

DOCTORAT

CHIMIE

HÉLÈNE GUYON

**MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE DE MESURE D'INTERACTION LIGAND-ARN
PAR ÉLECTROCHIMIE**

Thèse dirigée par Benoît LIMOGES et Laurent MICOUIN

Soutenue le 24 octobre 2016 devant la commission d'examen composée de :

Rapporteurs	Mme le Docteur	Corinne RAVELET
	M. le Docteur	Eric ENNIFAR
Examinatrice	Mme le Professeur	Claudine BUSS-HERMAN
Examinateur	M. le Docteur	Laurent MICOUIN
Examinateur	M. le Docteur	Benoît LIMOGES
Examinatrice	Mme le Docteur	Carine TISNÉ

Table des matières

Liste des abréviations	8
Introduction générale	11
I Contexte scientifique	11
I - L'émergence des ARN comme nouvelle cible thérapeutique	11
I - 1) Généralités sur les ARN	11
a) Propriétés structurales des ARN	11
b) Fonctions biologiques des ARN	14
1. ARN messenger et riboswitches	15
2. ARN de transfert	17
3. ARN ribosomique et ribozymes	18
4. Petits et longs ARN non codants	19
I - 2) L'ARN en chimie médicinale: pourquoi et comment les cibler ?	20
II - Les aminoglycosides	21
II - 1) Une famille d'antibiotiques à l'architecture conservée	21
II - 2) Caractéristiques physico-chimiques et modes d'action des aminoglycosides	23
a) Considérations générales de l'interaction avec l'ARN	23
b) Le ribosome: site d'interaction principal	24
c) Autres cibles des aminoglycosides	28
III - Méthodes analytiques pour l'étude des interactions ARN/ligand: les aminoglycosides comme cas d'étude	29
III - 1) Spectrométrie de masse	30
III - 2) Résonance plasmonique de surface	35
III - 3) Spectroscopie de fluorescence	37
III - 4) Titration calorimétrique isotherme	42
III - 5) Résonance magnétique nucléaire	44
III - 6) Couplage des techniques analytiques à du criblage: microarray	47
III - 7) Electrochimie	52
III - 8) Conclusion et objectifs du projet de thèse	54

II Synthèse de sondes ferrocéniques et étude des phénomènes de reconnaissance en présence d'ARN	57
I - Stratégies de synthèse d'analogues des aminoglycosides	57
I - 1) Approche par synthèse totale et hémisynthèse	57
I - 2) Dimères d'aminoglycosides	58
I - 3) Conjugués intercalants-aminoglycosides	60
I - 4) Analogues de la DOS	63
I - 5) Stratégie de marquage utilisée pour une étude électroanalytique	66
II - Synthèse de sondes électroactives pour l'étude des interactions ARN/ligands	68
II - 1) Synthèse de la sonde FcPRM	68
a) Mise au point du protocole de synthèse	68
b) Purification de la sonde FcPRM	73
II - 2) Synthèse de Fc-néamine	76
II - 3) Synthèse de FcDACP	77
III - Etudes de complexation entre ARN et sonde FcPRM	79
III - 1) L'ARNr 16S23 et l'aptamère à la néomycine	79
III - 2) Etudes des interactions entre la sonde FcPRM et l'ARN par RMN	80
a) Caractérisation du complexe sonde FcPRM/ARNr 16S23	80
b) Caractérisation de l'interaction entre l'aptamère et la sonde FcPRM	82
III - 3) Caractérisation du complexe FcPRM/ARNr 16S23 par ITC	83
IV - Conclusion	88
III Détection et quantification des interactions ARN/ligands par voie électrochimique	89
I - Présentation des techniques électrochimiques et travaux antérieurs	89
I - 1) Chronoampérométrie	90
I - 2) Voltamétrie cyclique	91
I - 3) Voltamétrie à vague carrée	93
I - 4) Stratégie de détection électrochimique d'une reconnaissance biomoléculaire en phase homogène: état de l'art	94
II - Détection électrochimique de l'interaction ARNr 16S23/sonde électroactive	96
II - 1) Caractérisation électrochimique de la sonde FcPRM	98
II - 2) Détermination de la constante de dissociation entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23	105
III - Etudes cinétiques	114
III - 1) Principe des mesures cinétiques dans des conditions de gouttelette tournante	114
III - 2) Procédure de détermination des constantes cinétiques de reconnaissance	116
IV - Extraction des grandeurs thermodynamiques ΔH	120
V - Détection électrochimique de l'interaction entre un aptamère/sonde électroactive: application à un autre système	120
V - 1) Détermination de la constante de dissociation entre l'aptamère à la néomycine et la sonde FcPRM	120
V - 2) Etudes cinétiques	123

VI - Conclusion	124
IV Compétition et parallélisation: vers un criblage électrochimique	125
I - Principe des expériences de dosage compétitif en phase homogène	125
II - Dosages compétitifs d'aminoglycosides non marqués	127
II - 1) Expériences de compétition vis-à-vis de l'ARNr 16S23	127
II - 2) Expériences de compétition entre la sonde FcPRM et la néomycine vis-à-vis de l'aptamère à la néomycine	131
III - Mesures parallélisées en électrochimie	134
III - 1) Mesures parallélisées sur cellules électrochimiques sérigraphiées	134
III - 2) Mesures parallélisées sur microplaque 48 puits	137
IV - Conclusion	141
Conclusion générale	144
V Partie expérimentale	145
I - Synthèse Organique	145
I - 1) Généralités	145
I - 2) Produits synthétisés	146
a) Synthèse de Fc-COOH - Composé 7	146
b) Synthèse de Fc-NHS - Composé 8	147
c) Préparation de la paromomycine "free-base" - Composé 9	148
d) Synthèse du composé 11	149
e) Synthèse de Fc-PRM - Composé 12	150
f) Synthèse de Chlorhydrate de néamine - Composé 13	151
g) Synthèse de néamine "free-base - Composé 14	152
h) Synthèse de Fc-néamine - Composé 16	153
i) Synthèse de 2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3- dibenzyle dicarboxylate - Composé 19	154
j) Synthèse de (±)-(1R,4S,5S)-5-hydroxy-2,3-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dibenzyle dicarboxylate - Composé 20	155
k) Synthèse de (±)-2,4-diaminocyclopentanol - Composé 5	156
l) Synthèse de (±)-2,4-di-tert-butyl-dicarbamate-cyclopentan-1-ol - Composé 21	157
m) Synthèse de (±)-2,4-di-tert-butyl-dicarbamate-cyclopentan-1-Ferrocenyl ester - Composé 22	158
n) Synthèse de Fc-DACP.2HCl - Composé 23	159
II - Préparation des échantillons d'ARN	160
III - Analyses RMN	160
III - 1) Observation de la formation du complexe ARN/FcPRM en RMN ¹ H 1D	160
III - 2) Observation de la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM en TOCSY	161
IV - Titration calorimétrique isotherme	162
V - Electrochimie	163

TABLE DES MATIÈRES

V - 1) Expériences de titrage - Détermination des constantes de dissociation K_D	164
V - 2) Expériences de compétition - Détermination de K_D d'aminoglycosides non marqués . . .	165
V - 3) Utilisation du dispositif de gouttelette tournante	167
a) Détermination de K_D à l'aide de la gouttelette tournante	167
Annexes	169
Bibliographie	175
Table des figures	185
Liste des tableaux	195
Résumé de la thèse	197

Liste des abréviations

#

1D: 1 dimension

2-AP: 2-aminopurine

2D: 2 dimensions

A

A: Adénine

AaRS: Aminoacyl-ARNt synthétase

aq.: Aqueux

ARNi: ARN interférent

ARNm: ARN messenger

ARNnc: ARN non codant

ARNr: ARN ribosomique

ARNsn: ARN nucléaire

ARNsno: ARN nucléolaire

ARNt: ARN de transfert

ATP: Adénosine triphosphate

B

BSA: Bovine serum albumin (Sérum d'Albumine Bovin)

C

C: Cytosine

CCM: Chromatographie sur couche mince

CE: Contre-électrode

CE₅₀: Concentration efficace permettant 50% de réponse

CRP: 5-carboxytetramethylrhodamine-paromomycine

CV: Cyclic voltammetry

D

D: Coefficient de diffusion

DACP: Diaminocyclopentanol

DCM: Dichlorométhane

D_{factor}: Facteur de dilution

DMF: N,N-Dimethylformamide

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DOS: 2-deoxystreptomine

E

E_{pa}: potentiel de pic anodique

E_{pc}: potentiel de pic cathodique

E_{eq}: potentiel de l'électrode à l'équilibre

E. coli: *Escherichia Coli*

EDCI: 1-Éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide

EDT: Electrode à disque tournant

EDTA: Éthylène diamine tétra-acétique

eq.: Equivalent

ESI-MS: Electrospray ionization-mass spectrometry

Et₂O: Diéthyl éther

F

FAXS: Fluorine chemical shift anisotropy and exchange for screening

Fc: Ferrocène

Fc⁺: Ferricinium

FcPRM: sonde ferrocène-paromomycine

FID: Fluorescence intercalator displacement

G

G: Guanine

H

HPLC: High performance liquid chromatography

I

i: Intensité de courant

i_C : courant capacitif

i_F : courant faradique

i_{p_a} : courant de pic anodique

i_{p_c} : courant de pic cathodique

ITC: Isothermal titration calorimetry

K

K_A : constante d'association

K_D : constante de dissociation

k_{on} : constante cinétique d'association

k_{off} : constante cinétique de dissociation

M

MS: Mass spectrometry

N

NBD: *endo*-N-Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide

O

Ox: Oxydant

P

PCR: Polymerase chain reaction

PMA: Phosphomolybdic acid

PVP: Polyvinylpyrrolidone

PRM: Paromomycine

R

Red: Réducteur

Ref: Electrode de référence

Rf: Rapport frontal

RMN: Résonance magnétique nucléaire

rpm: Tours par minute RRE: Rev responsive element

S

S: surface

SELEX: Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

SPEC: Screen-printed electrochemical cell

SPR: Surface plasmon resonance

T

T: Thymine

t.a: Température ambiante

TAR RNA: Transactivation responsive element RNA

TFA: Acide trifluoro-acétique

THF: Tetrahydrofurane

TOCSY: Total correlation spectroscopy

U

U: Uracile

V

VIH: Virus de l'immunodéficience humaine

W

WE: Electrode de travail

Introduction générale

Etant donné leur implication dans de nombreux processus biochimiques clés, les ARN sont maintenant considérés comme des cibles thérapeutiques prometteuses. Toutefois, réussir à cibler spécifiquement un ARN reste complexe en raison de leur diversité structurale et fonctionnelle. A ce jour, nos connaissances restent donc limitées sur ce qui constitue un bon ligand d'ARN. En l'absence de toute approche rationnelle, une stratégie de criblage pourrait permettre d'aboutir à l'élaboration de nouvelles molécules capables d'être spécifiquement reconnues par des structures d'ARN, et d'interagir avec leurs fonctions biologiques.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans cette problématique. Pour y répondre, une méthode électrochimique a été développée afin d'acquérir des informations qualitatives et quantitatives sur les interactions ARN/ligands, et ce grâce à l'utilisation d'une molécule redox reporter. L'élaboration de la sonde utilisée pour cette méthode tire parti de l'architecture d'une famille de ligands naturels des ARN: les aminoglycosides. Une fois cette méthode développée, on peut imaginer l'utiliser pour cribler des bibliothèques de molécules et ainsi développer de nouveaux ligands d'ARN. Ceci permettrait d'enrichir l'arsenal thérapeutique utilisé pour cibler les ARN, mais également de contourner les phénomènes de résistance aux antibiotiques dont les aminoglycosides font l'objet. En plus d'être adaptée pour du criblage haut débit, la méthode électrochimique peut s'avérer intéressante pour développer des biocapteurs permettant de doser les aminoglycosides dans des milieux biologiques complexes.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une présentation générale des ARN et des aminoglycosides. Ce chapitre permettra de rappeler les notions essentielles à la bonne compréhension de la problématique à laquelle nous tentons de répondre. Les différentes techniques analytiques généralement utilisées pour détecter et quantifier les interactions ARN/amino glycosides seront ensuite présentées. Après une brève introduction à chacune de ces méthodes, une discussion critique tentera d'expliquer les raisons pour lesquelles nous avons décidé de nous tourner vers une approche électroanalytique pour l'étude des interactions ARN/amino glycoside.

Le chapitre 2 présente les différentes stratégies employées pour la synthèse d'analogues des aminoglycosides. Après en avoir présenté certaines, nous montrerons comment nous sommes parvenus à synthétiser différents analogues redox d'amino glycosides. Nous nous attarderons ensuite sur l'étude d'une sonde, une paromomycine marquée avec un groupement redox, et nous verrons comment celle-ci se comporte en présence d'ARN.

Le chapitre 3 abordera la première étape de mise au point de la méthode de détection et de quantification d'un complexe ARN/aminoglycoside en phase homogène par voie électrochimique. Nous introduirons la preuve de concept en présentant les résultats obtenus pour la formation d'un complexe entre des ARN et un aminoglycoside marqué par un groupement redox.

La chapitre 4 montre comment il est possible d'étendre ce concept à l'étude de molécules non marquées. Pour cela, nous verrons comment l'analogue redox aminoglycoside est utilisé comme molécule reporter dans des expériences de compétition. Ces expériences de compétition permettent de quantifier indirectement les interactions entre un ARN et une molécule marquée. Egalement, des résultats préliminaires quant à l'application de cette méthode électrochimique en vue d'expérience de criblage seront présentés.

Contexte scientifique

I - L'émergence des ARN comme nouvelle cible thérapeutique

Depuis ces dix dernières années, il a été démontré que les ARN possèdent un rôle central dans de nombreux processus de régulation cellulaire¹ ce qui a amené la communauté scientifique à les considérer comme de nouvelles cibles thérapeutiques très prometteuses.^{2,3} En effet, la diversité fonctionnelle des ARN est en lien avec leur capacité à former des structures complexes. Ces différentes structures hautement organisées sont capables d'interagir avec différents partenaires cellulaires (protéines, ARN, ADN, cations, métabolites). Dans certains cas, ce sont de petites molécules exogènes qui vont interagir avec ces ARN et potentiellement interférer avec les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués. Une connaissance incomplète de ces phénomènes d'interaction nous a poussé à nous intéresser au développement d'une nouvelle méthode de détection et de quantification de ces interactions. Ce premier chapitre se focalisera sur le contexte général dans lequel s'inscrit ce projet. Après avoir présenté les caractéristiques physico-chimiques et fonctionnelles des ARN, nous verrons pourquoi et comment les aminoglycosides ont été sélectionnés en tant que ligands d'ARN. Enfin, un état de l'art des différentes techniques analytiques utilisées à ce jour dans ce contexte nous amènera à expliquer les raisons d'une approche électrochimique pour cette étude.

I - 1) Généralités sur les ARN

a) Propriétés structurales des ARN

L'ARN ou acide ribonucléique, est une macromolécule biologique présente chez tous les êtres vivants.⁴ Il provient de la séquence d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) codant, obtenu après d'éventuelles modifications post-transcriptionnelles (épissage, méthylations, isomérisations,...). Sa structure repose sur un enchaînement linéaire de nucléotides. Chacun de ces nucléotides est constitué d'un sucre, le ribose, d'un groupement phosphate et d'une base azotée. Il existe deux types de bases canoniques. Des bases purines, adénine (A) et guanine (G) et des bases pyrimidines, cytosine (C) et uracile (U).⁴ Les nucléotides sont reliés entre eux par une liaison phosphodiester impliquant l'oxygène du ribose en 3' d'un premier nucléotide avec le phosphate en 5' du nucléotide suivant formant ainsi une séquence linéaire (figure I.1).

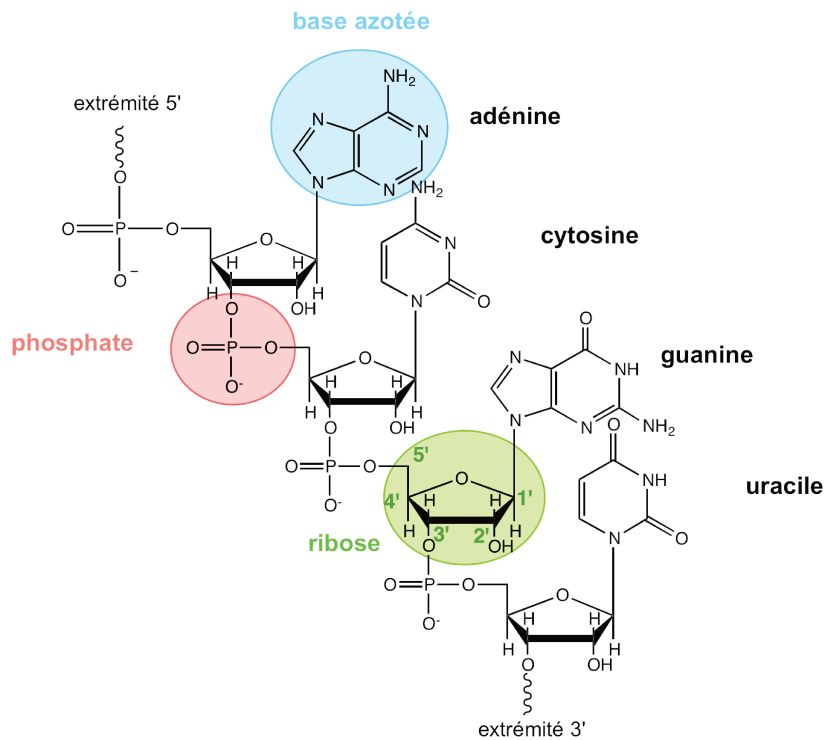


FIGURE I.1 – Structure primaire de l'ARN

L'ARN est souvent comparé à l'ADN dont sa structure est très proche:

- Comme l'ADN, l'ARN est un polyphosphate, chargé négativement à pH physiologique, ce qui lui confère une nature polyanionique, souvent associée à des cations métalliques.⁵
- Les bases azotées sont capables de s'associer par formation de liaisons hydrogènes de façon cano-nique ou non.

Cependant, ces deux molécules se distinguent l'une de l'autre:

- Le sucre est un désoxyribose pour l'ADN alors que l'ARN comporte un ribose. Cette différence est d'ailleurs la raison pour laquelle les ARN sont chimiquement moins stables que l'ADN et sont plus enclins à être hydrolysés en conditions alcalines⁶ (figure I.2).
- Les séquences d'ARN sont généralement plus courtes (quelques dizaines à quelques milliers de nu-cléotides).
- L'ARN est généralement sous forme monocaténaire contrairement à l'ADN dont la structure est bicaté-naire et organisée en double hélice.
- Dans l'ARN, le U remplace la thymine (T).
- La diversité chimique de l'ADN est moins complexe que celle de l'ARN, ce dernier étant capable de compter beaucoup de nucléotides modifiés⁷ dans sa séquence (comme par exemple la pseudouridine).

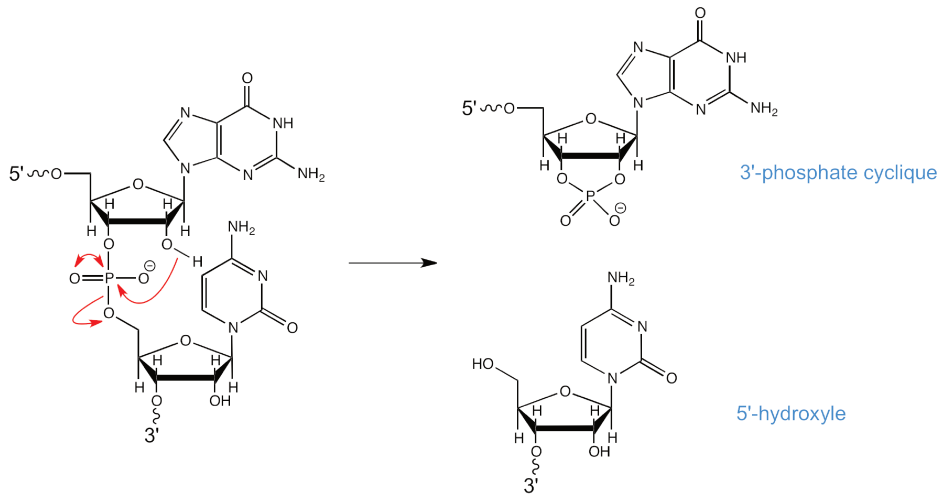


FIGURE I.2 – Hydrolyse de l'ARN en conditions alcalines

Tout comme les protéines, les ARN possèdent plusieurs niveaux d'organisation: une séquence primaire, secondaire et tertiaire.

1. La structure primaire d'un acide nucléique équivaut à sa séquence linéaire de nucléotides, directement obtenue après transcription de l'ADN. Les bases A, U, C et G s'alternent et sont liées entre elles par des liaisons phosphodiester. Notons que ces bases sont toutefois capables de subir des modifications post-transcriptionnelles, induites par la machinerie cellulaire ce qui complexifie les séquences nucléotidiques.⁸
2. La structure secondaire correspond au repliement d'un brin d'ARN monocaténaire sur lui-même grâce à des appariements internes entre bases complémentaires. Les appariements canoniques de type Watson-Crick permettent la formation de paires de bases entre A=U et C≡G par le biais de liaisons hydrogène entre nucléotides. Des appariements non-canoniques dits "bancals" (ou *wobble* en anglais tel que G=U), des appariements de Hoogsteen et parfois même des triplets de bases sont cependant fréquemment observés.⁹ Des structures comme les tiges-boucles, les boucles internes, les *bulges* (hernies), les pseudo-noeuds ou encore les tétrades de G (*G quadruplex*) sont alors obtenues (figure I.3).

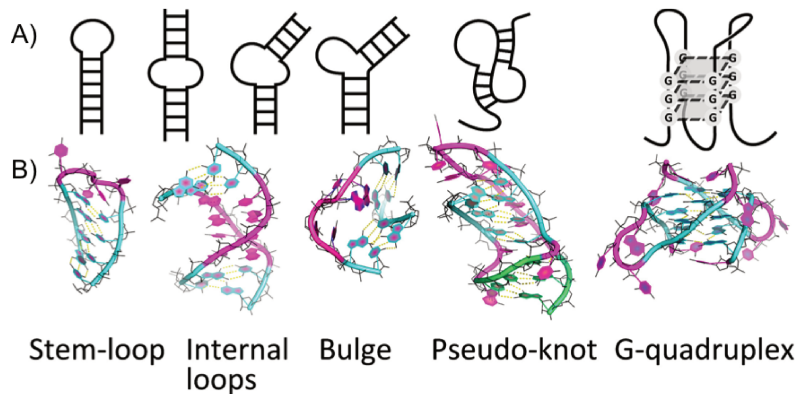


FIGURE I.3 – Exemples de structures secondaires de l'ARN représentés A) schématiquement B) en trois dimensions. Figure tirée de.¹⁰

3. La structure tertiaire est un niveau d'organisation supérieur. Cette dernière correspond à un repliement en trois dimensions. Cette structure est maintenue grâce aux liaisons hydrogènes entre nucléotides plus ou moins éloignés dans la séquence ainsi qu'à des interactions d'empilement. De plus, il est important de souligner la contribution des cations monovalents (Na^+) ou divalents (Mg^{2+}) dans la stabilité de ces structures tertiaires.¹¹ En effet, les groupements phosphate chargés négativement à pH physiologique entraînent des forces de répulsion électrostatiques entre eux. Les cations présents en solution permettent alors de stabiliser les structures d'ARN.

Contrairement à la structure primaire, les structures secondaire et tertiaire des ARN sont à l'origine de leur diversité fonctionnelle. Dans ces conformations, les nucléotides peuvent soit remplir une fonction biologique précise et/ou être capables de remplir un rôle structural dans l'architecture de l'ARN.

b) Fonctions biologiques des ARN

Les ARN sont capables de former des structures complexes et pré-organisées qui leur confèrent une grande diversité fonctionnelle au sein des cellules. D'ailleurs, un type d'ARN donné peut remplir à lui seul différentes fonctions biologiques, ce qui traduit la richesse et la complexité de ces molécules. A titre d'exemple, nous pouvons citer les ARN de transfert (ARNt) qui interviennent dans la traduction, servent d'amorce lors de l'initiation de la transcription inverse des rétrovirus,¹² jouent un rôle dans la synthèse de diverses molécules,^{13,14} . . . Une liste non exhaustive des différentes fonctions des ARN est rassemblée dans le tableau I.1.

Abréviation	Nom complet	Fonction
ARNm	ARN messenger	code pour les protéines
ARNt	ARN de transfert	associe un codon de trois nucléotides à un acide aminé
ARNr	ARN ribosomique	décode l'information génétique
petits ARNnc	petits ARN non codants	
miARN	micro ARN	régulation de l'expression des gènes
siARN	ARN interférent	régulation de l'expression des gènes
ARNsn	ARN nucléaire	rôle dans l'épissage des introns
ARNsno	ARN nucléolaire	rôle dans la maturation de l'ARNr
longs ARNnc	longs ARN non codants	régulation de l'expression des gènes

TABLE I.1 – Les différents ARN et leurs fonctions.

Hormis l'ARNm qui conduit à la synthèse des protéines, tous les autres types d'ARN sont dits non-codants (ARNnc). En effet, ils ne sont pas traduits en protéines mais interviennent dans plusieurs processus cellulaires. Chez l'Homme, 98 % du génome est non codant.¹⁵ L'importance accordée aux 2 % restants pour leur capacité à être traduits en protéines, a initialement conduit la communauté scientifique à considérer ces 98 % d'ADN comme étant inutiles (*junk DNA*) car leur fonction biologique était mal connue. Il a fallu attendre 2007 et le projet ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) pour mettre en évidence l'importance de ces séquences non codantes d'ADN. Il a été démontré que plus de 50 % de ces séquences sont malgré tout transcrites

en ARN et qu'elles possèdent des rôles cruciaux dans des phénomènes de signalisation et de régulation. Les ARN sont donc des molécules complexes d'un point de vue fonctionnel. Les paragraphes suivants vont s'attarder sur la présentation de différents types d'ARN et des fonctions biologiques qui leurs sont associées, afin de mieux comprendre leur rôle en tant que potentielle cible thérapeutique.

1. ARN messenger et riboswitches

La totalité de l'information génétique d'un organisme vivant est initialement contenue dans son ADN. Afin de pouvoir exprimer les gènes en une multitude de caractères hérités, plusieurs étapes sont nécessaires. L'ADN codant est initialement copié sous forme d'ARN pré-messager puis mûri en ARN messenger (ARNm) au cours des étapes de transcription et d'épissage (figure I.4). Cette séquence d'ARNm est ensuite traduite en protéines à l'aide du ribosome, de complexes ribonucléoprotéiques et d'ARN de transfert (ARNt).¹⁶ L'ARNm possède donc un rôle de support transitoire de l'information génétique lors de la traduction des gènes en protéines. L'ARN ribosomique (ARNr) et les ARNt sont également très importants lors de la traduction. Ces derniers seront plus amplement présentés dans les paragraphes qui leurs sont dédiés.

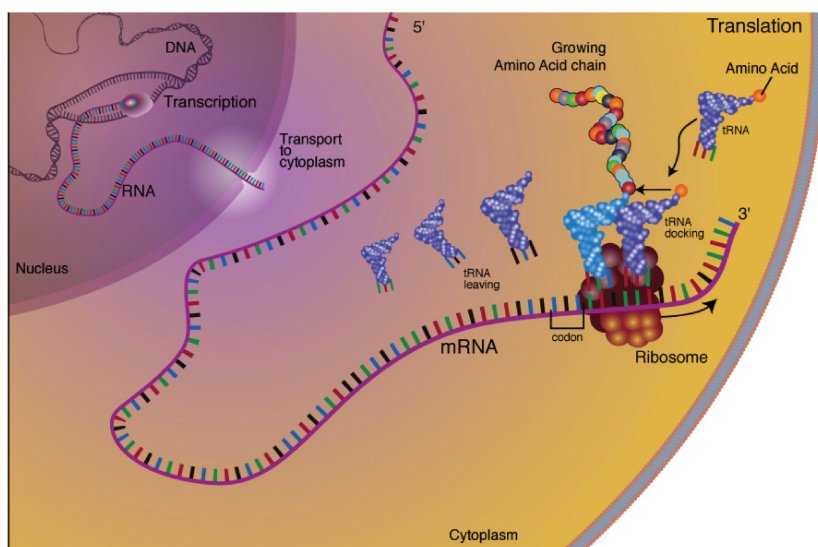


FIGURE I.4 – Schéma des étapes de transcription et de traduction. Source: National Human Genome Research Institute, "Talking Glossary of Genetic Terms". www.genome.gov/glossary/

Une approche thérapeutique intéressante est d'inhiber sélectivement la traduction des protéines en ciblant l'ARNm. Ceci est notamment possible grâce aux différents repliements présents sur un ARNm. Cette séquence linéaire simple brin présente trois régions (figure I.5): la région 5' non codante (appelée 5'-UTR), la région codante permettant la synthèse des protéines lors de la traduction, et enfin la séquence 3' non codante (3'-UTR). Les différentes structures secondaires présentes sur chacune de ces trois régions sont autant de possibilités d'inhiber le mécanisme de traduction en faisant appel à de petites molécules capables de reconnaître spécifiquement ces conformations d'ARN. La partie 5'-UTR, souvent impliquée dans des processus de régulation de la traduction est la plus ciblée des trois régions.

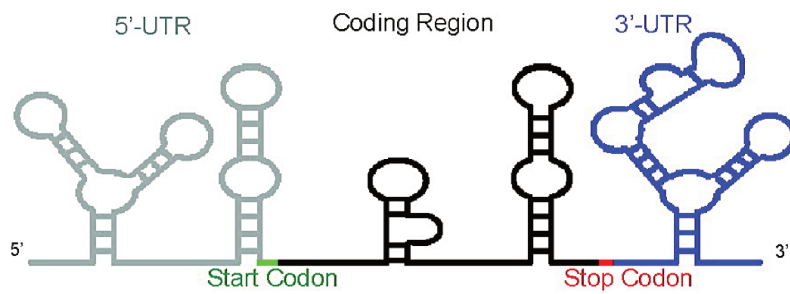


FIGURE I.5 – Les trois régions de l'ARNm. Tiré de¹⁷

La région 5'-UTR contient en effet des *riboswitches* (riborégulateur, en français) et une façon d'interférer avec l'ARNm consiste à les cibler. Les riboswitches sont des séquences capables de fixer de petites molécules. Elles sont situées en amont de la séquence codante de l'ARNm.^{18,19} Leur fonction consiste à réguler la traduction d'une protéine suite à une interaction avec une molécule. La synthèse d'une protéine, placée sous le contrôle de ce type de mécanisme, est donc directement dépendante de l'interaction riboswitch-métabolite. Les riboswitches possèdent deux domaines.²⁰ Le premier, appelé *domaine aptamère* permet la liaison avec une molécule cible de façon très affine. Le second, connu sous le nom de *domaine plateforme* subit alors des changements conformationnels des suites de l'interaction avec la molécule cible. En conséquence, l'équilibre est déplacé pour stabiliser une des conformations de cet ARNm aboutissant à une activation ou une inhibition de la traduction.¹⁹ Un exemple de riboswitch est illustré figure I.6. En absence du métabolite cible, la séquence Shine-Dalgarno (site de fixation du ribosome chez les procaryotes) est parfaitement accessible au ribosome et celui-ci peut initier la synthèse protéique. A l'inverse, la formation du complexe riboswitch-métabolite déplace l'équilibre vers une forme stabilisée de l'ARNm dans laquelle la séquence Shine-Dalgarno est inaccessible, ce qui inhibe la traduction.

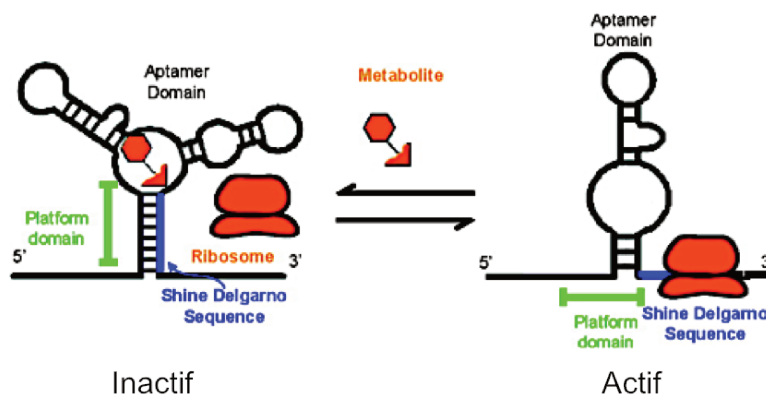


FIGURE I.6 – Un exemple de riboswitch. Tiré de¹⁷

Les riboswitches sont donc utilisés pour contrôler de nombreuses voies métaboliques. Il a été démontré qu'ils jouaient un rôle dans la biosynthèse et le transport de cofacteurs enzymatiques,²¹ dans le contrôle de la terminaison de la transcription,⁶ dans le contrôle de la localisation cellulaire de l'ARN ainsi que dans sa vitesse de dégradation.²² Les ARN sont capables de reconnaître une large gamme de molécules comme des acides aminés, des petites molécules organiques et même des ions métalliques.²³ Cette variété de métabolites montre donc qu'il existe différentes possibilités pour cibler les ARN.

