq, de solution 1 M dans H₂O BM), dégazé le mélange réactionnel sous atmosphère inerte d'argon. On ajoute 125 μ l de CuSO₄ (25 eq, de solution 100 mM dans H₂O BM). On laisse la réaction sous agitation à 45°C pendant 1h à 750 rpm. Le mélange est ensuite mis dans la microonde 100W à 60°C pendant 30 min. 7 Cycles dans la microonde, entre chaque cycle, le mélange réactionnel est dégazé et rajouté 10 μ l du NaAsc. Le mélange réactionnel a ensuite été centrifugé pour éliminer le surnageant. Les billes portant les oligos ont été lavées avec 300 μ l du DMF, 2 fois avec une solution d'EDTA 300 μ l à 0,5 M PH8 et une fois avec de l'eau 300 μ l pour obtenir le composé **12**.

Composé 13: MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2F3B-2NH₂

Les supports solides CPG portant les MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2F3B-2NHFmoc et MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2Contrôle -2NHFmoc (composé **12**) sont transférés dans deux tubes eppendorf 2 ml à bouchon vissé et incubés dans 500 μ l d'ammoniaque concentrée 28-30%, sous agitation à 55 °C pendant 5h30. Le milieu est progressivement laissé refroidir à température ambiante 2 min. Chaque brut de déprotection a été transféré dans un nouveau tube eppendorf sous l'hotte et les billes sont rincées par de l'eau (4 x 200 μ L). Le mélange brut de déprotection est alors évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speed-vac. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par gel d'acrylamide 6 % pour obtenir le composé **13**. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par Nanodrop et analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.19).

MALDI-TOF: calculer pour MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2F3B-2NH₂ : théorique 25197 g.mol⁻¹; trouver 25109 (M + H⁺).

MALDI-TOF: calculer pour MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2Contrôle -2NH₂ : théorique 25197 g.mol⁻¹; trouver 25091 (M + H⁺).

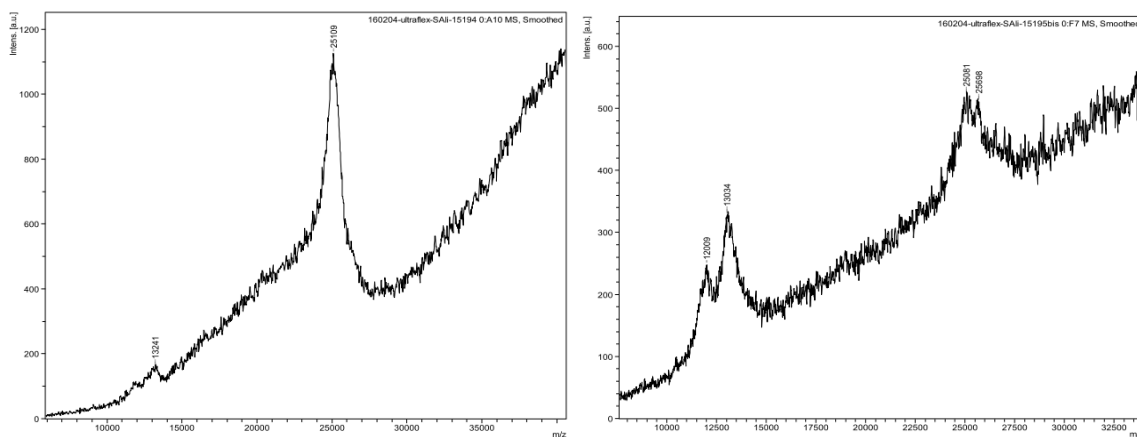
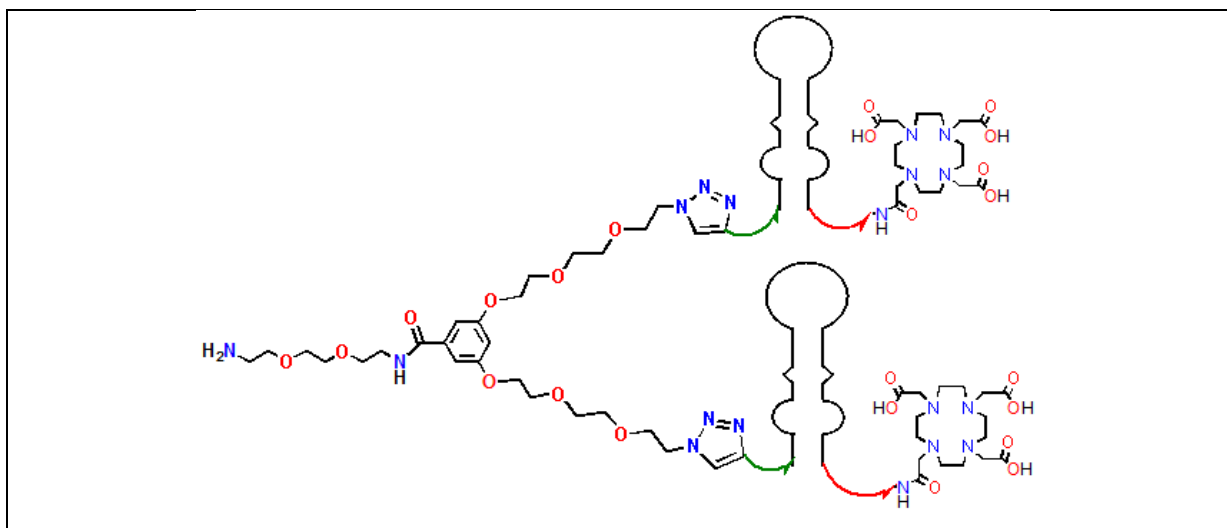


Figure 5.19. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2F3B-2NH₂ (à gauche) et de son MMTr-HN-dendron- espaceur HEG-2Contrôle -2NH₂ (à droite)

Composé 14: H₂N-dendron- espaceur HEG-2F3B-2DOTA

50 n.mol de MMTr-HN-dendron-espaceur HEG-2F3B-2NH₂ ou MMTr-HN-dendron-espaceur HEG-2Contrôle -2NH₂ (composé **13**) sont repris dans 150 µl de tampon de couplage. On additionne une solution de DOTA-NHS ester (1 mg, 100 eq) dans 30 µl de DMF anhydre en trois fois. Entre chaque addition, on laisse la réaction sous agitation à 45°C pendant 1h à 750 rpm. Après la dernière addition, l'incubation est maintenue une nuit sous agitation à 750 rpm à 25°C. Lendemain, les oligonucléotides ont été évaporé à sec, un traitement acide par une solution aqueuse d'acide acétique 80 % à 25°C pendant 1h30 à 750 rpm, a permis la déprotection du groupement MMTr. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par gel d'acrylamide 6 % pour obtenir le composé **14**. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par Nanodrop à 260 nm avec un rendement 46 % pour H₂N-dendron-espaceur HEG-2F3B-2DOTA et 60 % pour H₂N-dendron- espaceur HEG-2Contrôle -2DOTA et sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.20).

MALDI-TOF: calculer pour H₂N-dendron- espaceur HEG-2F3B-2DOTA: théorique 25702 g.mol⁻¹; trouver 25644 (M + H⁺).

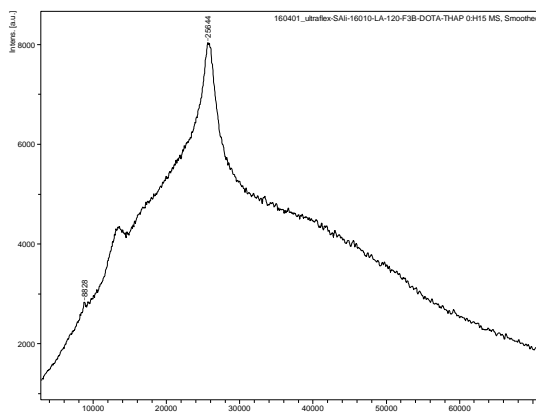
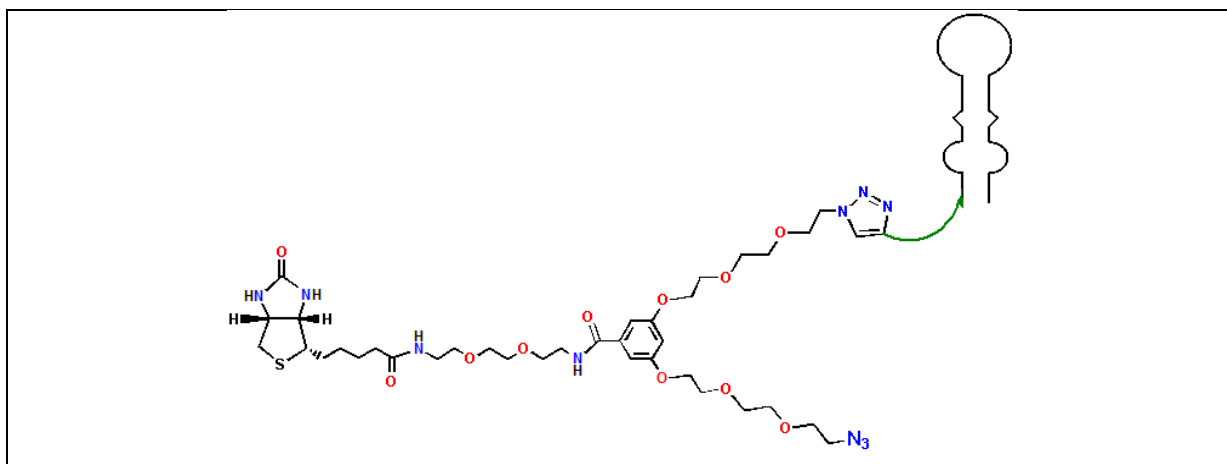


Figure 5.20. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de H₂N-dendron- espaceur HEG-2F3B-2DOTA

Composé 15: biotine-dendron-N₃-F3B

10 nmol du F3B-espaceur HEG- alcyne-NH₂ ou Contrôle-espaceur HEG- alcyne-NH₂ sont repris dans 10 µl H₂O BM. On additionne une solution 9 µl du composé 8 (10 eq, de solution 100 mM dans DMSO), 4 µl de TBTA (de solution 100 mM dans DMSO/t-BuOH 3/1 v/v), 2 µl de CuCl (de solution 100 mM dans DMSO/t-BuOH 3/1 v/v) et 10 µl du NaAsc (de solution 100 mM dans H₂O BM), dégazé le mélange réactionnel sous atmosphère inerte d'argon. On laisse la réaction sous agitation à 45°C pendant 3h à 750 rpm. Ensuite, 10 µl du NaAsc est ajouté, le mélange est laissé sous agitation à 45°C une nuit à 750 rpm. Lendemain, le mélange réactionnel est alors évaporé sous pression réduite à l'aide d'un appareil Speedvac. Les oligonucléotides sont ensuite purifiés par CLHP sur une colonne HEG pour obtenir le composé **15**. Les oligonucléotides purifiés sont quantifiés par Nanodrop avec un rendement 12 % pour Biotine-dendron (1N₃)- espaceur HEG-1F3B-1NH₂ et 15 % pour Biotine-dendron (1N₃)- espaceur HEG-1Contrôle -1NH₂ et sont analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Figure 5.21).

MALDI-TOF: calculer pour Biotine-dendron (1N₃)- espaceur HEG-1F3B-1NH₂ : théorique 14176 g.mol⁻¹; trouver 14495 (M + H⁺).

MALDI-TOF: calculer pour Biotine-dendron (1N₃)-espaceur HEG-1Contrôle-1NH₂ : théorique 14176 g.mol⁻¹; trouver 14491 (M + H⁺).

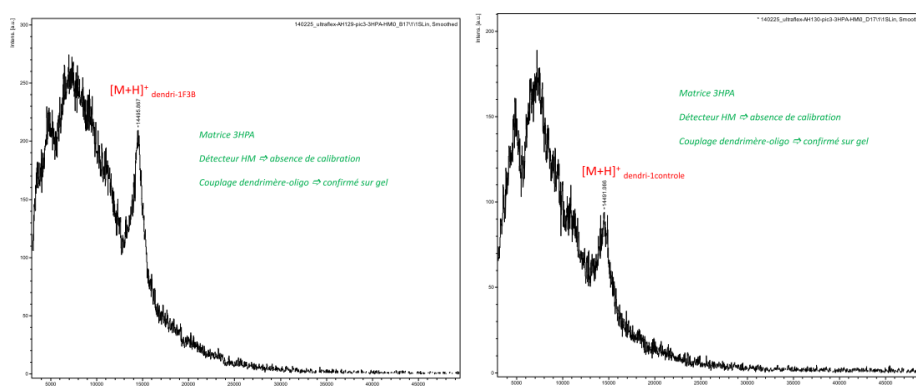
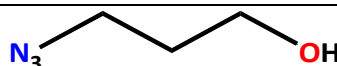


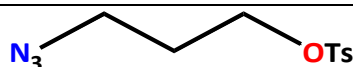
Figure 5.21. Spectrométrie de masse (Maldi-ToF, mode positif) de biotine-dendron-N₃-F3B (à gauche) et de son biotine-dendron-N₃-Contrôle (à droite)

Composé 16 : 3-azidopropan-1-ol $C_3H_7N_3O$ MM = 101.06 g.mol⁻¹

Dans un tricol de 100 mL, 2 g (14.4 mmol, 1.30 mL) de 1-bromo-3-propanol sont dilués dans 20 mL de DMF anhydre. Après addition de 1.41 g d'azoture de sodium (21.6 mmol), le milieu est alors agité et chauffé à 80 °C pendant 8h. La réaction est stoppée par l'ajout de 200 mL d'eau et le milieu à AcOEt (3 x 20 mL). Les phases organiques sont regroupées puis lavé par 3 fois 100 mL d'eau et une fois avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (3 x 100 mL). La phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre puis évaporée sous pression réduite. On obtient le composé **16** sous forme d'une huile jaune, le produit utilisé sans autre purification, m = 1.01 g, 69%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.74-3.68 (t, 2H); 3.44-3.39 (t, 2H); 1.82-1.76 (m, 2H).