2. ARN de transfert

Les ARNt sont principalement connus pour leur rôle dans la synthèse des protéines. Ils possèdent une structure secondaire, formée de plusieurs tiges-boucles, qui comporte quatre régions: un bras accepteur, un bras anticodon, un bras D et un bras T (figure I.7). Les ARNt peuvent être décrits comme étant des molécules faisant le lien physique entre l'information génétique codée par l'ARNm et les protéines, codées par les 20 acides aminés naturels. Plusieurs dizaines d'ARNt existent dans les cellules, chacun correspondant à un acide aminé spécifique qui est attaché à l'extrémité 3'-OH du bras accepteur. Les ARNt assurent la lecture des codons de l'ARNm par l'intermédiaire de leur anticodon. Ils permettent ainsi le transport des acides aminés au niveau du ribosome pour la traduction des gènes en protéines.²⁴

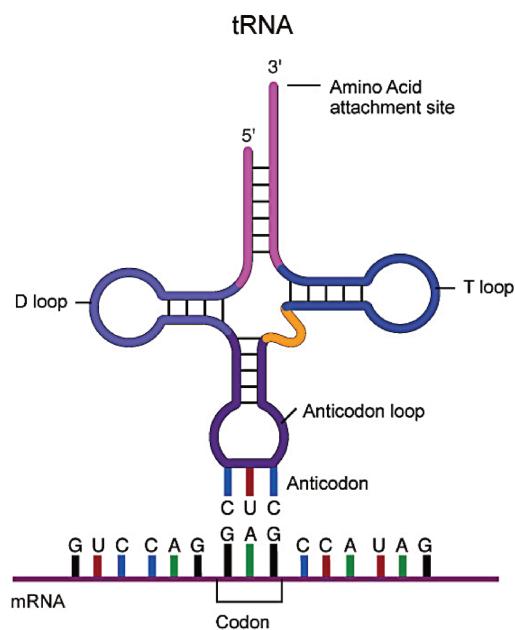


FIGURE I.7 – L'ARNt dans l'étape de traduction. Source: National Human Genome Research Institute, "Talking Glossary of Genetic Terms". www.genome.gov/glossary/

Une façon de cibler les ARNt est d'inhiber la synthèse des aminoacyl-ARNt synthétase (AaRS). Une vingtaine de ces enzymes existent dans les cellules. Leur rôle est de catalyser le couplage entre le bras accepteur de l'anticodon de l'ARNt et le bon acide aminé afin que celui-ci soit incorporé dans la séquence peptidique en cours de formation. De ce fait, viser ces AaRS permettrait d'inhiber la synthèse des protéines et conduire *in fine* à la mort cellulaire.²⁵

Les ARNt possèdent d'autres fonctions biologiques en dehors de la traduction. Certains aminoacides-ARNt sont impliqués dans la synthèse du peptidoglycane des bactéries à Gram positif²⁶ tandis que d'autres interviennent dans différentes voies de biosynthèse (par exemple dans la biosynthèse de la chlorophylle¹⁴ ou encore de diverses porphyrines¹³). Les ARNt sont également très connus pour servir de première amorce lors de l'initiation de la transcription inverse de rétrovirus. En effet, leur fonction première de transporteur d'acides aminés est parfois détournée pour servir d'amorce de polymérisation en vue de la synthèse d'ADN viral. Un exemple bien précis est le cas de l'ARNt^{Lys₃}, cible étudiée au laboratoire pour lutter contre le VIH (virus de

l'immunodéficience humaine). Le VIH est un rétrovirus et par définition, conserve son information génétique sous forme d'ARN et non pas d'ADN. Afin de se répliquer, le VIH va détourner la machinerie de biosynthèse de son hôte pour y intégrer son ARN génomique viral. Une enzyme, la transcriptase inverse, permettant la synthèse d'ADN à partir d'ARN, va entrer en action au cours d'une étape appelée rétrotranscription et utiliser l'ARNt^{lys}₃ comme amorce pour la polymérisation de désoxyribonucléotides.²⁷

Au vu de leurs fonctions très variées et de leur implication dans de nombreux processus cellulaires, les ARNt offrent donc de nombreuses stratégies antibactériennes et antivirales.

3. ARN ribosomique et ribozymes

Dans tous les organismes vivants, les ARNm sont traduits en protéines par une machinerie cellulaire très conservée, le ribosome. Comme illustré en figure I.8, le ribosome est constitué de deux sous-unités de taille et de fonction différentes²⁴:

- une grande sous-unité (60S chez les eucaryotes et 50S chez les procaryotes) dont le rôle est de permettre la synthèse de la liaison peptidique. La formation de cette liaison s'effectue au niveau du site catalytique du ribosome, le site P (pour *peptidyl-transférase*, en vert sur la figure I.8), qui fixe la chaîne polypeptidique naissante. Chez la bactérie, la grande sous-unité contient deux ARN ribosomiques (5S et 23S) contre trois pour les eucaryotes (5S, 5.8S et 28S).
- une petite sous-unité (40S chez les eucaryotes et 30 S chez les procaryotes) qui est responsable de la lecture de l'ARNm et de la vérification de l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. Ceci se déroule au niveau du site A de la petite sous-unité ribosomique (en rouge sur la figure I.8). Ainsi, le bon aminoacyl-ARNt correspondant au codon de l'ARNm en cours de lecture vient se fixer au complexe ribosome-ARNm et additionner un nouvel acide aminé. La petite sous-unité contient un seul ARN ribosomique (ARNr), appelé ARN 16S chez les bactéries et ARN 18S chez les eucaryotes, dont la longueur peut varier de 1500 à 1800 nucléotides.

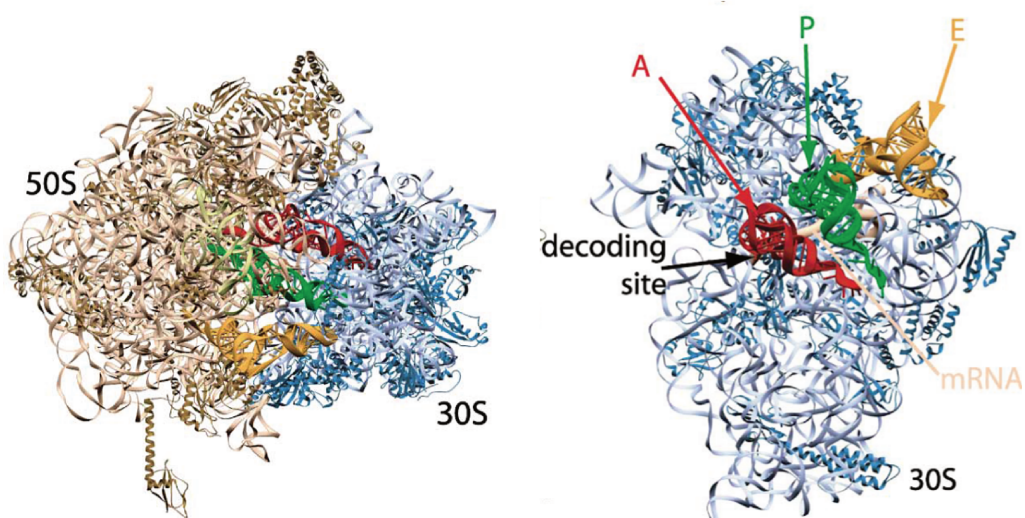


FIGURE I.8 – Structure du ribosome procaryote.²⁴

Le ribosome n'est pas seulement constitué d'ARN. Il compte également dans sa structure un nombre variable de protéines ribosomiques suivant l'espèce. Il a été démontré que les ARNr n'avaient pas uniquement un rôle structural, mais possédaient aussi une activité enzymatique: celle de catalyser la formation de la liaison peptidique. Le ribosome est donc une enzyme, parfois appelée *ribozyme*.^{28,29} Les propriétés catalytiques des ribozymes sont en lien avec leur aptitude à se replier et ainsi former des structures tertiaires favorisant la formation de cavités hydrophobes dans lesquelles peuvent venir se lier de petites molécules. Par ailleurs, un des arguments permettant d'étayer l'hypothèse selon laquelle l'ARN ribosomique est porteur de la fonction catalytique est d'ordre structural. Des études tridimensionnelles du ribosome ont permis de localiser le centre actif qui permet la formation de la liaison peptidique. Celui-ci est proche de l'extrémité des deux ARNt présents dans les sites A et P du ribosome. Or, cette région du ribosome ne contient que de l'ARN ribosomique et aucune protéine ribosomique. Par défaut, en l'absence de protéines, il a donc été admis que la catalyse ne pouvait être effectuée que par l'ARN ribosomique lui-même. Aujourd'hui il est reconnu que c'est l'ARN ribosomique qui catalyse la formation de la liaison peptidique, et non les protéines qui n'ont apparemment qu'un rôle de stabilisation structurale.⁴

Il existe d'autres exemples d'ARN pourvus d'une activité enzymatique tels que la RNase P qui catalyse la maturation des ARNt,³⁰ mais également certaines séquences d'ARN viral capables de coupure autocatalytique tel que le ribozyme "en tête de marteau"³¹ ("*hammerhead*").

Interférer avec l'activité catalytique d'un ribozyme est donc une approche largement étudiée afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques. Dans notre contexte d'étude, un exemple marquant est l'utilisation de l'ARNr 16S de la petite sous-unité du ribosome des bactéries comme cible thérapeutique. Cette stratégie passe par l'utilisation d'une famille de molécules, les aminoglycosides. Leur mode d'action consiste à interagir au niveau du site A de l'ARNr 16S de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. En interférant avec les propriétés de reconnaissance de ce site A, l'ARNr ne sera plus en mesure de distinguer un ARNt correct d'un mauvais au cours de la traduction. En conséquence, une augmentation du taux d'erreur dans la synthèse des protéines est observée aboutissant alors à la mort cellulaire. Les phénomènes d'interaction ainsi que le mode d'action des aminoglycosides sur l'ARNr procaryote seront détaillés dans la partie II - de ce chapitre (page 21).

4. Petits et longs ARN non codants

Depuis le début des années 2000, de nouveaux ARN non codants (ARNnc) ont été découverts.¹ La mise en évidence de leur implication dans de nombreux processus cellulaires et dans certaines maladies en lien avec le vieillissement a permis de grandes avancées dans le domaine du diagnostic et la question se pose de savoir si on peut en faire de bonnes cibles thérapeutiques.

Les micros ARN (miARN), présents chez les eucaryotes, sont de courtes séquences dont la taille est comprise entre 20 et 25 nucléotides. Ils sont connus pour jouer un rôle de régulateur post-transcriptionnel en étant capable d'éteindre l'expression d'un gène. Pour ce faire, ils s'apparient à une séquence complémentaire d'un ARNm cible entraînant alors une répression de la traduction ou encore la dégradation de cet ARNm.³² Il a

été démontré que ces miARN sont impliqués dans de nombreux processus de régulation cellulaire tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose.³³

D'autres exemples de courts ARN non codants existent, tels que les ARN nucléaires (ARNsn) et les ARN nucléolaires (ARNsno). Les ARNsn possèdent une longueur comprise entre 100 et 150 nucléotides selon les espèces. Ils sont impliqués dans la régulation de l'épissage des ARNm. Les ARNsno, quant à eux, ont une longueur comprise entre 60 et 300 nucléotides et sont contenus dans le nucléole des cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle dans la maturation des ARNr. Ils facilitent leur repliement et leur stabilisation en participant à l'incorporation de modifications chimiques, les deux principales étant la pseudouridylation et la méthylation en position 2' du ribose. Ces derniers interviennent également dans la maturation du ribosome.³⁴

Les longs ARN non codants sont une autre classe d'ARN. Sont considérés comme longs ARN non codants, tous les ARN dont la séquence est supérieure à 200 nucléotides. Ceux-ci apparaissent comme étant d'importants régulateurs du remodelage de la chromatine³⁵ et des questions se posent sur leur potentielle implication dans des maladies en lien avec le vieillissement.

I - 2) L'ARN en chimie médicinale: pourquoi et comment les cibler ?

Les ARN sont impliqués dans de nombreux processus biologiques et possèdent des rôles aussi variés que complexes du fait de leurs différentes structures secondaires et tertiaires. Hormis leur fonction d'intermédiaire dans le transfert de l'information génétique, les ARN sont essentiels dans divers phénomènes de régulation, de catalyse, de cascades de signalisation cellulaire ou encore d'épissage.^{1,36,37} Même si les protéines sont principalement visées lors de l'élaboration de nouveaux médicaments, de nombreux efforts sont maintenant mis en œuvre pour également cibler les ARNnc. Depuis plusieurs dizaines d'années, des stratégies permettant d'atteindre ces cibles plus originales ont ainsi été développées. L'aptitude des ARN à être de bonnes cibles pour l'action des antibiotiques^{38,39} et de petits métabolites^{17,40} a donc été mise à profit pour la conception de nouvelles voies thérapeutiques. Une possibilité consiste à cibler les séquences d'ARN tandis qu'une autre à pour but de cibler une structure d'ARN. Par l'action de ligands d'ARN, il est possible de déréguler les processus dans lesquels ces ARNnc sont impliqués, à la fois chez les procaryotes et les eucaryotes. Peu de choses sont cependant maîtrisées à ce sujet et cibler les ARN reste encore compliqué. Pour concevoir de tels ligands, il est toutefois nécessaire de tenir compte de certaines particularités de l'ARN.

Comme précédemment mentionné, les ARN sont capables d'adopter des structures tertiaires, comportant des boucles et des cavités leur permettant de lier spécifiquement de petites molécules. Cependant, l'étude de leurs propriétés biologiques et structurales est souvent compliquée par la difficulté à les produire en quantité et pureté suffisante. Ceci ne constitue pas le seul frein dans la recherche de bons ligands d'ARN, puisqu'il est également nécessaire de respecter les contraintes relatives à leurs caractéristiques physico-chimiques. Le squelette central des ARN, constitué de groupements phosphate chargés négativement à pH physiologique, leur confère une nature polyanionique. De ce fait, les molécules d'ARN se retrouvent souvent entourées de cations métalliques multivalents (ex: Mg^{2+}), essentiels pour leur structure.¹¹ Egalement, lorsqu'ils sont libres en solution, les ARN sont fortement solvatés grâce à la présence de nombreux groupements polaires au sein

des bases azotées et grâce à leur capacité à interagir avec un réseau organisé de molécules d'eau. En prenant en compte toutes ces caractéristiques, un bon ligand d'ARN devra donc être capable de perturber ce réseau de molécules d'eau mais devra aussi posséder un caractère cationique et être fortement polaire. Tous ces critères peuvent donc rendre la conception de ligands d'ARN assez complexe. Il a également été démontré que les ARN étaient dotés d'une grande souplesse structurale et que cette nature dynamique est essentielle à leur activité. L'interaction avec un ligand peut même induire un changement conformationnel de la macromolécule, privilégiant ainsi une conformation parmi toutes celles en équilibre afin d'optimiser les interactions avec ce ligand.⁴¹ Les stratégies envisagées pour cibler un ARN ne doivent donc pas uniquement reposer sur un modèle statique, mais doivent donc prendre en compte cet aspect dynamique.

Compte tenu de tous ces critères, on comprend bien que la conception originale de ligands visant spécifiquement des structures élaborées d'ARN reste difficile. Même les tentatives de modélisation de structures d'ARN et de criblage virtuel pour la recherche de bons ligands d'ARN restent complexes à réaliser. Il faut en effet tenir compte de leur nature dynamique et de la destabilisation de leur cage de solvation en réponse à une interaction avec un ligand.⁴² Une stratégie employée afin de simplifier la conception de ligands d'ARN consiste à s'inspirer des aminoglycosides. Ces molécules sont des ligands naturels des ARN, c'est pourquoi de nombreuses approches tirent parti de leur structure afin de développer des molécules capables d'interagir avec l'ARN.

II - Les aminoglycosides

II - 1) Une famille d'antibiotiques à l'architecture conservée

Les aminoglycosides sont une famille de produits naturels synthétisés par des bactéries de la famille des Actinomycètes et largement connue pour son action antibactérienne.⁴³ En effet, ces molécules possèdent un large spectre d'action et sont notamment utilisées lors de graves infections par des bactéries à Gram-négatif ou par des bactéries multi-résistantes.⁴⁴ Cependant, des phénomènes de résistance et plusieurs effets secondaires⁴⁵ (ototoxicité, toxicité rénale,...) limitent leur usage en grandes quantités et de façon systématique en cas d'infection. Toutefois, avec une action rapide et dose-dépendante contrôlée, les aminoglycosides présentent de grands avantages thérapeutiques et sont couramment utilisés en tant qu'antibiotiques. De plus, cette famille de molécules a été largement étudiée pour mieux comprendre les interactions ARN/ligands. En effet, leur capacité à reconnaître des ARN de structure et de nature différentes leur a permis d'être considérés comme des ligands universels d'ARN. Etudier leur comportement dans leur contexte d'action sur les ARN constitue donc un très bon point de départ pour mieux comprendre les caractéristiques de ce qui fait un bon ligand d'ARN. Ceci pourrait ainsi contribuer à la conception de nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Les molécules appartenant à cette famille d'antibiotiques possèdent un motif central aminocylitol, le plus souvent la 2-deoxystreptamine (DOS, en bleu sur la figure I.9). D'autres aminoglycosides peuvent toutefois provenir d'un motif central streptamine ou streptidine dans le cas de la streptomycine. Le motif DOS peut être lié à un ou plusieurs sucres porteurs de nombreuses fonctions amines qui, selon leur position, aboutissent à différents sous-groupes d'aminoglycosides. Comme indiqué sur la figure I.10, la DOS peut être monosubstitué

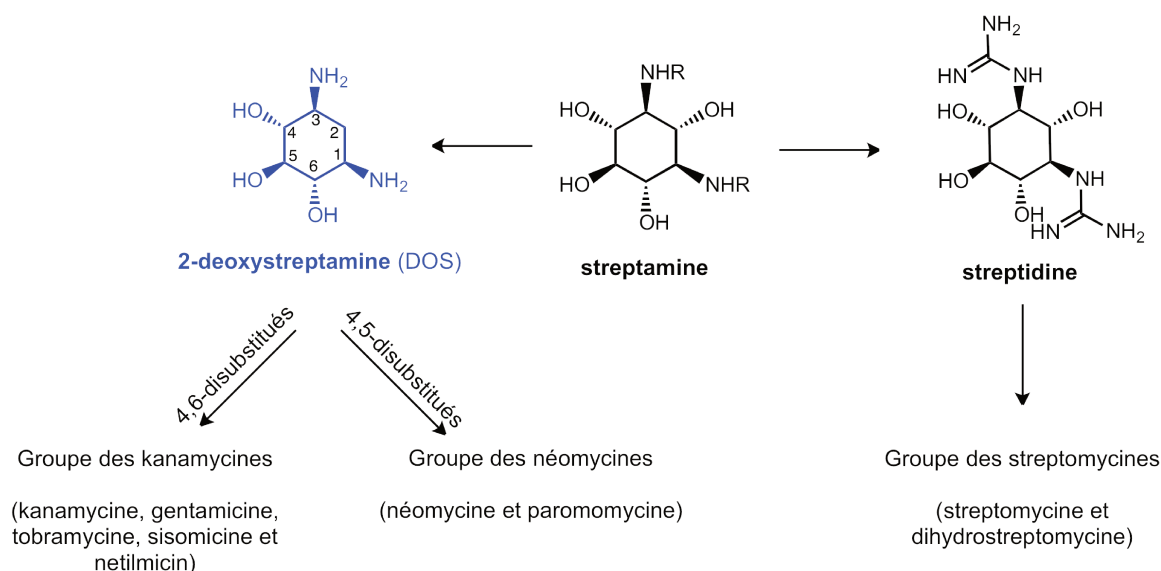


FIGURE I.9 – Classification générale des aminoglycosides.

en position 4 (comme c'est le cas pour la néamine, la paromamine ou encore l'apramycine), disubstituée en positions 4 et 5 (comme pour la néomycine ou la paromomycine (PRM)), ou disubstituée en positions 4 et 6 (kanamycine, tobramycine,...). Les aminoglycosides sont des molécules très fonctionnalisées et en conséquence, leur chimie est connue pour être relativement difficile notamment en raison de la présence de nombreuses fonctions amine et alcool réactives (cf chapitre II). En effet, les approches de synthèse asymétrique sont largement compliquées par la nature du cycle central DOS qui est un composé *méso*. Les aminoglycosides sont décrits comme étant des molécules polycycliques très polaires, chargés positivement à pH physiologique du fait de la présence de nombreux groupements amino protonés.

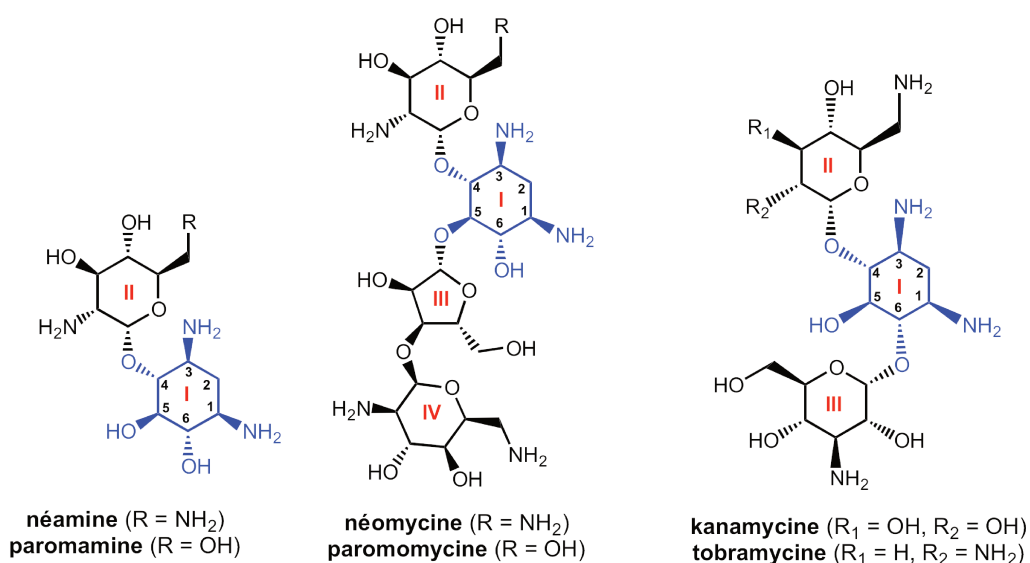


FIGURE I.10 – Exemples d'aminoglycosides.

II - 2) Caractéristiques physico-chimiques et modes d'action des aminoglycosides

a) Considérations générales de l'interaction avec l'ARN

Les aminoglycosides sont principalement connus pour être capables d'interagir avec des régions particulières de l'ARN telles que les tiges-boucles ou les bulges. En effet, les cavités hydrophobes résultant de ces interactions non canoniques sont un terrain propice à la fixation de petites molécules. Les aminoglycosides sont polycationiques à pH physiologique (figure I.11) et en raison de la nature polyanionique du squelette phosphaté de l'ARN au même pH, l'essentiel des forces d'interaction entre ces deux partenaires provient d'interactions électrostatiques.⁴²

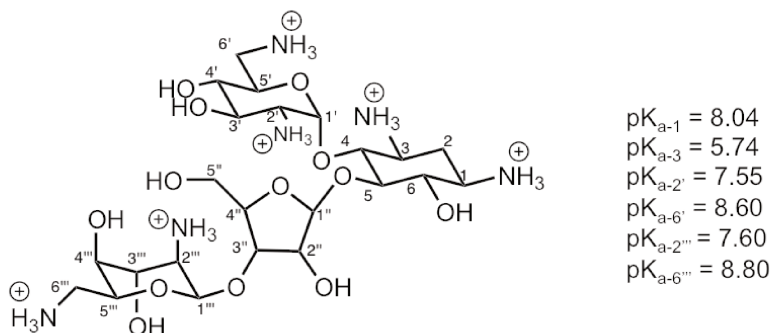


FIGURE I.11 – Structure de la néomycine et valeurs de pK_a de ses groupements amines⁴⁶

Pilch et son équipe ont ainsi précédemment démontré l'importance de cette contribution électrostatique en faisant varier la force ionique du tampon contenant des échantillons d'ARNr 16S.⁴⁷ Ainsi, en augmentant la concentration en NaCl, il leur été possible de remarquer une diminution des constantes d'affinité (K_A) mesurées lors de l'interaction avec différents aminoglycosides et ce, aussi bien en microcalorimétrie qu'en fluorescence. En doublant la concentration en NaCl (de 150 à 300 mM), la constante d'affinité mesurée est diminuée d'un facteur dix. Ceci met en avant l'importance de ces interactions électrostatiques et les conséquences liées à la force ionique du milieu puisqu'il est donc possible d'écranter plus ou moins fortement ces interactions. Ces précédentes études ont ainsi démontré que les forces d'interaction entre ARN et aminoglycosides reposent à plus de 50 % sur des interactions électrostatiques. Leur grande contribution est par ailleurs responsable du manque de sélectivité des aminoglycosides. Une stœchiométrie généralement supérieure au ratio 1:1 est régulièrement observée, suggérant alors la présence de multiples sites de liaison selon les conditions de force ionique utilisées.⁴⁸

D'autres types d'interactions, cette fois de nature non ioniques, participent également à la formation des complexes ARN/amino-glycosides.⁴⁹ Par exemple, l'effet hydrophobe causé par le repliement de l'ARN permet à de petites molécules de venir se fixer. Un autre type d'interaction est lié à la présence de nombreux groupements polaires (OH et NH_2) à la fois sur l'ARN et sur les aminoglycosides. En effet, ces groupements assurent l'établissement de liaisons hydrogènes, à la fois entre ces deux partenaires mais également avec les molécules d'eau environnantes. Ces liaisons hydrogène arrivent en deuxième position par ordre d'importance après les interactions électrostatiques. Elles permettent aux aminoglycosides d'affiner leur position au sein de la cavité hydrophobe mais aussi de médier la formation du complexe ARN/amino-glycoside en réorganisant la position des molécules d'eau, ce qui stabilise la structure globale du complexe. A titre d'exemple, les traits en

pointillés verts sur la figure I.12, illustrent la participation d'un réseau organisé de molécules d'eau dans le cas de l'interaction entre l'ARNr et la paromomycine. Ce réseau d'interactions fait intervenir les atomes d'oxygène des molécules d'eau du solvant, représentés par des sphères rouges. Nous pouvons donc dire que les interactions ARN/aminoglycosides sont décrites par une combinaison d'interactions électrostatiques, de liaisons hydrogène et d'effet hydrophobe.

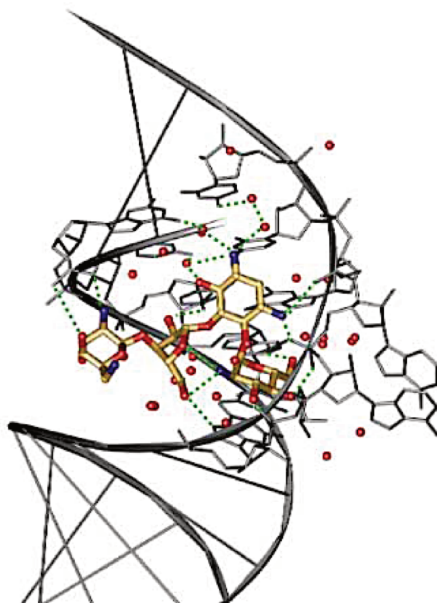


FIGURE I.12 – Contribution des molécules d'eau dans la formation de liaisons hydrogène entre le site A de l'ARNr et la paromomycine.⁵⁰

A l'instar des ARN, les aminoglycosides sont également dotés d'une grande flexibilité conformationnelle grâce aux liaisons glycosidiques situées entre les différents aminosucres. De ce fait, les aminoglycosides peuvent adopter différentes conformations afin de former des complexes stables avec les ARN.

b) Le ribosome: site d'interaction principal

La principale cible cellulaire des aminoglycosides est la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ces molécules agissent en se liant spécifiquement au site de décodage de l'ARNt aminoacylé (site A) et plus précisément, au niveau du grand sillon de l'hélice H44 de l'ARNr 16S⁵¹ (figure I.13). Ce site A est naturellement constitué de trois appariements canoniques G≡C, d'une paire U · U et d'un bulge formé par trois adénines non appariées (A1408, A1492 et A1493, suivant la numérotation chez *E.coli*). Ces adénines possèdent donc une conformation flexible et les résidus A1492 et A1493 sont dirigés vers l'intérieur de l'hélice.

Le rôle du site A de la petite sous-unité est de vérifier que l'ARNt correspondant au codon de l'ARNm en lecture soit recruté. Ce faisant, la grande sous-unité du ribosome catalyse la formation de la liaison peptidique aboutissant à l'incorporation du bon acide aminé dans la protéine en cours de synthèse. En présence du bon ARNt, un changement conformationnel s'opère et le site A passe d'une conformation "fermée" à une conformation "ouverte" grâce à un mécanisme de bascule des deux adénines A1492 et A1493 vers l'extérieur du bulge, signalant ainsi l'avancement dans le processus de traduction de l'ARNm en protéines.²⁸ Inversement, lorsqu'un mauvais ARNt est recruté, aucun changement conformationnel ne s'opère et le ribosome est alors

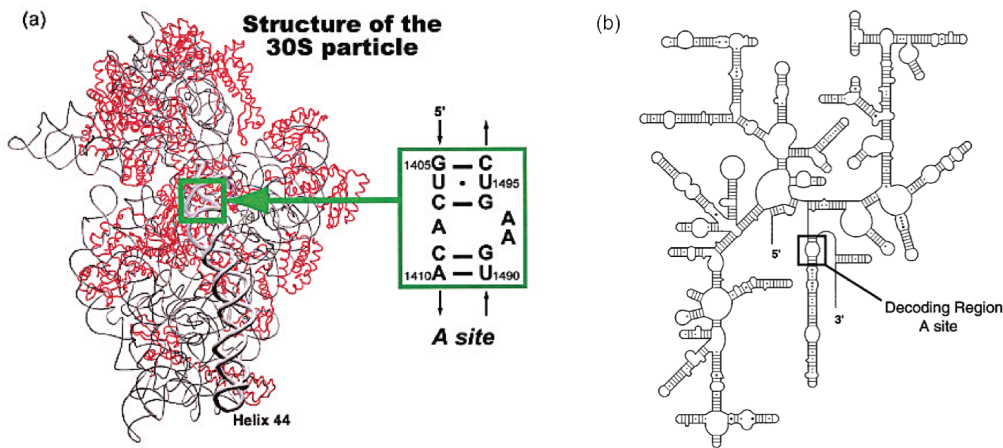


FIGURE I.13 – a) Structure cristalline de la petite sous-unité 30S du ribosome de *E.coli*. L'ARN 16S et les protéines ribosomales sont représentées en rouge et en gris respectivement.⁵¹ b) ARNr 16S de *E.coli*.⁵²

capable de différencier un bon acide aminé d'un mauvais et peut décider ou non de poursuivre la traduction de l'ARNm. La présence de ce bulge et plus particulièrement du mouvement de bascule des deux adénines, est cruciale pour le bon déroulement de la traduction et souligne l'importance du site A. En effet, comme l'indique la figure I.14, les antibiotiques de la famille des aminoglycosides possèdent un mode d'action exploitant ce mécanisme.^{3,53} De la même façon que les ARNt, ils sont capables de se lier au site A et entraînent ce même changement extra-hélicoïdal. L'ARN est stabilisé dans la conformation "ouverte" où les adénines A1492 et A1493 sont à l'extérieur du bulge. La barrière énergétique requise pour la fermeture du domaine ribosomique permettant de discriminer les ARNt entre eux étant abaissée, la précision de reconnaissance entre codon et anticodon est alors diminuée.^{54,55} Les aminoglycosides compromettent donc le bon déroulement de la traduction: l'incorporation d'acides aminés erronés favorise la production de protéines anormales menant *in fine* à l'apoptose de la cellule.^{56,57}

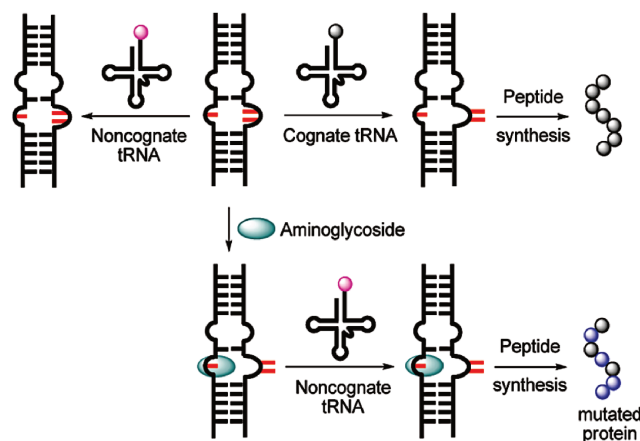


FIGURE I.14 – Mode d'action des aminoglycosides. Figure extraite de.³

Tous ces résultats ont pu être obtenus en développant un modèle simplifié d'ARNr 16S procaryote, utilisé afin de faciliter les analyses structurales. Afin de mieux comprendre les phénomènes d'interaction entre les aminoglycosides et l'ARNr 16S, Yoshizawa *et al.* furent les premiers à adopter une approche faisant appel à une tige boucle comme modèle pour représenter le site A.^{52,58} Des études structurales par RMN sur un frag-

ment d'ARNr 16S tronqué ne comportant que le site A, ont démontré que ce dernier conservait malgré tout ses propriétés d'interaction avec les aminoglycosides.⁵⁹ Cette courte séquence de 27 nucléotides (illustrée en figure I.15 - A) constituée des mêmes appariements G≡C, de la même paire U · U et des trois adénines non appariées formant un bulge, est donc un bon analogue du site A de la petite sous-unité ribosomique. Par des expériences de mutagenèse dirigée couplées à des études structurales par RMN, il leur a ainsi été possible d'identifier les nucléotides indispensables à la formation du complexe ARN/aminoglycoside⁵⁴ ainsi que la nature des fonctions chimiques des aminoglycosides impliqués dans les interactions. Dès lors, cette séquence modèle fut utilisée dans diverses études faisant appel à différentes techniques analytiques (cf partie III - de ce chapitre).

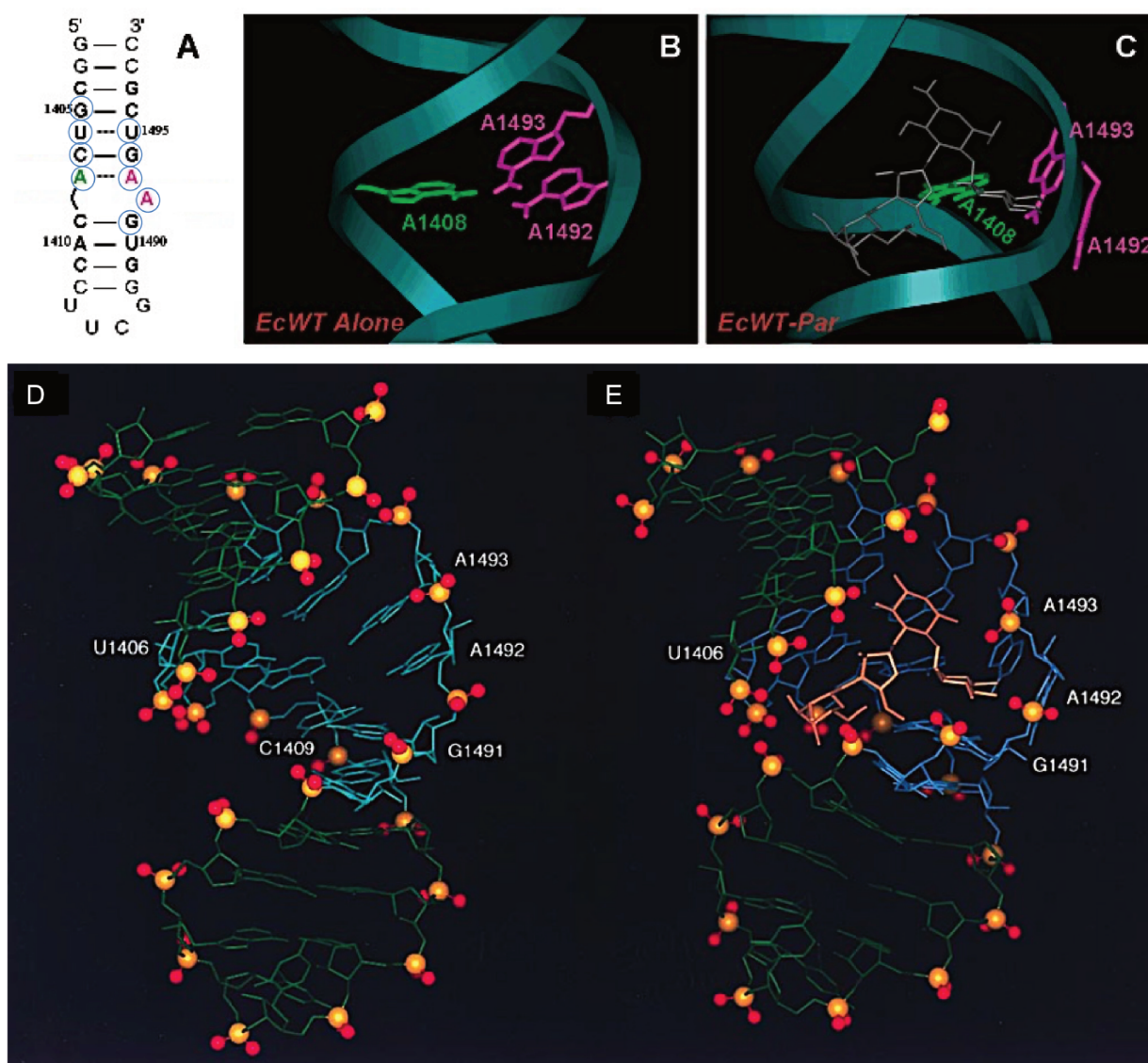


FIGURE I.15 – A) Modèle de l'ARNr 16S27 de *E. coli* utilisé par Fourmy *et al.*⁵⁹ Les nucléotides impliqués dans la formation du complexe avec les aminoglycosides sont entourés en bleu. B) Représentation schématique de l'ARNr 16S27 seul. C) ARNr 16S27 en présence de la paromomycine (PRM). Ces deux schémas illustrent bien le mouvement de bascule des deux adénines A1492 et A1493.⁶⁰ D) Structure aux rayons X de l'ARNr 16S27 seul. E) Structure aux rayons X du complexe ARNr 16S27-PRM. La PRM est représentée en couleur bronze.⁵⁹

Les structures cristallines de complexes impliquant divers aminoglycosides en présence de ce mime du site A (long de 27 ou de 23 nucléotides), isolées par Westhof et son équipe, contribuèrent à une meilleure compréhension des phénomènes de reconnaissance^{50,51,61} et confirmèrent la nature de ces interactions. Le site d'interaction sur l'ARN 16S a été précisément identifié et il est communément admis que cet ARN utilise un mécanisme identique pour tous les antibiotiques appartenant à la famille des aminoglycosides⁶² (figure I.15). Il a été démontré que le cycle central II (motif de la DOS) était crucial pour les phénomènes de reconnaissance avec l'ARN.^{28,58,63} La DOS s'insère et se lie aux paires de bases localisées à l'intérieur du grand sillon du site A de l'hélice, par l'intermédiaire de ses deux fonctions amine en N1 et en N3. Le substituant situé en position 4 (cycle I), quant à lui, vient se positionner au sein d'une poche formée par la paire de bases non canonique A1408 et A1493, et une base non appariée, l'adénine 1492 (figure I.16). En s'insérant dans cette poche, la DOS est contrainte dans une conformation où elle s'empile contre la base G1491 et forme ainsi une liaison hydrogène avec le résidu A1408. Cette interaction se faisant, les deux adénines 1492 et 1493 changent de conformation et sont alors expulsées du bulge, en dehors de l'hélice. Ces motifs sont essentiels pour assurer la spécificité des aminoglycosides pour le site A. Des interactions supplémentaires impliquant les sucres en position 5 ou 6 permettent d'augmenter l'affinité avec la cible mais ne contribuent pas à la spécificité. De plus, la structure moléculaire des aminoglycosides, constituée de nombreux groupements basiques et donneurs de liaison hydrogène (fonctions amine), permet d'orienter la molécule et affine son positionnement dans l'ARN 16S. Il a également été démontré que les nucléotides A1408 et G1494 tendent à bouger légèrement une fois le complexe formé.

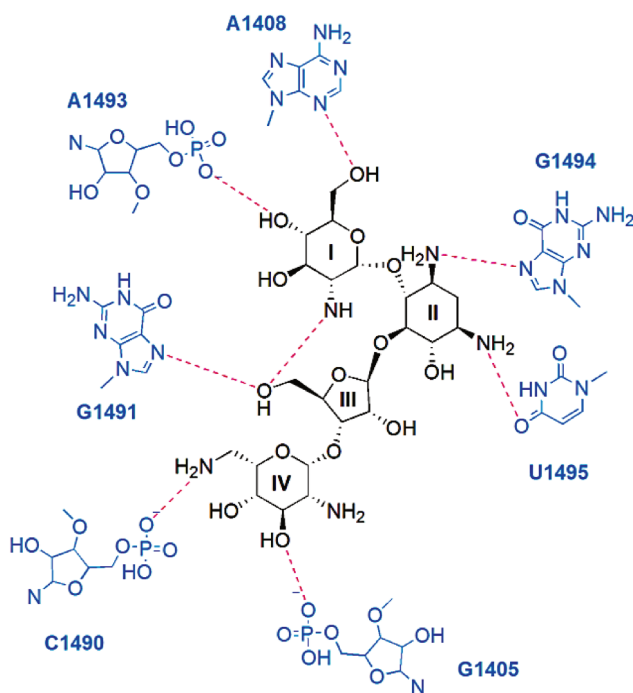


FIGURE I.16 – Interaction de la PRM avec les résidus spécifiques de la sous-unité 30S du ribosome.⁶⁴ Les interactions impliquant les molécules d'eau environnantes n'ont pas été illustrées pour plus de clarté.

c) Autres cibles des aminoglycosides

Nous avons pu le voir précédemment, la famille des aminoglycosides est principalement connue pour son activité antibiotique. Cependant, le ribosome bactérien ne constitue pas leur seule cible et il a été démontré que les aminoglycosides pouvaient être utilisés pour interagir avec des ARN viraux. Cibler spécifiquement un ARN viral en développant de petites molécules capables d'interférer avec les mécanismes lui permettant de se multiplier pourrait constituer une voie thérapeutique intéressante.³ Pour cela, la communauté scientifique s'est intéressée à des éléments de régulation virale, situés dans des régions non codantes de l'ARNm. Nous nous intéresserons ici aux éléments TAR et RRE des ARNm du VIH.

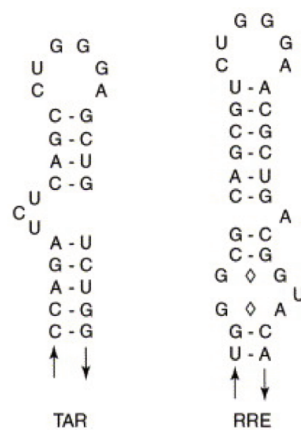


FIGURE I.17 – Les ARNm du VIH comme cibles des aminoglycosides.⁴⁰

De nombreux travaux ont montré que les aminoglycosides pouvaient interférer avec certaines étapes de la rétro-transcription du génome du VIH.⁴⁰ La protéine virale Tat joue le rôle d'activateur de la transcription du virus du VIH. Cette protéine est capable de se fixer sur un élément de séquence de l'ARNm viral, appelé TAR (pour *Transactivation Responsive Element*), long de 45 nucléotides et en forme de tige-boucle. En l'absence de l'interaction Tat-TAR, seuls de courts transcrits d'ARN non polyadénylés sont produits (figure I.18). A l'inverse, la fixation de la protéine Tat permet le recrutement de nouvelles protéines telles que la cycline T1. Cette dernière est une sous-unité de la protéine kinase TAK, et permet de jouer le rôle d'intermédiaire dans les processus d'interaction avec la machinerie cellulaire.⁶⁵ L'interaction Tat-TAR permet ainsi d'augmenter drastiquement le taux de transcription et tout l'ARN est alors produit.⁶⁶ De précédentes études se sont donc concentrées sur le développement de molécules capable d'inhiber l'interaction Tat-TAR. Tor et son équipe ont procédé au criblage d'une librairie d'aminoglycosides et ont pu mettre en évidence que la néomycine est capable d'interférer avec la formation de ce complexe avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) submicromolaire.⁶⁷

Une fois la transcription du VIH réalisée, l'ARNm doit être épissé puis transporté depuis le noyau vers le cytoplasme pour l'étape de traduction. L'exportation de l'ARNm est rendue possible par la protéine virale Rev.⁶⁸ Celle-ci agit en se fixant sur un domaine terminal en forme de tige-boucle appelé séquence RRE (pour *Rev Responsive Element*). Cette séquence est présente sur les transcrits d'ARN qui n'ont subi aucune ou qu'une seule excision-épissage. L'interaction Rev-RRE favoriserait alors le passage de tous les ARNm contenant cette séquence RRE du noyau vers le cytoplasme, aboutissant ainsi à la traduction de l'ARN en protéines

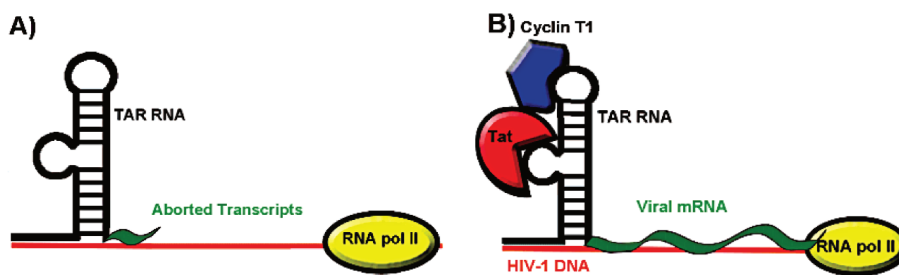


FIGURE I.18 – Interaction Tat-TAR. Tiré de.¹⁷

de structure.⁶⁸ L'inhibition de l'interaction Rev-RRE empêcherait donc la production de nouvelles protéines et bloquerait la prolifération du virus. Il a été démontré que la néomycine était capable d'inhiber *in vitro* l'interaction Rev-RRE avec un K_i (constante d'inhibition) proche du micromolaire.⁴⁸ Ces premiers résultats ont ainsi pu ouvrir un nouveau champ d'étude relatif au ciblage des interactions Rev-RRE.

A l'instar du VIH, le virus de l'hépatite C se réplique en détournant la machinerie cellulaire de son hôte. Pour cela, le virus vient directement recruter le ribosome eucaryote de manière interne à l'aide de la séquence IRES (pour *Internal Ribosome Entry Site*), située en amont de la séquence codante de l'ARN. L'interaction IRES-ribosome va alors permettre l'initiation de la traduction du génome viral. Influencer sur la formation de ce complexe constitue donc une voie thérapeutique intéressante à explorer.⁴⁰ De précédentes études menées sur le complexe IRES-ribosome ont pu mettre en évidence que l'utilisation d'une famille de ligands du type benzimidazoles était capable d'interférer avec le démarrage de la traduction de l'ARN.⁶⁹ Des lors, des analogues de la DOS ont été développés et utilisés afin d'interférer avec la formation de ce complexe en induisant un changement conformationnel de l'IRES.⁷⁰

Nous avons pu le voir tout au long de la première partie de ce chapitre, utiliser les aminoglycosides afin de développer de nouvelles voies thérapeutiques visant des structures particulières de l'ARN est une stratégie très répandue. Toutefois, ces composés sont surtout intéressants dans le cadre d'études *in vitro*, puisque leur manque de spécificité, leur structure très polaire et leur toxicité rendent leur optimisation difficile. Ils ont permis toutefois d'établir certains principes de base pour l'interaction entre des petites molécules et les ARN. La partie qui suit est dédiée à une présentation des méthodes analytiques permettant de mesurer et ainsi mieux comprendre ces phénomènes d'interactions.

III - Méthodes analytiques pour l'étude des interactions ARN/ligand: les aminoglycosides comme cas d'étude

Les études d'interaction que nous allons présenter impliquent le complexe formé par différents aminoglycosides et la structure en tige-boucle permettant de mimer le site A de l'ARNr. Pour l'étude d'un même complexe, chaque méthode repose cependant sur une approche différente. Il est donc important de mentionner que les résultats obtenus grâce à ces différentes techniques ne sont pas si facilement comparables entre eux. Les conditions expérimentales utilisées (pH, température, tampon, force ionique), le marquage ou non des molécules étudiées, l'appareillage, l'environnement d'étude (en phase homogène ou hétérogène),... constituent un

ensemble de paramètres importants qui influent sur la nature des résultats. Cette partie va donc être dédiée à une présentation critique des méthodes analytiques les plus souvent employées dans l'étude des interactions ARNr 16S/aminoglycosides. Même si nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude du fragment 16S, ces mêmes méthodes ont parfois été utilisées pour l'étude d'autres fragments d'ARN qui seront mentionnés le cas échéant. Nous aborderons le principe de fonctionnement de chaque technique et nous comparerons leurs avantages et leurs inconvénients. Cette présentation générale nous permettra enfin d'expliquer pourquoi une approche électrochimique pourrait compléter et peut-être améliorer les études précédemment menées sur ce même système.

III - 1) Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS: Mass Spectrometry) est une technique analytique permettant de déterminer la masse moléculaire de composés présents dans un échantillon. Il est ainsi possible d'identifier ces composés et même de les quantifier.⁷¹

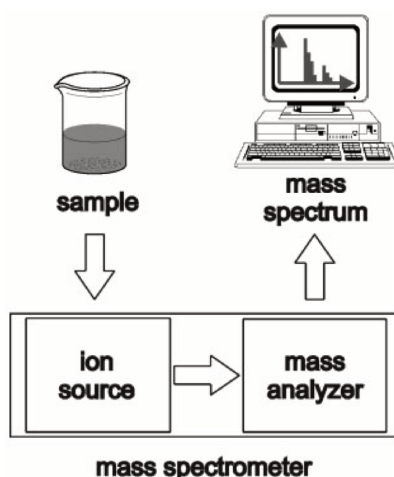


FIGURE I.19 – Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse. Tiré de *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*.⁷²

Un spectromètre de masse (figure I.19) comporte généralement quatre parties disposées en série. Chacune possède un rôle bien précis :

1. Ionisation de l'échantillon: les molécules sont introduites dans l'appareil sous forme liquide, gazeuse ou même solide et sont ensuite ionisées. Cette première étape est rendue possible par un élément de l'appareil appelé *source*. Une source d'ionisation peut être utilisée en mode positif ou négatif selon la charge de l'ion que l'on souhaite détecter. Cette étape qui implique un changement d'état est particulièrement importante pour la quantification d'une interaction.
2. Accélération des ions: une série de lentilles électroniques permet la convergence et l'accélération des ions formés à la sortie de la source.
3. Séparation: les ions précédemment formés possèdent des masses et des charges différentes. Sous l'effet d'un champ électrique et/ou magnétique, l'*analyseur de masse* est alors capable de les séparer selon leur rapport masse sur charge (m/z).

4. Détection et traitement des signaux: le *détecteur* traduit la quantité d'ions observés en un signal électrique d'intensité proportionnelle. Le détecteur amplifie le signal qui est ensuite traité informatiquement. Les résultats sont finalement représentés sous forme d'un *spectre de masse* illustrant l'abondance des ions. Ceux-ci sont classés par ordre croissant de leur rapport m/z .

Plus particulièrement ici, nous avons choisi de présenter l'ESI-MS (pour *Electrospray Ionization-Mass Spectroscopy*). Du fait de son étape d'ionisation caractéristique, cette technique de MS est communément utilisée lorsqu'il s'agit d'analyser des biomolécules (peptides, protéines, acides nucléiques...). En effet, elle présente l'avantage de pouvoir transférer l'échantillon ionisé depuis la solution jusqu'au détecteur avec une fragmentation quasi-nulle. Ceci est particulièrement intéressant lorsque l'on étudie des assemblages supra-moléculaires, en particulier avec les acides nucléiques puisqu'il est ainsi possible d'observer les pics moléculaires des formes complexées gardées intactes.⁷³ L'ESI-MS fonctionne en deux étapes (figure I.20). La première consiste à former des gouttelettes à partir de l'analyte en solution qui est injecté dans un capillaire. Pour cela, l'extrémité de ce capillaire est soumise à un champ électrique. En mode négatif, ce champ électrique entraîne la migration des ions négatifs (mode utilisé pour les acides nucléiques) et inversement en mode positif. Au bout du capillaire, des espèces chargées vont alors s'accumuler à la surface de la solution jusqu'à atteindre un point de rupture ayant pour conséquence la dispersion de la solution sous forme de gouttelettes. Au cours de la deuxième étape, les gouttelettes contenant l'analyte ionisé s'évaporent progressivement sous l'action combinée d'un gaz séchant et de la température appliquée. Leur taille diminue progressivement jusqu'à exploser. Les ions contenus dans ces gouttelettes sont ainsi totalement désolvatés et se retrouvent en phase gazeuse. Ces derniers sont alors détectés par le spectromètre de masse en fonction de leur rapport m/z .⁷⁴

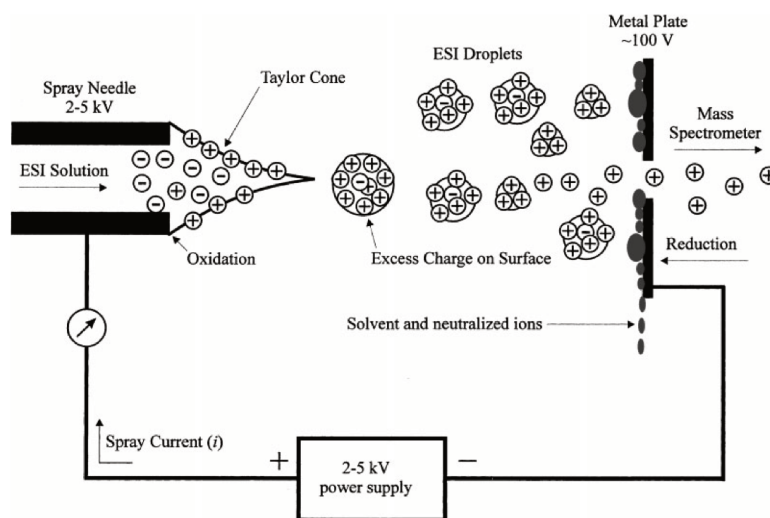


FIGURE I.20 – Schéma du principe d'ionisation par nébulisation. Figure extraite de Cech *et al.*⁷⁵

Sannes-Lowery *et al.*⁷⁶ ont mesuré l'affinité de la paromomycine pour l'ARNr 16S27 en réalisant des expériences de dosage par ESI-MS (figure I.21). Ces expériences de dosage ont été réalisées en additionnant des quantités croissantes de paromomycine (de 10 à 200 nM) à 50 nM d'ARN 16S dans un mélange 150 mM $\text{NH}_4\text{OAc}/50\%$ isopropanol. Une valeur de K_D égale à $52\text{ nM} \pm 4\text{ nM}$ a été déterminée pour la forma-

tion quasi-majoritaire d'un complexe équimolaire ARN 16S27/PRM. Le spectre ESI-MS illustré sur la figure I.21-A montre bien la distinction entre la forme libre de l'ARN 16S27 et la forme liée à la PRM (abrégée PM). Egalement, un complexe 1:2 (légendé par une flèche sur la même figure) n'a été détecté qu'à l'état de traces confirmant bien la forme majoritaire 1:1 déjà mentionnée dans la littérature par d'autres méthodes analytiques. Certains points restent toutefois à préciser concernant cette étude. Les acides nucléiques ne sont pas si facilement analysables en ESI-MS. Ceci est dû aux interactions électrostatiques se déroulant entre les groupements phosphate des acides nucléiques et des cations métalliques tels que Na^+ ou K^+ . La présence de ces espèces cationiques est alors à prendre en compte lors de la détermination de la masse moléculaire d'une espèce et peut réduire la précision de cette mesure. Une façon courante pour contourner ce problème est l'addition d'ammonium dans l'échantillon dans le but de substituer ces cations métalliques lors de la fixation avec les groupements phosphodiester. L'ammonium sera ensuite relargué sans l'oligonucléotide sous forme d'ammoniac gazeux au moment de l'étape de nébulisation. C'est précisément ce qui a été réalisé dans l'exemple cité ici. Ces mesures par ESI-MS ont préalablement nécessité la désolvatation de ces espèces cationiques puis l'addition de NH_4OAc . L'absence de cations métalliques peut donc nous pousser à nous questionner sur la bonne pré-organisation de l'ARN et donc sur la précision de ces analyses quantitatives d'interaction avec les aminoglycosides.

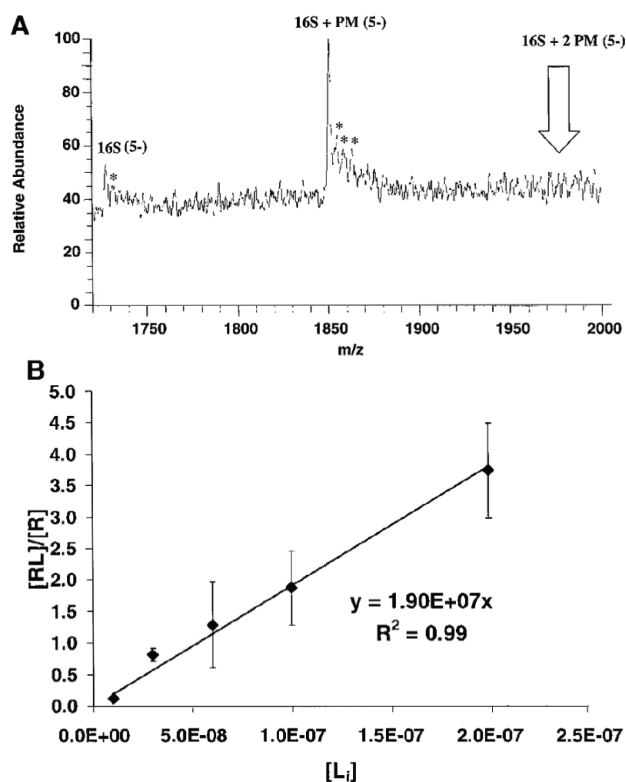


FIGURE I.21 – A) Spectre ESI-MS obtenu lors du dosage de l'ARNr 16S par la PRM. B) Détermination du K_D par régression linéaire des données obtenues lors de la titration de l'ARN 16S par la PRM. Figure extraite de.⁷⁶

Griffey *et al.* ont également utilisé l'ESI-MS pour étudier ce système mais cette fois, par une approche qui s'apparente à une stratégie de criblage.^{77,78} Une solution d'ARN à 5 μM a été analysée par ESI-MS en présence de six aminoglycosides différents, chacun à une concentration de 0.5 μM sur l'exemple de spectre

III - . MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ARN/LIGAND: LES AMINOGLYCOSIDES COMME CAS D'ÉTUDE

illustré en figure I.22. La solution d'ARN ici utilisée correspondait à un mélange équimolaire de deux types d'ARN longs de 27 bases: un ARN 16S et un ARN 18S, ce dernier étant marqué par une chaîne polyéthylène à son extrémité 5' afin de séparer son signal de celui de l'ARN 16S sur le spectre de masse. Cette expérience de dosage simultanée et en parallèle a été répétée pour un même mélange d'aminoglycosides en proportions égales mais à différentes concentrations. Chaque aminoglycoside étant présent en proportion égale dans cette solution, les expériences de dosage ont été répétées en faisant varier la concentration de ce mélange de 0 à 0.6 μM dans une solution à pH 7 contenant 50 mM NH_4OAc /10 % isopropanol. Par comparaison des abondances relatives de chaque espèce ionique et par régression linéaire de ces points expérimentaux les K_D (constante de dissociation) de chaque aminoglycoside ont ainsi pu être déterminés (figure I.22-B). Dans ces conditions de pH et de tampon, la PRM possède donc un K_D égal à 110 ± 2 nM.⁷⁷ Contrairement à l'exemple cité précédemment, les mesures n'ont pas été réalisées dans les mêmes gammes de concentrations et la solution d'échantillon est moins concentrée en sels. Avec une même technique, les valeurs de K_D déterminées d'une étude à l'autre diffèrent du simple au double, signe que chaque valeur de K_D est "unique" car liée aux conditions expérimentales.

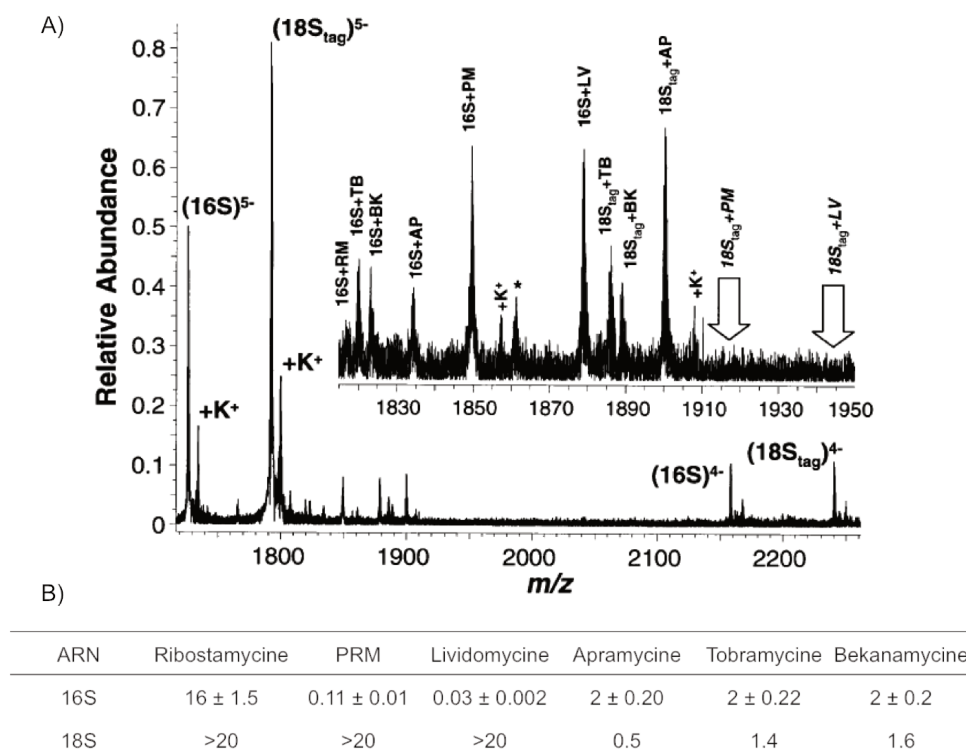


FIGURE I.22 – A) Spectre ESI-MS obtenu lors du dosage des ARN 16S et 18S en présence de six aminoglycosides. AP: apramycine, RM: ribostamycine, TB: tobramycine, BK: kanamycine B, PM: paromomcyine, LV: lividomycine. La région du spectre correspondant à m/z entre 1820 et 1950 a été agrandie. B) K_D (en μM) obtenus pour chacun des aminoglycosides. Figure extraite de.⁷⁷

Nous avons choisi de nous focaliser sur l'ESI-MS car elle est bien adaptée à l'étude des acides nucléiques mais il existe d'autres approches de spectrométrie de masse. Une autre méthode plus destructive, la dissociation induite par collision, peut également être utilisée. Par fragmentation du complexe ARN/ligand formé, il est alors possible d'identifier le site de fixation de petites molécules sur l'ARN.^{77,78} L'étude des complexes ARNr

16S/aminoglycosides a ici été mentionnée à titre d'exemple mais d'autres séquences d'ARN ont été analysées par cette méthode, telles que la séquence TAR (pour *Transactivation Responsive Element*) de l'ARN du VIH-1. Nous l'avons mentionné, la séquence TAR est une tige-boucle comportant un bulge interne située près de l'extrémité 5' du transcrit du VIH et possède deux sites de liaison. L'un pour une protéine Tat et l'autre pour une protéine cellulaire appelée cycline T.⁷⁹ La fixation de la protéine Tat à la séquence TAR augmente de façon importante le taux de transcription de l'ARN viral. Perturber cette interaction, notamment par l'usage des aminoglycosides, est une approche antivirale intéressante pour cibler le VIH. Les phénomènes de reconnaissance avec la néomycine ont été étudiés par ESI-MS en présence soit, de la séquence TAR seule, soit du complexe Tat-TAR. Il a été démontré que trois sites séquentiels capables de fixer la néomycine étaient présents sur la séquence TAR alors que seulement deux sites étaient présents dans le cas du complexe tat-TAR pré-formé.⁸⁰

L'ESI-MS permet de déterminer en phase gazeuse l'affinité d'un ligand pour sa cible ARN et la stoechiométrie de formation de ce complexe en suivant les modifications de poids moléculaire.⁸¹ Contrairement aux autres techniques de MS, l'ESI-MS est considérée comme étant une technique douce puisque l'ionisation des molécules se déroule sous pression atmosphérique et à température ambiante ce qui permet aux échantillons de ne pas être fragmentés. Elle permet l'analyse de molécules pouvant aller jusqu'à 500 kDa et nécessite généralement de faibles quantités d'échantillon. Moins de 50 μ L d'une solution d'acide nucléique à 1-10 μ M sont suffisants. L'ESI-MS permet une analyse rapide, automatisable et est considérée comme une méthode très sensible puisqu'elle possède une limite de détection de l'ordre de la picomole.⁸²

A l'inverse, un inconvénient majeur est son équipement coûteux et la nécessité de faire appel à un expérimentateur qualifié. Ceci limite son utilisation en routine et la rend peu adaptée à une utilisation pour des expériences de criblage. Plus important encore, l'ESI-MS ne permet pas l'utilisation de solutions apolaires ni de solutions contenant de fortes concentrations en sels.⁷¹ Pour l'ESI-MS, la nature des espèces présentes dans l'échantillon joue un rôle déterminant dans la sensibilité et la précision des mesures. Généralement, les ARN nécessitent d'être solubilisés dans des solutions tampon contenant des cations métalliques afin d'empêcher les phénomènes de répulsion entre les groupements phosphate et ainsi stabiliser leur structure secondaire ou tertiaire. Comme mentionné précédemment, une analyse par ESI-MS peut donc être influencée par la présence de ces cations. Ils peuvent en effet influencer sur l'abondance relative de l'échantillon, lui aussi, sous forme ionisée. La formation de potentiels adduits peut également interférer avec la détection des molécules d'intérêt. Cela complique la détermination et la précision de la masse moléculaire si certains adduits ne sont pas séparés des ions de la molécule protonée. L'ESI-MS est donc une technique puissante en terme de détection mais n'est pas la méthode de choix pour effectuer des mesures quantitatives impliquant les acides nucléiques. De plus, l'utilisation de cette méthode nécessite de mélanger la solution d'échantillon à un solvant organique (Acétonitrile, Méthanol ou Isopropanol le plus souvent), pouvant rendre les résultats peu représentatifs des conditions physiologiques.

III - 2) Résonance plasmonique de surface

La technique SPR (*Surface Plasmon Resonance* en anglais) est une autre méthode de mesure permettant de détecter et de suivre en temps réel les interactions entre des biomolécules et leur ligands. Elle est souvent utilisée pour étudier les phénomènes de reconnaissance impliquant des protéines, des polysaccharides, des lipides ou des acides nucléiques. Au cours d'une expérience SPR, le récepteur se trouve immobilisé sur une surface métallique: le *sensor chip* (pour biocapteur). Une solution tampon contenant le *ligand* est alors apportée en flux continu à la surface du capteur au moyen d'un dispositif de microfluidique. Comme indiqué en figure I.23 le capteur est constitué de plusieurs éléments:

1. La base est constituée d'un support en verre.
2. Celui-ci est surmonté d'une fine couche métallique, généralement faite d'or.
3. Les éléments précédents sont finalement recouverts d'un substrat permettant le greffage spécifique du récepteur à la surface du capteur. Il est possible d'utiliser différentes surfaces (Dextran, chaînes aliphatiques C18, streptavidine...) selon la nature du récepteur à immobiliser.

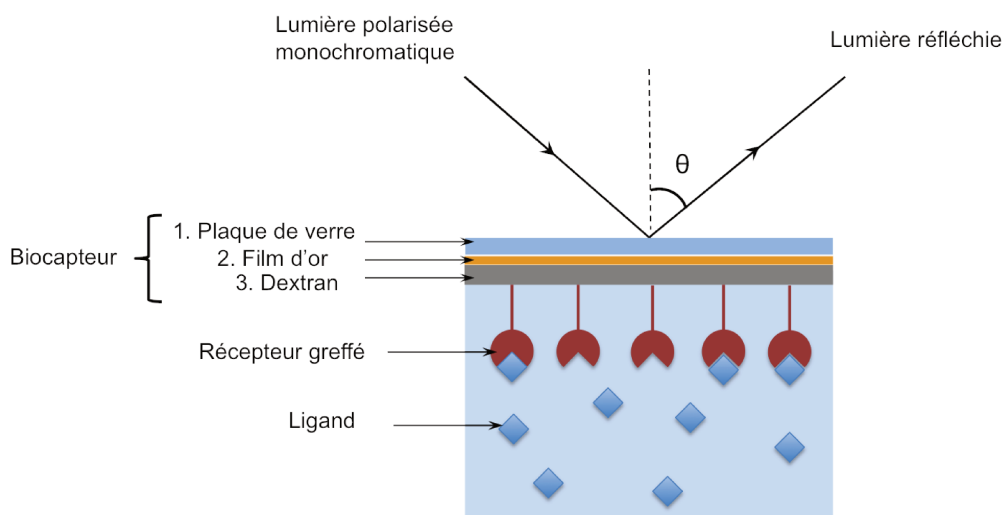


FIGURE I.23 – Principe de la SPR.⁸³

En SPR, la détection des interactions entre biomolécules repose sur le principe suivant: un rayon monochromatique va venir irradier la surface du biocapteur qui sépare deux milieux d'indice de réfraction différents. Selon son angle d'incidence, le faisceau peut évoluer de deux façons. Dans un premier cas, il peut être totalement réfléchi. Dans l'autre, une partie du rayon incident est réfléchi tandis que l'autre est réfractée. Ce deuxième cas de figure, plus fréquent, est celui qui nous intéresse dans le cadre de la SPR. En effet, lorsque les photons du rayon incident entrent en résonance avec les électrons libres situés à la surface du métal conducteur, des ondes évanescentes se forment à l'interface entre le métal et le diélectrique. Ce phénomène d'oscillation porte le nom de résonance de plasmons de surface.⁸⁴ Or, la propagation de cette onde est modifiée par toute perturbation se produisant à l'interface où elle est formée. Lorsque des phénomènes d'association ou de dissociation se produisent au niveau de cette interface, l'indice de réfraction au voisinage de la surface est modifié et va perturber l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude. Ceci va alors se

traduire par un changement de l'angle de résonance (angle θ sur la figure I.23). L'enregistrement de la variation de cet angle de résonance en fonction du temps permet de suivre en temps réel la fixation des molécules injectées sur le biocapteur. Les phénomènes d'interaction sont représentés sur un *sensorgramme* où le signal de résonance est exprimé en unités de résonance (RU) en fonction du temps. La différence entre la valeur de RU obtenue en fin de mesure avec la valeur de RU mesurée avant injection (désignée par RU_{antibody} sur l'exemple de la figure I.24) permet d'obtenir la quantité de molécule immobilisée. Une variation de 1000 RU correspond à une déviation de l'angle de résonance de 0.1 degré, ainsi qu'à une fixation de 1 ng de protéine ou 0.8 ng d'acide nucléique par mm^2 de surface.⁸⁵

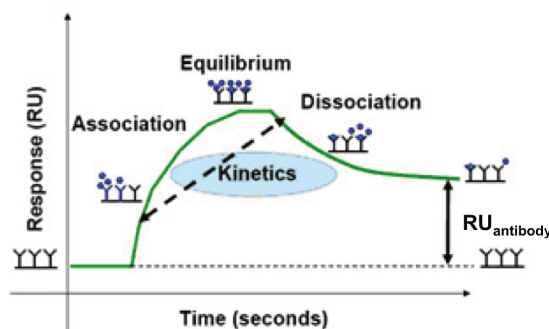


FIGURE I.24 – Exemple de sensorgramme obtenu pour une reconnaissance antigène/anticorps. Source: www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/proteon-surface-plasmon-resonance-detection-system#1

L'accumulation de l'analyte en surface au cours du temps permet de mesurer en temps réel les phénomènes de reconnaissance et leur cinétique, sans avoir recours à un marquage des molécules. La SPR donne accès à des informations cinétiques et thermodynamiques telles que: la constante cinétique d'association (k_{on}), la constante cinétique de dissociation (k_{off}), l'affinité (K_D) ainsi que la concentration en molécules fonctionnelles.