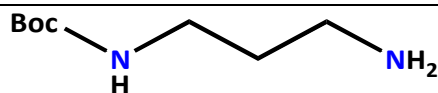
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 59.8; 48.4; 31.4.

Composé 17 : 3-azidopropyl 4-methylbenzenesulfonate $C_{10}H_{13}N_3O_3S$ MM = 255.29 g.mol⁻¹

Dans un tricol de 250 mL, on ajoute 8 mL d'une solution de NaOH à 50% à une solution de composé **16** (0.5 g, 4.9 mmol) dans 50 mL de THF. Le milieu réactionnel est agité à 0 °C pendant 30 min avant addition aux gouttes à gouttes via une ampoule à brome 4,20 g (22,1 mmol) de TsCl dissous dans 50 mL de THF. Après 8h d'agitation, le milieu est dilué avec de l'eau et extrait au CHCl₃ (3 x 30 mL). Les phases organiques sont regroupées puis lavées avec une solution de NaCl saturé (100 mL). Après élimination des produits secondaires, la solution est séchée par Na₂SO₄ et concentrée. On obtient, après purification par chromatographie (éluant M2/Hexane 5/5 v/v), le composé **17** sous forme d'une huile jaune-orangé; m = 0.354 g, 28%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 7.81-7.74 (d, 2H); 7.42-7.35 (d, 2H); 4.19-4.12 (t, 2H); 3.43-3.39 (t, 2H); 2.49-2.44 (s, 3H); 1.89-1.82 (m, 2H).

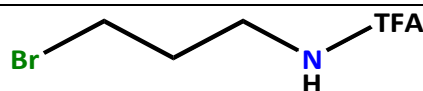
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 145.1; 132.7; 123; 128; 67; 47.3; 28.5; 21.7.

Composé 18 : tert-butyl 3-aminopropylcarbamate $C_8H_{18}N_2O_2$ MM = 174.14 g.mol⁻¹

Dans un tricol de 500 mL sous atmosphère inerte, contenant le 1,3-diaminopropane (6.76 mL, 81 mmol) dans 200 mL de DCM anhydre, on additionne très lentement via une ampoule à brome 3.53 g (16.2 mmol) de dicarbonate de di-tert-butyle dissous dans 100 mL de DCM anhydre. Après 2h d'agitation à TA, le milieu réactionnel est filtré sur fritté, le précipité est lavé au DCM et le filtrat récupéré et évaporé à sec. L'huile formée est mise en solution dans du Et₂O et la phase organique est lavée avec une solution de K₂CO₃ saturée. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé. On récupère le composé **18** sous forme d'une huile incolore; m = 2.568 g, 94%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.26-3.16 (q, 2H); 2.73-2.68 (q, 3H); 1.63-1.57 (m, 5H); 1.48-1.41 (s, 9H).

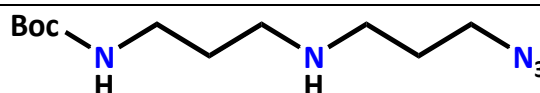
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 156.15; 39.8; 39.8; 38.3; 37.2; 33.4; 31.2; 28.4.

Composé 19 : N-(3-bromopropyl)-2,2,2-trifluoroacetamide $C_5H_7BrF_3NO$ MM = 234.01 g.mol⁻¹

Dans un bicol de 250 mL, contenant du bromhydrate de 3-bromopropan-1-amine (4 g, 18.3 mmol) en solution dans 100 mL de méthanol, on additionne 14.8 mL (11 mmol) de triéthylamine et le milieu réactionnel est mis à 0°C et 13 mL (11 mmol) de TFA sont ajoutés. Après 3h d'agitation à 0°C, le solvant est évaporé puis le résidu mis en solution dans 100 mL de DCM. La solution est lavée avec de l'eau (100 mL) puis une solution de NaHCO₃ saturée (2 x 100 mL) et par une solution de NaCl saturée (100 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé. On récupère le composé **19** sous forme d'une poudre jaune; m = 3.4 g, 80%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.87-6.76 (s, 1H); 3.66-3.53 (q, 2H); 3.46-3.41 (m, 2H); 2.23-2.18 (m, 2H).

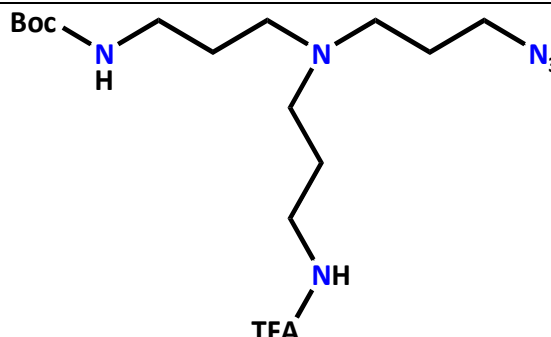
¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 157.4; 117.6; 113.8; 38.6; 31.2; 30.

Composé 20 : tert-butyl 3-(3-azidopropylamino)propylcarbamate $C_{11}H_{23}N_5O_2$ MM = 257.33 g.mol⁻¹

Dans un ballon de 25 mL sous atmosphère inerte contenant 103 mg (0.58 mmol) de composé **18** en solution dans 10 mL d'acetonitrile anhydre, on ajoute 342 mg de KF suivi de 150 mg (0.58 mmol) de composé **17**. Après 3 jours d'agitation à 50°C, le milieu est filtré sur frité puis le filtrat est récupéré et évaporé. On obtient **20** après purification par chromatographie (éluant CH₂Cl₂/MeOH/ NH₃ 1% : 100/2.5/1 v/v/v) sous forme d'une huile jaune-orangée; m = 70 mg, 47%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.46-3.39 (t, 2H); 3.18-3.10 (m, 2H); 2.67-2.58 (m, 2H); 1.83-1.78 (m, 2H); 1.69-1.61 (t, 2H); 1.48-1.37 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 156.8; 78.1; 37.2; 28.8; 27.9; 27.

Composé 21 : N-(3-azidopropyl)-N-(3-(2,2,2-trifluoroacetamide)propyl)-N-tert-butyl 3-aminopropylcarbamate $C_{16}H_{29}F_3N_6O_3$ MM = 410.44 g.mol⁻¹

Dans un ballon de 25 mL sous atmosphère inerte contenant 70.5 mg (0.27 mmol) de composé **20** en solution dans 5 mL d'acetonitrile anhydre, on ajoute 160 mg (2,7 mmol) de KF suivi de 64 mg (0,27 mmol) de composé **19**. Après 3 jours d'agitation à 50°C, le milieu est filtré sur frité puis le filtrat récupéré et évaporé. On obtient **21** après purification par chromatographie (éluant CH₂Cl₂/MeOH/ NH₃ 1% : 100/2.5/1 v/v/v) sous forme d'une huile jaune-orangée; m = 39 mg, 35%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.46-3.39 (t, 4H); 3.18-3.10 (m, 2H); 2.64-2.47 (m, 6H); 1.80-1.75 (m, 4H); 1.69-1.59 (t, 2H); 1.44-1.37 (s, 9H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 156.8; 78.1; 37.2; 28.8; 27.9; 27.

MS (ESI) : calculer pour $C_{16}H_{29}F_3N_6O_3$: théorique $410.44 \text{ g.mol}^{-1}$; trouver 409.2 ($M - H^+$).

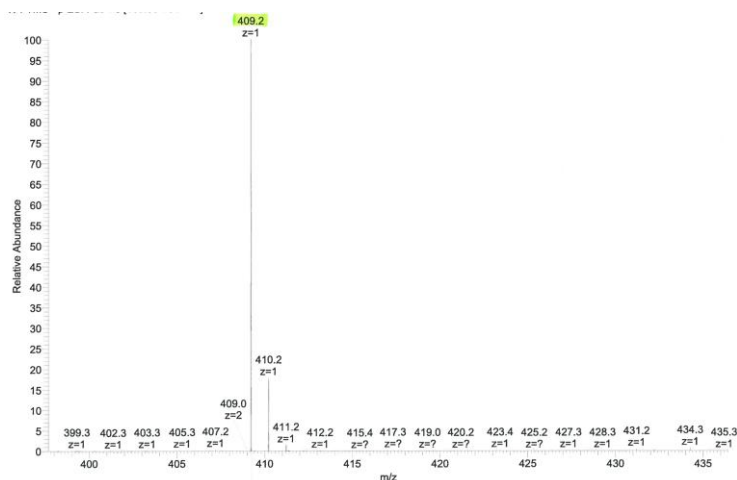
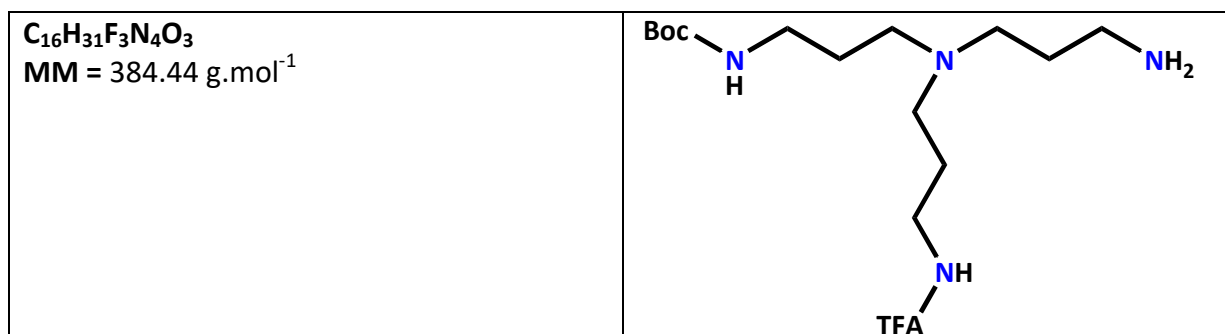


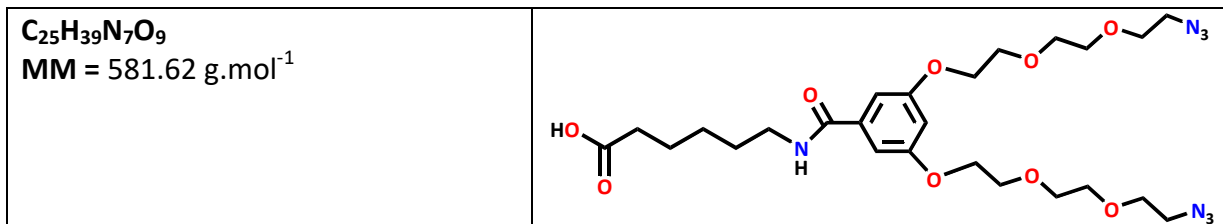
Figure 2.22. Spectromètre de masse MS (ESI) du composé 21

Composé 22 : N-(3-aminoopropyl)-N-(3-(2,2,2-trifluoroacetamide)propyl)-N-tert-butyl 3-aminopropylcarbamate



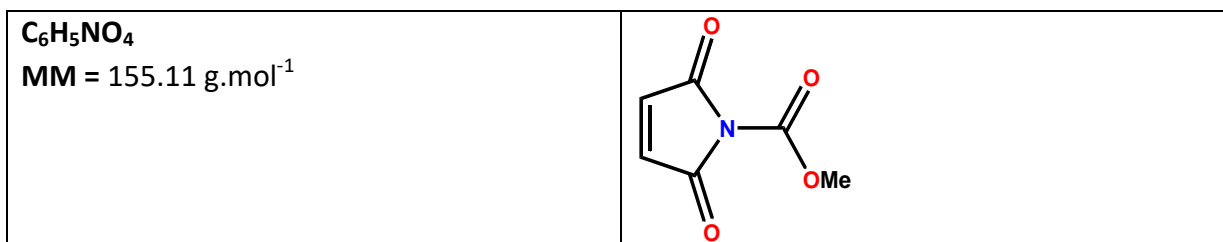
Dans un tube eppendorf de 2 mL muni d'un bouchon, contenant 80 mg (0.3 mmol) de résine de PPh_3 et 0.3 mL de THF anhydre, on additionne 25 mg (0.06 mmol) de composé **21**. Après 2h d'agitation à TA, on additionne 0.5 mL d'eau. Les billes de PPh_3 sont évacuées et le solvant évaporé. On récupère le produit pur suivant CCM sous la forme d'une huile jaune orangée, utilisé tel quel pour l'étape suivante; m = 84.2 mg, 73%.

Composé 23 : 6-(3,5-bis(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzamido)hexanoic acid



Dans un bicol de 100 mL contenant 130 mg (0.23 mmol) de composé **5** en solution dans 15 mL de DMF anhydre, on additionne goutte à goutte en 1h, 52 mg (0.39 mmol) d'acide aminocaproïque dissous dans 15 mL de NaHCO₃ 1M. Après 24 h d'agitation à TA, on neutralise avec 15 mL d'HCl 1N puis on extrait au DCM (3 x 40 mL). Les phases organiques sont regroupées et évaporées. On obtient **23** après purification par chromatographie (éluant M2 AcOH 2% : v/v) sous forme d'une huile jaune-orangée; m = 0.652 g, 50.2%.

Composé 24 : methyl 2,5-dioxo-2H-pyrrole-1(5H)-carboxylate



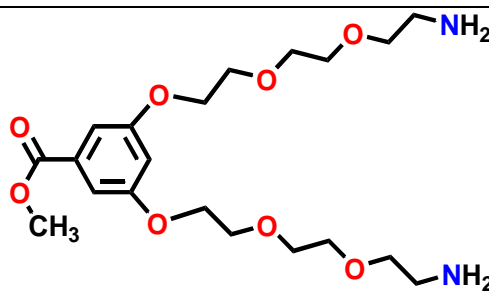
Dans un bicol de 250 mL, contenant du maléimide (2 g, 0.2 mmol) en solution dans 80 mL d'AcOH, on additionne 2 mL (0.21 mmol) de N-méthyl morpholine et le milieu réactionnel est mis à 0°C pendant 10 min. on additionne ensuite 2 mL deméthylchloroformate dans 5 mL d'AcOEt. L'agitation est maintenue 1h à TA, le milieu réactionnel est dilué avec 100 mL d'AcOEt puis lavée avec une solution de NaHCO₃ saturée (2 x 100 mL) et par une solution de NaCl saturée (100 mL). La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ puis le solvant est évaporé. On récupère le composé **24** sous forme d'une poudre; m = 1.28 g, 41.2%.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 6.91-6.86 (d, 2H); 4-3.92 (s, 3H).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 165.8; 148; 146; 54.9.