Pour l'étude des complexes ARN 16S/aminoglycosides, une méthode souvent employée est l'utilisation d'un ARN biotinyllé à l'une de ses extrémités.⁸⁶ En utilisant un sensor chip recouvert de streptavidine, l'ARN est immobilisé grâce à une interaction biotine/streptavidine. Avec cette méthode, plusieurs molécules de la famille des aminoglycosides ont été caractérisées dont la paromomycine, la néomycine et la néamine.^{87,88} La formation d'un complexe 1:1 entre l'ARN 16S et la paromomycine a été observée par SPR dans un tampon 10 mM HEPES pH 7.4, contenant 150 mM NaCl et 3 mM EDTA. Dans ces conditions, un K_D de 0.2 μM a pu être déterminé pour la paromomycine. De la même façon, les K_D de la néamine et de la néomycine ont été mesurés autour d'une valeur de 7.8 μM et 19 nM respectivement. Ces expériences de dosage ont été réalisées en présence d'une solution à 0.1 μM d'ARN 16S biotinyllé, et en faisant varier la concentration en aminoglycoside de 0.01 à 100 μM .

D'autres séquences d'ARN ont également été étudiées par SPR, telles que le site RRE (pour *Rev Responsive Element*), présent dans l'ARNm du virus du VIH de type 1.⁴⁸ Nous l'avons déjà mentionné dans la partie II-c) de ce chapitre, ce site RRE est normalement dédié à la reconnaissance de la protéine Rev qui, s'y fixant, permet à l'ARNm viral d'être exporté depuis le noyau vers le cytoplasme permettant ainsi la synthèse de protéines structurales du virus.⁷⁹ Toute interruption de l'interaction Rev-RRE compromet alors la réplication du

virus du VIH. Les aminoglycosides ayant également la capacité de reconnaître la séquence RRE, leur fonction antivirale a été largement étudiée. Hendrix et son équipe ont ainsi pu observer par SPR la présence de trois sites de fixation de la néomycine sur une séquence d'ARN comportant le site RRE, chaque site possédant une affinité submicromolaire ($K_D \approx 200$ nM). La PRM a elle aussi été étudiée, et son affinité a été déterminée comme étant 15 fois inférieure ($K_D \approx 3$ mM) à celle de la néomycine.⁴⁸

La SPR est une méthode rapide et automatisable qui donne accès en temps réel à des données thermodynamiques et cinétiques. Il est possible de détecter des constantes cinétiques comprises entre $10^3 < k_{on} < 10^6$ M⁻¹.s⁻¹ pour les phénomènes d'association et $10^{-5} < k_{off} < 10^{-1}$ s⁻¹ pour les phénomènes de dissociation.⁸⁵ Également, cette méthode est souvent utilisée dans des stratégies de criblage où les phénomènes de reconnaissance de chaque molécule pour une même cible sont comparées. C'est une technique qui nécessite de faibles quantités d'échantillon immobilisé⁸⁶ (nanomoles) ce qui est un avantage majeur dans l'analyse de molécules telles que les acides nucléiques.

Cette technique présente malgré tout plusieurs inconvénients. Elle n'est pas adaptée aux molécules de petites taille (< 1000 g/mol) car elles génèrent de trop faibles variations de signal. Un autre paramètre important lors d'une analyse par SPR est le RII (*Refractive Index Increment*) qui correspond à la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration d'un échantillon à une température, une longueur d'onde et un type de solvant donnés. Les valeurs de RII ne sont généralement pas corrigées lorsqu'il s'agit de la formation d'un complexe équimolaire entre deux molécules de même nature (ex: protéine-protéine). Cependant, il devient nécessaire d'appliquer un facteur de correction à ces RII dès lors que l'on étudie deux partenaires moléculaires de nature différente et dont la stœchiométrie de formation du complexe est inconnue ou supérieure à 1.⁸⁹ En SPR, un traitement rigoureux de ces valeurs de RII est donc nécessaire pour la fiabilité des études quantitatives. Il est également important de rappeler que la SPR est une technique mesurant les interactions moléculaires au voisinage d'une interface, et qu'elle nécessite donc d'immobiliser une molécule sur une surface. Cela nécessite de prendre en compte la position à fonctionnaliser sur le récepteur afin de ne pas interférer dans les phénomènes de reconnaissance.⁹⁰ Également, la nature et la longueur du bras espaceur permettant le greffage est un autre facteur à prendre en considération. Une fois le récepteur immobilisé, celui-ci doit conserver une mobilité et une flexibilité suffisante pour permettre l'interaction avec son ligand. Enfin, il est important de souligner que les valeurs de K_D obtenues par cette méthode sont représentatives de phénomènes se produisant en phase hétérogène et ne sont pas si facilement comparables à celles déterminées en solution.

III - 3) Spectroscopie de fluorescence

La spectroscopie de fluorescence est une technique courante en chimie analytique lorsqu'il s'agit d'étudier des interactions. Son principe repose sur l'excitation d'une molécule à une longueur d'onde donnée. En absorbant ces photons, cette molécule va alors passer dans un état électroniquement excité.⁹¹ Cet état étant instable, la molécule va restituer son excédent énergétique sous forme d'un rayonnement lumineux de plus faible énergie appelé "fluorescence" et va ainsi revenir à son état fondamental (figure I.25). Plusieurs méthodes de spectroscopie de fluorescence permettent d'étudier la reconnaissance entre un ARN et son ligand.

Nous nous focaliserons surtout sur les méthodologies faisant intervenir le quenching de fluorescence et la polarisation de fluorescence.

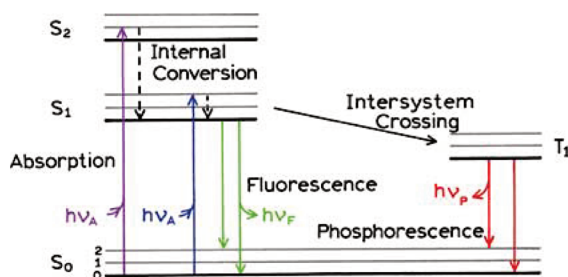


FIGURE I.25 – Diagramme de Jablonski illustrant la désexcitation moléculaire sous forme de fluorescence ou de phosphorescence. Tiré de⁹²

La polarisation de fluorescence (figure I.26) consiste à exciter une molécule avec une lumière polarisée linéairement. Après excitation, on remarque que dans certains cas la fluorescence qui en résulte est également polarisée dans la direction du dipôle d'émission de la molécule. Dans ce type d'expérience, on se repose sur une grandeur appelée, *polarisation de fluorescence*. Cette valeur notée r est synonyme des degrés de liberté d'une molécule fluorescente. En d'autres termes, cela illustre la facilité avec laquelle le fluorophore tourne sur lui-même. Dans une expérience de polarisation de fluorescence, on cherche à observer si une molécule voit ses degrés de liberté modifiés. Si c'est le cas, alors une variation de polarisation de fluorescence traduira un changement d'environnement moléculaire. De façon générale, il faut savoir que la polarisation de fluorescence:

- augmente si le poids moléculaire augmente
- augmente si la viscosité du solvant augmente
- diminue si le temps de vie à l'état excité augmente

Les mesures de polarisation de fluorescence peuvent donc fournir des informations sur la mobilité, la taille, la forme et la flexibilité des molécules. Cette méthode est souvent employée pour l'étude des interactions entre les acides nucléiques et de petites molécules.^{93,94} Pour l'étude des interactions ARNr 16S/aminoglycosides, deux stratégies peuvent être employées. Le fluorophore peut être soit sur l'ARN,⁹⁵ soit sur le ligand.^{96,97}

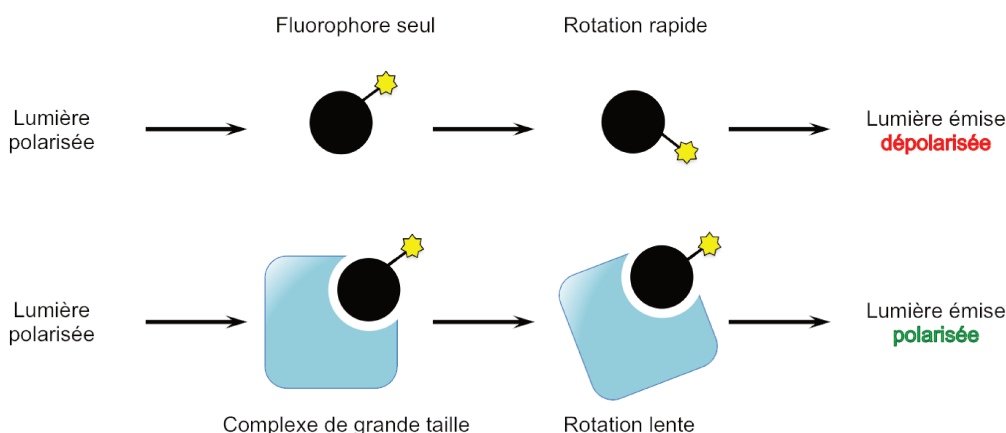


FIGURE I.26 – Schéma illustrant le principe de la polarisation de fluorescence. Adapté de *Technical Resource Guide Fluorescence Polarization Fourth Edition*, disponible sur <https://tools.thermofisher.com/downloads/FP1.pdf>

L'équipe de Rando a déjà utilisé la polarisation de fluorescence pour étudier la reconnaissance entre l'ARNr 16S et les aminoglycosides.^{97,98} Ce mime du site A de l'ARNr a été mis en présence d'un analogue fluorescent de la paromomycine, fonctionnalisé par une 5-carboxytetramethylrhodamine (appelée CRP, cf. figure I.27) au niveau de son amine primaire.

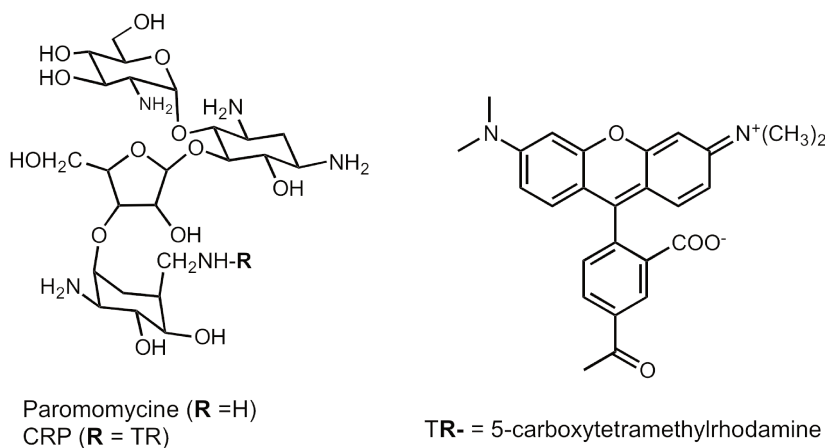


FIGURE I.27 – La CRP, sonde fluorescente utilisée dans l'étude de Rando⁹⁷ par polarisation de fluorescence.

Une fois ce fluorophore mis en présence de l'ARN, une augmentation de la polarisation de fluorescence a pu être observée. Cette augmentation est synonyme d'un changement dans la liberté de rotation du fluorophore entraînant une déviation du rayonnement fluorescent émis. La réponse fluorescente enregistrée est donc synonyme de la formation du complexe ARNr 16S/aminoglycoside. A partir des expériences de titrage en phase homogène de la CRP (10 nM) par l'ARNr 16S (additions de 0 à 500 nM), le K_D de cette sonde a été déterminé à 165 nM. Des expériences de compétition ont ensuite été menées dans les mêmes conditions réactionnelles que les mesures de K_D ($\lambda_{excitation} = 550$ nm, $\lambda_{émission} = 580$ nm, tampon 20 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$). Par addition d'aminoglycosides non marqués sur le complexe ARNr 16S/CRP pré-formé (300 nM d'ARN pour 10 nM de sonde), ils ont pu observer une diminution de la polarisation de fluorescence. La CRP est déplacée de son site de fixation sur l'ARN et remplacée par la molécule compétitrice. Plusieurs aminoglycosides ont été testés par cette méthode, dont la néomycine et la paromomycine. Par une régression non-linéaire des points expérimentaux faisant appel à un modèle 1:1 de complexation, des K_D de 132 nM et 1.85 μM ont été respectivement déterminés.

La même approche a été utilisée, mais cette fois par détection de l'extinction (ou *quenching*) de la fluorescence.⁹⁶ Pour cela, une série d'analogues de la paromomycine fonctionnalisés à l'aide de dérivés du pyrène ont été développés (figure I.28). Ils ont tout d'abord été utilisés dans des expériences de dosage en présence du 27-mer d'ARN afin de déterminer leur K_D respectifs. Les mesures de fluorescence ont été réalisées dans les conditions suivantes $\lambda_{excitation} = 340$ nm, $\lambda_{émission} = 380$ nm, tampon 20 mM HEPES pH 7.5, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$. Ces molécules ont ensuite joué le rôle de sondes rapportrices dans des expériences de compétition avec la paromomycine non marquée. L'addition de 2 mM de paromomycine sur un complexe fluorophore (10 nM)/ ARNr 16S (1 μM) a permis de déterminer un K_D de la paromomycine autour de 2 μM et ce, quelque que soit le dérivé pyrène utilisé. Ces interactions compétitives ont ensuite été mesurées avec d'autres aminoglycosides, testés en parallèle sur plaque de 96 puits avec pour objectif de

classer ces molécules selon le pourcentage de rétablissement de la fluorescence dès l'ajout du compétiteur. Une fois encore, la néomycine a été identifiée comme étant l'aminoglycoside ayant la meilleure affinité pour l'ARNr 16S parmi tous ceux testés puisqu'elle a permis de regagner 60 % de la fluorescence initiale. Notons cependant que cette méthode ne permet pas de différencier significativement les autres aminoglycosides les uns des autres. En effet, la paromomycine, la gentamycine C, la kanamycine B et la tobramycine ont rétabli la fluorescence à hauteur de 30 % environ.

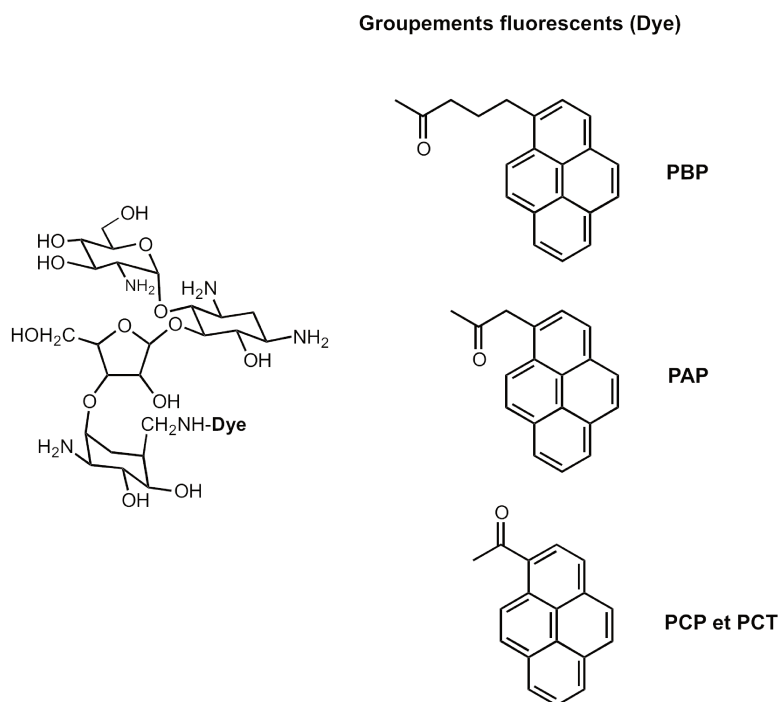


FIGURE I.28 – Paromomycine fonctionnalisée avec différents dérivés du pyrène, utilisés par Hamasaki et Rando.⁹⁶

Notons que la sonde pyrène-PRM possède un K_D environ 8 fois inférieur à celle de la PRM non marquée. De par sa structure plane polyaromatique, le pyrène est capable de s'intercaler entre les bases de l'ARN. Les interactions de type π -stacking avec les bases nucléotidiques sont responsables de cette meilleure affinité pour l'ARN.⁹⁹ Une grande quantité de PRM a donc dû être utilisée pour déplacer l'équilibre vers la forme non complexée du fluorophore. Ce résultat illustre les éventuelles difficultés que l'on peut rencontrer avec le marquage du ligand, lequel ne doit pas trop perturber les propriétés de reconnaissance entre molécules. Un effort constant doit être fait sur l'utilisation d'un marquage conservant les propriétés structurales et fonctionnelles des molécules natives. Cette sonde fluorescente au pyrène en est un parfait exemple.

Plutôt que de marquer le ligand, une autre stratégie consiste à marquer l'ARN avec un fluorophore. Les équipes de Pilch⁶⁰ et Hermann⁹⁵ ont publié des travaux dans lesquels l'adénine 1492 de l'ARN 16S est substituée par un isomère fluorescent. L'adénine modifiée, appelée 2-aminopurine (2-AP), voit sa fonction amine maintenant portée par le carbone en position 2 (figure I.29). Ces deux exemples d'étude ont principalement fourni des informations structurales sur les changements conformationnels liés à la reconnaissance entre l'ARNr 16S et la paromomycine mais ne mentionnent pas la détermination directe de K_D par fluorescence.

III - . MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ARN/LIGAND: LES AMINOGLYCOSIDES COMME CAS D'ÉTUDE

Les résultats font essentiellement allusion à la formation d'un complexe entre l'ARN portant la 2-AP et la paromomycine. L'interaction entre cet ARN fluorescent et son ligand paromomycine a entraîné une exaltation de la fluorescence due à l'expulsion physique de la 2-AP en dehors du bulge. Étant davantage exposée au solvant, la désactivation par émission de fluorescence est donc réduite puisque la 2-AP n'est plus capable d'interagir avec les autres nucléotides du bulge. À l'inverse, en absence d'aminoglycoside, aucun changement conformationnel ne se produit et la fluorescence de l'ARN 2-AP reste stable. Shandrick et son équipe⁹⁵ ont réalisé leurs expériences de fluorescence dans les conditions réactionnelles suivantes: $\lambda_{\text{excitation}} = 310 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 370 \text{ nm}$ dans un tampon 30 mM cacodylate pH 6.8. Le second exemple que nous avons cité a été réalisé par l'équipe de Pilch⁶⁰ où les mesures par fluorescence ont été réalisées à $\lambda_{\text{excitation}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 370 \text{ nm}$ et dans un tampon 10 mM cacodylate pH 5.5 en présence de 0.1 mM EDTA et 60 mM NaCl. Même si aucune valeur de K_D n'a été déterminée par cette approche, les deux exemples mentionnés ont confirmé les informations structurales déjà acquises par d'autres méthodes telles que la RMN⁶² (abordé en partie III - 5). L'analyse par fluorescence a permis de confirmer le rôle clé de l'A1492 dans la reconnaissance avec les aminoglycosides.

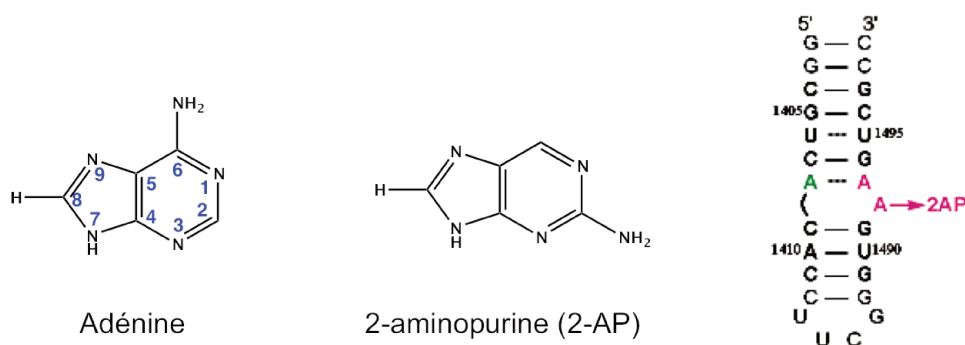


FIGURE I.29 – ARN 16S27 modifié par une 2-AP en position 1492.

Les phénomènes de reconnaissance entre les aminoglycosides et la séquence RRE du VIH ont également fait l'objet d'une étude par polarisation de fluorescence.⁹⁸ Comme précédemment mentionné, les aminoglycosides sont aussi capables de se fixer au niveau de la séquence RRE de l'ARNm du VIH et d'ainsi empêcher la fixation de la protéine Rev. En se fixant de cette façon, les aminoglycosides entraînent l'interruption de la transcription du virus du VIH. Dans cette étude, la sonde fluorescente utilisée est un analogue de la protéine Rev, fonctionnalisée par une fluorescéine à son extrémité N-ter grâce à une liaison peptidique. Comme indiqué sur la figure I.30, la séquence d'ARN RRE correspond à une tige-boucle contenant un bulge central et sur lequel la protéine Rev vient se fixer. Dans cette étude, un court peptide de 16 acides aminés capable de se lier à RRE a été utilisé. De même, son analogue fluorescent, appelé FI-REV₃₄₋₅₀ a été synthétisé et utilisé comme sonde rapportrice. Par des études de compétition réalisées dans les mêmes conditions⁹⁶ que pour l'ARNr 16S (mentionnées précédemment en page 39), la néomycine et la tobramycine reconnaissent la séquence RRE du VIH avec des K_D de $1.18 \pm 0.24 \mu\text{M}$ et $2.29 \pm 0.12 \mu\text{M}$ respectivement.

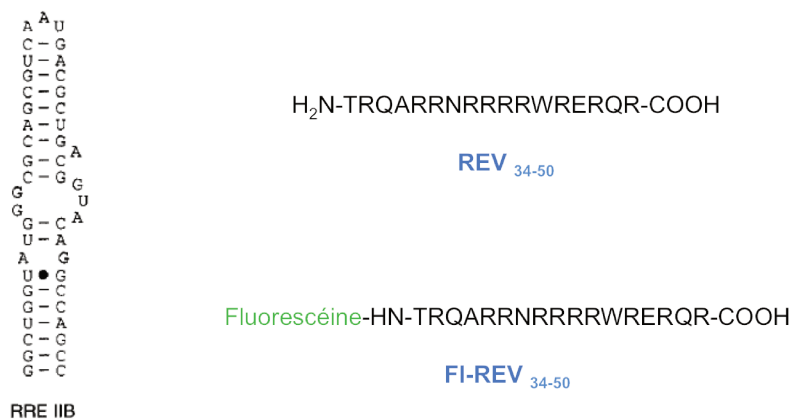


FIGURE I.30 – Structures de la séquence RRE, du peptide Rev et de son analogue fluorescent utilisés dans l'étude de Rando.⁹⁸

Nous l'avons vu, l'utilisation de cette technique analytique nécessite le marquage de l'une des deux molécules par un fluorophore. Les modifications apportées ne doivent pas perturber leur intégrité structurale ni influencer les phénomènes de reconnaissance entre molécules. Ceci est d'autant plus important lorsque l'on travaille avec des ARN qui peuvent être difficiles à fonctionnaliser et fragiles à manipuler. Quelques subtilités sont également à prendre en compte afin de garantir la fiabilité des mesures car il est parfois possible d'observer des artefacts comme des phénomènes de *photo-bleaching*. De plus, les mesures de fluorescence sont très sensibles à l'environnement (température, pH, nature du solvant, concentration en échantillon). Le choix de cette technique doit également se faire en adéquation avec la durée de vie de la fluorescence émise (4 ns est suffisant pour des molécules de petites tailles < 10 kDa mais insuffisant pour des molécules > 30 kDa).¹⁰⁰ Indépendamment de ces quelques inconvénients, la fluorescence est une technique relativement facile et rapide à utiliser. Elle a permis de déduire des informations structurales mais aussi de quantifier les interactions entre l'ARNr 16S et les aminoglycosides. La spectrométrie de fluorescence possède également une excellente sensibilité conduisant à des limites de détection 100 à 1000 fois meilleure que la spectrophotométrie UV-visible d'absorption (de l'ordre du picomolaire⁹¹).

III - 4) Titration calorimétrique isotherme

La titration calorimétrique isotherme (ou ITC pour *Isothermal Titration Calorimetry*) est une technique analytique elle aussi dédiée à l'étude des interactions moléculaires. Elle constitue la seule technique permettant un accès direct à la mesure de la constante d'association en solution, sans avoir besoin de marquer les molécules. Elle permet de détecter des affinités pouvant aller jusqu'au nanomolaire.

Son principe repose sur la mesure de la différence de chaleur provenant de l'interaction entre deux molécules. Toute interaction est généralement liée à un échange de chaleur. Au cours de l'interaction, l'énergie thermique est soit dégagée vers le milieu extérieur (elle est alors définie comme étant exothermique), soit absorbée depuis le milieu extérieur (elle est alors dite endothermique).¹⁰¹ L'ITC permet la mesure de ces variations de chaleur et fournit, en une seule expérience, le profil thermodynamique complet de cette transformation (enthalpie ΔH , entropie ΔS , constante d'association K_A et stœchiométrie). Cette technique est utilisée dans de nombreux cas. Le plus courant est l'étude des interactions biomoléculaires (par exemple entre pro-

III - . MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ARN/LIGAND: LES AMINOGLYCOSIDES COMME CAS D'ÉTUDE

téines, entre protéine/ligand, entre protéine/acide nucléique, ou même entre polysaccharides¹⁰²), mais peut également être employée dans des études cinétiques.¹⁰³ Afin d'effectuer ces mesures, un *microcalorimètre* est utilisé. Il est constitué d'une cellule de référence (maintenue à température constante) et d'une cellule de mesure, toutes deux entourées d'un caisson adiabatique (figure I.31). La cellule de mesure contient généralement le récepteur en solution. Le ligand y est injecté progressivement (l'inverse est également possible) afin de réaliser des expériences de titrage dans des conditions de température et d'agitation constantes. Chaque addition de ligand dans la cellule de mesure entraîne une perturbation de la chaleur, jusqu'à ce qu'elle soit stable, en raison de l'interaction entre le ligand et la biomolécule. Les signaux enregistrés correspondent donc à la puissance calorifique fournie par le microcalorimètre pour revenir à la différence de chaleur initiale séparant les deux cellules de l'appareil. Il est alors nécessaire d'intégrer cette puissance calorifique pour obtenir la variation d'enthalpie liée à l'interaction entre les deux molécules. En fin de dosage, le récepteur est saturé et aucune variation d'enthalpie due à l'interaction n'est alors observable. Seule l'énergie de dilution est alors mesurée.

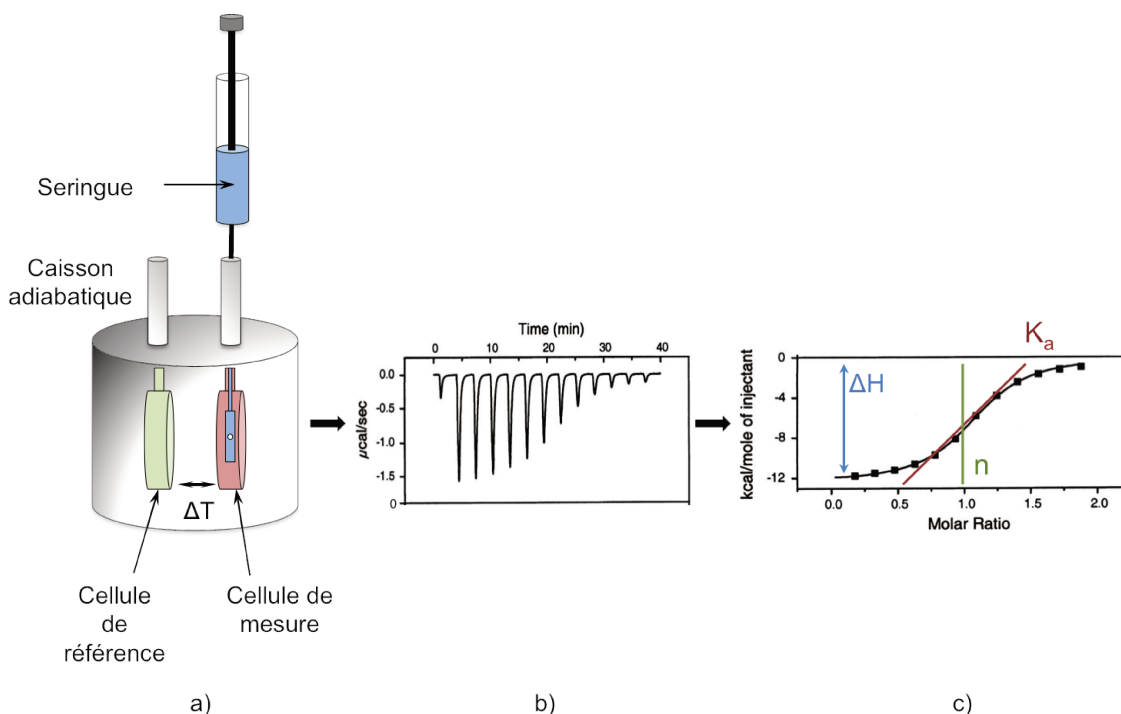


FIGURE I.31 – a) Schéma d'un microcalorimètre. b) Exemple de profil ITC. c) Données thermodynamiques obtenues à partir d'un profil ITC. Adapté de¹⁰⁴

La figure I.31 illustre un exemple de mesure ITC où l'anhydrase carbonique II est titrée par le 4-carboxybenzenesulfonamide.¹⁰⁴ Les pics négatifs obtenus sont synonymes d'une interaction entre le ligand et sa cible ($\Delta H < 0$). Ces pics sont intégrés pour obtenir la quantité de chaleur dégagée à chaque ajout du ligand dans la solution contenant la biomolécule. Depuis un profil ITC, la pente de la courbe d'intégration des pics nous permet d'obtenir la valeur de la constante d'association (K_A) (que l'on traduit ensuite en constante de dissociation K_D puisque $K_D = \frac{1}{K_A}$). On obtient également la variation globale d'enthalpie de l'interaction par la différence entre les deux plateaux de la courbe. Enfin, la stœchiométrie est obtenue à la moitié de la pente.

L'équipe de Pilch a été la première à étudier le profil thermodynamique de la reconnaissance entre l'ARNr 16S et les aminoglycosides en faisant appel à l'ITC.^{46,47,105} L'étude de ce système dans différentes conditions de température, tampon, pH et force ionique a permis de mieux comprendre les interactions mises en jeu lors de cette interaction. Un résultat important concerne la force ionique du tampon dans lequel les mesures sont effectuées. En faisant varier la concentration en Na⁺ de 60 mM à 147 mM, ils ont pu observer une diminution de l'affinité de l'aminoglycoside pour l'ARNr 16S (table I.2). Cette observation indique alors que les interactions électrostatiques jouent un rôle primordial dans les phénomènes de reconnaissance. En effet, plus la force ionique du tampon est élevée, plus les charges présentes en solution vont venir écranter les interactions électrostatiques qui permettent à l'ARNr 16S et aux aminoglycosides de se lier entre eux. Une fois encore, cela confirme le fait que chaque valeur de K_D ne reflète l'affinité que dans des conditions réactionnelles très précises. Par cette méthode, le K_D de la PRM pour l'ARN 16S a été déterminé autour de 27 nM (à 25 °C dans un tampon 10 mM cacodylate de sodium pH 5.5, en présence de 0.1 mM EDTA et 150 mM NaCl). Dans les conditions réactionnelles utilisées,⁶⁰ il leur a été possible de déterminer de très bonnes valeurs de K_D (nanomolaires) pour les aminoglycosides testés.

[Na ⁺] (mM)	T _{m0} (°C) ^a	T _m (°C) ^a	K ₂₅ ^{T_m} (M ⁻¹) ^b
Neomycin			
60	68.8	80.8	(9.4 ± 4.0) × 10 ⁹
81	70.2	80.7	(5.6 ± 2.2) × 10 ⁹
109	71.5	79.6	(2.1 ± 0.8) × 10 ⁹
129	72.4	78.7	(1.0 ± 0.3) × 10 ⁹
147	72.9	78.3	(7.1 ± 2.4) × 10 ⁸
Paromomycin			
60	68.8	78.5	(9.3 ± 4.2) × 10 ⁸
81	70.2	77.3	(3.3 ± 1.4) × 10 ⁸
109	71.5	76.1	(1.2 ± 0.5) × 10 ⁸
129	72.4	75.9	(6.8 ± 2.7) × 10 ⁷
147	72.9	75.2	(3.6 ± 1.5) × 10 ⁷

TABLE I.2 – Effets de la concentration en Na⁺ sur la T_m (température de fusion) et l'affinité des aminoglycosides pour l'ARN 16S. Tiré de⁴⁶

L'atout principal de l'ITC réside dans le fait qu'elle ne nécessite aucun marquage des échantillons et permet pourtant d'avoir un profil thermodynamique complet de l'interaction. C'est un avantage majeur puisqu'aucun artefact lié au marquage n'influence alors les mesures ni l'interaction entre les deux partenaires, comme c'est le cas pour la fluorescence par exemple. Un autre avantage est que cette technique n'est en aucun cas limitée par la taille des échantillons.

Cependant, un inconvénient majeur est la nécessité d'utiliser de grandes quantités d'échantillon (200 µL de solution de biomolécule et 50 µL de solution de ligand devant être idéalement 10 fois plus concentrée que la molécule cible). De plus, elle est très sensible à la température et à la force ionique.