Composé 25 : methyl 3,5-bis(2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)benzoate

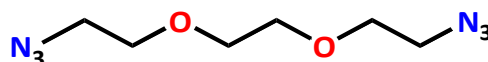
$C_{20}H_{34}N_2O_8$
 MM = 430.49 g.mol⁻¹



Dans un ballon de 10 mL contenant 100 mg (0.21 mmol) **4** en solution dans 5 mL de THF et 0.3 mL d'eau, on additionne 170 mg (0.64 mmol) de PPh₃. Après 24 h d'agitation à TA, le THF est évaporé et 10 mL d'eau sont ajoutés au résidu. Le milieu est lavé au DCM (3 x 50 mL). La phase aqueuse est récupérée et l'eau est évaporée. Le brut est filtré sur silice. On obtient **25** sous forme d'une huile jaune orangée; m = 0.69 g, 97%.

Composé 26: 1,2-bis(2-azidoethoxy)-ethane

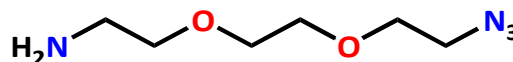
$C_6H_{12}N_6O_2$
 MM = 200.01 g.mol⁻¹



A un mélange de DMF/H₂O (9/1 : 200 mL v/v) est additionné du dichlorotriéthylglycol (8.91 mL, 56.7 mmol) et de l'azoture de sodium (11.05 g, 170 mmol). Le mélange est alors agité 22h à 80°C. Après retour à température ambiante, le composé est extrait avec Et₂O (3 x 50 mL); la phase organique est séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentrée sous pression réduite. On obtient le composé **26** sous forme d'une huile incolore; m= 9.1 g, 80%.

Composé 27 : 2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethanamine

$C_6H_{14}N_4O_2$
 MM = 174.11 g.mol⁻¹
 Rf : 0.25 (M2/MeOH = 9/1 v/v)



L'intermédiaire diazido-TEG **26** (8 g, 40 mmol) est ajouté à une solution aqueuse de HCl (1M, 70 mL), THF (14 mL) et Et₂O (70 mL) sous agitation forte à 0°C pendant 10 minutes. PPh₃ (10.5 g, 40 mmol) en solution dans Et₂O (75 mL), est additionné par portions sur 1h à 0°C puis l'agitation est maintenue pendant 20 h à température ambiante. La solution est

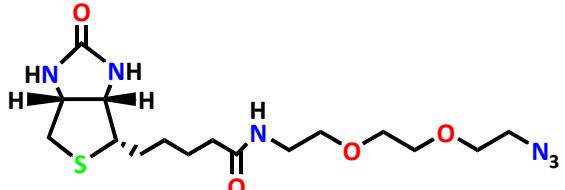
diluée avec HCl (50 mL, 4N) et la phase organique est lavée avec d'HCl (2x50 mL, 4N). La phase aqueuse est ensuite lavée avec Et₂O (3x50 mL), puis NaOH solide est ajoutée sur la phase aqueuse jusqu'à pH=14; le composé est alors extrait par CH₂Cl₂ (3x50 mL), séchée sur sulfate de sodium anhydre et concentré sous pression réduite. On obtient le produit **27** sous forme d'une huile incolore; m=4.85 g, 70%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 3.45-3.73 (m, 6H, 3 x CH₂-O); 3.49-3.56 (m, 2H, CH₂); 3.37-3.45 (m, 2H, CH₂-N₃); 2.84-2.92 (m, 2H, CH₂-NH₂).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) : 73.1; 70.2; 69.8; 69.6; 50.2; 41.3.

MS (ESI) : calculer pour C₆H₁₄N₄O₂ : 174.1 g.mol⁻¹; trouver [M+H]⁺ : 174.9 g.mol⁻¹.

Composé 28 : N-(2-{{2-(2-azidoethoxy)ethoxy}}ethyl)-5-[(4R)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamide

<p>C₁₆H₂₈N₆O₄S MM = 400.19 g.mol⁻¹ Rf : 0.30 (M2/MeOH = 8.5/1.5 v/v)</p>	
---	---

Sous d'argon inerte, on ajoute à une solution du composé **7** (0.3 g, 0.88 mmol), dans du DMF anhydre (10 mL), de l'Et₃N distillé (0.68 mL, 4.87 mmol). Une solution du **27** (0.23 g, 1.32 mmol) dans 2 mL du DMF anhydre à été additionné goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu est agité une nuit à température ambiante. La réaction à été suivi par chromatographie sur couche mince (M2/MeOH : 8/2 v/v). Lendemain; la solution est alors évaporée à sec, ensuite lavée par Et₂O (2x50 mL). On obtient, après concentration par chromatographie sur colonne (élution M₂/MeOH : 9.5/0.5 v/v jusqu'à M₂/MeOH : 8.5/1.5 v/v), le composé **28** sous forme d'une poudre blanche m=0.27 g, 64 %.

¹H NMR (300 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) : 4.55-4.48 (m, 1H, CH-NH); 4.36-4.29 (m, 1H, CH-NH); 3.74-3.61 (m, 8H, 4xCH₂); 3.6-3.53 (m, 3H, CH); 3.43-3.34 (m, 6H, 3xCH₂); 3.26-3.18 (m, 1H, CH₂-S); 2.56-2.47 (m, 1H, CH₂-S); 2.43-2.34 (m, 1H, CH₂-S); 2.28-2.19 (m, 2H, CH₂-CO); 1.8-1.56 (m, 4H, 2xCH₂); 1.51-1.38 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) : 174.7; 164.7; 70.1; 69.9; 69.7; 69.2; 62; 60; 55.6; 50; 39.7; 38.9; 35.4; 28.4; 28; 25.5.

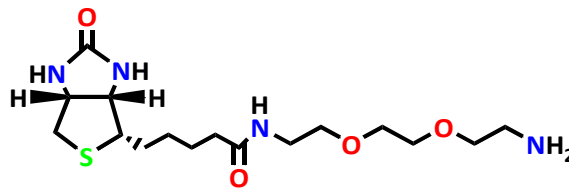
¹³C NMR (DEPT) (75 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) : 70.1; 69.9; 69.7; 69.3; 61.9; 60.2; 55.6; 50.3; 39.7; 38.9; 35.4; 28.4; 28.1; 25.5.

Composé 29 : N-(2-{{2-(2-aminoethoxy)ethoxy}}ethyl)-5-[(4R)-2-oxohexahydro-1H-thieno[3,4-d]imidazol-4-yl]pentanamide

C₁₆H₃₀N₄O₄S

MM = 374.2 g.mol⁻¹

Rf : 0.15 (M2/MeOH = 8/2 v/v)



Dans un tube eppendorf de 2 mL muni d'un bouchon vissé, contenant 0.25 g (0.75 mmol) de résine de PPh₃ et 0.7 mL de DMF anhydre, une solution du **28** (0.15 g, 0.37 mmol) dans 0.3 mL du DMF anhydre à été additionné. Après la fin de l'addition, le milieu est agité 3h à température ambiante, on additionne (0.19 mL, 9.37 mmol) d'eau et le milieu est encore agité 15h à température ambiante. La réaction à été suivi par chromatographie sur couche mince (M2/MeOH : 8/2 v/v). Les billes de PPh₃ sont évacuées et le solvant évaporé. On récupère le produit **29** pur sous la forme d'une poudre blanche m=0.14 g, 98.3%.

¹H NMR (300 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) : 4.55-4.48 (m, 1H, CH-NH); 4.36-4.28 (m, 1H, CH-NH); 3.69-3.50 (m, 8H, 4xCH₂); 3.43-3.29 (m, 4H, 2xCH₂); 3.27-3.17 (m, 1H, CH₂-S); 2.95-2.89 (m, 2H, CH₂-NH₂); 2.76-2.66 (m, 1H, CH₂-S); 2.56-2.43 (m, 2H, CH₂-S); 2.29-2.18 (m, 2H, CH₂-CO); 1.81-1.56 (m, 4H, 2xCH₂); 1.51-1.41 (m, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75 MHz, MeOD-d₄) δ (ppm) : 174.7; 163.4; 70.4; 70; 69.9; 69.3; 62; 60; 55.6; 40.3; 39.7; 38.9; 35.6; 28.4; 28.1; 25.5.

MS (ESI) : calculer pour C₁₆H₃₀N₄O₄S : 374.2 g.mol⁻¹; Trouver : [M+H]⁺ : 375.3 g.mol⁻¹.

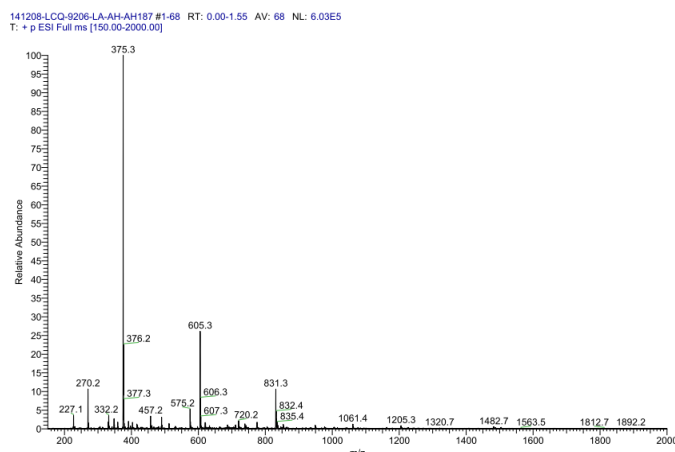
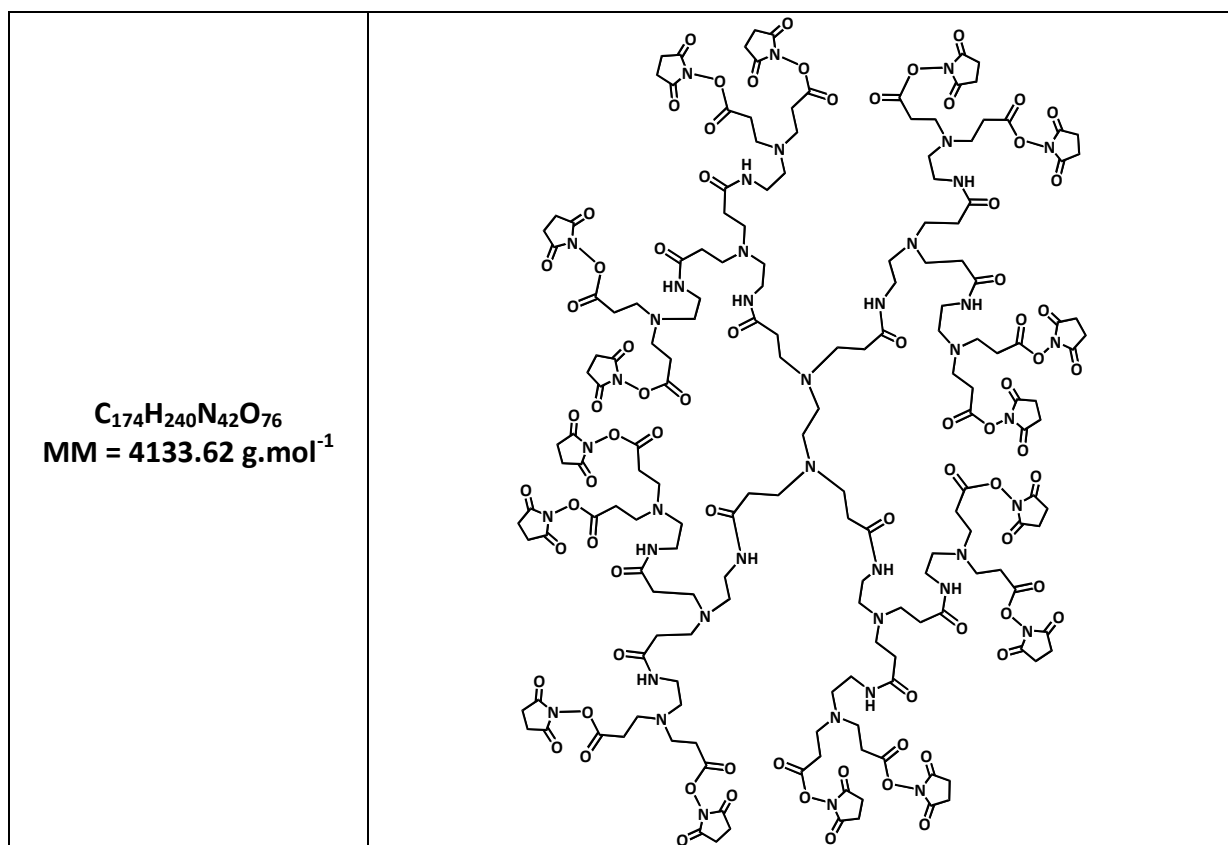


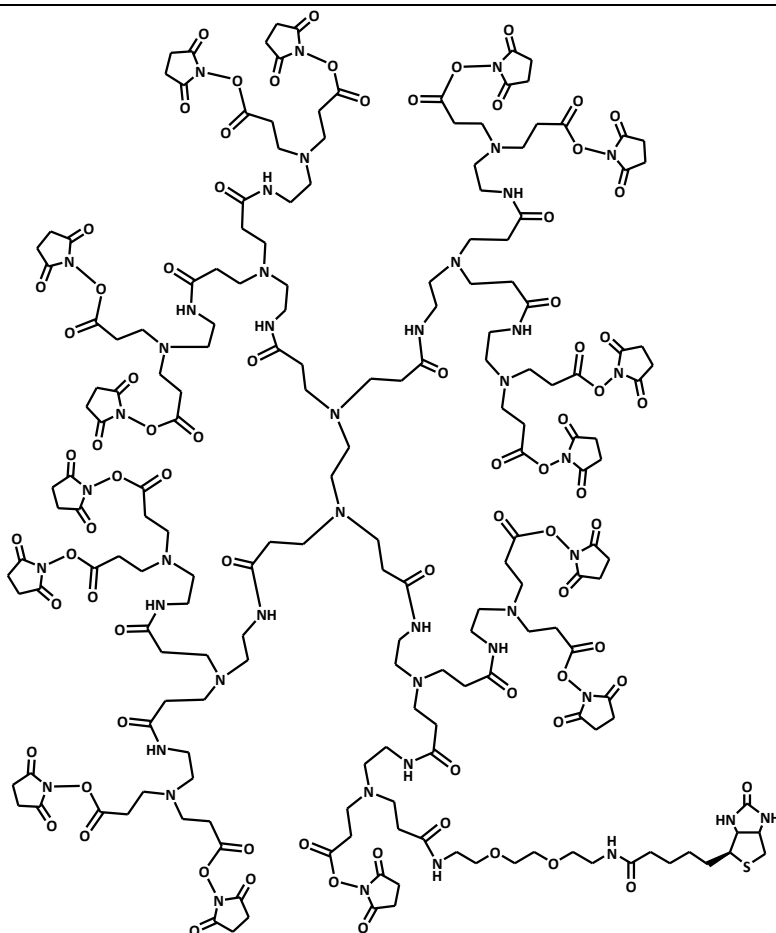
Figure 5.23. Spectromètre de masse MS (ESI) du composé 29

Composé 30 : Dendrimère PAMAM-16NHS

Sous d'argon inerte, on ajoute à une solution du dendrimère commercial PAMAM-16COOH (0.1 g, 0.04 mmol) dans du DMF anhydre (2 mL), du NHS (0.12 g, 0.93 mmol) et du DCC (0.19 g, 0.93 mmol). La solution est ensuite laissée sous agitation magnétique 24h à température ambiante, le mélange est ensuite filtré. Le filtrat est alors éliminé sous pression réduite. Puis rincée plusieurs fois avec CH_2Cl_2 jusqu'à élimination complète du DCU. On obtient le produit **30** sous forme d'huile visco introduite directement sans purification ultérieure dans l'étape suivante, m= 0.15 g, 93.1%.