III - 5) Résonance magnétique nucléaire

Pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une macromolécule biologique, une technique souvent employée est la cristallographie aux rayons X. Elle est cependant moins facile à mettre en œuvre dans le cas des ARN qui peuvent être difficiles à cristalliser. De plus, les ARN sont capables d'adopter des structures com-

III - . MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ARN/LIGAND: LES AMINOGLYCOSIDES COMME CAS D'ÉTUDE

plexes et d'être pourvus d'une grande flexibilité conformationnelle (cf. partie I - 1), page 11). Ceci complique donc leur analyse par cristallographie aux rayons X. Une alternative est l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN). En effet, l'analyse de l'échantillon se faisant en solution, il est alors possible d'obtenir des informations sur la structure et la dynamique des ARN.¹⁰⁶ Cette technique spectroscopique permet d'obtenir des données structurales telles que les distances inter-atomiques, les changements conformationnels d'une molécule et permet même d'étudier la reconnaissance entre un ligand et sa cible.^{107,108} Pour cela, on s'intéresse aux valeurs de déplacement chimique (δ).

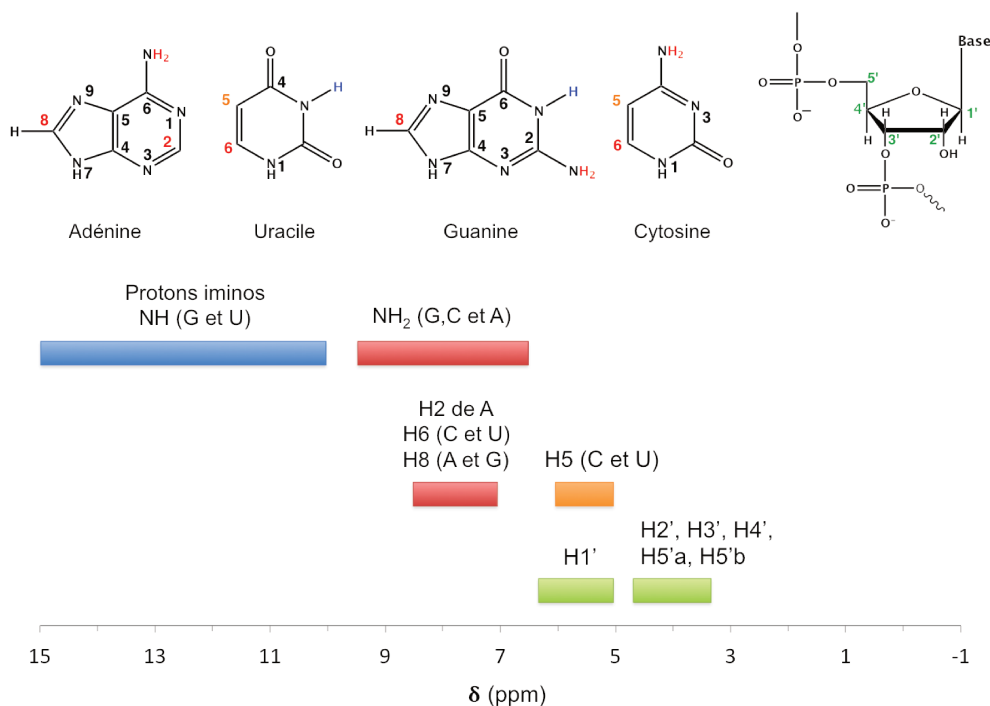


FIGURE I.32 – Déplacements chimiques en ¹H RMN des bases de l'ARN et des protons du ribose.¹⁰⁸

Afin d'obtenir des informations structurales sur les interactions entre les acides nucléiques et leurs ligands, on peut suivre les variations de déplacements chimiques par le biais de deux expériences RMN.¹⁰⁹ La première consiste à enregistrer un spectre ¹H RMN 1D dans l'eau. Lorsqu'un ligand vient se fixer sur l'ARN, les nucléotides impliqués dans l'interaction voient leurs signaux modifiés et il est ainsi possible de cartographier la zone de l'ARN concernée. On s'intéresse plus précisément aux variations de déplacement chimique (δ) des protons iminos qui sont localisés à très bas champ entre 10 ppm et 15 ppm (en bleu sur la figure I.32). En regardant cette zone du spectre, on observe la variation des liaisons hydrogènes entre les bases de l'ARN et/ou les liaisons se formant entre les bases et un ligand. Les protons iminos sont portés par l'uracile (U), la guanine (G) et la thymine (dans le cas de l'ADN). Toutefois, il n'est possible de réaliser cette mesure qu'à condition d'utiliser des séquences qui permettent d'éliminer sélectivement les signaux des protons de l'eau. Il est nécessaire d'utiliser une séquence "Watergate"¹¹⁰ permettant de supprimer le pic de l'eau si l'on veut pouvoir visualiser ces signaux. La TOCSY constitue une deuxième expérience permettant de localiser les modifications structurales résultant de la reconnaissance entre un acide nucléique et son ligand. Un spectre 2D TOCSY dans D₂O permet d'observer une corrélation ¹H-¹H à travers les liaisons chimiques. On peut alors dégager des informations sur les interactions impliquant les protons H5-H6 des C et U et même obtenir des

informations sur le repliement de l'ARN.

Le groupe de Puglisi a largement contribué à l'étude des complexes ARNr 16S27/aminoglycosides par RMN et a été le premier à fournir des informations structurales à ce sujet.^{52,54,111} Les structures publiées permettent de définir le site de fixation de la PRM⁵⁸ et de la gentamycine¹¹² au niveau du site A. Les aminoglycosides viennent se fixer spécifiquement au niveau du bulge de l'ARN formé par l'expulsion de l'A1492 et de la paire de bases A1408-A1493. Des liaisons hydrogènes impliquant les cycles I et III des aminoglycosides avec les nucléotides 1405 à 1409 et 1491 à 1495 de l'ARN permettent de stabiliser le complexe formé. Des expériences de dosage par RMN leur ont également permis de déterminer un K_D de $0.2 \mu\text{M}$ ^{52,111} pour la PRM.

Précédemment au laboratoire, une stratégie employant la RMN ¹⁹F a été utilisée pour l'étude des interactions ARN/aminoglycosides. L'intérêt du ¹⁹F réside dans son abondance naturelle relative de 100 % et de son très fort rapport gyromagnétique. De plus, l'atome de fluor possède une plage de déplacement chimique environ 20 fois plus large que celle du proton ce qui en fait un isotope de choix pour analyser des structures par RMN. Un mime du site A de l'ARNr, plus court que ceux reportés dans la littérature jusqu'alors, a été utilisé. Comme indiqué en figure I.33, ce fragment long de 23 nucléotides a été mis en présence d'une sonde fluorée externe afin d'étudier les phénomènes de reconnaissance avec les aminoglycosides par le biais d'expériences de compétition.¹¹³ La sonde fluorée utilisée a été développée en s'inspirant du cycle central DOS, le but étant de l'utiliser en tant que composé modèle des aminoglycosides. Dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5 en présence de 50 mM de KCl, il a ainsi été possible de déterminer les valeurs de K_D pour la néomycine, paromamine et néamine respectivement égales à 35 μM , 125 μM et 55 μM . Concernant la paromomycine, son K_D serait proche de 36 μM dans ces conditions réactionnelles. Le classement général de ces aminoglycoside par ordre d'affinité est le même que ceux reportés dans la littérature, confirmant ainsi la validité de cette méthode.

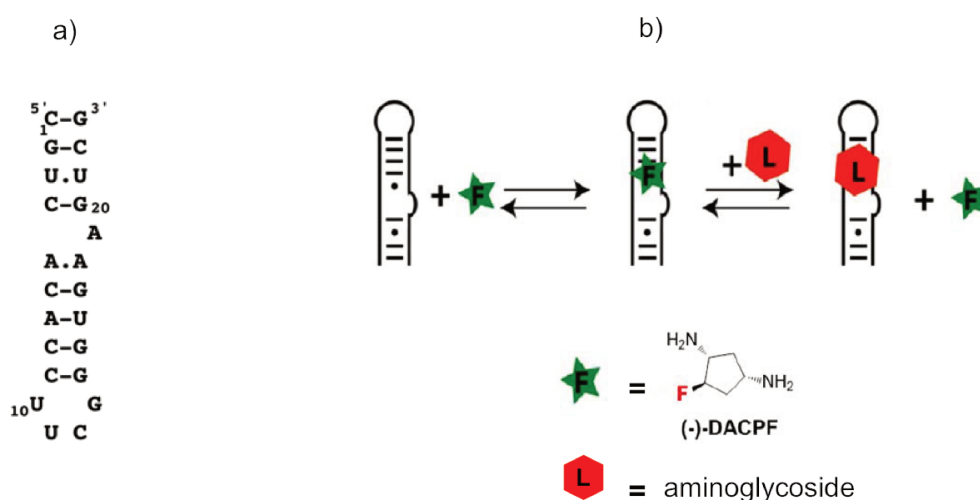


FIGURE I.33 – a) Séquence de l'ARN 16S23. b) Principe des expériences de compétition réalisées par ¹⁹F RMN. L'étoile verte symbolise la sonde fluorée tandis que l'hexagone rouge illustre la molécule compétitrice non marquée.¹¹³

La RMN est la méthode généralement employée pour avoir accès à des informations structurales et pour observer les changements conformationnels résultant d'interactions moléculaires. Toutefois, un inconvénient majeur est son coût. L'utilisation de cette technique spectroscopique est également limitée par la taille des acides nucléiques pouvant être analysés (moins de 150 nucléotides environs).¹¹⁴ Elle est également peu sensible et nécessite donc l'utilisation de grandes quantités d'échantillon (et parfois même l'utilisation de marquages isotopiques) afin de mener des études structurales. En effet, la RMN n'est capable de mesurer des K_D que de l'ordre du mM.¹⁰⁹ Pour l'étude de la formation de complexes par RMN, un autre inconvénient que l'on peut rencontrer est lié à la cinétique d'échange de la formation du complexe étudié.¹¹⁵ La vitesse d'échange entre les deux états libre et lié d'une molécule est déterminante pour le type de signal obtenu. Pour une réaction $A^* \rightleftharpoons A^*B$, plusieurs cas de figures sont envisageables et ceux-ci sont illustrés en sur la figure I.34. En situation d'échange lent, les résonances de la forme libre et liée sont parfaitement discernables.¹¹⁶ A l'inverse, lorsque le passage de la forme libre à la forme liée de la molécule est trop rapide par rapport à l'échelle de temps de la mesure par RMN, un signal moyenné représentatif des deux formes est observé. Dans ces conditions l'étude et la quantification de la formation de complexes par RMN peut s'avérer plus délicate.

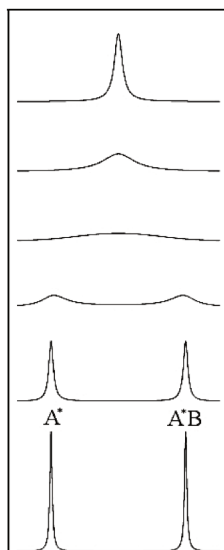


FIGURE I.34 – Influence des cinétiques d'échange dans l'interprétation de signaux par RMN. Adapté de.¹¹⁷

III - 6) Couplage des techniques analytiques à du criblage: microarray

Le terme *microarray*, désigne un assemblage de molécules (identiques ou différentes) greffées de façon organisée sur un support solide à l'échelle de dépôts micrométriques (figure I.35). Cette configuration est combinée à une autre méthode d'analyse (fluorescence, radioactivité, chemiluminescence, colorimétrie...) pour détecter les phénomènes d'interaction se produisant en surface et permet ainsi d'analyser en parallèle une grande variété de molécules. Par cette méthode, il est possible de cribler des bibliothèques de composés ou encore d'analyser et de quantifier des phénomènes de reconnaissance intermoléculaires en une seule et même expérience de façon rapide et simultanée et à partir de faibles volumes d'échantillons.

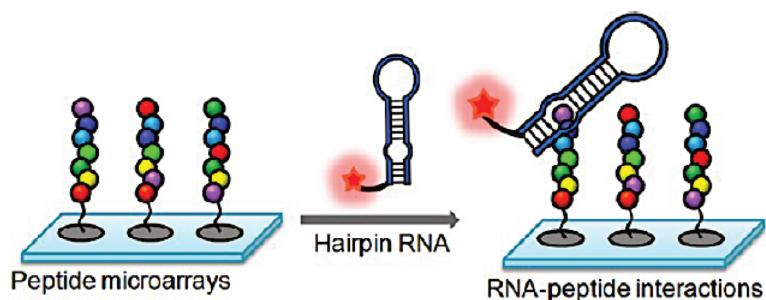


FIGURE I.35 – Principe d'utilisation de microarray. Tiré de ¹¹⁸

La technologie microarray peut être utilisée pour immobiliser de petites molécules organiques, des protéines, des acides nucléiques et même des organismes biologiques plus complexes tels que des cellules ou des virus. Les microarrays sont généralement préparés par dépôts robotisés de gouttelettes (volumes de l'ordre du nanolitre) d'une solution d'échantillon à la surface d'une lame en verre. Comme indiqué sur la figure I.36, les ligands étudiés sont immobilisés (de façon covalente ou non) au moyen de groupements fonctionnels dans une configuration la plus organisée possible. ¹¹⁹ Une fois les dépôts effectués, le microarray est incubé en présence d'ARN. Après incubation, la surface est rincée pour retirer l'excédent d'ARN. Les interactions avec le ligands sont ensuite analysées et quantifiées pour détermination de K_D ou de nouveaux hits pharmaceutiques.

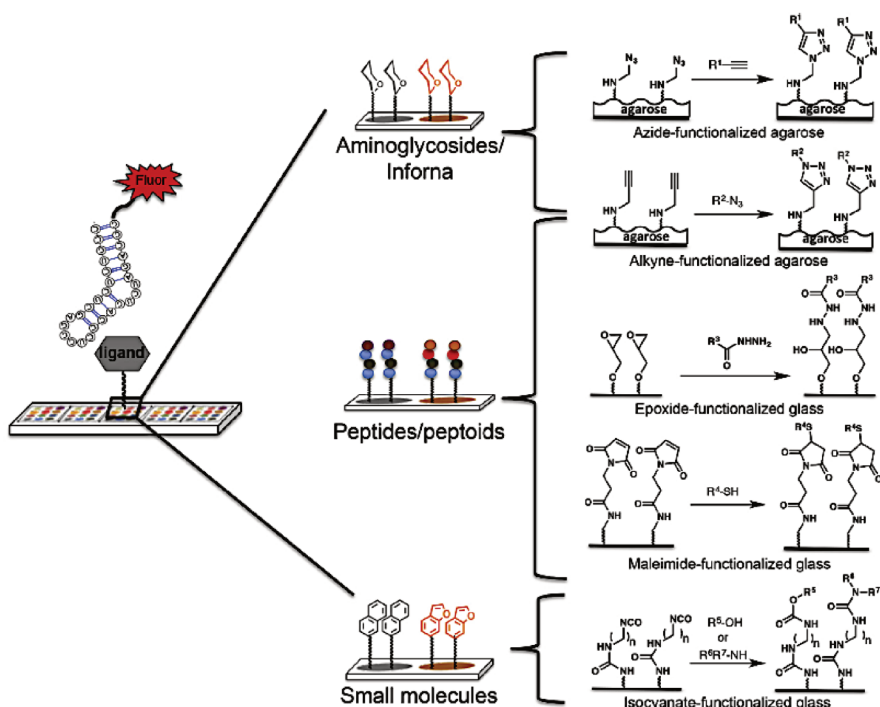


FIGURE I.36 – Stratégies d'immobilisation utilisées pour le criblage d'ARN. Tiré de ¹¹⁹

L'équipe de Disney a publié un premier exemple d'utilisation des microarrays pour l'étude des interactions entre ARN et aminoglycosides au moyen d'une détection par fluorescence. ¹²⁰ Les ARN utilisés dans cet exemple sont deux 27-mer mimant le site A des ARNr chez les bactéries (16S) et chez l'Homme (18S). Comme indiqué en figure I.37, ces deux oligonucléotides ont été marqués à leur extrémité 3' par un groupement fluorescent afin de révéler les phénomènes d'interaction avec les aminoglycosides. L'ARN 16S a été marqué

III - . MÉTHODES ANALYTIQUES POUR L'ÉTUDE DES INTERACTIONS ARN/LIGAND: LES AMINOGLYCOSIDES COMME CAS D'ÉTUDE

avec une 5-carboxytetramethylrhodamine alors que l'ARN 18S a été marqué avec une fluorescéine. Ces ARN ont été préparés dans un tampon 20 mM HEPES pH 7.4 contenant 200 mM de NaCl et une solution concentrée à 10 μ M a été utilisée pour les mesures.

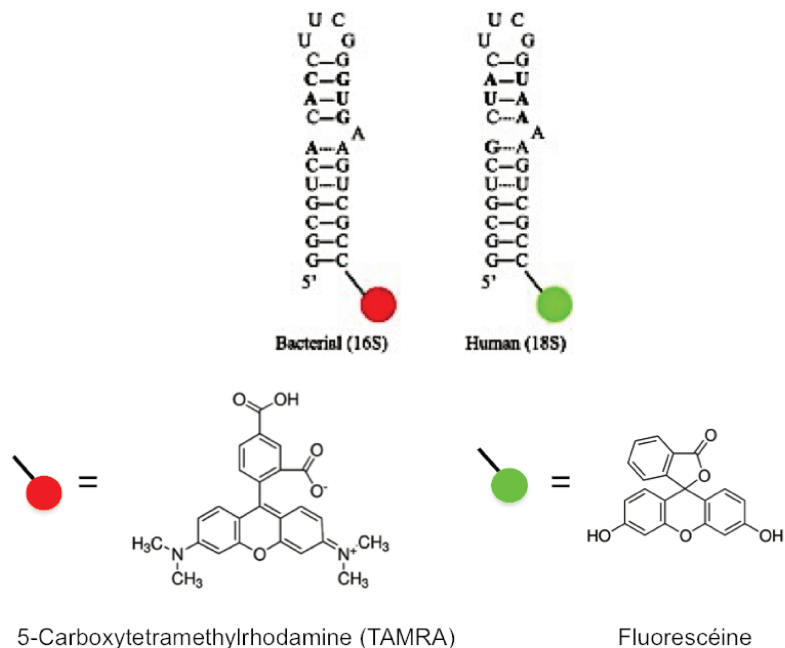


FIGURE I.37 – ARN fluorescents utilisés dans l'étude de Disney par microarray. Adapté de ¹²⁰

La reconnaissance entre une série d'aminoglycosides immobilisées a premièrement été testée en présence d'ARN 16S avant d'être répétée avec l'ARN 18S. Les intensités de fluorescence émises à la suite de la formation du complexe ARN/ligand ont été comparées afin de procéder à un classement illustrant l'affinité de l'aminoglycoside pour l'ARN. Pour l'ARN bactérien, l'amikacine a montré la meilleure réponse fluorescente et se distingue des autres molécules de façon significative. Suivent ensuite la lividomycine, la PRM, la néomycine et la tobramycine qui possèdent des intensités de fluorescence comparables (figure I.38). Concernant l'ARN 18S humain, une fois encore l'amikacine possède la fluorescence la plus intense. Viennent ensuite la kanamycine, la néomycine puis la tobramycine qui ont été classées par ordre décroissant d'intensité de fluorescence. Le fait que l'amikacine possède ici la réponse fluorescente la plus intense n'est pas en accord avec les classements obtenus par d'autres méthodes analytiques dans lesquelles la néomycine est la molécule la plus affine pour l'ARN 16S. Ce résultat pourrait probablement s'expliquer par le fait que la méthode employée pour immobiliser les aminoglycosides affecte les propriétés d'interaction avec l'ARN. En effet, les composés sont immobilisés grâce à une réaction de couplage entre les fonctions amine des aminoglycosides et les groupements succinimide recouvrant le support en verre. Ce premier exemple d'analyse par microarray démontre néanmoins qu'il est possible et facile de cribler un grand nombre de molécules dans le but de découvrir de nouveaux ligands d'ARN.

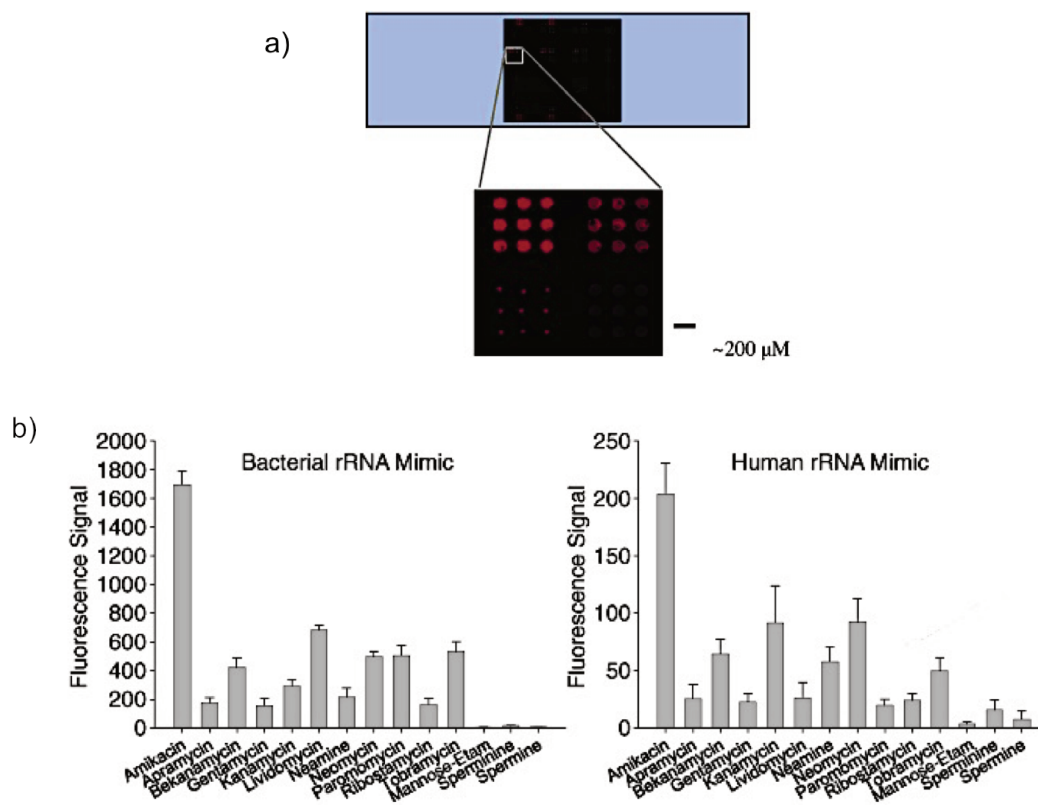


FIGURE I.38 – Immobilisation d’aminoglycosides sous forme de microarray en présence d’ARN et analyse de leur réponse par fluorescence. a) Microarray d’aminoglycosides en présence d’ARN 16S. b) Intensité de fluorescence observée pour chaque aminoglycoside en présence d’ARN 16S ou 18S. Tiré de ¹²⁰

L’équipe de Wong a également utilisé cette technique pour l’étude du complexe tobramycine/ARN 16S. ¹²¹ Afin de procéder à l’immobilisation de la tobramycine, la fonction -OH portée par le carbone en position 6’ du cycle III a été remplacée par une amine (la substitution est encadrée en rouge sur la figure I.39). Cet analogue de la tobramycine a ensuite été modifié par l’addition d’un bras espaceur long de 15 atomes de carbone permettant son immobilisation sous forme de microarray (linker désigné par R = C₁₅H₁₈, encadré en vert sur la figure I.39). La tobramycine immobilisée a été mise en présence de différentes concentrations d’ARN 16S dans un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7.5 contenant 150 mM NaCl et 4 mM MgCl₂. Ces expériences de dosage ont permis de déterminer un K_D égal à 1.9 ± 0.3 μM pour la tobramycine par lecture de l’intensité de fluorescence émise à λ = 535 nm.

L’intérêt principal de cette technique repose sur sa capacité à fournir une analyse rapide et en parallèle d’une grande variété de molécules puisqu’il est possible d’immobiliser plus de 10 000 molécules différentes sur une même surface. ¹¹⁹ Cette approche est particulièrement attractive pour cribler de grandes bibliothèques de molécules dans le but de trouver de bons ligands d’ARN. C’est également une technique permettant une très grande économie d’échantillon. Des concentrations en ARN autour du nM dans des volumes de l’ordre du nL suffisent pour utiliser la technologie microarray. Ceci est un avantage majeur lorsque l’on travaille avec les ARN qui sont difficiles à manipuler et à synthétiser en grande quantité.

Cette technique sensible (K_D autour du nM) comporte cependant plusieurs inconvénients. Tout d’abord, les

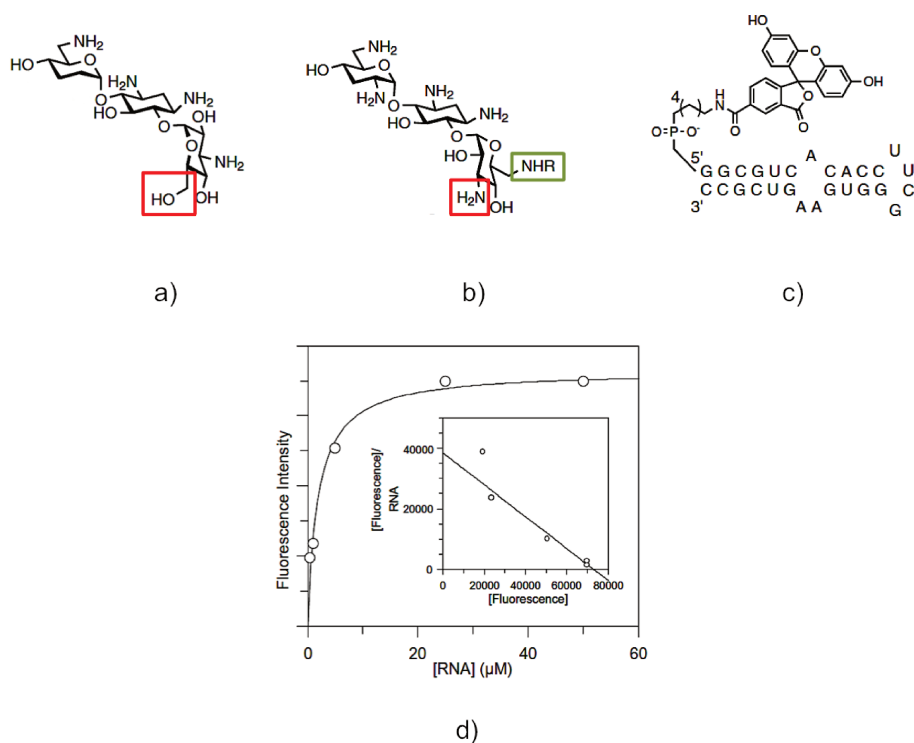


FIGURE I.39 – a) tobramycine. b) Analogue de la tobramycine utilisé pour cette étude, R = C₁₅H₁₈. c) ARN 16S27 marqué en 5' par une Fluorescéine. d) Dosage de la tobramycine par l'ARN 16S27-Fluorescéine. Adapté de¹²¹

équipements et le matériel d'analyse nécessaires à son utilisation en font une méthode coûteuse. De plus, l'utilisation de microarray nécessite un "double-marquage": un premier pour immobiliser le ligand sur la lame en verre et un second sur l'ARN afin d'analyser les réponses résultant de l'interaction. Nous l'avons déjà mentionné, le marquage de molécules peut s'avérer parfois difficile à mettre en œuvre mais doit surtout être réalisé en gardant à l'esprit qu'il ne faut pas modifier les propriétés intrinsèques des molécules. Ceci est encore plus complexe lorsqu'un double marquage est nécessaire, comme c'est le cas ici. Rappelons également que le principe de ces méthodes repose sur une reconnaissance ligand/récepteur à une interface solide, laquelle peut être affectée par des effets d'encombrements stériques liés à la proximité de la surface. Il en résulte des mesures d'affinités qui peuvent être différentes de celles en phase homogène. Il convient donc avec ces méthodes de parvenir à contrôler l'immobilisation des molécules pour que celles-ci reconnaissent de façon optimale leur ligand. La plupart des biais en microarray sont généralement liés à un manque de précision et de reproductibilité dans le greffage des molécules en surface.¹²²

Bien qu'étant une technique avantageuse grâce au gain de temps et d'échantillon qu'elle représente, ses nombreuses qualités ne sont exploitées qu'à condition d'avoir des protocoles d'immobilisation et de mesure parfaitement optimisés. En effet, son niveau de sensibilité est tel que la surface construite se doit d'être parfaitement reproductible surtout si l'on veut réussir à cribler et comparer des molécules les unes aux autres. Sa difficulté de mise en œuvre et son coût ne la rendent donc pas facilement accessible en routine en tant que biocapteur.

III - 7) Electrochimie

La dernière méthode analytique que nous aborderons dans ce chapitre est la détection par voie électrochimique. Les techniques électrochimiques ont été utilisées à de nombreuses reprises comme outil analytique pour étudier les phénomènes de reconnaissance entre biomolécules. Des anticorps, des ions, des molécules organiques, des protéines, . . . ont ainsi pu être détectés à l'aide de techniques électroanalytiques que l'on peut classer selon deux grandes catégories:

- celles qui procèdent en phase hétérogène: le ligand ou le récepteur est immobilisé à la surface d'une électrode. De ce fait, le signal électrochimique enregistré rend compte d'une reconnaissance entre un ligand et sa cible à la surface d'une électrode.
- celles qui reposent sur le suivi électrochimique de la réaction de reconnaissance en phase homogène. Dans ce cas, la réponse électrochimique enregistrée est représentative d'un phénomène d'interaction se déroulant en solution.

En se focalisant sur les acides nucléiques, nous avons pu constater que la majorité des exemples mentionnés dans la littérature reposent sur une approche dans laquelle des aptamères (ADN ou ARN) sont immobilisés à la surface d'une électrode. Ferapontova *et al.*¹²³ ont développé un biocapteur permettant de détecter la théophylline, une molécule souvent utilisée dans le traitement des bronchites ou de l'asthme. La méthode de détection fait appel à un aptamère ARN immobilisé sur une électrode d'or (figure I.40). Cet aptamère a été marqué à son extrémité 3' par un groupement ferrocène (Fc), et thiolé en 5' afin d'être immobilisé sur l'électrode d'or. Les auteurs ont démontré que sous forme non complexée, le groupement Fc restait relativement éloigné de la surface de l'électrode en raison de la flexibilité de l'aptamère. Le courant initialement enregistré est donc peu intense. Cependant, en présence de théophylline, l'aptamère opère une capture conformationnelle de son ligand, ce qui rapproche le groupement ferrocène de la surface de l'électrode et facilite ainsi le transfert d'électron entre l'électrode et le groupement ferrocène. La formation du complexe aptamère/ligand entraîne alors une réponse électrochimique plus intense. Bien qu'intéressante, cette approche nécessite toutefois une double modification chimique de l'ARN. De plus, la modification chimique de l'ARN par le marqueur ferrocène et son immobilisation sur l'électrode peuvent affecter l'affinité et la spécificité de la reconnaissance avec sa cible.

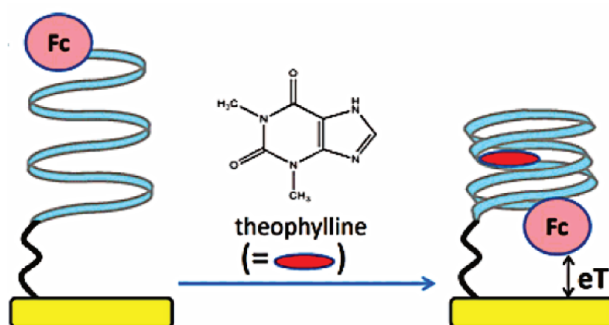


FIGURE I.40 – Biocapteur utilisant l'ARN pour détecter la théophylline en phase hétérogène, tiré de.¹²³ eT: transfert d'électron.

Un autre exemple utilisant un aptamère ARN immobilisé en surface a été développé par l'équipe de White.¹²⁴ Le principe est quasiment le même que précédemment en ce sens que l'efficacité du transfert électronique varie selon la distance du marqueur électroactif par rapport à la surface de l'électrode. La forme complexée de l'aptamère ARN permet d'augmenter l'intensité du signal car le marqueur est rapproché de la surface de l'électrode. Cette fois, l'aptamère a été marqué par le bleu de méthylène à l'extrémité 3'. L'extrémité 5', quant à elle, est thiolée pour permettre d'immobiliser l'aptamère sur une électrode d'or. Cet exemple a été développé pour la détection d'un aminoglycoside, la tobramycine (figure I.41).

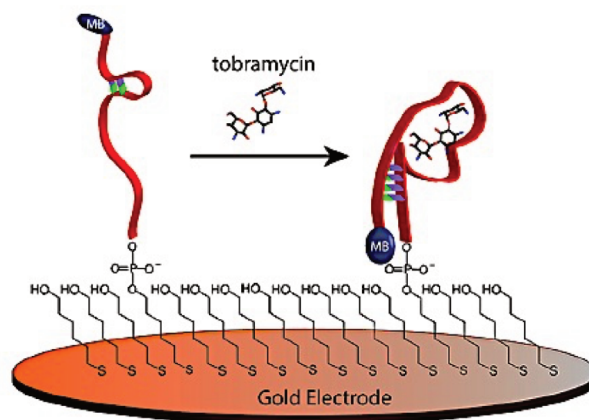


FIGURE I.41 – Méthodologie de détection de la tobramycine en phase hétérogène, adapté de.¹²⁴

Le bleu de méthylène a également été employé par Ferguson *et al.*¹²⁵ pour marquer un aptamère ADN immobilisé sur une électrode d'or afin de détecter un autre aminoglycoside, la kanamycine, dans une approche identique au schéma de principe précédent.

Un autre exemple intéressant concerne la détection par impédancemétrie de la néomycine via une réaction de compétition vis-à-vis d'un complexe néomycine/aptamère immobilisé sur une électrode d'or¹²⁶ (figure I.42). La néomycine, immobilisée à la surface d'une électrode d'or, est initialement mise en présence d'un aptamère capable de la fixer. Le complexe ARN/néomycine alors formé fournit initialement un premier signal électrochimique. Cette électrode dont la surface est modifiée par l'immobilisation de complexes aptamère/néomycine est ensuite impliquée dans une réaction de compétition. En plongeant cette électrode modifiée dans une solution de néomycine, l'aptamère est alors déplacé. La perturbation qui a ainsi été appliquée à la surface de l'électrode d'or est détectée par spectroscopie d'impédance et permet de rapporter les phénomènes d'interactions entre l'ARN et la néomycine. Par cette approche de compétition, il a été possible de déterminer un K_D pour la néomycine.