Composé 31 : Dendrimère PAMAM(15NHS)-Biotine

C₁₈₆H₂₆₅N₄₅O₇₇S
MM = 4395.41 g.mol⁻¹



Sous d'argon inerte, on ajoute à une solution du composé **30** (2.5 mg, 6.67 μmol , 1 eq), dans du DMF anhydre (1.2 mL), de l' Et_3N distillé (1.39 μL , 10.01 μmol), une solution du **29** (27.59 mg, 6.67 μmol , 1 eq) dans 1 mL du DMF anhydre à été additionné goutte à goutte. Après la fin de l'addition, le milieu est agité une nuit à température ambiante. Lendemain, la solution est alors évaporée à sec, ensuite lavée par Et_2O (2 x 1 mL). Le composé **31** est obtenu sous forme d'une huile visco m= 26.3 mg, 89.76%.

Références Bibliographiques

- 1- Toulmé JJ, Da Rocha S, Dausse E, Azéma L, Lebars I, Moreau S. 2007. Aptamers, from concept to tools. *Med Nucl* **31**: 478-484.
- 2- Wilson C, Szostak JW. 1995. *In vitro* evolution of a self-alkylating ribozyme. *Nature* **374**: 777-782.
- 3- Niazi JH, Lee SJ, Kim YS, Gu MB. 2008. ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. *Bioorg Med Chem* **16**: 1254-1261.
- 4- Ellington AD, Szostak JW. 1990. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**: 818–822.
- 5- Tuerk C, Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment : RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505-510.
- 6- Lakhin AV, Tarantul VZ, Gening LV. 2013. Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta Naturae* **5**: 34-43.
- 7- Toulmé JJ, Giegé R. 1998. Aptamers : ligands and catalysts obtained by *in vitro* selection. *Medecine sciences* **14**: 155-166.
- 8- Pendergrast PS, Marsh HN, Grate D, Healy JM, Stanton M. 2005. Nucleic acid aptamers for target validation and therapeutic applications. *J Biomol Tech* **16**: 224-234.
- 9- Ni X, Castanares M, Mukherjee A, Lupold SE. 2011. «Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons». *Curr Med Chem* **18**: 4206-4214.
- 10- Watson JD, Crick FHC. 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**: 737-738.
- 11- Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucl Acids Res* **34**: 564-574.
- 12- Hilbers CW, Heus HA, Dongen MJPV, Wumenga SS. 1994. The Hairpin Elements of Nucleic Acid Structure: DNA and RNA Folding. *Nucleic Acids Mol Biol* **8**: 56-104.
- 13- Radom F, Jurek PM, Mazurek MP, Otlewski J, Jeleń F. 2013. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnol Adv* JBA-06677.
- 14- Ganji A, Varasteh A, Sankian M. 2016. Aptamers: new arrows to target dendritic cells. *J Drug Target* **24**: 1–12.
- 15- Dausse E, Da Rocha Gomes S, Toulmé JJ. 2009. Aptamers : a new class of oligonucleotides in the drug discovery pipeline. *Curr Opin Pharmacol* **9**: 602-607.
- 16- Gold L, Polisky B, Uhlenbeck O, Yarus M. 1995. Diversity of oligonucleotide functions. *Annu Rev Biochem* **64**: 763-797.
- 17- Famulok M, Mayer G. 1999. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr Top Microbiol Immunol* **243**: 123-136.
- 18- Toulmé JJ. 2000. Aptamers: selected oligonucleotides for therapy. *Curr Opin Mol Ther* **2**: 318-324.
- 19- Shangguan D, Cao ZH, Meng L, Mallikaratchy P, Sefah K, Wang H, Li Y, Tan WH. 2008a. Cell-specific aptamer probes for membrane protein elucidation in cancer cells. *J Proteome Res* **7**: 2133–2139.

- 20- Li X, An Y, Jin J, Zhu Z, Hao L, Liu L, Shi Y, Fan D, Ji T, Yang CJ. 2015. Evolution of DNA aptamers through *in vitro* metastatic-cell-based systematic evolution of ligands by exponential enrichment for metastatic cancer recognition and imaging. *Anal Chem* **87**: 4941–4948.
- 21- Li X, Zhang W, Liu L, Zhu Z, Ouyang G, An Y, Zhao C, Yang CJ. 2014. *In Vitro* Selection of DNA Aptamers for Metastatic Breast Cancer Cell Recognition and Tissue Imaging. *Anal Chem* **86**: 6596–6603.
- 22- Sefah K, Tang ZW, Shangguan DH, Chen H, Lopez-Colon D, Li Y, Parekh P, Martin J, Meng L, Phillips JA, et al. 2009. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* **23**: 235–244.
- 23- Shangguan D, Meng L, Cao ZC, Xiao Z, Fang X, Li Y, Cardona D, Witek RP, Liu C, Tan W. 2008b. Identification of Liver Cancer-Specific Aptamers Using Whole Live Cells. *Anal Chem* **80**: 721–728.
- 24- Xu J, Teng IT, Zhang L, Delgado S, Champanhac C, Cansiz S, Wu C, Shan H, Tan W. 2015. Molecular Recognition of Human Liver Cancer Cells Using DNA Aptamers Generated via Cell-SELEX. *Plos One* **10**: e0125863.
- 25- Jensen KB, Atkinson BL, Willis MC, Koch TH, Gold L. 1995. Using *in vitro* selection to direct the covalent attachment of human immunodeficiency virus type 1 Rev protein to high-affinity RNA ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12220–12224.
- 26- Golden MC, Collins BD, Willis MC, Koch TH. 2000. Diagnostic potential of PhotoSELEX-evolved ssDNA aptamers. *J Biotechnol* **81**: 167-178.
- 27- Kong HY, Byun J. 2013. Nucleic Acid aptamers: new methods for selection, stabilization, and application in biomedical science. *Biomol Ther (Seoul)* **21**: 423-434.
- 28- Shangguan D, Li Y, Tang Z, Cao ZC, Chen HW, Mallikaratchy P, Sefah K, Yang CJ, Tan W. 2006. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11838-11843.
- 29- Mi J, Liu YM, Rabbani ZN, Yang ZG, Clary BM. 2010. *In vivo* selection of tumor-targeting RNA motifs, *Nat Chem Biol* **6**: 22-24.
- 30- Berezovski M, Musheev M, Drabovich A, Krylov SN. 2006. Non-SELEX selection of aptamers. *J Am Chem Soc* **128**: 1410-1411.
- 31- Gopinath SC. 2007. Methods developed for SELEX. *Anal Bioanal Chem* **387**: 171-182.
- 32- White R, Rusconi C, Scardino E, Wolberg A, Lawson J, Hoffman M, Sullenger B. 2001. Generation of species cross-reactive aptamers using "toggle" SELEX. *Mol Ther* **4**: 567-573.
- 33- Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Kondo A. 2010. Selection of DNA aptamers using atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res* **38**: e21.
- 34- Wlotzka B, Leva S, Eschgfäller B, Burmeister J, Kleinjung F, Kaduk C, Muhn P, Hess-Stumpp H, Klussmann S. 2002. *In vivo* properties of an anti-GnRH Spiegelmer: an example of an oligonucleotide-based therapeutic substance class. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8898-8902.
- 35- Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. 1992. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature* **355**: 564-566.
- 36- Stojanovic MN, De Prada P, Landry DW. 2001. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J Am Chem Soc* **123**: 4928-4931.

- 37- Gal SW, Amontov S, Urvil PT, Vishnuvardhan D, Nishikawa F, Kumar PK, Nishikawa S. 1998. Selection of a RNA aptamer that binds to human activated protein C and inhibits its protease function. *Eur J Biochem* **252**: 553-562.
- 38- Stojanovic MN, Landry DW. 2002. Aptamer-Based Colorimetric Probe for Cocaine. *J Am Chem Soc* **124**: 9678-9679.
- 39- Lauhon CT, Szostak JW. 1995. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J Am Chem Soc* **117**: 1246-1257.
- 40- Ciesiolka J, Gorski J, Yarus M. 1995. Selection of an RNA domain that binds Zn²⁺. *RNA* **1**: 538-550.
- 41- Huizenga DE, Szostak JW. 1995. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry* **34**: 656-665.
- 42- Mannironi C, Di Nardo A, Fruscoloni P, Tocchini-Valentini GP. 1997. *In vitro* selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry* **36**: 9726-9734.
- 43- Ducongé F, Toulmé JJ. 1999. *In vitro* selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *RNA* **5**: 1605-1614.
- 44- Berens C, Thain A, Schroeder R. 2001. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg Med Chem* **9**: 2549-2556.
- 45- Hicke BJ, Marion C, Chang YF, Gould T, Lynott CK, Parma D, Schmidt PG, Warren S. 2001. Tenascin-C aptamers are generated using tumor cells and purified protein. *J Biol Chem* **276**: 48644-48654.
- 46- Meli M, Vergne J, Décout JL, Maurel MC. 2002. Adenine-aptamer complexes: a bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base. *J Biol Chem* **277**: 2104-2111.
- 47- Mendonsa SD, Bowser MT. 2004. *In vitro* selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal Chem* **76**: 5387-5392.
- 48- Majerfeld I, Puthenvedu D, Yarus M. 2005. RNA affinity for molecular L-histidine; genetic code origins. *J Mol Evol* **61**: 226-235.
- 49- Mann D, Reinemann C, Regina S, Beate S. 2005. *In vitro* selection of DNA aptamers binding ethanolamine. *Biochem Biophys Res Commun* **338**: 1928-1934.
- 50- Mosing RK, Mendonsa SD, Bowser MT. 2005. Capillary electrophoresis-SELEX selection of aptamers with affinity for HIV-1 reverse transcriptase. *Anal Chem* **77**: 6107-6112.
- 51- Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. 2005. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal Bioanal Chem* **383**: 83-91.
- 52- Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, White PA. 2006. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Ch* **50**: 3019-3027.
- 53- Ferreira CSM, Matthews CS, Missailidis S. 2006. DNA Aptamers That Bind to MUC1 Tumour Marker: Design and Characterization of MUC1-Binding Single-Stranded DNA Aptamers. *Tumor Biol* **27**: 289-301.
- 54- Tang J, Xie J, Shao N, Yan Y. 2006. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two *in vitro* selection methods. *Electrophoresis* **27**: 1303-1311.

- 55- Hui Y, Shan L, Lin-Fu Z, Jian-Hua Z. 2007. Selection of DNA aptamers against DC-SIGN protein. *Mol Cell Biochem* **306**: 71-77.
- 56- Wurster SE, Maher LJ. 2008. Selection and characterization of anti-NF-kappaB p65 RNA aptamers. *RNA* **14**: 1037-1047.
- 57- Joeng CB, Niazi JH, Lee SJ, Gu MB. 2009. ssDNA aptamers that recognize diclofenac and 2-anilinophenylacetic acid. *Bioorg Med Chem* **17**: 5380-5387.
- 58- Low SY, Hill JE, Peccia J. 2009. DNA aptamers bind specifically and selectively to (1-->3)-beta-D-glucans. *Biochem Biophys Res Commun* **378**: 701-705.
- 59- Miyachi Y, Shimizu N, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. 2009. Selection of a DNA aptamer that binds 8-OHdG using GMP-agarose. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 3619-3622.
- 60- Takahashi T, Tada K, Mihara H. 2009. RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (Abeta) inhibit the aggregation of Abeta. *Mol Biosyst* **5**: 986-991.
- 61- Savory N, Abe K, Sode K, Ikebukuro K. 2010. Selection of DNA aptamer against prostate specific antigen using a genetic algorithm and application to sensing. *Biosens Bioelectron* **26**: 1386-1391.
- 62- Sefah K, Meng L, Lopez-Colon D, Jimenez E, Liu C, Tan W. 2010. DNA aptamers as molecular probes for colorectal cancer study. *PLoS one* **5**: e14269.
- 63- Van Simaey D, López-Colón D, Sefah K, Sutphen R, Jimenez E, Tan W. 2010. Study of the molecular recognition of aptamers selected through ovarian cancer cell-SELEX. *PLoS one* **5**: e13770.
- 64- Srisawat C, Engelke DR. 2010. Selection of RNA aptamers that bind HIV-1 LTR DNA duplexes: strand invaders. *Nucleic Acids Res* **38**: 8306-8315.
- 65- Adachi H, Ishiguro A, Hamada M, Sakota E, Asai K, Nakamura Y. 2011. Antagonistic RNA aptamer specific to a heterodimeric form of human interleukin-17A/F. *Biochimie* **93**: 1081-1088.
- 66- Jo M, Ahn JY, Lee J, Lee S, Hong SW, Yoo JW, Kang J, Dua P, Lee DK, Hong S, et al. 2011. Development of Single-Stranded DNA Aptamers for Specific Bisphenol A Detection. *Oligonucleotides* **21**: 85-91.
- 67- He J, Liu Y, Fan M, Liu X. 2011. Isolation and identification of the DNA aptamer target to acetamiprid. *J Agric Food Chem* **59**: 1582-1586.
- 68- Kim J, Kim MY, Kim HS, Hah SS. 2011. Binding of uranyl ion by a DNA aptamer attached to a solid support. *Bioorg Med Chem Lett* **21**: 4020-4022.
- 69- Kim MY, Jeong S. 2011. *In vitro* selection of rna aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells. *Nucleic Acid Ther* **21**: 173-178.
- 70- Rockey WM, Hernandez FJ, Huang SY, Cao S, Howell CA, Thomas GS, Liu XY, Lapteva N, Spencer DM, McNamara JO, et al. 2011. Rational truncation of an rna aptamer to prostate-specific membrane antigen using computational structural modeling. *Nucleic Acid Ther* **21**: 299-314.
- 71- Shigdar S, Lin J, Yu Y, Pastuovic M, Wei M, Duan W. 2011. RNA aptamer against a cancer stem cell marker epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Sci* **102**: 991-998.

- 72- Huang YZ, Hernandez FJ, Gu B, Stockdale KR, Nanapaneni K, Scheetz TE, Behlke MA, Peek AS, Bair T, Giangrande PH, et al. 2012. RNA aptamer-based functional ligands of the neurotrophin receptor, trkB. *Mol Pharmacol* **82**: 623–635.
- 73- Thiel KW, Hernandez LI, Dassie JP, Thiel WH, Liu X, Stockdale KR, Rothman AM, Hernandez FJ, McNamara JO 2nd, Giangrande PH. 2012. Delivery of chemo-sensitizing sirnas to her2+ breast cancer cells using rna aptamers. *Nucleic Acids Res* **40**: 6319–6337.
- 74- Bhattacharya SD, Mi Z, Kim VM, Guo H, Talbot LJ, Kuo PC. 2012. Osteopontin Regulates Epithelial Mesenchymal Transition-Associated Growth of Hepatocellular Cancer in a Mouse Xenograft Model. *Ann Surg* **255**: 319-325.
- 75- Kang D, Wang J, Zhang W, Song Y, Li X, Zou Y, Zhu M, Zhu Z, Chen F, Yang CJ. 2012. Selection of DNA Aptamers against Glioblastoma Cells with High Affinity and Specificity. *PLoS ONE* **7**: e42731.
- 76- Han SR, Lee SW. 2013. *In Vitro* Selection of RNA Aptamer Specific to Salmonella Typhimurium. *J Microbiol Biotechnol* **23**: 878-884.
- 77- Woo HM, Kim KS, Lee JM, Shim HS, Cho SJ, Lee WK, Ko HW, Keum YS, Kim SY, Pathinayake P, et al. 2013. Single-stranded DNA aptamer that specifically binds to the influenza virus NS1 protein suppresses interferon antagonism. *Antiviral Res* **100**: 337-345.
- 78- Tan Y, Shi YS, Wu XD, Liang HY, Gao YB, Li SJ, Zhang XM, Wang F, Gao TM. 2013. DNA aptamers that target human glioblastoma multiforme cells overexpressing epidermal growth factor receptor variant III *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* **34**: 1491-1498.
- 79- Hanazato M, Nakato G, Nishikawa F, Hase K, Nishikawa S, Ohno H. 2014. Selection of an aptamer against mouse GP2 by SELEX. *Cell Struct Funct* **39**: 23-29.
- 80- Ara MN, Hyodo M, Ohga N, Akiyama K, Hida K, Hida Y, Shinohara N, Harashima H. 2014. Identification and expression of troponin T, a new marker on the surface of cultured tumor endothelial cells by aptamer ligand. *Cancer Med* **3**: 825-834.
- 81- Chen X, Huang Y, Duan N, Wu S, Xia Y, Ma X, Zhu C, Jiang Y, Wang Z. 2014. Screening and Identification of DNA Aptamers against T-2 Toxin Assisted by Graphene Oxide. *J Agric Food Chem* **62**: 10368-10374.
- 82- Kim JW, Kim EY, Kim SY, Byun SK, Lee D, Oh KJ, Kim WK, Han BS, Chi SW, Lee SC, et al. 2014. Identification of DNA Aptamers toward Epithelial Cell Adhesion Molecule via Cell-SELEX. *Mol Cells* **37**: 742-746.
- 83- Sakai H, Ikeda Y, Honda T, Tanaka Y, Shiraishi K, Inui M. 2014. A cell-penetrating phospholamban-specific RNA aptamer enhances Ca²⁺ transients and contractile function in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **76**: 177-185.
- 84- Niazi JH, Verma SK, Niazi S, Qureshi A. 2015. *In vitro* HER2 protein-induced affinity dissociation of carbon nanotube-wrapped anti-HER2 aptamers for HER2 protein detection. *Analyst* **140**: 243-249.
- 85- Parashar A, Rajput YS, Sharma R. 2015. Aptamer-Based Sensing of β -Casomorphin-7. *J Agric Food Chem* **63**: 2647-2653.
- 86- Mondragón E, Maher LJ. 2015. RNA aptamer inhibitors of a restriction endonuclease. *Nucleic Acids Res* **43**: 7544-7555.

- 87- Matsunaga K, Kimoto M, Hanson C, Sanford M, Young HA, Hirao I. 2015. Architecture of high-affinity unnatural-base DNA aptamers toward pharmaceutical applications. *Sci Rep* **5**: 18478.
- 88- Gao S, Hu B, Zheng X, Cao Y, Liu D, Sun M, Jiao B, Wang L. 2016b. Gonyautoxin 1/4 aptamers with high-affinity and high-specificity: From efficient selection to aptasensor application. *Biosens Bioelectron* **79**: 938–944.
- 89- Tang XL, Hua Y, Guan Q, Yuan CH. 2016. Improved detection of deeply invasive candidiasis with DNA aptamers specific binding to (1→3)- β -D-glucans from *Candida albicans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **35**: 587- 595.
- 90- Wu Q, Wu L, Wang Y, Zhu Z, Song Y, Tan Y, Wang XF, Li J, Kang D, Yang CJ. 2016. Evolution of DNA aptamers for malignant brain tumor gliosarcoma cell recognition and clinical tissue imaging. *Biosens Bioelectron* **80**: 1–8.
- 91- Hamula CLA, Peng H, Wang Z, Tyrrell GJ, Li XF, Le XC. 2016. An improved SELEX technique for selection of DNA aptamers binding to M-type 11 of *Streptococcus pyogenes*. *Methods* **15**: 51-57.
- 92- Almasi F, Mousavi Gargari SL, Bitaraf F, Rasoulinejad S. 2016. Development of a Single Stranded DNA Aptamer as a Molecular Probe for LNCap Cells Using Cell-SELEX. *Avicenna J Med Biotechnol* **8**: 104-111.
- 93- Jia W, Ren C, Wang L, Zhu B, Jia W, Gao M, Zeng F, Zeng L, Xia X, Zhang X, et al. 2016. CD109 is identified as a potential nasopharyngeal carcinoma biomarker using aptamer selected by cell-SELEX. *Oncotarget*. Doi: 10.18632/oncotarget.10530. [Epub ahead of print]
- 94- Tuerk C, MacDougal S, Gold L. 1992. RNA Pseudoknots that Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6988-6992.
- 95- Yang Q, Goldstein IJ, Mei HY, Engelke DR. 1998. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5462-5467.
- 96- Jenison RD, Gill SC, Polisky B. 1994. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**: 1425-1429.
- 97- Burke DH, Hoffman DC. 1998. A novel acidophilic RNA motif that recognizes coenzyme A. *Biochemistry* **37**: 4653-4663.
- 98- Kiga D, Futamura Y, Sakamoto K, Yokoyama S. 1998. An RNA aptamer to the xanthine/guanine base with a distinctive mode of purine recognition. *Nucl Acids Res* **26**: 1755-1760.
- 99- Floege J, Ostendorf T, Janssen U, Burg M, Radeke HH, Vargeese C, Gill SC, Green LS, Janjic N. 1999. Novel approach to specific growth factor inhibition *in vivo*: antagonism of platelet-derived growth factor in glomerulonephritis by aptamers. *Am J Pathol* **154**: 169-179.
- 100- Barton JL, Bunka DHJ, Knowling SE, Lefevre P, Warren AJ, Bonifer C, Stockley PG. 2009. Characterization of RNA aptamers that disrupt the RUNX1–CBF β /DNA complex. *Nucleic Acids Research* **37**: 6818-6830.
- 101- Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. 2005. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* **56**: 555–583.
- 102- Jayasena SD. 1999. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin Chem* **45**: 1628-1650.

- 103- Lee JF, Stovall GM, Ellington AD. 2006. Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 282–289.
- 104- Chen CH, Chernis GA, Hoang VQ, Landgraf R. 2003. Inhibition of heregulin signaling by an aptamer that preferentially binds to the oligomeric form of human epidermal growth factor receptor-3. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9226–9231.
- 105- Da Pieve C, Perkins AC, Missailidis S. 2009. Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with ^{99m}Tc and biodistribution in MCF7 tumour bearing mice. *Nucl Med Biol* **36**: 703–710.
- 106- Tombelli S, Minunni M, Mascini M. 2005. Analytical applications of aptamers. *Biosens Bioelectron* **20**: 2424–2434.
- 107- Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. 1993. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3745-3749.
- 108- Griffin LC, Tidmarsh GF, Bock LC, Toole JJ, Leung LL. 1993. In vivo anticoagulant properties of a novel nucleotide-based thrombin inhibitor and demonstration of regional anticoagulation in extracorporeal circuits. *Blood* **81**: 3271-3276.
- 109- Xiao Y, Lubin AA, Heeger AJ, Plaxco KW. 2005. Label-Free Electronic Detection of Thrombin in Blood Serum by Using an Aptamer-Based Sensor. *Angew Chem Int Ed* **44**: 5456 –5459.
- 110- Van Melckebeke H, Devany M, Di Primo C, Beaurain F, Toulmé JJ, Bryce DL, Boisbouvier J. 2008. Liquid-crystal NMR structure of HIV TAR RNA bound to its SELEX RNA aptamer reveals the origins of the high stability of the complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 9210-9215.
- 111- Eulberg D, Klussmann S. 2003. "Spiegelmers: Biostable Aptamers". *Chem Bio Chem* **4**: 979-983.
- 112- Da Rocha S, Azéma L, Allard M, Toulmé JJ. 2010. Aptamers as imaging agents. *Expert Opin Med Diagn* **4**: 511-518.
- 113- Watts JK, Deleavey GF, Masad JD. 2008. Chemically modified siRNA: tools and applications. *Drug discovery today* **13**: 842-855.
- 114- Gao S, Zheng X, Jiao B, Wang L. 2016a. Post-SELEX optimization of aptamers. *Anal Bioanal Chem* **408**: 4567-4573.
- 115- Lin Y, Qiu Q, Gill SC, Jayasena D. 1994. Modified RNA sequence pools for *in vitro* selection. *Nucleic Acids Res* **22**: 5229-5234.
- 116- Kasahara Y, Kuwahara M. 2012. Artificial Specific Binders Directly Recovered from Chemically Modified Nucleic Acid Libraries. *J Nucleic Acids* **2012**: Article ID 156482, 13 pages.
- 117- Gijts M, Aerts A, Impens N, Baatout S, Luxen A. 2016. Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. *Nucl Med Biol* **43**: 253-271.
- 118- Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA, Sullenger BA. 2004. *In vivo* activity of nuclease-resistant siRNAs. *RNA* **10**: 766-771.
- 119- Burmeister PE, Lewis SD, Silva RF, Preiss JR, Horwitz LR, Pendergrast PS, McCauley TG, Kurz JC, Epstein DM, Wilson C, et al. 2005. Direct *In Vitro* Selection of a 2'-O-Methyl Aptamer to VEGF. *Chemistry Biology* **12**: 25-33.