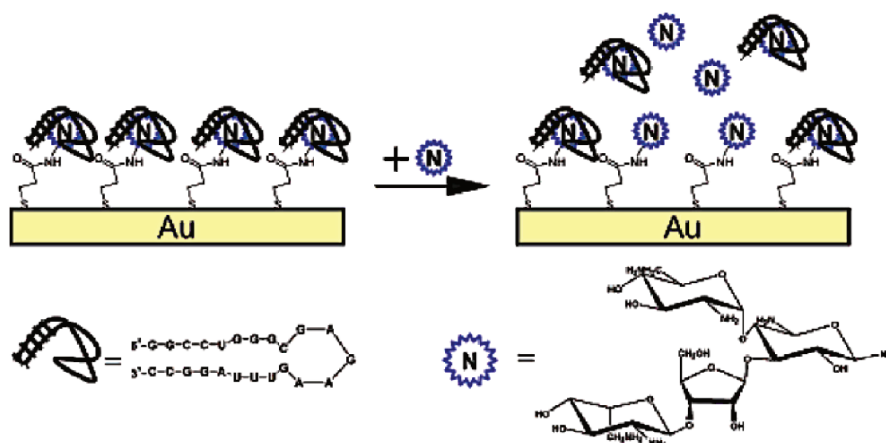


FIGURE I.42 – Biocapteur à ARN permettant de détecter la néomycine, tiré de.¹²⁶ Le cercle bleu représenté sur le schéma représente la néomycine.

Nous l'avons vu au cours de cette partie, seuls quelques exemples illustrent l'utilisation de l'électrochimie pour détecter et quantifier les interactions entre les acides nucléiques et de petites molécules. De plus, ces exemples ne font appel qu'à des ADN ou des ARN immobilisés à la surface des électrodes. Ces méthodes en phase hétérogène présentent de nombreux inconvénients. En plus de la nécessité de passer par une étape préalable de fonctionnalisation de la surface de l'électrode, les processus de reconnaissance impliquant des molécules immobilisées peuvent être moins bons et plus lents en raison de l'encombrement stérique présent au voisinage de la surface.¹²⁷ Egalement, ces dispositifs nécessitent de passer par une étape de modification chimique des électrodes et des molécules afin de les immobiliser.¹²⁸ Enfin, les interactions se déroulant sur une surface peuvent être considérées comme étant moins représentatives des interactions se déroulant en milieu homogène, comme c'est le cas dans le milieu intra-cellulaire. Les méthodes électroanalytiques se déroulant en phase homogène semblent donc être une approche plus cohérente. Toutefois, il n'existe pour le moment aucun exemple qui mentionne l'utilisation d'un dispositif électroanalytique pour l'étude des ARNs et des aminoglycosides en phase homogène. Nous avons donc décidé de développer une nouvelle approche électrochimique permettant d'étudier ces molécules.

Nous nous sommes tournés vers un mode de détection par voie électrochimie en raison des nombreux avantages inhérents à cette technique. Sa rapidité, sa simplicité de mise en œuvre, son faible coût de fonctionnement, sa sensibilité (K_D mesurés inférieurs au μM) en font une technique de choix pour étudier ces molécules en phase homogène. Egalement, sa prédisposition à être miniaturisable permet d'envisager son application en tant que biocapteur dans le dosage des aminoglycosides ou encore pour réaliser des expériences de criblage de bibliothèques de molécules.

III - 8) Conclusion et objectifs du projet de thèse

Comme résumé dans le tableau I.3, chaque technique analytique possède ses propres avantages et inconvénients pour l'étude des complexes ARN/amino glycosides. De ce fait, les résultats obtenus par chaque technique ne sont pas si facilement comparables les uns aux autres. Pour un même aminoglycoside, il existe

une grande variabilité dans la valeur du K_D reportée dans la littérature. Cette variabilité s'explique en partie par la grande diversité des conditions expérimentales utilisées (tampon, force ionique, pH, température, ...) mais aussi par un manque de fiabilité et de robustesse de certaines techniques. Une discussion s'ouvre alors au sujet de la pertinence de la technique et des conditions réactionnelles à utiliser afin de réaliser une étude plus représentative des phénomènes se déroulant en conditions physiologiques. Dans ce contexte l'utilisation de l'électrochimie semble constituer une approche intéressante, à la fois par son aspect original (très peu d'études font appel à cette technique pour détecter et quantifier les interactions ARN/ligand en phase homogène) mais également pour des questions pratiques (technique simple, rapide et économique).

La suite de ce manuscrit de thèse va donc présenter la mise au point de la technique développée dans le cadre de ce projet. Nous allons dans un premier temps décrire les sondes électrochimiques qui ont été développées dans le cadre de cette thèse et ensuite montrer comment la formation de complexe en présence d'ARN a été caractérisée (chapitre II). Le chapitre III portera sur l'utilisation de ces sondes pour une détection et une quantification des phénomènes de reconnaissance entre les aminoglycosides et les ARN par voie électrochimique. Le dernier chapitre (chapitre IV) portera sur des études de compétition entre notre sonde électroactives et différents aminoglycosides en vue d'une stratégie de criblage de molécules pouvant constituer de bons ligands d'ARN.

Technique analytique	K _D	Tampon	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
ESI-MS	110 nM ⁷⁷ (PRM) 52 nM ⁷⁶ (néomycine)	50 mM NH ₄ OAc/10 % isopropanol 150 mM NH ₄ OAc/50 % isopropanol	pM	Non destructive (aucune fragmentation) Aucun marquage Peu d'échantillon Rapide Automatisable	Equipement coûteux Peu simple à utiliser Intolérance aux sels
SPR	0.2 μM ⁸⁸ (PRM) 7.8 μM ⁸⁸ (néamine) 19 nM ⁸⁸ (néomycine)	HEPES 10 mM pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA	nM	Informations thermodynamiques et cinétiques Rapide Automatisable	Mesure en phase hétérogène Taille des échantillons Modification chimique pour immobilisation
Fluorescence	0.132 μM ⁹⁷ (néomycine) 1.85 μM ⁹⁷ (PRM)	20 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl ₂	pM	Simple Rapide Très sensible	Marquage des molécules Artéfacts de mesures (<i>photo-bleaching</i>) Temps d'observation < 1 s
Microarray	1.9 μM ¹²¹ (tobramycine)	50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 4 mM MgCl ₂	nM	Economie d'échantillon Rapide	Equipement coûteux Double modification (récepteur et ligand) Mesure en phase hétérogène Précision d'immobilisation de l'échantillon
ITC	27 nM ⁴⁶ (PRM)	10 mM cacodylate de sodium pH 5.5, 0.1 mM EDTA, 150 mM NaCl	pM	Aucun marquage Aucune limite de taille Accès à tous les paramètres thermodynamiques	Grande quantité d'échantillon Très sensible à l'environnement
RMN	35 μM ¹¹³ (néomycine) 36 μM ¹¹³ (PRM) 55 μM ¹¹³ (néamine) 125 μM ¹¹³ (paromamine) 0.2 μM ⁵² (PRM)	10 mM KPO ₄ pH 6.5, 50 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6.4 ⁵²	mM	Simple Rapide	Equipement Grande quantité d'échantillon Taille de l'échantillon Sensibilité Marquage isotopique

TABLE I.3 – Comparatif des techniques utilisées pour l'étude des interactions entre l'ARN 16S et les aminoglycosides.

Chapitre II

Synthèse de sondes ferrocéniques et étude des phénomènes de reconnaissance en présence d'ARN

I - Stratégies de synthèse d'analogues des aminoglycosides

En raison de leur capacité à reconnaître différentes structures d'ARN, les aminoglycosides ont été largement utilisés pour l'étude des interactions ARN/ligands.⁴⁴ Dès lors, ces molécules ont constitué un bon point de départ pour la conception de nouveaux ligands d'ARN et de nombreuses stratégies de synthèse ont été envisagées à partir de leur structure. Certaines reposent sur la simplification de leur squelette, très fonctionnalisé, afin de diminuer la toxicité des aminoglycosides et/ou de leur permettre d'échapper aux mécanismes enzymatiques aboutissant aux phénomènes de résistance.⁹⁹ D'autres approches sont employées pour développer des molécules plus affines et plus spécifiques des acides nucléiques.^{129,130}

Les quelques exemples que nous allons mentionner ne fournissent qu'un bref aperçu des méthodes employées pour la synthèse d'analogues ou de molécules mimant les aminoglycosides. Après avoir abordé ces différentes approches, nous verrons comment nous avons procédé pour synthétiser des sondes utilisables pour des études électroanalytiques. Nous verrons ensuite comment l'une d'entre elle, la sonde ferrocène-paromomycine, interagit avec l'ARN grâce à des résultats obtenus par RMN et par ITC.

I - 1) Approche par synthèse totale et hémisynthèse

Bien que complexe, la synthèse totale de certaines aminoglycosides a déjà été réalisée.^{131,132} Toutefois, elle ne constitue pas l'approche préférentielle pour synthétiser des analogues d'aminoglycosides. Les nombreuses étapes de protection et de déprotection ainsi que la nécessité de contrôler la diastéréosélectivité à chaque étape rendent le processus laborieux. Ces synthèses totales multi-étapes très complexes conduisent généralement à de faibles rendements finaux et c'est pourquoi des méthodes d'hémisynthèse ont été développées. Ainsi, de nombreux analogues ont pu être synthétisés à partir du composé naturel produit à l'échelle industrielle par des souches optimisées de *Streptomyces*. Les approches par hémisynthèse démarrent généralement par une première étape d'hydrolyse en milieu acide où les motifs minimaux nécessaires à la reconnaissance avec les ARN sont conservés, avant d'être modifiés chimiquement dans différentes étapes de synthèse. Comme indiqué sur la figure II.1, ce sont généralement le motif central de la 2-déoxystreptamine (2-DOS) ou encore les parties paromamine et néamine qui sont conservés en fonction de la force de l'acidité

utilisée et les conditions réactionnelles mises en œuvre.

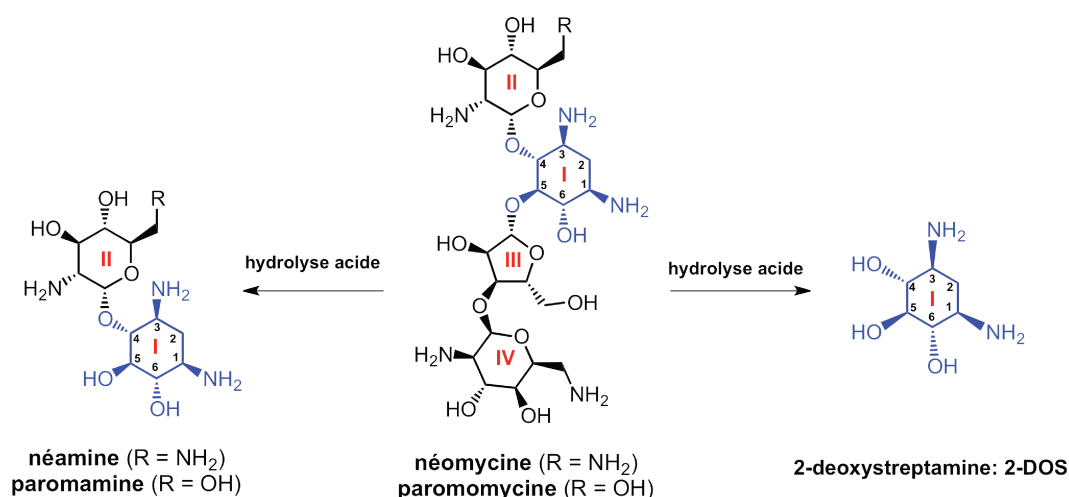


FIGURE II.1 – Dégradation contrôlée d'aminoglycosides en milieu acide.

I - 2) Dimères d'aminoglycosides

Puisque les aminoglycosides peuvent avoir plusieurs sites de liaison au sein de l'ARN, une des stratégies employées pour obtenir de bons analogues consiste à combiner les motifs proches les uns des autres afin d'augmenter leur affinité (figure II.2). Dans de nombreux exemples, la néamine a été utilisée comme composé "modèle" et la nature ainsi que la longueur du bras espaceur séparant les deux monomères ont été étudiés.

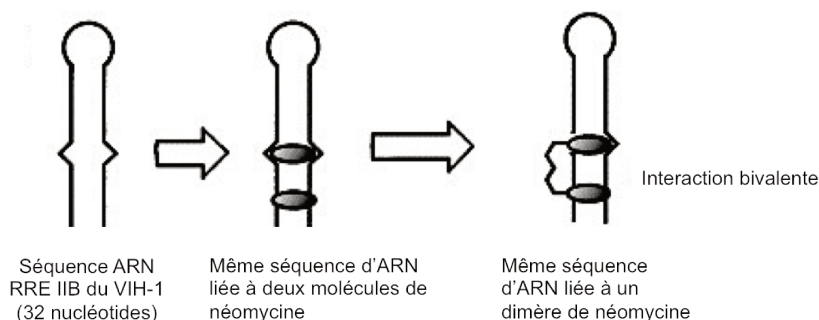


FIGURE II.2 – Représentation schématique de l'utilisation de dimères d'aminoglycosides, adaptée de.¹³³

Wang et Tor ont synthétisé des dimères d'aminoglycosides et se sont concentrés sur l'utilisation d'un bras espaceur suffisamment long et flexible pour permettre aux deux monomères de se positionner favorablement dans la poche de liaison¹²⁹ sur l'ARN. Ils ont alors observé que ces dimères avaient une activité plus importante que celle obtenue en doublant la concentration du monomère.

En exploitant cette stratégie, l'équipe de Wong a également développé une série de dimères de néamine et a étudié l'influence de la longueur et de la nature du bras espaceur⁸⁸ (figure II.3). Les K_D de ces dimères pour l'ARNr 16S ont ensuite été mesurés par SPR. Deux familles de dimères ont été synthétisées. Dans une première librairie de molécules, les dimères comportent des bras amides de longueur variable. Ceux-ci ont

été obtenus après réaction entre des amines de longueur variable et les monomères de néamine porteurs d'un acide carboxylique. Dans la deuxième famille de molécules, des bras 1,2-hydroxylamine ont été utilisés pour relier les deux monomères. Cette deuxième famille de composés a été obtenue plusieurs étapes de synthèse. Les dérivés époxy-néamines aboutissent aux alcools correspondants par ouverture de l'époxyde avec différentes diamines. Les deux séries de molécules synthétisées ont montré des comportements différents. L'utilisation de bras amides ne permet pas d'obtenir de meilleurs K_D que celui du monomère néomycine. Également, une stœchiométrie de 2:1 a été observée, montrant que cette première série ne permettait pas d'amplifier les effets liés à l'utilisation de deux monomères de néamine. À l'inverse, les molécules comportant cette fois un lien 1,2-hydroxylamine ont montré de meilleures affinités que le monomère ($K_D \approx 40$ nM contre 100 nM pour le monomère) avec une stœchiométrie 1:1. Après les étapes finales de déprotections des fonctions alcool et amines, les rendements globaux sont relativement bas pour la famille des dimères porteurs d'un bras amide tandis que les rendements sont relativement bons lorsque le bras espaceur est un bras amine.

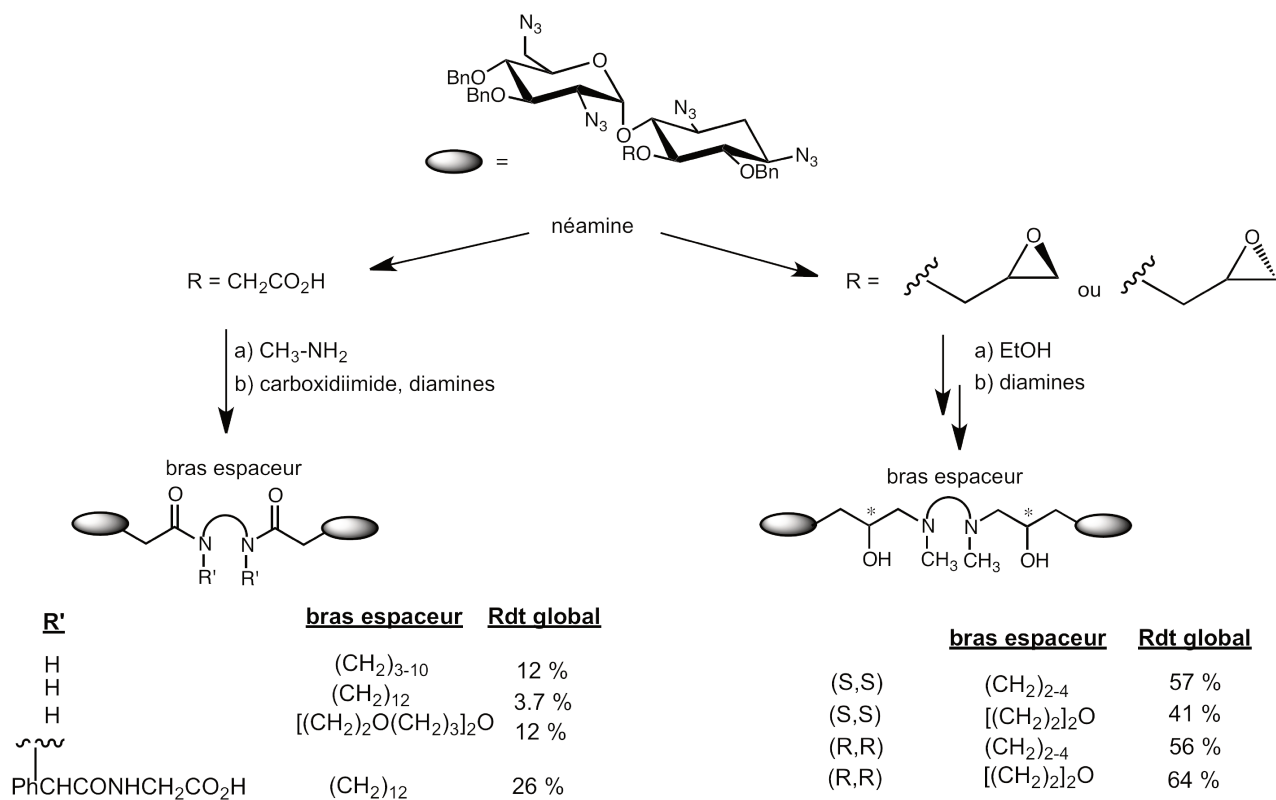


FIGURE II.3 – Dimères de la néamine avec divers bras espaceurs de type amide ou amine.⁸⁸

Même si l'utilisation de dimère d'aminoglycoside semble améliorer l'affinité pour l'ARN, l'obtention de ces composés nécessite cependant de devoir passer par des synthèses multi-étapes.¹³² Avant de pouvoir étudier l'influence de divers bras espaceurs sur ces dimères de néamine, le monomère utilisé a été isolé à partir de cinq étapes de synthèse comme montré sur la figure II.4. En partant de la néamine, trois étapes successives sont tout d'abord nécessaires afin de protéger les amines en azoture puis de protéger les fonctions alcool en éthers de benzyl. Une fois les fonctions réactives de la néamine protégées, celle-ci est ensuite hydrolysée en milieu acide. Cet intermédiaire est ensuite fonctionnalisé en position 5. Ce n'est qu'après ces nombreuses étapes que la formation de dimères de néamine est possible.

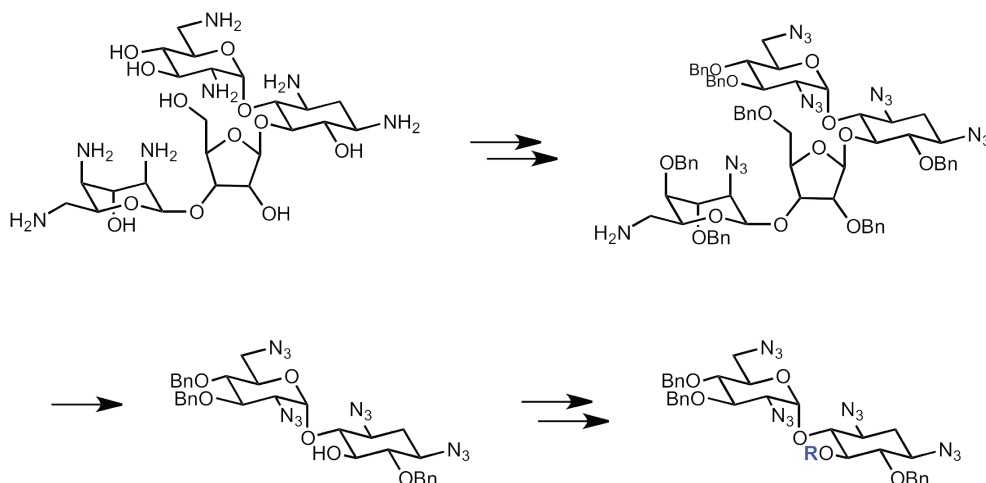


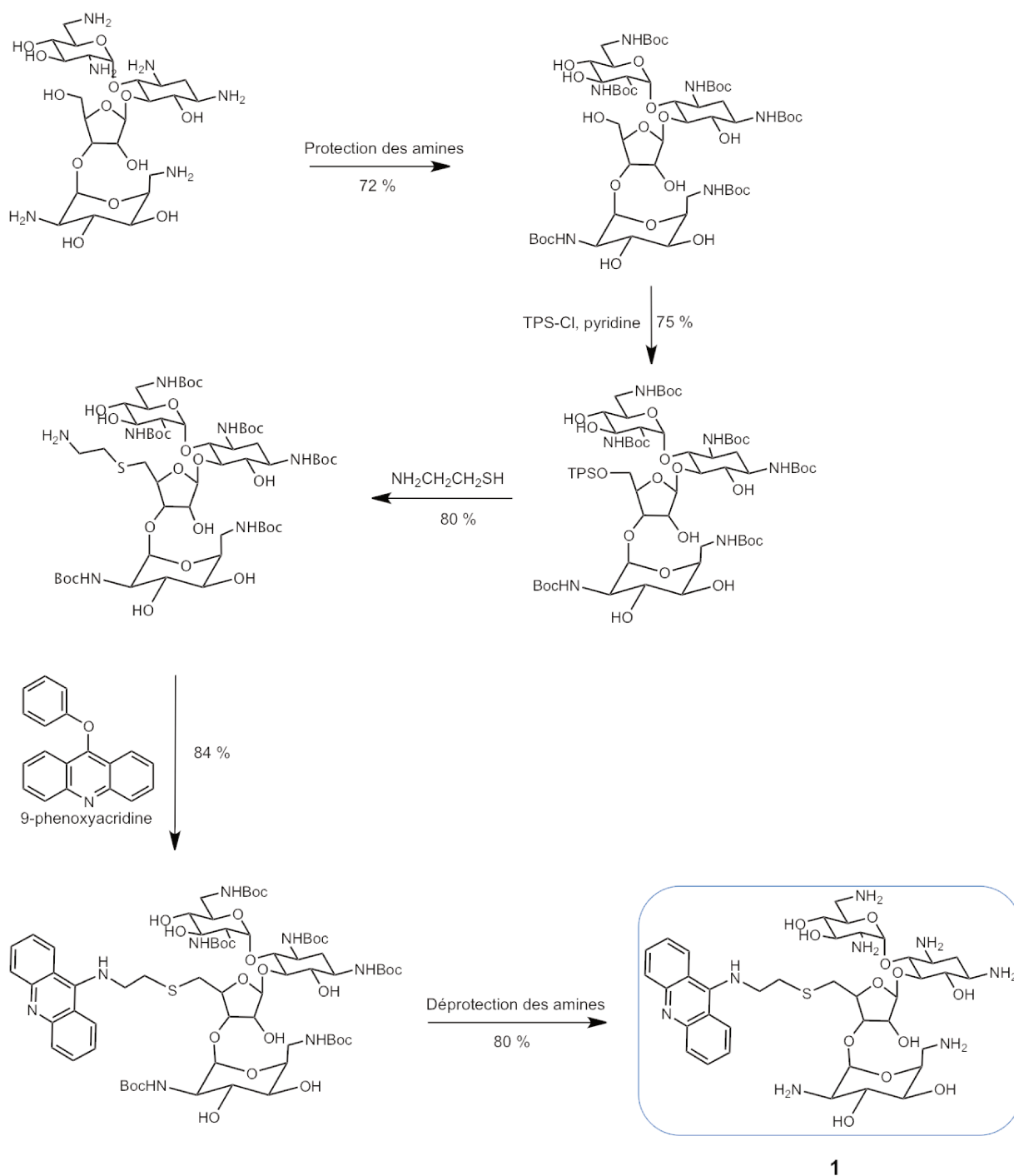
FIGURE II.4 – Néamine protégée, utilisée pour la formation de dimères par l'équipe de Wong.⁸⁸

D'autres exemples de dimères de néamine, dont les monomères sont reliés par "chimie click" ou par un bras méthylène disulfure, ont été synthétisés et leur K_D ont été respectivement mesurées pour l'ARN viral TAR¹³⁰ et l'ARN viral RRE.¹³³ Une fois encore, il a été démontré que les dimères possédaient une meilleure affinité pour l'ARN que les monomères correspondants, à condition d'utiliser un bras espaceur adéquat, permettant aux deux monomères de se fixer dans leurs sites respectifs. Ceci démontre bien l'intérêt de s'appuyer sur la promiscuité des différents sites de fixation des aminoglycosides pour concevoir des ligands puissants.

I - 3) Conjugués intercalants-aminoglycosides

Les bénéfices des groupements intercalants ont également été utilisés pour étudier les phénomènes de reconnaissance entre les aminoglycosides et des régions en duplex de l'ARN. Par cette approche, on peut espérer tirer parti d'une double interaction. D'une part, les interactions se déroulant entre l'aminoglycoside et la boucle. De l'autre, celles impliquant le groupement intercalant et l'hélice.

En partant de ce constat, l'équipe de Tor a synthétisé des analogues de la néomycine, modifiés de façon covalente en position 5" du cycle III, par un groupement acridine.^{134,135} Des dérivés néomycine-acridine ont pu être synthétisés en suivant la voie de synthèse schématisée en figure II.5. Une fois encore, en raison des nombreuses fonctions réactives présentes sur les aminoglycosides, des étapes successives de protection et déprotection ont dû être réalisées afin de mener au composé désiré. Les deux premières étapes correspondent à la protection des amines par des groupements -Boc, puis de la protection de l'alcool en position 5" du cycle III par un groupement triphenylsilane. Cette fonction alcool conduit ensuite au composé thiolé correspondant avec réaction avec la cystéamine. L'introduction de ce bras espaceur thiolé porteur d'une fonction amine permet donc de faire réagir la néamine avec le 9-phenoxyacridine et ainsi introduire ce groupement intercalant. Après déprotection de toutes les fonctions amine et alcool, le composé néo-acridine **1** a pu être isolé avec un rendement de 80 %.

FIGURE II.5 – Synthèse de la néo-acridine **1**

Plusieurs exemples de dérivés acridine ont été synthétisés en suivant ce protocole (figure II.6). Ces molécules ont ensuite été étudiées en présence de l'ARN viral RRE. L'action combinée du groupement s'intercalant entre les bases de l'ARN et de l'interaction de la néomycine avec l'ARN a permis d'aboutir à de très bonnes valeurs de K_D (de l'ordre du nanomolaire), environ 100 fois supérieures à celle de l'aminoglycoside de départ.¹³⁵

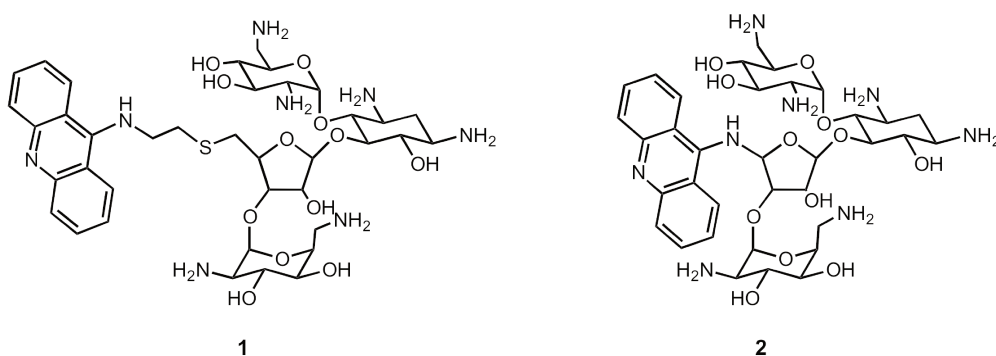


FIGURE II.6 – Exemples de néomycines modifiées par un groupement acridine, synthétisées par l'équipe de Tor.¹³⁴

Hamasaki *et al.* se sont également basés sur la capacité des groupements intercalants à interagir avec les bases des acides nucléiques via des interactions de type π -stacking. Ils ont également synthétisé des néamines modifiées à l'aide de groupement anthracène, acridine ou encore par des cycles aromatiques plus simples. Dans cette étude, le groupe aromatique a été introduit par une réaction de condensation entre l'amine primaire de la néamine et un dérivé N-hydroxysuccinimide du groupement intercalant correspondant (II.7).

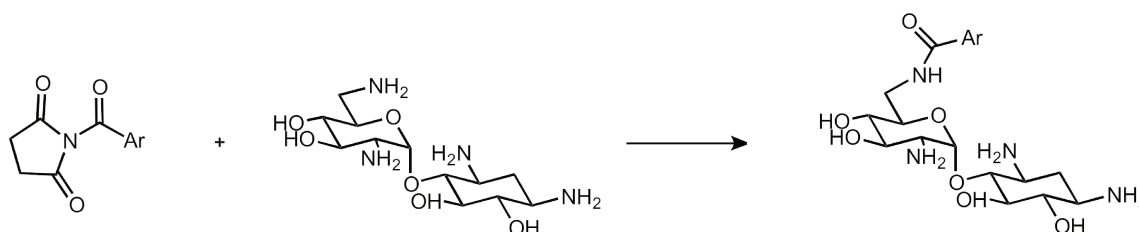


FIGURE II.7 – Approche utilisée par Hamasaki *et al.* pour la synthèse de dérivés intercalants de la néamine

Ces composés ont ensuite été mis en présence d'un ARN viral RRE, et leurs constantes de dissociation ont été mesurée à 25°C par fluorescence dans un tampon 20 mM Tris-HCl pH 7.5 contenant 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl.¹³⁶ Ils ont ainsi montré que les dérivés pyrène de la néamine: PCN, PAN et PBN, (illustrés en figure II.8) possédaient respectivement des constantes de dissociation environ 80, 27 et 70 fois plus basses que la néamine sous forme de monomère. Ces résultats suggèrent que le groupement pyrène stabilise le complexe formé avec l'ARN, en s'intercalant dans le grand sillon ou encore en s'empilant sur les bases des nucléotides.⁹⁹ Ceci peut être considéré comme un biais dans l'étude des constantes de dissociation puisque l'on a ici affaire à une interaction "améliorée", ne correspondant pas rigoureusement aux phénomènes de complexation entre les aminoglycosides et les ARN.

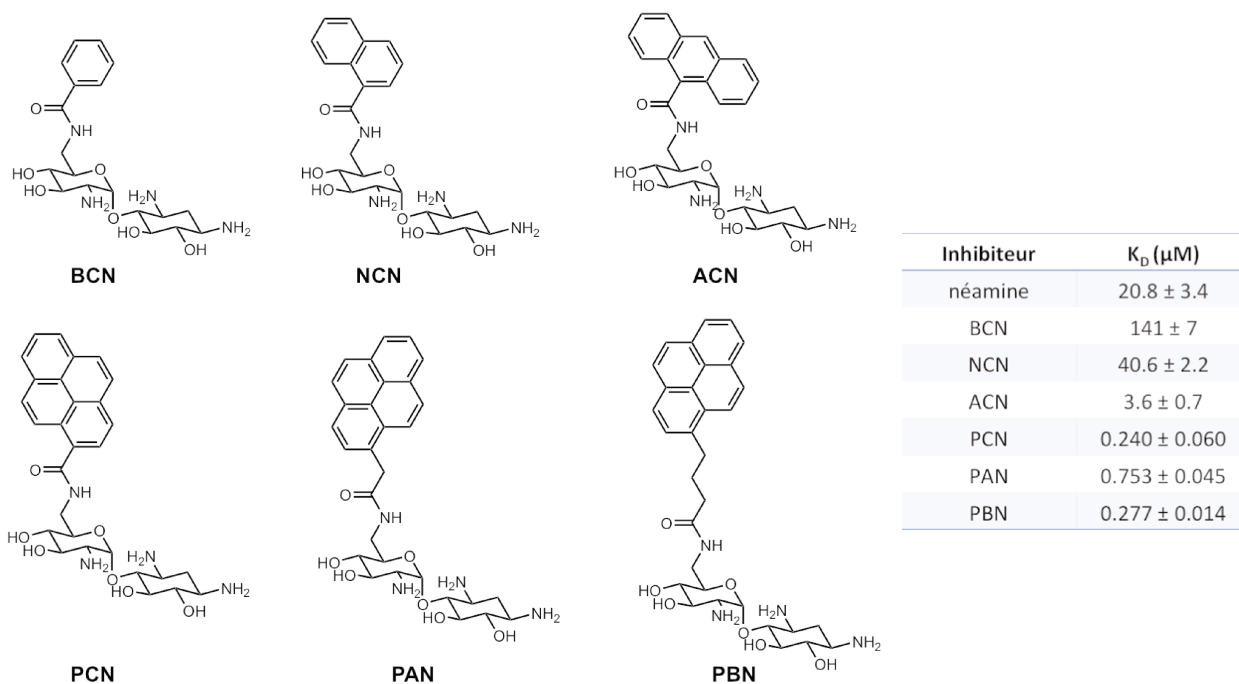


FIGURE II.8 – Analogues de la néamine, fonctionnalisés avec des groupements aromatiques, synthétisés par Hamasaki *et al.*¹³⁶

I - 4) Analogues de la DOS

Pour obtenir de nouveaux ligands du site A du ribosome, une autre méthode consiste à simplifier le squelette hautement fonctionnalisé des aminoglycosides. Les études structurales réalisées sur des complexes aminoglycosides-ARN^{50,63} ont révélé que le cycle 2-deoxystreptamine (DOS) correspondait à la structure minimale requise pour la reconnaissance avec l'ARN. Des études complémentaires ont démontré que des modifications chimiques portées sur les cycles I et II influençaient les interactions avec l'ARN, tandis que les autres cycles (III et IV) sont moins sensibles aux modifications structurales.^{43,64} De ce fait, de nombreux travaux se sont concentrés sur la modification de ce cycle central afin de développer de meilleurs ligands d'ARN.¹³⁷

En se servant des précédents travaux de Yoshizawa, dans lesquels il a été démontré que la DOS était capable de se lier à des tiges-boucles avec des K_D de l'ordre du millimolaire,⁶³ l'équipe de Hergenrother a synthétisé un grand nombre de dimères de la DOS et a étudié leur comportement en présence de structures similaires d'ARN.¹³⁸ Diverses structures d'ARN ont été testées. Parmi elles, des tetra-, hexa-, hepta- et octa-boucles. Les premiers dimères de la DOS synthétisés par Hergenrother et son équipe ont montré de bonnes affinités mais aucune sélectivité pour une structure d'ARN en particulier. Tous ces dimères possédaient un $K_D \approx 6 \mu\text{M}$. La même équipe a ensuite synthétisé une autre librairie de dimères en utilisant une stratégie de synthèse combinatoire par chimie "click".¹³⁹ La stratégie de synthèse utilisée a consisté à réaliser une cycloaddition 1,3-dipolaire entre un analogue alcyne de la DOS (lui-même obtenu après trois étapes de synthèse) et un azoture en présence de Cu^I (figure II.9).