- 120- Thiel WH, Bair T, Thiel KX, Dassie JP, Rockey WM, Howell CA, Liu XY, Dupuy AJ, Huang L, Owczarzy R, et al. 2011. Nucleotide Bias Observed with a Short SELEX RNA Aptamer Library. *Nucleic Acid Ther* **21**: 253-263.
- 121- Friedman AD, Kim D, Liu R. 2015. Highly stable aptamers selected from a 20-fully modified fGmH RNA library for targeting biomaterials. *Biomaterials* **36**: 110-123.
- 122- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham ET Jr, Guyer DR, Adamis AP. 2006. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 123-132.
- 123- Hall AHS, Wan J, Shaughnessy EE, Shaw BR, Alexander KA. 2004. RNA interference using boranophosphate siRNAs: structure-activity relationships. *Nucleic acids Res* **32**: 5991-6000.
- 124- Petersen M, Wengel J. 2003. LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol* **21**: 74-81.
- 125- Doessing H, Vester B. 2011. Locked and Unlocked Nucleosides in Functional Nucleic Acids. *Molecules* **16**: 4511-4526.
- 126- Shi H, He X, Cui W, Wang K, Deng K, Li D, Xu F. 2014. Locked nucleic acid/DNA chimeric aptamer probe for tumor diagnosis with improved serum stability and extended imaging window *in vivo*. *Anal Chim Acta* **812**:138-144.
- 127- Kimoto M, Nakamura M, Hirao I. 2016. Post-ExSELEX stabilization of an unnatural-base DNA aptamer targeting VEGF₁₆₅ toward pharmaceutical applications. *Nucleic Acids Res* **44**: 7487-7494.
- 128- Agarwal KL, Büchi H, Caruthers MH, Gupta N, Khorana HG, Kleppe K, Kumar A, Ohtsuka E, Rajbhandary UL, Van de Sande JM, et al. 1970. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature* **227**: 27-34.
- 129- Letsinger RL, Mahadevan V. 1965. Oligonucleotide synthesis on a polymer support. *J Am Chem Soc* **87**: 3526-3527.
- 130- Miyoshi KI, Arentzen R, Huang T, Itakura K. 1980. Solid-phase synthesis of polynucleotides. IV. Usage of polystyrene resins for the synthesis of polydeoxyribonucleotides by the phosphotriester method. *Nucleic Acids Res* **8**: 5507-5517.
- 131- Chow F, Kempe T, Palm G. 1981. Synthesis of oligodeoxyribonucleotides on silica gel support. *Nucleic Acids Res* **9**: 2807-2817.
- 132- Matteucci MD, Caruthers MH. 1981. Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J Am Chem Soc* **103**: 3185-3191.
- 133- Ito H, Ike Y, Ikuta S, Itakura K. 1982. Solid phase synthesis of polynucleotides. VI. Further studies on polystyrene copolymers for the solid support. *Nucleic Acids Res* **10**: 1755-1769.
- 134- Köster H, Biernat J, McManus J, Wolter A, Stumpe A, Narang CK, Sinha ND. 1984. Polymer support oligonucleotide synthesis - XV. Synthesis of oligodeoxynucleotides on controlled pore glass (CPG) using phosphate and a new phosphite triester approach. *Tetrahedron* **40**: 103-112.
- 135- Engels JW, Uhlmann E. 1989. Gene Synthesis [New Synthetic Methods (77)]. *Angew Chem Int Ed* **28**: 716-734.
- 136- Bonte FJ, Harris TS, Hynan LS, Bigio EH, White CL. 2006. Tc-99m HMPAO SPECT in the differential diagnosis of the dementias with histopathologic confirmation. *Clin Nucl Med* **31**: 376-378.

- 137- Cherry SR. 2006. Multimodality *in vivo* imaging systems: twice the power or double the trouble? *Annu Rev Biomed Eng* **8**: 35–62.
- 138- Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, Thrall JH. 2005. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst* **97**: 172-187.
- 139- Dobrucki L, Sinusas A. 2005. Molecular imaging. a new approach to nuclear cardiology. *Q J Nucl Med Mol Im* **49**: 106-115.
- 140- Croteau E, Bénard F, Cadorette J, Gauthier ME, Aliaga A, Bentourkia M, Lecomte R. 2003. Quantitative gated pet for the assessment of left ventricular function in small animals. *J Nuc Med* **44**: 1655-1661.
- 141- Weissleder R. 2002. Scaling down imaging: Molecular mapping of cancer in mice. *Nature Reviews Cancer* **2**: 11-18.
- 142- Cutler CS, Hennkens HM, Sisay N, Huclier-Markai S, Jurisson SS. 2013. Radiometals for Combined Imaging and Therapy. *Chem Rev* **113**: 858–883.
- 143- Challapalli A, Sharma R, Hallett WA, Kozlowski K, Carroll L, Brickute D, Twyman F, Al-Nahhas A, Aboagye EO. 2014. Biodistribution and Radiation Dosimetry of Deuterium-Substituted ¹⁸F-Fluoromethyl-[1, 2-²H₄]Choline in Healthy Volunteers. *Nucl Med* **55**: 256-263.
- 144- Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, Dumy P, Fagret D, Ghezzi C, Vuillez JP. 2007. *In vivo* imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha_v\beta_3$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **34**: 2037-2047.
- 145- Clarke ET, Martell AE. 1991. Stabilities of the Fe(III), Ga(III) and In(III) chelates of N,N',N''-tri-azacyclononanetriacetic acid. *Inorg Chim Acta* **181**: 273-280.
- 146- Zhu H, Snyder M. 2003. Protein Chip Technology. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 55-63.
- 147- Houseman BT, Mrksich M. 2002. Carbohydrate Arrays for the Evaluation of Protein Binding and Enzymatic Modification. *Chem Biol* **9**: 443-454.
- 148- Sapsford KE, Berti L, Medintz IL. 2006. Materials for fluorescence resonance energy transfer analysis: beyond traditional donor-acceptor combinations. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**: 4562-4589.
- 149- Linnet T. 2012. Forster distance calculator - PyMOLWiki.
- 150- Masuko M, Ohuchi S, Sode K, Ohtani H, Shimadzu A. 2000. Fluorescence resonance energy transfer from pyrene to perylene labels for nucleic acid hybridization assays under homogeneous solution conditions. *Nucleic Acids Res* **28**: E34.
- 151- Baker MB, Bao G, Searles CD. 2012. *In vitro* quantification of specific microRNA using molecular beacons. *Nucleic Acids Res* **40**: e13.
- 152- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. 1999. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol* **17**: 804-807.
- 153- Zhang CY, Johnson LW. 2009. Single quantum-dot-based aptameric nanosensor for cocaine. *Anal Chem* **81**: 3051-3055.

- 154- Chen H, Zhao J, Zhang M, Yang H, Ma Y, Gu Y. 2015. MUC1 aptamer-based near-infrared fluorescence probes for tumor imaging. *Mol Imaging Biol* **17**: 38-48.
- 155- Paganin-Gioanni A, Bellard E, Paquereau L, Ecochard V, Golzio M, Teissié J. 2010. Fluorescence imaging agents in cancerology. *Radiol Oncol* **44**: 142-148.
- 156- Bellard E, Chabot S, Ecochard V, Martinez O, Paganin-Gioanni A, Pelofy S, Paquereau L, Rols MP, Couderc B, Justin Teissie J, et al. 2013. Fluorescence Imaging in Cancerology. *Curr Mol Imaging* **2**: 3-17.
- 157- Frangioni JV. 2003. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* **7**: 626-634.
- 158- Waggoner A. 2006. Fluorescent labels for proteomics and genomics. *Curr Opin Chem Biol* **10**: 62-66.
- 159- Kricka LJ, Ann C. 2002. Stains, labels and detection strategies for nucleic acids assays. *Biochem* **39**: 114-129.
- 160- Lavis LD, Raines RT. 2008. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem Biol* **3**: 142-155.
- 161- Weinmann HJ, Brasch RC, Press WR, Wesbey GE. 1984. Characteristics of gadolinium-DTPA complex: a potential NMR contrast agent. *AJR Am J Roentgenol* **142**: 619-624.
- 162- Magerstädt M, Gansow OA, Brechbiel MW, Colcher D, Baltzer L, Knop RH, Girton ME, Naegele M. 1986. Gd(DOTA): an alternative to Gd(DTPA) as a T1,2 relaxation agent for NMR imaging or spectroscopy. *Magn Reson Med* **3**: 808-812.
- 163- Shah S, Jenkins T, Markowitz A, Gilkeson R, Rajiah P. 2016. Multimodal imaging of the tricuspid valve: normal appearance and pathological entities. *Insights Imaging* **7**: 649-667.
- 164- Le Jeune F, Ferré JC. 2015. Imagerie multimodale TEP et IRM dans la prise en charge des démences. *Médecine Nucléaire* **39**: 268-278.
- 165- Park K, Lee S, Kang E, Kim K, Choi K, Kwon IC. 2009. New generation of multifunctional nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Adv Funct Mater* **19**: 1553-1566.
- 166- Wehrl HF, Sauter AW, Divine MR, Pichler BJ. 2015. Combined PET/MR: a technology becomes mature. *J Nucl Med* **56**: 165-168.
- 167- Hüber MM, Staubli AB, Kustedjo K, Gray MHB, Shih J, Fraser SE, Jacobs RE, Meade TJ. 1998. Fluorescently detectable magnetic resonance imaging agents. *Bioconjug Chem* **9**: 242-249.
- 168- Stephenson KA, Banerjee SR, Besanger T, Sogbein OO, Levadala MK, McFarlane N, Lemon JA, Boreham DR, Maresca KP, Brennan JD, et al. 2004. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* imaging: isostructural Re and ^{99m}Tc complexes for correlating fluorescence and radioimaging studies. *J Am Chem Soc* **126**: 8598-8599.
- 169- Suchý M, Hudson RHE. 2008. Synthetic Strategies Toward N-Functionalized Cyclens. *Eur J Org Chem* **2008**: 4847-4865.
- 170- Pandey SK, Gryshuk AL, Sajjad M, Zheng X, Chen Y, Abouzeid MM, Morgan J, Charamisinau I, Nabi HA, Oseroff A, et al. 2005. Multimodality agents for tumor imaging (PET, fluorescence) and photodynamic therapy. A possible "see and treat" approach. *J Med Chem* **48**: 6286-6295.
- 171- Wan Y, Kim YT, Li N, Cho SK, Bachoo R, Ellington AD, Iqbal SM. 2010. Surface-Immobilized Aptamers for Cancer Cell Isolation and Microscopic Cytology. *Cancer Res* **70**: 9371-9380.

- 172- Zhang P, Zhao NX, Zeng ZH, Chang CC, Zu YL. 2010. Combination of an Aptamer Probe to CD4 and Antibodies for Multicolored Cell Phenotyping. *Am J Clin Pathol* **134**: 586-593.
- 173- Zhao N, Bagaria HG, Wong MS, Zu Y. 2011. A nanocomplex that is both tumor cell-selective and cancer gene-specific for anaplastic large cell lymphoma. *J Nanobiotechnol* **9**: 2.
- 174- Gupta S, Thirstrup D, Jarvis TC, Schneider DJ, Wilcox SK, Carter J, Zhang C, Gelinas A, Weiss A, Janjic N, et al. 2011. Rapid histochemistry using slow off-rate modified aptamers with anionic competition. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **19**: 273-278.
- 175- Charlton J, Sennello J, Smith D. 1997. *In vivo* imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem Biol* **4**: 809–816.
- 176- Song KM, Lee S, Ban C. 2012. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors* **12**: 612-631.
- 177- Cerchia L, Duconge F, Pestourie C, Boulay J, Aissouni Y, Gombert K, Tavitian B, De Franciscis V, Libri D. 2005. Neutralizing aptamers from whole-cell SELEX inhibit the RET receptor tyrosine kinase. *PLoS Biol* **3**: 123.
- 178- Davydova AS, Vorobjeva MA, Venyaminova AG. 2011. Escort aptamers: new tools for the targeted delivery of therapeutics into cells. *Acta Naturae* **3**: 12-29.
- 179- Iliuk AB, Hu L, Tao WA. 2011. Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal Chem* **83**: 4440–4452.
- 180- Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang YF, Lynott CK, Heil J, Borkowski S, Hilger CS, Cook G, Warren S, et al. 2006. Tumor Targeting by an Aptamer. *J Nucl Med* **47**: 668-678.
- 181- Jacobson O, Yan X, Niu G, Weiss ID, Ma Y, Szajek LP, Shen B, Kiesewetter DO, Chen X. 2015. PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer. *J Nucl Med* **56**: 616-621.
- 182- Mease RC, Foss CA, Pomper MG. 2013. PET imaging in prostate cancer: focus on prostate-specific membrane antigen. *Curr Top Med Chem* **13**: 951-962.
- 183- Lupold SE, Hicke BJ, Lin Y, Coffey DS. 2002. Identification and characterization of nuclease-stabilized RNA molecules that bind human prostate cancer cells via the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res* **62**: 4029–4033.
- 184- Dassie JP, Liu XY, Thomas GS, Whitaker RM, Thiel KW, Stockdale KR, Meyerholz DK, McCaffrey AP, McNamara JO, Giangrande PH. 2009. Systemic administration of optimized aptamer-siRNA chimeras promotes regression of PSMA-expressing tumors. *Nat biotechnol* **27**: 839-849.
- 185- Zhou J, Rossi JJ. 2014. Cell-type-specific, Aptamer-functionalized Agents for Targeted Disease Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids* **3**: e169.
- 186- Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. 2008. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. *Chem Eur J* **14**: 1769–1775.
- 187- Huang YF, Shangguan D, Liu H, Phillips JA, Zhang X, Chen Y, Tan W. 2009. Molecular assembly of an aptamer-drug conjugate for targeted drug delivery to tumor cells. *ChemBiochem* **10**: 862–868.
- 188- Shi H, He X, Wang K, Wu X, Ye X, Guo Q, Tan W, Qing Z, Yang X, Zhou B. 2011. Activatable aptamer probe for contrast-enhanced *in vivo* cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 3900–3905.

- 189- Zhao Z, Fan H, Zhou G, Bai H, Liang H, Wang R, Zhang X, Tan W. 2014. Activatable Fluorescence/MRI Bimodal Platform for Tumor Cell Imaging via MnO₂ Nanosheet–Aptamer Nanoprobe. *J Am Chem Soc* **136**: 11220–11223.
- 190- Trinh TL, Zhu G, Xiao X, Puszyk W, Sefah K, Wu Q, Tan W, Liu C. 2015. A Synthetic Aptamer–Drug Adduct for Targeted Liver Cancer Therapy. *PLoS One* **10**: e0136673.
- 191- Li J, Zheng H, Bates PJ, Malik T, Li XF, Trent JO, Ng CK. 2014. Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: Preliminary assessment in lung cancer. *J Nucl Med Biol* **41**: 179–185.
- 192- Liao ZX, Chuang EY, Lin CC, Ho YC, Lin KJ, Cheng PY, Chen KJ, Wei HJ, Sung HW. 2015. An AS1411 aptamer-conjugated liposomal system containing a bubble-generating agent for tumor-specific chemotherapy that overcomes multidrug resistance. *J Control Release* **208**: 42–51.
- 193- Da Pieve C, Williams P, Haddleton DM, Palmer RMJ, Missailidis S. 2010. Modification of thiol functionalized aptamers by conjugation of synthetic polymers. *Bioconjugate Chem* **21**: 169–174.
- 194- Tan L, Neoh KG, Kang ET, Choe WS, Su X. 2011. PEGylated anti-MUC1 aptamer-doxorubicin complex for targeted drug delivery to MCF7 breast cancer cells. *Macromol Biosci* **11**: 1331–1335.
- 195- Da Pieve C, Blackshaw E, Missailidis S, Perkins AC. 2012. PEGylation and Biodistribution of an anti-MUC1 Aptamer in MCF-7 Tumor-Bearing Mice. *Bioconjugate Chem* **23**: 1377–1381.
- 196- Taghdisi SM, Danesh NM, Sarreshtehdar Emrani A, Tabrizian K, Zandkarimi M, Ramezani M, Abnous K. 2013. Targeted delivery of Epirubicin to cancer cells by PEGylated A10 aptamer. *J Drug Target* **21**: 739–744.
- 197- Blom E, Velikyan I, Monazzam A, Razifar P, Nair M, Razifar P, Vanderheyden JL, Krivoshein A, Backer M, Backer J, et al. 2011. Synthesis and characterization of scVEGF-PEG-[68Ga]NOTA and scVEGF-PEG-[68Ga]DOTA PET tracers. *J Label Compd* **54**: 685–692.
- 198- Lee CC, MacKay JA, Fréchet JM, Szoka FC. 2005. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* **23**: 1517–1526.
- 199- Duncan R, Izzo L. 2005. Dendrimer biocompatibility and toxicity. *Adv Drug Delivery Rev* **57**: 2215–2237.
- 200- Jain K, Kesharwani P, Gupta U, Jain NK. 2010. Dendrimer toxicity: Let's meet the challenge. *Int J Pharm* **394**: 122–142.
- 201- Roberts JC, Bhalgat MK, Zera RT. 1996. Preliminary biological evaluation of polyamidoamine (PAMAM) Starburst dendrimers. *J Biomed Mater Res* **30**: 53–65.
- 202- Malik N, Wiwattanapatapee R, Klopsch R, Lorenz K, Frey H, Weener JW, Meijer EW, Paulus W, Duncan R. 2000. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility *in vitro*, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers *in vivo*. *J Control Release* **65**: 133–148.
- 203- Na M, Yiyun C, Tongwen X, Yang D, Xiaomin W, Zhenwei L, Zhichao C, Guanyi H, Yunyu S, Longping W. 2006. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by *in vitro* and *in vivo* studies. *Eur J Med Chem* **41**: 670–674.
- 204- Devarakonda B, Hill RA, Liebenberg W, Brits M, de Villiers MM. 2005. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *Int J Pharm* **304**: 193–209.

- 205- Langereis S, Dirksen A, Hackeng TM, Van Genderen MHP, Meijer EW. 2007. Dendrimers and magnetic resonance imaging. *New J Chem* **31**: 1152–1160.
- 206- Longmire MR, Ogawa M, Choyke PL, Kobayashi H. 2011. Biologically optimized nano-sized molecules and particles: more than just size. *Bioconjugate Chem* **22**: 993–1000.
- 207- Villaraza AJ, Bumb A, Brechbiel MW. 2010. Macromolecules, dendrimers, and nanomaterials in magnetic resonance imaging: the interplay between size, function, and pharmacokinetics. *Chem Rev* **110**: 2921-2959.
- 208- Wiener EC, Brechbiel MW, Brothers H, Magin RL, Gansow OA, Tomalia DA, Lauterbur PC. 1994. Dendrimer-based metal chelates: a new class of magnetic resonance imaging contrast agents. *Magn Reson Med* **31**: 1–8.
- 209- Talanov VS, Regino CA, Kobayashi H, Bernardo M, Choyke PL, Brechbiel MW. 2006. Dendrimer-based nanoprobe for dual modality magnetic resonance and fluorescence imaging. *Nano Lett* **6**: 1459-1463.
- 210- Majoral JP. 2013. Utilisation de dendrimères pour une nanomédecine innovatrice. *Biol Aujourd'hui* **207**: 61-70.
- 211- Koyama Y, Talanov VS, Bernardo M, Hama Y, Regino CA, Brechbiel MW, Choyke PL, Kobayashi H. 2007. A dendrimer-based nanosized contrast agent dual-labeled for magnetic resonance and optical fluorescence imaging to localize the sentinel lymph node in mice. *J Magn Reson Imaging* **25**: 866-871.
- 212- Ghobril C, Lamanna G, Kueny-Stotz M, Garofalo A, Billotey C, Felder-Flesch D. 2012. Dendrimers in nuclear medical imaging. *New J Chem* **36**: 310–323.
- 213- Parat A, Kryza D, Degoul F, Taleb J, Viillard C, Janier M, Garofalo A, Bonazza P, Heinrich-Balard L, Cohen R, et al. 2015. Radiolabeled dendritic probes as tools for high in vivo tumor targeting: application to melanoma. *J Mater Chem B* **3**: 2560-2571.
- 214- Shukla R, Thomas TP, Peters JL, Desai AM, Kukowska-Latallo J, Patrick AK, Kotlyar A, Baker JR Jr. 2006. HER2 specific tumor targeting with dendrimer conjugated anti-HER2 mAb. *Bioconjug Chem* **17**: 1109-1115.
- 215- Swanson SD, Kukowska-Latallo JF, Patri AK, Chen C, Ge S, Cao Z, Kotlyar A, East AT, Baker JR. 2008. Targeted gadolinium-loaded dendrimer nanoparticles for tumor-specific magnetic resonance contrast enhancement. *Int J Nanomedicine* **3**: 201-210.
- 216- Vincent L, Varet J, Pille JY, Bompais H, Opolon P, Maksimenko A, Malvy C, Mirshahi M, Lu H, Vannier JP, et al. 2003. Efficacy of dendrimer-mediated angiostatin and TIMP-2 gene delivery on inhibition of tumor growth and angiogenesis: *In vitro* and *in vivo* studies. *Int J Cancer* **105**: 419-429.
- 217- Poon Z, Chen S, Engler AC, Lee H, Atas E, Von Maltzahn G, Bhatia SN, Hammond PT. 2010a. Ligand-Clustered “Patchy” Nanoparticles for Modulated Cellular Uptake and *In Vivo* Tumor Targeting. *Angew Chem* **122**: 7424–7448
- 218- Poon Z, Chen S, Engler AC, Lee H, Atas E, Von Maltzahn G, Bhatia SN, Hammond PT. 2010b. Ligand-clustered “patchy” nanoparticles for modulated cellular uptake and *in vivo* tumor targeting. *Angew Chem Int Ed* **49**: 7266–7270.

- 219- Kojima C, Turkbey B, Ogawa M, Bernardo M, Regino CAS, Bryant LH Jr, Choyke PL, Kono K, Kobayashi H. 2011. Dendrimer-Based MRI Contrast Agents: The Effects of PEGylation on Relaxivity and Pharmacokinetics. *Nanomedicine* **7**: 1001–1008.
- 220- Zhu W, Okollie B, Bhujwala ZM, Artemov D. 2008. PAMAM dendrimer-based contrast agents for MR imaging of Her-2/neu receptors by a three-step pretargeting approach. *Magn Reson Med* **59**: 679-685.
- 221- Mayer G. 2009. The Chemical Biology of Aptamers. *Angew Chem Int Ed* **48**: 2672–2689.
- 222- Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed* **40**: 2004-2021.
- 223- Kolb HC, Sharpless KB. 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *D D T* **8**: 1128-1137.
- 224- Seo TS, Li Z, Ruparel H, Ju J. 2003. Click chemistry to construct fluorescent oligonucleotides for DNA sequencing. *J Org Chem* **68**: 609-612.
- 225- Jierry L, Ameer NB, Thomann JS, Frisch B, Gonthier E, Voegel JC, Senger B, Decher G, Felix O, Schaaf P, et al. 2010. Influence of Cu(I)-Alkyne π -Complex Charge on the Step-by-Step Film Buildup through Sharpless Click Reaction. *Macromolecules* **43**: 3994–3997.
- 226- Philipp MEG, Simon W, Johannes G, Thomas C. 2008. Click- click- click: single to triple modification of DNA. *Angew chem In Ed* **47**: 3442-3444.
- 227- Rouhanifard SH, Nordstrøm LU, Zheng T, Wu P. 2013. Chemical probing of glycans in cells and organisms. *Chem Soc Rev* **42**: 4284-4296.
- 228- Yao JZ, Uttamapinant C, Poloukhine A, Baskin JM, Codelli JA, Sletten EM, Bertozzi CR, Popik VV, Ting AY. 2012. Fluorophore Targeting to Cellular Proteins via Enzyme-Mediated Azide Ligation and Strain-Promoted Cycloaddition. *J Am Chem Soc* **134**: 3720–3728.
- 229- Baskin JM, Prescher JA, Laughlin ST, Agard NJ, Chang PV, Miller IA, Lo A, Codelli JA, Bertozzi CR. 2007. Copper-free click chemistry for dynamic *in vivo* imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 16793-16797.
- 230- Chang PV, Prescher JA, Sletten EM, Baskin JM, Miller IA, Agard NJ, Lo A, Bertozzi CR. 2010. Copper-free click chemistry in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:1821-1826.
- 231- Jawalekar AM, Malik S, Verkade JM, Gibson B, Barta NS, Hodges JC, Rowan A, van Delft FL. 2013. Oligonucleotide tagging for copper-free click conjugation. *Molecules* **18**: 7346-7363.
- 232- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C. 2004. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* **48**: 411-424.
- 233- Haubner R, Beer AJ, Wang H, Chen X. 2010. Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **1**: S86-103.
- 234- Lelongt B, Ronco P, Piedagnel R. 2002. "Métalloprotéases matricielles : infidélités à la matrice extracellulaire." *Med Sciences* **18**: 519-521.
- 235- Tirand L, Thomas N, Dodeller M, Dumas D, Frochot C, Maunit B, Guillemain F, Barberi-Heyob M. 2007. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: An *in vivo* and *in vitro* study. *Drug Metab Dispos* **35**: 806-813.

- 236- Da Rocha GS, Miguel J, Azema L, Eimer S, Ries C, Dausse E, Loiseau H, Allard M, Toulmé JJ. 2012. ^{99m}Tc -MAG3-Aptamer for Imaging Human Tumors Associated with High Level of Matrix Metalloprotease-9. *Bioconjug Chem* **23**: 2192–2200.
- 237- Flanagan WM, Wolf JJ, Olson P, Grant D, Lin KY, Wagner RW, Matteucci MD. 1999. A cytosine analog that confers enhanced potency to antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3513-3518.
- 238- Lee CH, Rajendran R, Jeong MS, Ko HY, Joo JY, Cho S, Chang YW, Kim S. 2013. Bioimaging of targeting cancers using aptamer-conjugated carbon nanodots. *Chem Commun (Camb)* **49**: 6543-6545.
- 239- Liu S. 2009. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjug Chem* **20**: 2199-2213.
- 240- Liu S. 2015. Radiolabeled Cyclic RGD Peptide Bioconjugates as Radiotracers Targeting Multiple Integrins. *Bioconjugate Chem* **26**: 1413–1438.
- 241- Brian JH, Andrew WS, Ty G, Ying-Fon C, Cynthia KL, James H, Sandra B, Christoph-Stephan H, Gary C, Stephen W, et al. 2006. Tumor Targeting by an Aptamer. *JNM* **47**: 668-678.
- 242- Wilson WD. 2002. Tech. Sight. Analyzing biomolecular interactions. *Science* **295**: 2103-2105.
- 243- Liu Y, Wilson WD. 2010. Quantitative Analysis of Small Molecule–Nucleic Acid Interactions With a Biosensor Surface and Surface Plasmon Resonance Detection. *Methods Mol Biol* **613**: 1–23.
- 244- Baffou G, Kreuzer MP, Kulzer F, Quidant R. 2009. Temperature mapping near plasmonic nanostructures using fluorescence polarization anisotropy. *Optics Express* **17**: 3291-3298.
- 245- Guo XQ, Castellano FN, Li L, Lakowicz JR. 1998. Use of a Long-Lifetime Re(I) Complex in Fluorescence Polarization Immunoassays of High-Molecular-Weight Analytes. *Anal Chem* **70**: 632-637.
- 246- Cruz-Aguado JA, Penner G. 2008. Fluorescence polarization based displacement assay for the determination of small molecules with aptamers. *Anal Chem* **15**: 8853–8855.
- 247- Ruta J, Perrier S, Ravelet C, Fize J, Peyrin E. 2009. Noncompetitive fluorescence polarization aptamer-based assay for small molecule detection. *Anal Chem* **81**: 7468–7473.
- 248- Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM, Thompson KM, Wilson C, McCauley TG. 2004. Pharmacokinetics and Biodistribution of Novel Aptamer Compositions. *Pharm Res* **21**: 2234-2246.
- 249- Rusconi CP, Roberts JD, Pitoc GA, Nimjee SM, White RR, Quick G, Scardino E, Fay WP, Sullenger BA. 2004. Antidote-mediated control of an anticoagulant aptamer *in vivo*. *Nat Biotech* **22**: 1423–1428.
- 250- Dougan H, Lyster DM, Vo CV, Stafford A, Weitz JI, Hobbs JB. 2000. Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nucl Med Biol* **27**: 289–297.
- 251- Willis MC, Collins BD, Zhang T, Green LS, Sebesta DP, Bell C, Kellogg E, Gill SC, Magallanez A, Knauer S, et al. 1998. Liposome-anchored vascular endothelial growth factor aptamers. *Bioconjug Chem* **9**: 573–582.
- 252- Bagalkot V, Zhang L, Levy-Nissenbaum E, Jon S, Kantoff PW, Langer R, Farokhzad OC. 2007. Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer. *Nano Lett* **7**: 3065-3070.