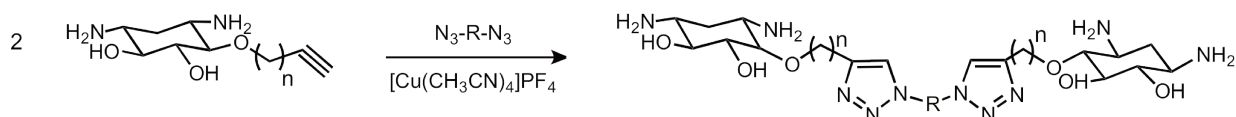


FIGURE II.9 – Approche par chimie "click" pour la synthèse de dimères de DOS.

Parmi tous les composés synthétisés, deux dimères se sont révélés particulièrement sélectifs, l'un du motif tétraboucle l'autre d'une structure octaboucle (figure II.10).

	$K_D = 0.3 \mu\text{M}$	$K_D = 4.8 \mu\text{M}$
	$K_D > 25 \mu\text{M}$	$K_D = 0.3 \mu\text{M}$
Paromomycine	$K_D > 1000 \mu\text{M}$	$K_D > 1000 \text{mM}$

FIGURE II.10 – Deux dimères de DOS, spécifiques d'ARN tétra et octa-boucle.¹³⁹

L'équipe de Wong a également travaillé sur l'élaboration d'une série d'analogues exploitant le motif central de la DOS¹³² (figure II.11). Cette étude se concentre sur la diversification chimique de la position 5 de la DOS afin de tirer parti de son rôle central dans les interactions avec l'ARN. Ils ont ainsi étudié les relations structure-activités d'une bibliothèque de molécules, porteuses de divers groupements amino-, hydroxy-, et aromatiques en position 5 du cycle II de la néamine. Tous les composés montrés en figure II.11 ont été obtenus avec des rendements variants de 13 à 80 %. Toutefois, l'introduction d'un motif variable à cette position a d'abord nécessité la synthèse d'un précurseur de la néamine où toutes les fonctions réactives sont protégées. Comme illustré sur la figure II.12, cinq étapes sont nécessaires à l'obtention de la néamine. Cette néamine protégée subit ensuite deux étapes supplémentaires (une étape d'alkylation puis d'oxydation) avant l'étape clé d'introduction du groupement variable en position 5 de la DOS (figure II.12). Les composés finaux ne sont obtenus qu'après déprotection des fonctions réactives de la néamine. Les K_D de ces molécules ont ensuite été mesurés par SPR en présence de l'ARNr 16S. Parmi toutes les molécules synthétisées, deux se sont particulièrement démarquées (composés **3** et **4**) avec des K_D inférieurs à celui de la néamine. Les K_D des composés **3** et **4** pour l'ARNr 16S sont de 0.8 et 0.5 μM respectivement (contre K_D (néamine) = 7 μM par SPR dans les mêmes conditions).

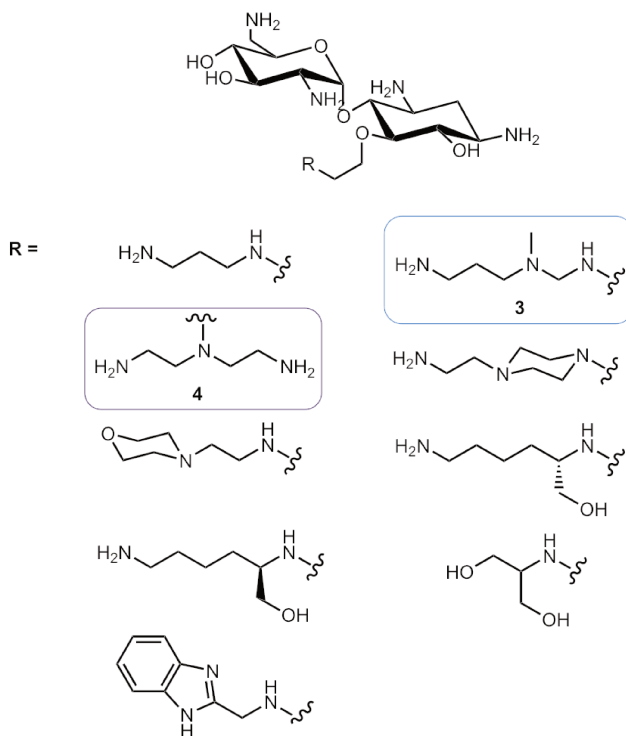
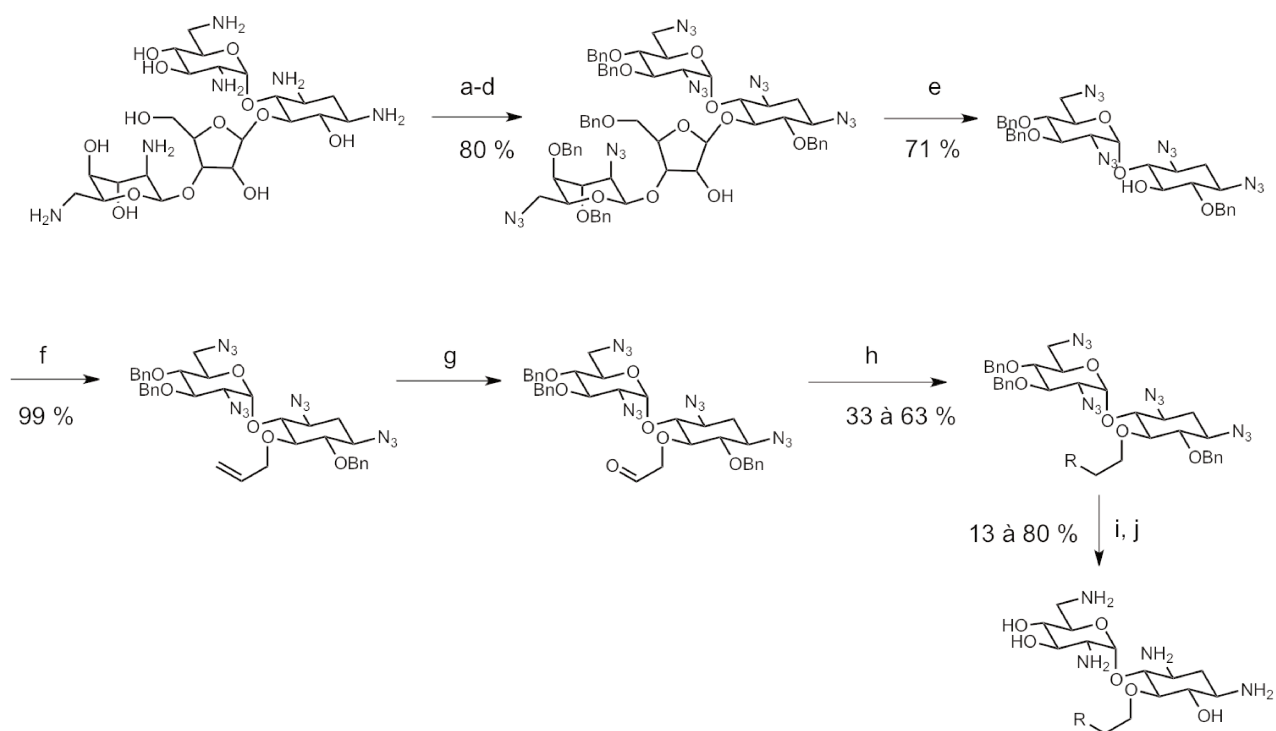


FIGURE II.11 – Analogues de la néamine synthésisés par l'équipe de Wong.¹³²



(a - d) Protection des amines et alcools, (e) Hydrolyse acide de la néomycine, (f) Alkylation en position 5 de la DOS, (g) Oxydation, (h) Addition du motif variable, (i et j) Déprotection des fonctions amine et alcool.

FIGURE II.12 – Voie de synthèse empruntée par l'équipe de Wong pour la synthèse de divers analogues de la néamine fonctionnalisés en position 5.¹³²

Précédemment au laboratoire, des travaux ont également été menés sur l'élaboration de nouveaux ligands d'ARN en utilisant le cycle DOS comme modèle moléculaire (figure II.13). Pour cela, un mime de ce cycle central a été synthétisé: le diaminocyclopentanol (DACP, composé **5**). Un certain nombre d'analogues du DACP ont pu être synthétisés afin d'augmenter la diversité moléculaire de ce fragment.¹⁴⁰ Leurs propriétés de reconnaissance vis-à-vis de diverses structures d'ARN ont ensuite été étudiées.¹⁴¹ L'un d'entre eux, le *cis*-1,3-diamino-4-fluorocyclopentane (DACPF, composé **6**), a été utilisé en tant que sonde rapportrice en RMN ¹⁹F afin de mesurer les K_D de diverses aminoglycosides pour l'ARNr 16S23.¹¹³

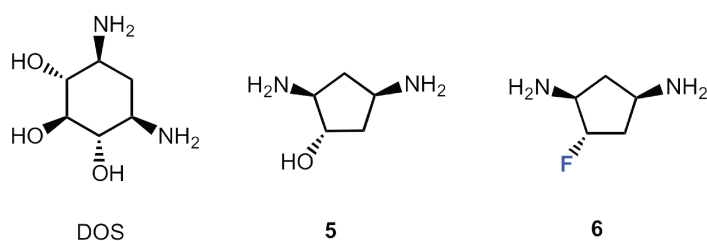


FIGURE II.13 – L'analogue fluoré de la DOS précédemment synthétisé au laboratoire, le DACPF (composé **6**).

Comme nous venons de le voir, de nombreuses stratégies de synthèse ont été employées afin de conduire à des molécules susceptibles de constituer de bons ligands d'ARN. En s'inspirant de la structure des aminoglycosides, de nombreuses modifications fonctionnelles ont été envisagées^{129,132}: changement de la flexibilité conformationnelle de la molécule, modification de la distribution spatiale des fonctions alcools et amines, fonctionnalisation avec des chaînes latérales variées (nucléotides, peptides, chaîne aliphatiques ou aromatiques fonctionnalisées, . . .)¹⁴² Les stratégies de synthèse précédemment mentionnées conduisent toutes à la formation de mime des aminoglycosides avec de bons rendements. L'inconvénient commun à toutes ces méthodes est cependant le nombre d'étapes à réaliser avant de pouvoir obtenir le composé souhaité. En effet, toutes ces méthodes nécessitent de passer par des étapes de protection et de déprotection successives ce qui rend le processus de synthèse long et complexe. L'objectif de cette thèse n'est pas d'élaborer de nouvelles approches de synthèse conduisant à des ligands originaux d'ARN, mais de développer une méthodologie novatrice pour l'analyse des interactions ARN/ligands. C'est pourquoi, nous avons envisagé d'utiliser des approches moins complexes, nous permettant seulement d'aboutir rapidement et facilement aux composés souhaités. Nous allons maintenant voir comment nous avons procédé pour synthétiser des analogues électroactifs des aminoglycosides.

I - 5) Stratégie de marquage utilisée pour une étude électroanalytique

Marquer directement un ARN pour le suivre via une méthode analytique est une stratégie qui s'accompagne de nombreux inconvénients. En effet, la fragilité des ARN et leur tendance à être facilement hydrolysés⁶ demande certaines précautions de manipulation. Ceci rend leur modification chimique réalisable, mais délicate. Par ailleurs, dès que l'on modifie une biomolécule, on prend le risque d'interférer avec son activité biologique,

ses propriétés physicochimiques et donc, avec les mécanismes de reconnaissance. Pour ces raisons, il nous semblait intéressant de développer des sondes externes, capables de se lier avec une grande variété d'ARN et d'être utilisables pour des analyses par voie électrochimique. Notre objectif a donc été de développer de telles molécules en nous appuyant sur l'architecture des aminoglycosides, connus pour être de bons ligands universels d'ARN. Ces sondes permettraient d'étudier par électrochimie les interactions impliquant les ARN sans toutefois nécessiter leur modification chimique.

Le ferrocène (que l'on appellera Fc pour le reste de ce manuscrit) est souvent utilisé pour mener des analyses par voie électrochimique dans des domaines variés de la chimie: catalyseur organométallique, sondes d'ions ou de biomolécules,¹⁴³... La chimie de ce métallocène a été largement étudiée.¹⁴⁴ De ce fait, les stratégies de synthèse impliquant cette molécule sont connues et devraient, en théorie, rendre la synthèse de ces sondes moins complexe. Egalement, le ferrocène est un groupement bien caractérisé électrochimiquement.¹⁴⁵ Plus important encore, la principale raison quant à son utilisation réside dans sa capacité à générer un signal simple et facilement interprétable lors d'études électroanalytiques. D'autre part, bien que présentant des motifs plans, le ferrocène, contrairement aux motifs utilisés en spectroscopies optiques, ne peut pas s'intercaler dans des hélices. Par conséquent, il ne devrait, à priori, pas contribuer à l'interaction entre la sonde et sa cible. Toutes ces considérations font de ce groupement électroactif, un motif de choix pour fonctionnaliser les aminoglycosides. Pour faciliter la voie de synthèse, nous avons souhaité utiliser un aminoglycoside dans son intégralité. Nous avons donc décidé de fonctionnaliser une position qui semble avoir une implication secondaire dans les phénomènes de reconnaissance avec l'ARN. Etant donné que les cycles I et II sont essentiels pour la liaison avec l'ARN,^{58,63} nous avons donc ciblé le cycle IV. Plus particulièrement l'amine en position 6'' du cycle IV des aminoglycosides. Au sein de la paromomycine, cette amine présente comme avantage d'être la seule amine primaire de la molécule non substituée en alpha. Elle est donc plus réactive que les autres amines et constitue une position cinétiquement plus favorable à une modification chimique (position désignée par une flèche verte sur la figure II.14).

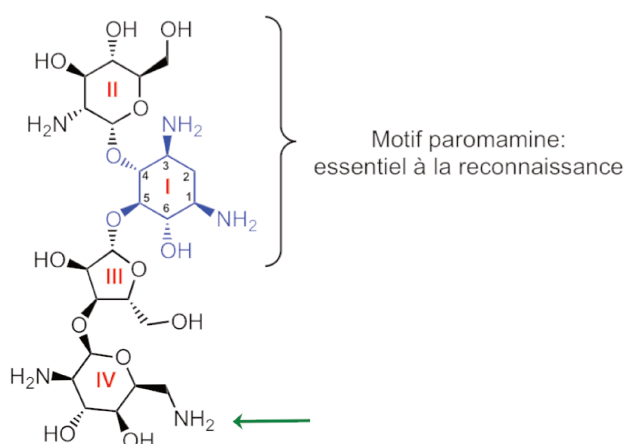


FIGURE II.14 – Stratégie de synthèse d'un analogue électroactif de la paromomycine.

Nous allons maintenant aborder les différentes voies de synthèses empruntées pour mener à trois sondes électrochimiques différentes.

II - Synthèse de sondes électroactives pour l'étude des interactions ARN/ligands

II - 1) Synthèse de la sonde FcPRM

a) Mise au point du protocole de synthèse

Dans le cadre de ce projet de thèse, notre premier objectif a été de synthétiser une sonde électrochimique à partir de la paromomycine (PRM). La synthèse du composé électroactif d'intérêt a initialement été tentée par une amination réductrice (figure II.15). Le sulfate de paromomycine (0,28 mmol ; 1 Eq) a été dissous dans du MeOH (10 mL) donnant ainsi une suspension blanche. Pour solubiliser le réactif, une faible quantité d'eau a donc été rajoutée au mélange réactionnel (0,5 mL). Enfin le carboxaldéhyde de ferrocène (Fc-CHO) est rajouté (0,42 mmol ; 1,5 Eq). Après 30 minutes d'agitation, l'espèce réductrice est additionnée (0,56 mmol, 2 Eq) et le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. Après filtration du brut réactionnel, une analyse par RMN ^1H dans CDCl_3 a uniquement montré la présence de l'aldéhyde de départ. La principale difficulté concernant la synthèse de cette sonde électroactive repose dans une grande différence de solubilité de nos deux réactifs. D'une part, nous disposons d'un composé très apolaire: Fc-CHO. D'autre part, la présence de nombreuses fonctions amines et alcools sur le sulfate de paromomycine en font un composé très polaire. La nature polycationique de ce composé le rend parfaitement hydrosoluble. Réussir à faire réagir ces deux espèces n'est donc pas chose aisée. Afin de trouver les conditions réactionnelles adéquates, différents solvants ont été testés sur le sulfate de paromomycine (PRM. H_2SO_4) tels que le tétrahydrofurane, l'acétate d'éthyle, le dichloroéthane, le toluène, le chloroforme et l'acétonitrile. Tous ces solvants n'ont pas permis de solubiliser le réactif de départ. Basifier le mélange réactionnel avec quelques gouttes de triéthylamine avant d'homogénéiser aux ultrasons s'est également montré inefficace.

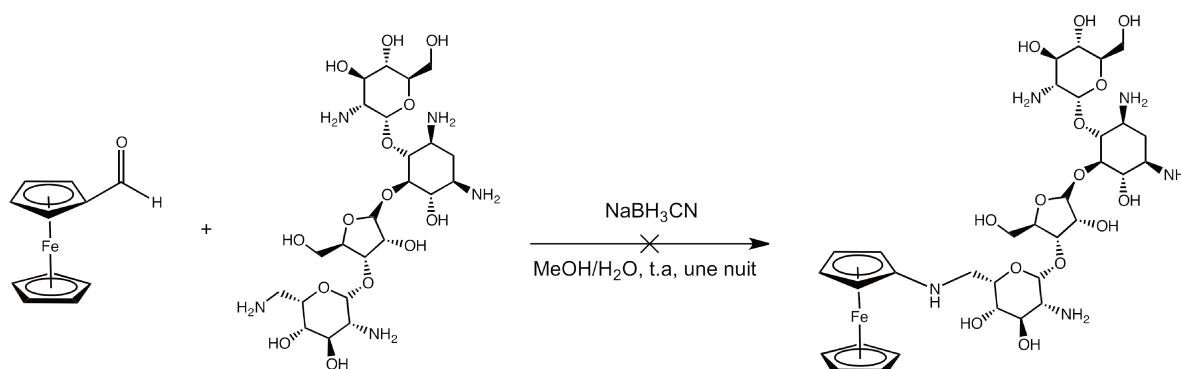
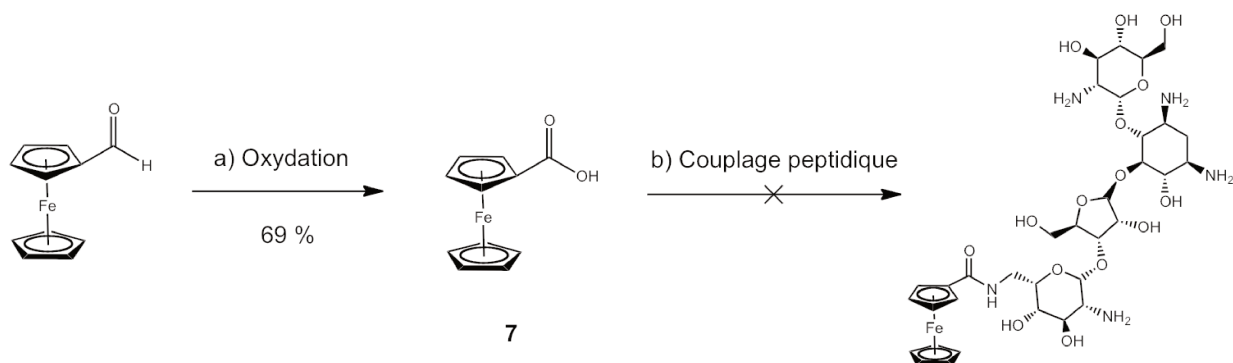


FIGURE II.15 – Essai d'amination réductrice entre le sulfate de paromomycine et le carboxaldéhyde de ferrocène (Fc-CHO).

Une autre stratégie a donc été envisagée. Dans cette nouvelle approche, nous avons préféré partir de l'acide carboxylique de ferrocène (composé **7**) pour le faire réagir avec notre sulfate de paromomycine dans une réaction de couplage peptidique.¹⁴⁶ Le ferrocène **7** a été synthétisé en suivant le protocole décrit par Batsanov *et al.*¹⁴⁷ Une oxydation du carboxaldéhyde de ferrocène par une solution aqueuse de KMnO_4 a tout d'abord permis d'isoler le composé **7** avec un rendement de 69 % (figure II.16). Une fois le ferrocène **7** isolé, celui-ci est mis en présence de sulfate de paromomycine pour effectuer une réaction de couplage

peptidique¹⁴⁶ à l'aide de HOBt et EDCI dans le DMF. Cette fois, aucun problème de solubilité n'a été rencontré. Du fait de la grande polarité de la PRM.H₂SO₄, une purification par chromatographie sur gel de silice n'est pas envisageable. Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation de la HPLC en phase inverse comme méthode de purification. Cette technique devait nous permettre de séparer la fraction du composé **7** en excès et de l'isoler du produit de la réaction grâce à une différence de polarité entre ces deux molécules. L'analyse de notre brut réactionnel aux longueurs d'onde d'absorption du Fc ($\lambda = 340$ nm et 450 nm), n'a pas montré la présence du produit recherché. Cette approche n'ayant pas permis de conduire à la formation du composé désiré, nous avons pensé à utiliser un substrat plus réactif. Nous avons alors décidé d'activer la fonction acide carboxylique du ferrocène **7** en ester pour faciliter sa réactivité avec le sulfate de paromomycine.



a) KMnO₄ aq. , 0°C, acétone puis NaOH 20% ; b) PRM.H₂SO₄, HOBt, EDCI, DMF, t.a, 2h.

FIGURE II.16 – Tentative de couplage peptidique entre le composé **7** et le sulfate de paromomycine

Le composé **7** a donc été activé en ester de N-hydroxysuccinimide en suivant le protocole décrit par Ferapontova *et al.*¹²³ Après une purification par chromatographie sur gel de silice (Et₂O/cyclohexane 80:20), le ferrocène sous forme d'ester activé (composé **8**) a pu être isolé avec 82 % de rendement (figure II.17). Une fois l'ester ferrocénique **8** obtenu, un nouvel essai de couplage avec le sulfate de paromomycine a été réalisé en suivant un protocole décrit par Wang *et al.*⁹⁸ Dès l'addition du ferrocène au milieu réactionnel, nous avons pu observer l'apparition d'un précipité de couleur orange. Une analyse du brut réactionnel par HPLC en phase inverse a pu montrer que seul le composé **8** de départ était présent. Ceci peut s'expliquer par une mauvaise solubilité des réactifs dans ces conditions réactionnelles.

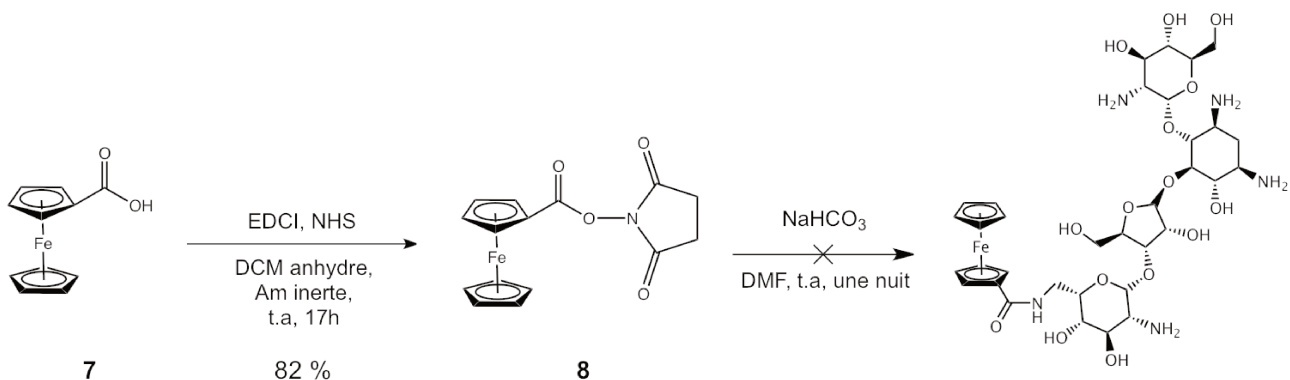


FIGURE II.17 – Synthèse de la sonde électroactive à partir de l'ester activé Fc-NHS (composé **8**).

Afin de favoriser la réaction entre le dérivé ferrocène **8** et l'amine primaire du sulfate de paromomycine, nous avons voulu travailler dans un milieu réactionnel au pH contrôlé. En effet, un pH basique est requis pour que l'amine joue bien son rôle de nucléophile et attaque l'ester du ferrocène. Cette même réaction a donc été testée en milieu tamponné grâce à un mélange DMF/tampon phosphate à pH 8 (35:65) (figure II.18). Jusqu'alors, les réactifs étaient utilisés en proportions quasi-équimolaires. De ce fait, la stoechiométrie des réactifs a également été changée pour tenter d'améliorer la réactivité (1 eq. de composé **8** pour 5 eq. PRM.H₂SO₄). De nouveau, la réaction a été suivie au cours du temps par HPLC. Au fil des heures, le milieu réactionnel contenait toujours le ferrocène **8** de départ sans mener à l'apparition d'une nouvelle espèce. Le mélange réactionnel étant biphasique dans ces conditions, la molécule attendue n'a pu être obtenue. La même réaction, répétée en chauffant à 60 °C, n'a également pas permis d'obtenir le produit.

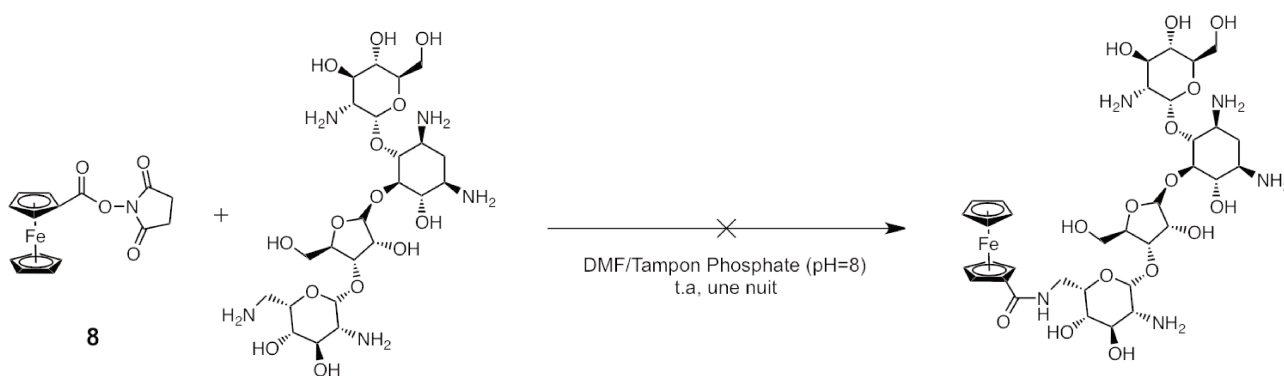
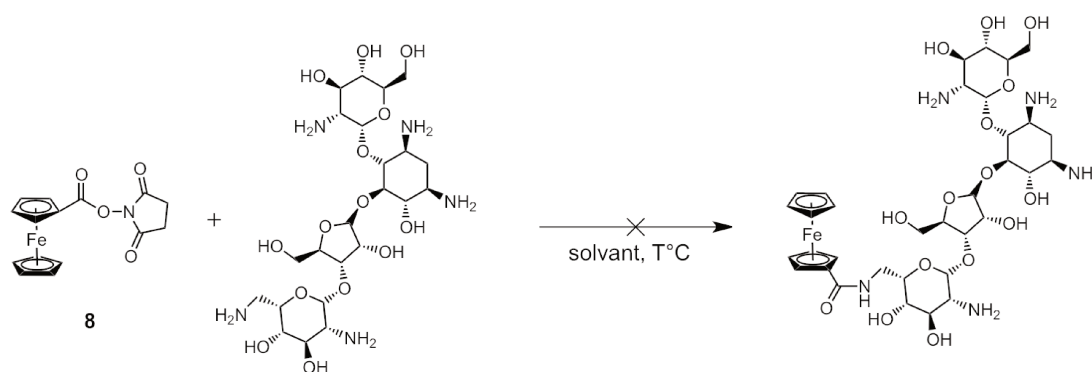


FIGURE II.18 – Essai en milieu tamponné au phosphate à pH 8 en présence de DMF

Nous l'avons mentionné, l'absence du produit pourrait s'expliquer par le fait que le milieu réactionnel n'était pas suffisamment homogène dans ces conditions. D'autres conditions réactionnelles ont été testées afin d'améliorer la solubilité des réactifs, et sont résumées dans le tableau II.1. Les paramètres ayant fait l'objet de modifications sont la stœchiométrie des réactifs, le solvant et la température. Pour chaque essai, un suivi par HPLC en phase inverse a été effectué en comparant le temps de rétention du dérivé ferrocénique **8** libre au temps de rétention du brut réactionnel. Pour permettre l'élution en HPLC analytique, nous avons utilisé une colonne C18 et utilisé un gradient acétonitrile à 0,1 % en acide trifluoroacétique, évoluant de 0 à 100 % dans l'eau pendant 40 minutes. Du fait de la forte polarité de la paromomycine, le produit résultant devrait posséder un temps de rétention plus court que celui du ferrocène **8** n'ayant pas réagi. Dans chacun de nos essais, aucune espèce possédant un temps de rétention plus court n'a pu être observée en détection UV, aux longueurs d'onde d'absorption $\lambda = 340$ et 450 nm. Pour chacun des paramètres modifiés, les réactions ne semblaient pas évoluer au cours du temps.

Tous les essais menés jusqu'à présent nous ont amené à penser que le pH pourrait jouer un rôle clé dans cette réaction. En se plaçant à pH acide les fonctions amine de la PRM.H₂SO₄ seraient sous forme d'ammonium NH₃⁺ et non sous forme NH₂ diminuant alors l'aspect nucléophile de l'amine primaire censée réagir avec notre ferrocène. Pour les expériences suivantes, nous avons donc décidé de travailler avec la paromomycine base (paromocycine "free-base") et non sous forme de sulfate (forme commerciale). Pour cela, une



Entrée	Stoechiométrie	Solvant	Température(°C)	Temps	Aspect	Rendement
1	1:4	NaHCO ₃ aq./DMF (58:42)	t.a	une nuit	précipité orange	-
2	1:1.5	NaHCO ₃ aq./DMF (1:2)	t.a	une nuit	soluble	-
3	1:5	DMF/tampon phosphate (35:65)	t.a	une nuit	précipité orange	-
4	1:5	DMF/tampon phosphate (35:65)	60 °C	une nuit	précipité orange	-

 TABLE II.1 – Récapitulatifs des conditions utilisées dans la réaction entre le composé **11** et PRM.H₂SO₄.

résine échangeuse de cation de type Amberlite IRA-400 (OH⁻) a été utilisée (figure II.19). Comme décrit dans le protocole élaboré par Nogueira *et al.*,¹⁴⁸ le pH de chaque fraction a été vérifié et seules celles ayant un pH de 9 ont été conservées. Toutes ces fractions ont été rassemblées et lyophilisées, aboutissant à un solide blanc. Une analyse par RMN ¹H dans D₂O a confirmé l'obtention de la paromomycine basique **9**. L'utilisation de cette résine s'est avérée pratique, évitant ainsi l'utilisation d'un milieu tamponné à pH basique ou encore une vérification régulière du pH au cours des réactions. L'inconvénient de cette technique repose cependant dans le faible rendement obtenu. A chaque utilisation de cette résine, seule la moitié de la quantité initiale parvient à être récupérée sous forme "free-base".

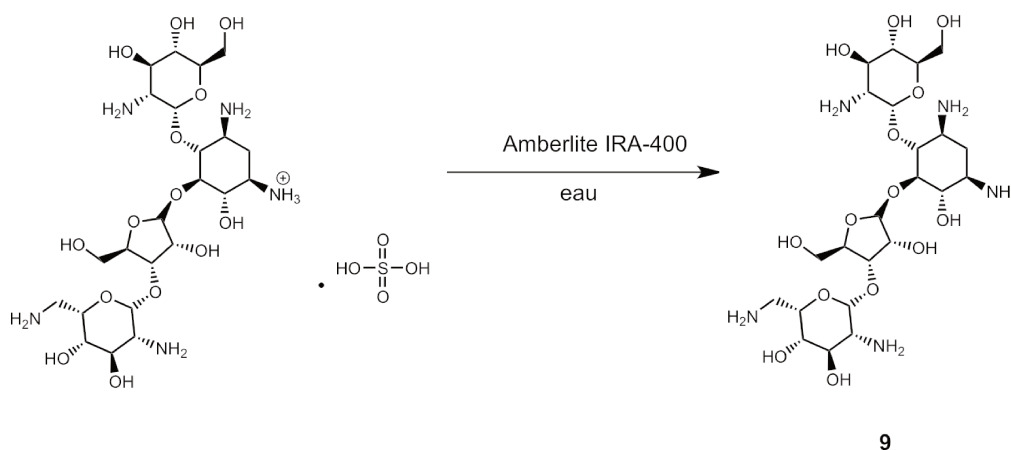


FIGURE II.19 – Utilisation d'une résine échangeuse de cation Amberlite IRA-400.

Dès lors, nous avons choisi d'utiliser la paromomycine dépourvue de ses contre-ions (PRM free-base) afin de la fonctionnaliser par un groupement ferrocène. Pour parvenir à la synthèse de la sonde électroactive désirée, une stratégie inspirée de celle décrite par Yan *et al.*¹⁴⁹ a été utilisée. Leurs travaux ont mis en évidence la fonctionnalisation de la position 6' de plusieurs aminoglycosides grâce à l'utilisation de dérivés de la N-hydroxysuccinimide, activés sous forme d'ester (figure II.20).

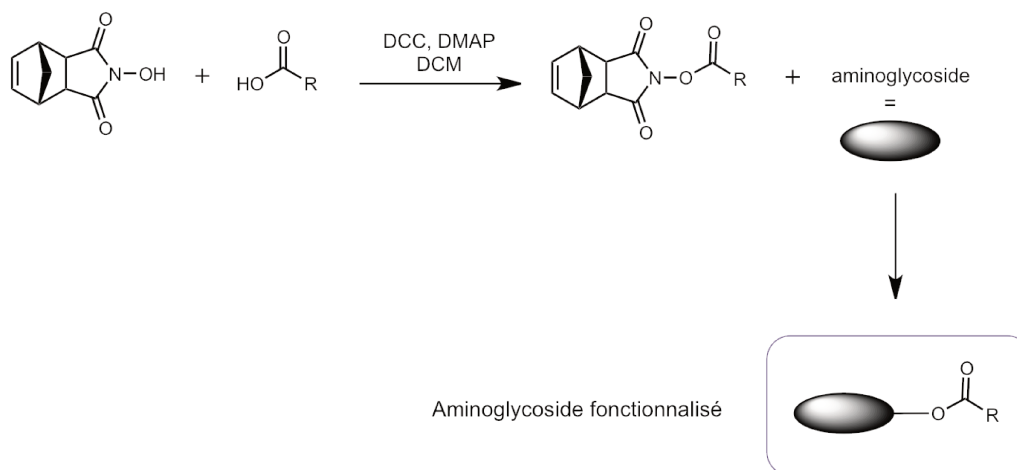


FIGURE II.20 – Stratégie employée par Yan *et al.*¹⁴⁹ afin de fonctionnaliser les aminoglycosides.