- 253- Hwang DW, Ko HY, Lee JH, Kang H, Ryu SH, Song IC, Lee DS, Kim S. 2010. A Nucleolin-Targeted Multimodal Nanoparticle Imaging Probe for Tracking Cancer Cells Using an Aptamer. *J Nucl Med* **51**: 98-105.
- 254- Wang AZ, Bagalkot V, Vasilliou CC, Gu F, Alexis F, Zhang L, Shaikh M, Yuet K, Cima MJ, Langer R, et al. 2008. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugates for combined prostate cancer imaging and therapy. *Chem Med Chem* **3**: 1311-1315.
- 255- Yu MK, Jeong YY, Park J, Park S, Kim JW, Min JJ, Kim K, Jon S. 2008. Drug-loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy *in vivo*. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 5362-5365.
- 256- Dua P, Kim S, Lee DK. 2011. Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins. *Methods* **54**: 215-225.
- 257- Borbas KE, Ferreira CS, Perkins A, Bruce JI, Missailidis S. 2007. Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer. *Bioconjug Chem* **18**: 1205-1212.
- 258- Lee IH, An S, Yu MK, Kwon HK, Im SH, Jon S. 2011. Targeted chemoimmunotherapy using drug-loaded aptamer-dendrimer bioconjugates. *J Control Release* **155**: 435-441.
- 259- Kim Y, Cao Z, Tan W. 2008. Molecular assembly for high-performance bivalent nucleic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5664–5669.
- 260- Musumeci D, Montesarchio D. 2012. Polyvalent nucleic acid aptamers and modulation of their activity: a focus on the thrombin binding aptamer. *Pharmacol Ther* **136**: 202-215.
- 261- Oupicky D, Ogris M, Howard KA, Dash PR, Ulbrich K, Seymour LW. 2002. Importance of lateral and steric stabilization of polyelectrolyte gene delivery vectors for extended systemic circulation. *Mol Ther* **5**: 463-472.
- 262- Köhn M, Wacker R, Peters C, Schröder H, Soulère L, Breinbauer R, Niemeyer CM, Waldmann H. 2003. Staudinger ligation: a new immobilization strategy for the preparation of small-molecule arrays. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**: 5830-5834.
- 263- Gololobov YG, Zhmurova IN, Kasukhin LF. 1981. Sixty years of Staudinger reaction. *Tetrahedron* **37**: 437–472.
- 264- Gololobov YG, Kasukhin LF. 1992. Recent advances in the Staudinger reaction. *Tetrahedron* **48**: 1353–1406.
- 265- Amaral SP, Fernandez-Villamarin M, Correa J, Riguera R, Fernandez-Megia E. 2011. Efficient Multigram Synthesis of the Repeating Unit of Gallic Acid-Triethylene Glycol Dendrimers. *Org Lett* **13**: 4522–4525.
- 266- Patel K, Angelos S, Dichtel WR, Coskun A, Yang YW, Zink JI, Stoddart JF. 2008. Enzyme-Responsive Snap-Top Covered Silica Nanocontainers. *J Am Chem Soc* **130**: 2382-2383.
- 267- Fernandez-Megia E, Correa J, Rodríguez-Meizoso I, Riguera R. 2006. A Click Approach to Unprotected Glycodendrimers. *Macromolecules* **39**: 2113-2120.
- 268- Meunier SJ, Wu QQ, Wang SN, Roy R. 1997. Synthesis of hyperbranched glycodendrimers incorporating alpha- thiosialosides based on a gallic acid core. *Can J Chem* **75**: 1472–1482.

- 269- Adamczyk M, Fishpaugh JR, Heuser KJ. 1997. Preparation of Succinimidyl and Pentafluorophenyl Active Esters of 5- and 6- Carboxyfluorescein. *Bioconjugate Chem* **8**: 253–255.
- 270- Wilchek M, Bayer EA. 1990. Biotin-containing reagents. *Methods Enzymol* **184**: 123-138.
- 271- Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Briand JP, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. 2006. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem Commun* 1182–1184.
- 272- Borcard F, Godinat A, Staedler D, Blanco HC, Dumont AL, Chapuis-Bernasconi C, Scaletta C, Applegate LA, Juillerat FK, Gonzenbach UT, et al. 2011. Covalent Cell Surface Functionalization of Human Fetal Osteoblasts for Tissue Engineering. *Bioconjug Chem* **22**: 1422–1432.
- 273- Thaner RV, Eryazici I, Farha OK, Mirkin CA, Nguyen ST. 2014. Facile one-step solid-phase synthesis of multitopic organic–DNA hybrids via “click” chemistry. *Chem Sci* **5**: 1091–1096.
- 274- Chan TR, Hilgraf R, Sharpless KB, Fokin VV. 2004. Polytriazoles as copper(I)-stabilizing ligands in catalysis. *Org Lett* **6**: 2853-2855.
- 275- Park JY, Lee TS, Song IH, Cho YL, Chae JR, Yun M, Kang H, Lee JH, Lim JH, Cho WG, Kang WJ. 2016. Hybridization-based aptamer labeling using complementary oligonucleotide platform for PET and optical imaging. *Biomaterials* **100**: 143-151.
- 276- Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. 2006. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res* **34**: 564-574.
- 277- Li H, Zhu Z, Fahrenbach AC, Savoie BM, Ke C, Barnes JC, Lei J, Zhao YL, Lilley LM, Marks TJ, et al. 2013. Mechanical bond-induced radical stabilization. *J Am Chem Soc* **135**: 456-467.
- 278- Perrone S, Usai M, Lazzari P, Tucker SJ, Wallace HM, Zanda M. 2013. Efficient cell transfection with melamine-based gemini surfactants. *Bioconjug Chem* **24**: 176-187.
- 279- Stromgaard K, Brierley MJ, Andersen K, Sløk FA, Mellor IR, Usherwood PN, Krogsgaard-Larsen P, Jaroszewski JW. 1999. Analogues of neuroactive polyamine wasp toxins that lack inner basic sites exhibit enhanced antagonism toward a muscle-type mammalian nicotinic acetylcholine receptor. *J Med Chem* **42**: 5224-5234.
- 280- Pak JK, Hesse M. 1998. Regioselective Deprotection and Acylation of Penta-N-Protected Thermopentamine. *Helv Chim Acta* **81**: 2300–2313.
- 281- Ayesa S, Samuelsson B, Classon B. 2008. A One-Pot, Solid-Phase Synthesis of Secondary Amines from Reactive Alkyl Halides and an Alkyl Azide. *Synlett* 97-99.
- 282- Klein E, DeBonis S, Thiede B, Skoufias DA, Kozielski F, Lebeau L. 2007. New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5. *Bioorg Med Chem* **15**: 6474-6488.
- 283- De P, Li M, Gondi SR, Sumerlin BS. 2008. Temperature-regulated activity of responsive polymer-protein conjugates prepared by grafting-from via RAFT polymerization. *J Am Chem Soc* **130**: 11288-11289.
- 284- Fujita D, Suzuki K, Sato S, Yagi-Utsumi M, Kurimoto E, Yamaguchi Y, Kato K, Fujita M. 2012. Synthesis of a Bridging Ligand with a Non-denatured Protein Pendant: Toward Protein Encapsulation in a Coordination Cage. *Chem Lett* **41** : 313-315.

Liste de publications et communications

Publications

Kryza D, Debordeaux F, Azéma L, **Hassan A**, Paurelle O, Schulz J, Savona-Baron C, Charignon E, Bonazza P, Taleb J, Fernandez P, Janier M, Toulmé JJ. 2016. Ex Vivo and In Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas. *PLoS One* **11**: e0149387.

Communications orales

- 1- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2013**. Aptamers, application in biomedical Imaging. Journée scientifique de la SFR TecSan, 27 juin 2013. Pessac (flash poster).
- 2- Toulmé JJ, Da Rocha S, Dausse E, Fernandez P, Allard M, Kryza D, Janier M, Scarano S, Crispo F, Minunni M, **Hassan A**, Paurelle O, Azéma L. **2015**. Imaging human tumors with aptamers to Matrix MetalloProtease-9. Workshop : "Antisense & Therapeutic Oligonucleotides" 30 mars 2015, Oxford, Royaume-Uni.
- 3- Toulmé JJ, Dausse E, Fernandez P, Debordeaux F, Kryza D, Janier M, Scarano S, Crispo F, Minunni M, **Hassan A**, Paurelle O, Azéma L. **2015**. Detecting human tumors with aptamers to Matrix MetalloProtease-9. Workshop [11th Annual Meeting of the OTS (Oligonucleotide Therapeutics Society)]. 11-14 octobre 2015, Leiden, Pays-Bas.
- 4- Toulmé JJ, Dausse E, Fernandez P, Debordeaux F, Kryza D, Janier M, **Hassan A**, Paurelle O, Azéma L. **2015**. Imaging human tumors with aptamers to Matrix MetalloProtease-9. Workshop (EuroNanoMed: The European Nanomedicine Meeting). 7-9 décembre 2015, Grenoble, France.

Communications par affiche

- 1- **Hassan A**, Da Rocha S, Vialard-Miguel J, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2012**. Application Biotechnologique des Aptamères : Détection de la MMP-9, marqueur de tumeurs cérébrales. Journée scientifique de la SFR TecSan 2012. Pessac.
- 2- Chaou T, **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Toulmé JJ. **2012**. Aptamères: Outils de détection de biomarqueurs. Journée CNES, november 2012. Paris.
- 3- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2013**. Aptamers as tools for biomedical Imaging. Journée BIOGUNE workshop/ Pays Basque, 18 avril 2013. Pessac.

- 4- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2013**. Aptamers, application in biomedical Imaging. Journée scientifique de la SFR TecSan, 27 juin 2013. Pessac.
- 5- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for biomedical Imaging. XXI^{èmes} journées jeunes chercheurs SCT (Société de chimie thérapeutique), 24-25 mars 2014. Montpellier
- 6- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for biomedical Imaging. Journée scientifique de l'école doctorale SVS (Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé), 9 avril 2014. Arcachon.
- 7- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for imaging tumors. Journée scientifique de la SFR TecSan, 24 juin 2014. Pessac.
- 8- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for imaging tumors. Journée RNA CLUB workshop, 26-27 juin 2014. Pessac.
- 9- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for imaging tumors. Journée Cancéropole (Qunad l'imagerie rencontre les Nanotechnologie), 3-4 décembre 2014. Pessac.
- 10- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2014**. Nucleic Acid Aptamers as tools for imaging tumors. Journée scientifique de l'école doctorale SVS (Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé), 16 avril 2014. Arcachon.
- 11- **Hassan A**, Da Rocha S, Azéma L, Dausse E, Allard M, Toulmé JJ. **2015**. Aptamers anti-MMP-9 as Tools for Imaging human tumors. Journée scientifique de la FR TecSan, 12 mai 2015. Pessac.
- 12- **Ali S**, Paurelle O, **Hassan A**, Kryza D, Henriët E, Janier M, Fernandez P, Toulmé JJ, Saltel F, Azéma L. **2016**. Aptamers as tools for biomedical Imaging. Journée scientifique de TRAIL, 7 juillet 2016. Bordeaux.

Modifications chimiques des aptamères, pour des applications en imagerie biomédicale

Résumé : l'objectif de ma thèse a été de développer de nouvelles sondes utilisables en imagerie biomédicale, basées sur l'utilisation d'aptamères, pour la détection de deux types de tumeurs : les glioblastomes et les mélanomes. Les traceurs développés ont pour objectif de cibler la protéine matricielle hMMP-9. Lors d'une thèse précédente, un aptamère anti hMMP-9 noté F3B a été obtenu. Afin de transformer cet aptamère en une sonde pour l'imagerie biomédicale, différents conjugués F3B ont été préparés: Cy5, DOTA ou MAG₃. L'affinité des nouveaux conjugués pour l'hMMP-9 a été évaluée par SPR et sur coupes de tumeurs. Des études de biodistribution des conjugués F3B-DOTA et F3B-MAG₃ ont été réalisées sur des souris portant le mélanome, les résultats ont montré que les deux aptamères marqués détectent spécifiquement l'hMMP-9. De plus, la détection de la protéine hMMP-9 par le conjugué F3B-CY5 a été confirmée par imagerie de fluorescence.

Afin d'améliorer la sensibilité de détection des tumeurs, deux types de modifications ont été envisagées, développer des structures multimériques de F3B et élaborer d'un système bi-fonctionnel. Pour ces deux approches, nous avons synthétisé un dendrimère à point focal, pouvant donner accès à une imagerie multi-modale. Ce dendrimère porte deux ou trois bras espaceur porteurs d'un groupement azoture utilisé pour le couplage avec les aptamères par la chimie «click». Le dendrimère porte au point focal une fonction amine NH₂ utilisée pour fixer une biotine, afin de déterminer l'affinité K_d de cette nouvelle sonde par SPR. Par la suite un ligand DOTA sera fixé afin de pouvoir visualiser ce traceur en TEMP.

Mots-clés : Aptamère, SELEX, MMP-9, Mélanome, Imagerie biomédicale, Chimie «click», Dendrimère, Tumeur.

Chemical modifications of aptamers, for biomedical imagery applications

Abstract: The aim of my thesis was to develop new probes that can be used in biomedical imaging, based on the use of aptamers for the detection of two types of tumors: glioblastomas and melanomas. Tracers have been developed with the aim to target the matrix protein hMMP-9. In a thesis, an aptamer anti-hMMP-9 noted F3B was obtained. Based on this compound, different derivatives were prepared for using in biomedical imaging: F3B-Cy5, F3B-DOTA or F3B-MAG₃. The affinity of the new conjugates for hMMP-9 was evaluated by SPR and on sections of human melanomas. Biodistribution studies of F3B-DOTA conjugates and F3B-MAG₃ were performed at on melanoma bearing mice, the results showed that both radiolabeled aptamers specifically detected the hMMP-9. In addition, optical fluorescence imaging confirmed the binding to hMMP-9 by F3B-CY5.

In order to improve tumor detection sensitivity, two types of modifications were investigated: developing of F3B multimeric structures and a bi-functional system. For both these approaches, we synthesized a dendrimer with a focal point, which could give access to a multi-modal imaging. This dendrimer has two or three spacers bearing an azide group used for coupling with aptamers by "click" chemistry. The dendrimer carrying at the focal point an amine function NH₂ used for fixing biotin in order to determine the affinity K_d of this new probe by using SPR. A DOTA ligand will be fixed later in order to view this tracer in SPECT.

Keywords: Aptamer, SELEX, MMP-9, Melanoma, Biomedical imaging, Click chemistry, Dendrimer, Tumor.

Unité de recherche

[INSERM U1212, 146 rue Léo Sagnat, Bat 3A, 1ère étage, 33076 Bordeaux Cedex]