Nous nous sommes donc inspiré de cette approche pour synthétiser un dérivé ferrocénique de la N-hydroxysuccinimide, qui sera ensuite employé pour fonctionnaliser la paromomycine. La première étape a été réalisée selon le schéma réactionnel de la figure II.21. Le ferrocène **7** et l'endo-N-Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide (composé **10**) ont été dissous dans un mélange CH₂Cl₂/DMF (8:1). Après complète solubilisation de ces deux réactifs, un agent de couplage (EDCI) et une base (DMAP) ont été rajoutés au mélange réactionnel. Après agitation pendant une nuit à température ambiante le nouvel ester ferrocénique **11** a pu être isolé avec un rendement de 46 %.

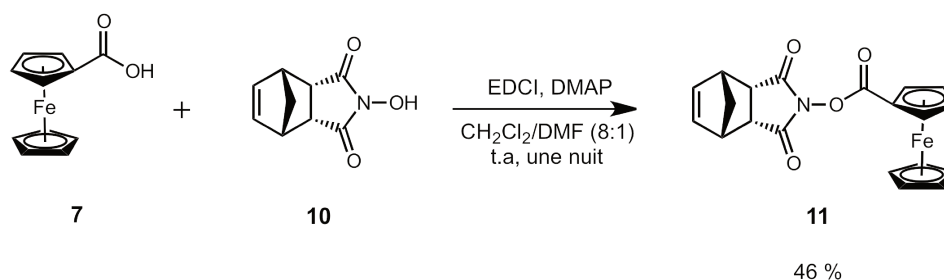
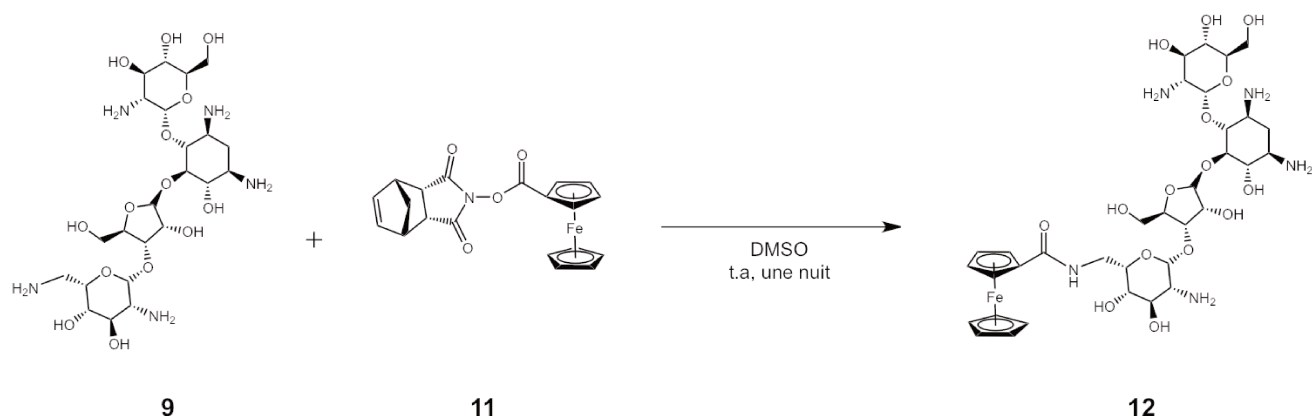


FIGURE II.21 – Synthèse du ferrocène **11**.

Une fois l'ester **11** synthétisé, nous avons procédé aux essais de couplage avec la PRM-free base **9**. Jusqu'à présent, les solvants utilisés rendaient le milieu réactionnel peu homogène, pouvant expliquer la mauvaise réactivité. Pour ce nouvel essai, le DMSO a été choisi comme solvant de la réaction même s'il s'avère difficile à éliminer (figure II.22). Nous avons décidé de combiner les réactifs avec une stoechiométrie 1:0.8 (paromomycine **9**: ferrocène **11**) et cette fois, le mélange réactionnel est apparu parfaitement limpide et homogène. L'aspect homogène du milieu réactionnel nous a poussé à suivre cette réaction par HPLC.

FIGURE II.22 – Synthèse de la sonde électroactive FcPRM (composé **12**)

b) Purification de la sonde FcPRM

Dans toutes les réactions précédemment mentionnées, la conversion des produits de départ a été suivie par HPLC. En raison de la grande polarité du composé d'intérêt, nous sommes focalisés sur l'utilisation de cette méthode qui nous semblait être la plus adaptée pour suivre et purifier les produits de réaction. Dans un premier temps, tous les bruts réactionnels ont été analysés par HPLC analytique en phase inverse sur colonne C18. Le système d'éluion utilisé a été le suivant:

- solvant A: H₂O + TFA 0.1%
- solvant B: CH₃CN + TFA 0.1%

L'éluion a suivi un gradient de 0 à 100 % en CH₃CN + 0.1 % TFA sur une durée de 20 minutes et à une température de 25 °C. Les profils d'éluion ont été observés à une longueur d'onde de 210 nm.

Le suivi de l'avancement des réactions par HPLC s'est avéré complexe. Les mélanges réactionnels étant souvent biphasiques, les échantillons prélevés et observés par HPLC étaient peu représentatifs des réactions en cours. En utilisant le DMSO, l'homogénéité du milieu réactionnel a été nettement améliorée et nous avons ainsi pu envisager un bon suivi de la réaction par HPLC. La réaction précédemment illustrée en figure II.22, a été suivie par HPLC analytique selon le mode d'éluion précédemment mentionné. L'apparition d'un très faible pic possédant un temps de rétention $t_r = 2.5$ min (contre $t_r = 3.8$ min pour Fc-NBD seule comme référence) à $\lambda = 210$ nm nous a encouragé à croire qu'il s'agissait du produit attendu: la PRM acylée par un groupement ferrocène (figure II.23).

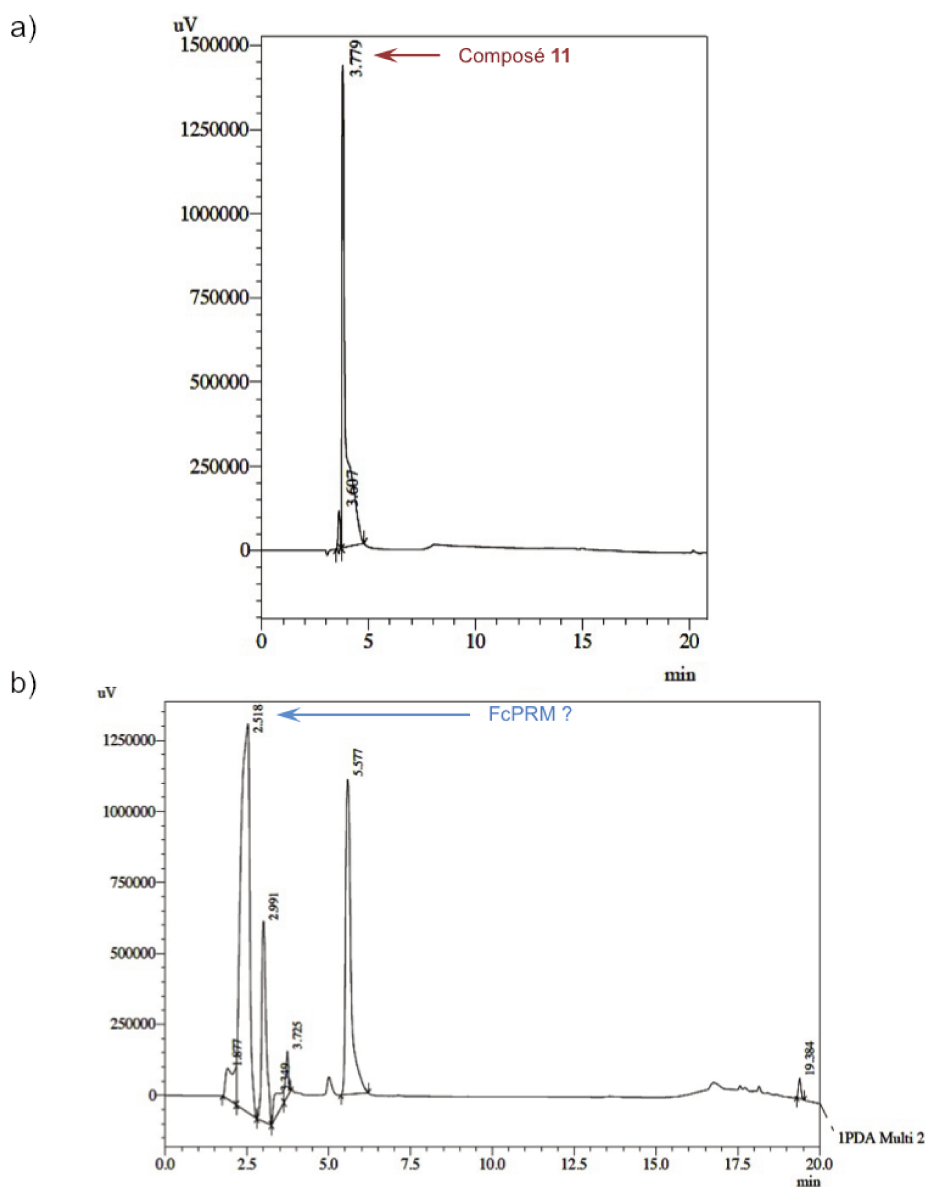


FIGURE II.23 – Profils d'élution HPLC observés à 210 nm pour a) Le dérivé ferrocène **11** seul, après élution sur 20 minutes b) brut réactionnel de la réaction conduisant à la sonde électroactive, après élution sur 20 min.

Nous avons donc entrepris une purification de ce brut réactionnel par HPLC semi-préparative en utilisant les mêmes conditions d'élution et la même colonne C18. La purification s'est avérée délicate en raison des temps de rétention très proches entre le pic du produit de réaction et celui du produit de départ. L'obtention du produit sous forme très diluée après élution et l'étape de lyophilisation qui s'en est suivie, nous ont malheureusement empêché de l'isoler en quantité suffisante pour pouvoir identifier sa nature exacte. Ceci nous a conduit à douter de la nature du composé élué à $t_r = 2.5$ min, et à penser que la synthèse de cette sonde ne pouvait être réalisée dans ces conditions réactionnelles.

Ce n'est qu'en répétant cette réaction à l'identique et en prenant un échantillon du brut réactionnel afin de l'analyser par spectrométrie de masse, que nous avons pu observer un pic de l'ion moléculaire possédant une valeur m/z correspondant au produit de réaction attendu (figure II.24).

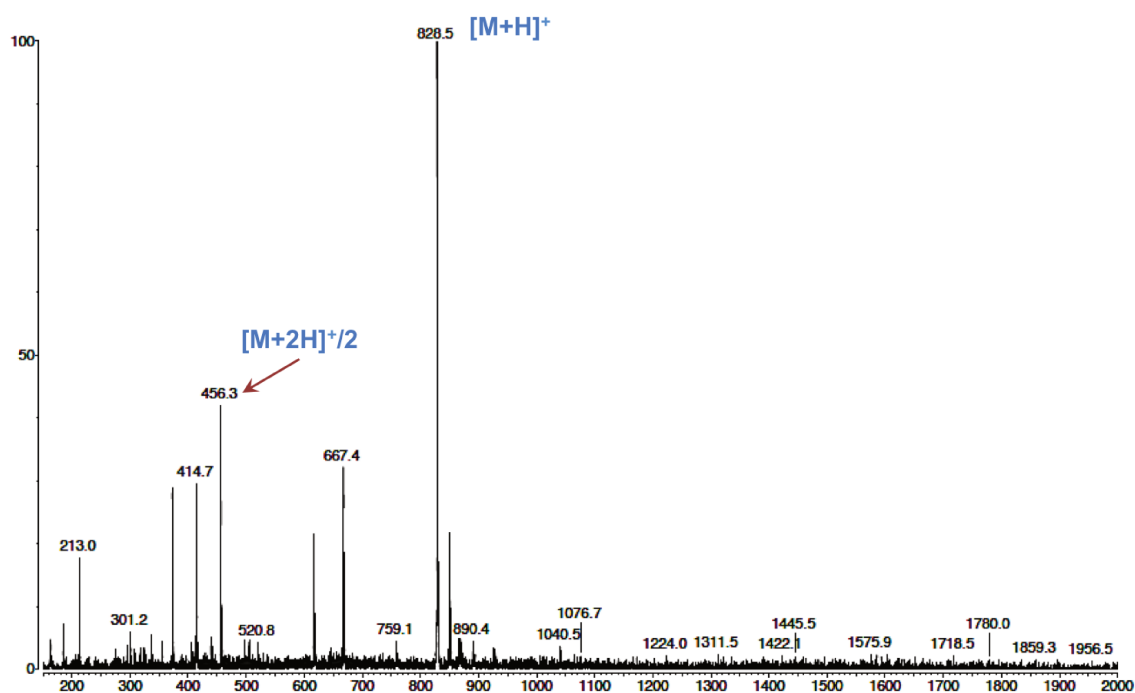


FIGURE II.24 – Spectre de masse du brut réactionnel contenant la sonde FcPRM, obtenu par ESI-MS (ESI⁺)

Le produit souhaité semble donc se former, mais la principale difficulté repose essentiellement sur l'élaboration d'une méthode permettant de l'isoler. Nous nous sommes alors tournés vers l'utilisation de la chromatographie flash sur gel de silice. Sainlos *et al.*¹⁵⁰ et Mével *et al.*¹⁵¹ ont précédemment réussi une purification par colonne sur des composés similaires. Après agitation à température ambiante pendant une nuit, le brut réactionnel a été concentré sous pression réduite pour éliminer le DMSO au maximum. Le brut réactionnel a ensuite été purifié sur gel de silice en utilisant un mélange CHCl₃/MeOH/NH₄OH 28 % (2:2:1). Les fractions récupérées ont ensuite été lyophilisées à plusieurs reprises et ont permis d'obtenir un solide jaune. Une caractérisation complète de cette molécule nous a permis de confirmer qu'elle correspondait bien à la paromomycine fonctionnalisée par une fonction ferrocène, (composé **12**). Malgré un rendement modeste de 32 %, nous avons été en mesure d'isoler cette sonde électroactive. Pour l'heure, ce rendement nous est apparu satisfaisant puisque l'objectif de la thèse n'est pas d'élaborer un protocole de synthèse optimisé pour cette molécule mais d'étudier les interactions entre l'ARN et divers ligands par voie électrochimique. Nous appellerons cette molécule FcPRM pour la suite de ce manuscrit.

Toutefois, en raison de la forte proportion en méthanol et ammoniac dans le système d'éluant utilisé lors de la purification, nous sommes en mesure de suspecter la présence de silice dans notre produit final. Pour la préparation de solutions en sonde FcPRM en vue d'analyses électrochimiques, la quantité réelle de produit restera donc à confirmer par voltammétrie cyclique. Nous expliquerons dans le chapitre 3 comment nous avons réussi à vérifier l'exactitude des concentrations lors des mesures électrochimiques en reliant la concentration au courant mesuré. Cette méthode de séparation nous a néanmoins permis d'isoler le produit désiré et nous disposons maintenant d'une méthode pour isoler cette molécule. Ceci nous permettra à l'avenir d'explorer cette réaction et de l'optimiser. Cette méthode de purification a été utilisée pour les autres sondes électroactives synthétisées.

II - 2) Synthèse de Fc-néamine

En parallèle, nous avons procédé à la synthèse d'une deuxième sonde électroactive en série néamine. La néamine **13** a préalablement été obtenue par dégradation en milieu acide de la néomycine commerciale (figure II.25). Pour cela, nous nous sommes inspirés du protocole publié par l'équipe de Wong.¹⁵² La néomycine a été ajoutée à un mélange MeOH/HCl (12.1 M) 9.2:1 et le tout a été porté au reflux pendant 4 heures. Après refroidissement à température ambiante pendant une nuit, un précipité a été obtenu. Après filtration, le chlorhydrate de néamine **13** a pu être isolé avec un rendement de 43 %. Dans une seconde étape, la néamine **13** a été passée sur résine échangeuse de cations afin de la débarrasser de ses contre-ions et d'isoler la néamine sous forme base **14**. La méthode employée a été la même que pour la paromomycine **9**. Une résine échangeuse de cations Amberlite IRA-400 a été utilisée, et la néamine-base **14** a ainsi été isolée avec un rendement de 60 %.

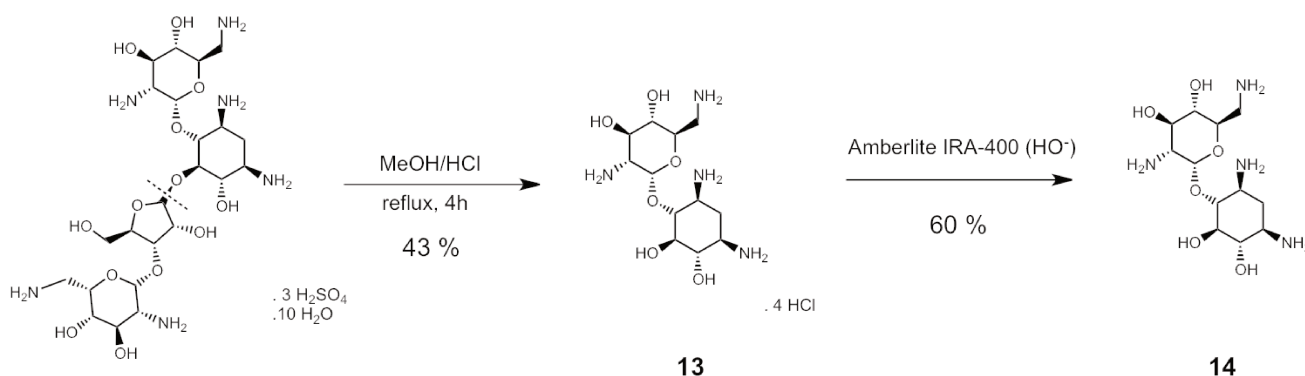


FIGURE II.25 – Synthèse de la néamine free-base.

Comme pour la synthèse de la sonde FcPRM **12**, nous avons envisagé de fonctionnaliser l'unique amine primaire de la molécule par un groupement ferrocène. Après avoir isolé la néamine-free base **14**, un premier essai d'acylation en présence du ferrocène activé a été réalisé (cf figure II.26). Le protocole utilisé a été inspiré des travaux de Roestamadji *et al.*¹⁵³ Nous avons mis la néamine **14** (11,9 mmol ; 1 eq.) en présence du dérivé ferrocène **11** (11,9 mmol ; 1 eq.) dans du dioxane (1,44 mL). Cette première tentative n'a pas permis d'obtenir le produit attendu en raison d'une mauvaise solubilité du ferrocène **11** dans ce solvant.

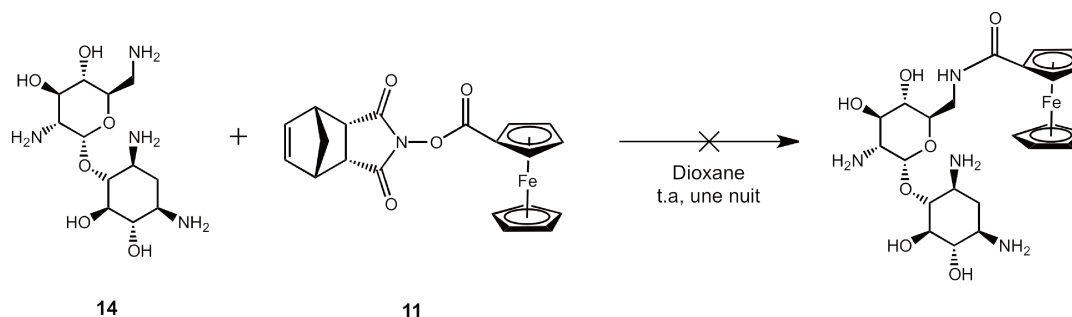


FIGURE II.26 – Essai de synthèse de la néamine dans le dioxane

Un autre essai d'acylation a été réalisée à l'aide d'un chlorure d'acide de ferrocène **15**. Ce ferrocène **15** a été mélangé à la néamine-base **14** en présence d'une base et la réaction a été réalisée dans des conditions de Schotten-Baumann. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, le brut réactionnel a été concentré au maximum avant d'être purifié en utilisant le protocole précédemment décrit dans le paragraphe II-1)b). Après purification sur colonne à l'aide d'un éluant $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (5:3:1), le produit attendu **16** a pu être isolé avec un rendement de 25 %. Nous sommes donc parvenus à synthétiser une deuxième sonde électroactive que l'on appellera maintenant Fc-néamine.

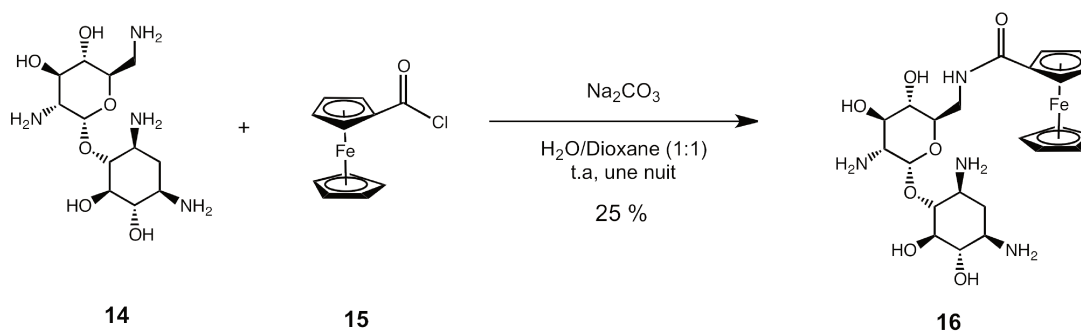


FIGURE II.27 – Synthèse de la sonde Fc-néamine **16**.

II - 3) Synthèse de FcDACP

Précédemment au laboratoire, le composé *cis*-1,3-diaminocyclopentanol (DACP) (composé **5** sur la figure II.28) a été largement étudié et utilisé comme motif de départ pour l'élaboration d'une grande variété de molécules permettant de mimer les aminoglycosides. Ce fragment, obtenu par désymétrisation d'hydrazines bicycliques,¹⁵⁴ constitue un mime simplifié du cycle central de la DOS vis à vis d'acides nucléiques^{155,156} ou d'enzymes de modification d'aminoglycosides.¹⁵⁷ L'intérêt de ce mime simplifié d'aminoglycosides a conduit notre équipe à augmenter la diversité moléculaire de ce fragment diaminocyclopentanol, par exemple en introduisant un atome de fluor pour des études RMN ^{19}F ^{113,140,141} ou dans notre cas avec un groupement ferrocène, afin de réaliser des études sur les phénomènes de reconnaissance entre les ARN et de petits ligands. Parallèlement aux réactions d'acylation menées jusqu'alors sur les aminoglycosides, nous avons donc cherché à synthétiser une troisième sonde électrochimique en partant de ce composé **5**.

La synthèse de l'aminocyclopentanol **5** se déroule en trois étapes (cf figure II.28). La première étape met en jeu une réaction de Diels-Alder entre le cyclopentadiène **17** fraîchement distillé à partir de son dimère, et son diénophile **18** selon un protocole décrit par l'équipe de Meyers.¹⁵⁸ L'hydrazine bicyclique **19** résultant de cette cycloaddition est ensuite hydroxylée à l'aide d'une réaction d'hydroboration suivie d'un traitement à l'eau oxygénée. La stéréosélectivité de cette réaction (dihydroxylation sur la face *exo* de l'hydrazine) est parfaitement contrôlée grâce à l'encombrement stérique causé par un des deux groupements carbamate qui vient pointer vers la face *endo*. Le composé composé intermédiaire **20** obtenu, peut alors être ouvert par hydrogénéolyse catalysée au palladium sur charbon afin de donner le DACP **5** avec un bon rendement de 68 % sur trois étapes. Une fois cette molécule obtenue, les amines sont protégées par des groupements Boc. La fonction OH du dicarbamate **21** obtenu peut ensuite être impliquée dans diverses réactions.

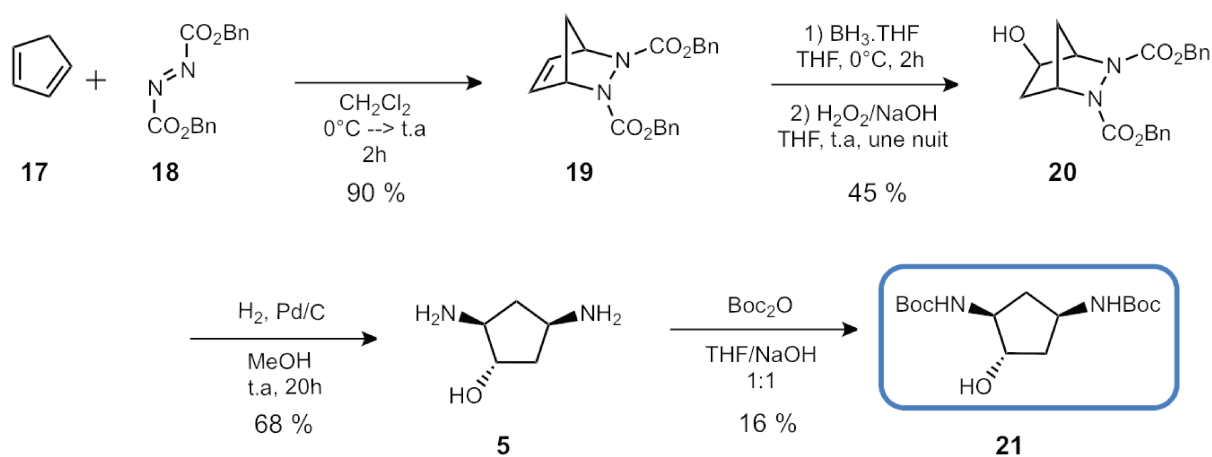


FIGURE II.28 – Voie de synthèse du dicarbamate **21**.

Dans le cadre de notre projet, nous avons donc décidé de fonctionnaliser le dicarbamate **21** avec le dérivé ferrocénique **7** afin d'aboutir à une troisième sonde électrochimique (figure II.29). Ici encore, la synthèse de la sonde se fait via un couplage pseudopeptidique.¹⁵⁹ Sous atmosphère inerte, le dicarbamate **21** et l'acide carboxylique de ferrocène **7** sont mélangés dans du THF en présence de DMAP et EDCI. Un premier intermédiaire ferrocène **22**, a pu être isolé avec un rendement de 36 %. L'étape finale de déprotection a été réalisée en milieu acide pour conduire à la molécule finale **23**, Fc-DACP, qui a pu être isolée avec un rendement de 22 %. Contrairement aux réactions précédentes impliquant des molécules hydrosolubles, la synthèse de cette sonde s'est avérée moins difficile puisqu'aucun problème de solubilité n'a été rencontré. Toutefois, les étapes de protection et de déprotection successives ont conduit à un rendement très modéré.

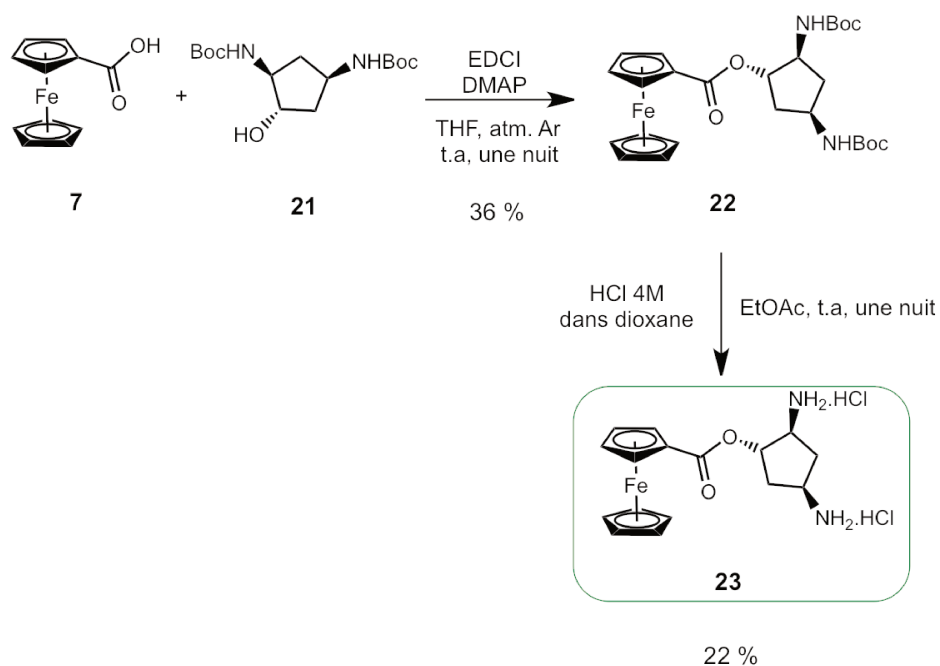


FIGURE II.29 – Synthèse de la sonde Fc-DACP **23**.

III - Etudes de complexation entre ARN et sonde FcPRM

III - 1) L'ARNr 16S23 et l'aptamère à la néomycine

Dans le cadre de ce projet de thèse, nous avons décidé de nous focaliser sur l'étude de deux ARN: l'ARNr 16S23, que nous avons déjà décrit dans le chapitre I, et un aptamère à la néomycine.

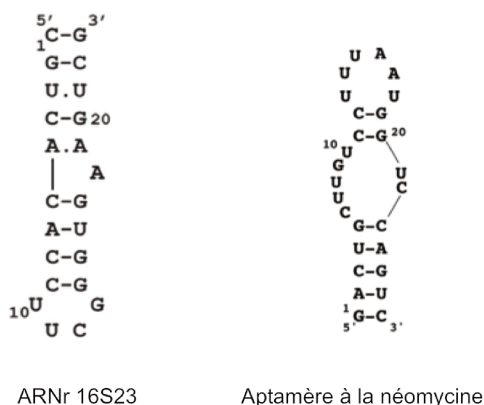


FIGURE II.30 – Structures d'ARN étudiées.

Les aptamères sont des acides nucléiques provenant d'une sélection *in vitro* par la méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment).¹⁶⁰ Cette technique consiste à rechercher des séquences spécifiques d'une cible dans une banque d'oligonucléotides aléatoires. Comme illustré sur la figure II.31, elle comprend différentes étapes:

1. Des séquences d'ARN ou d'ADN aléatoires sont incubées avec la cible d'intérêt.
2. et 3. Seules les séquences capables de reconnaître la molécule cible sont conservées, tandis que les autres sont écartées.
3. Les séquences qui ont été conservées sont ensuite amplifiées par PCR.
4. Enfin, ces oligonucléotides sont clonés et séquencés.

L'enchaînement de ces étapes constituent un cycle SELEX et plusieurs cycles doivent être répétés (environ 8 à 20 fois), jusqu'à ce que les candidats ARN ou ADN présentant l'affinité la plus forte pour la cible soient isolés. Ces candidats portent le nom d'aptamères. Depuis une dizaine d'années, la méthode SELEX a été utilisée pour générer des aptamères dirigés contre des molécules-cibles de structure et de taille extrêmement variables¹²⁸ telles que des acides nucléiques, des petites molécules organiques (ex : l'ATP, la L-tyrosinamide, . . .) et des cibles plus complexes comme des récepteurs membranaires ou des cellules entières.¹⁶¹

Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé un aptamère à la néomycine qui a été développé par le Prof. Beatrix Suess.¹⁶² Cet aptamère a été étudiée au laboratoire au cours de la thèse de Thomas Lombès, et c'est pourquoi compléter ses résultats à l'aide d'analyses électrochimiques s'est avéré intéressant.

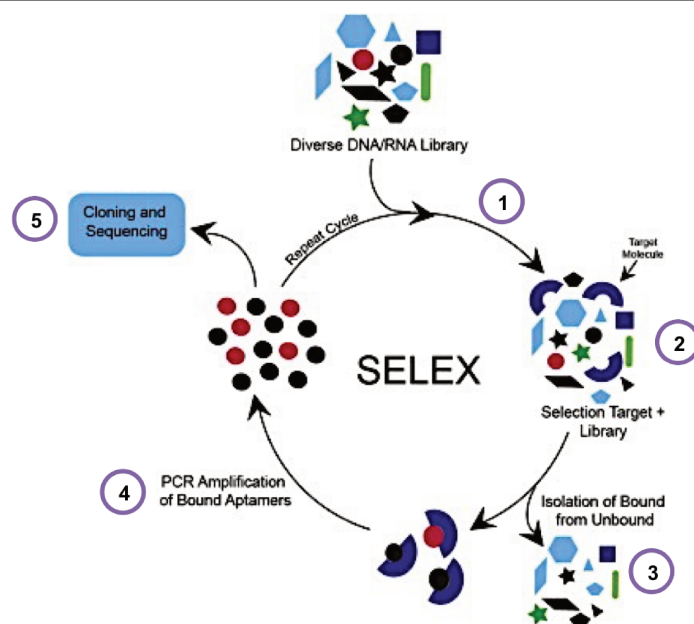


FIGURE II.31 – Principe de la méthode SELEX, adapté de.¹⁶⁰

Certains aptamères sont connus comme étant capables de se lier spécifiquement à des molécules possédant des fonctions pharmaceutiques. Les aptamères peuvent donc être utilisés comme des biocapteurs permettant d'analyser la présence de certaines molécules en solution.^{124,126,163} D'ailleurs, de récents travaux ont été publiés par Ferguson *et al.*, dans lesquels des aptamères immobilisés sur une surface d'or ont été développés pour permettre la détection de quantités submicromolaires de tobramycine par voie électrochimique.¹²⁵ Il nous est donc paru intéressant de tirer parti de cette caractéristique des aptamères pour développer une méthode de détection électroanalytique, applicable cette fois en phase homogène.

III - 2) Etudes des interactions entre la sonde FcPRM et l'ARN par RMN

a) Caractérisation du complexe sonde FcPRM/ARNr 16S23

Une fois la sonde FcPRM synthétisée, nous avons étudié son comportement en présence de l'ARNr 16S23 et de l'aptamère à la néomycine par RMN ¹H. Le but étant d'observer si cette sonde, analogue ferrocénique de la paromomycine, se fixe bien au niveau du même site de fixation que la paromomycine non marquée, sur cet ARN. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de RMN ¹H 1D et 2D TOCSY.

Des expériences de RMN du proton ont tout d'abord été réalisées. Les spectres ont été enregistrés dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl, à 288K et en utilisant une séquence Watergate pour la suppression du signal de l'eau.¹¹⁰ La figure II.32 montre le spectre RMN ¹H 1D de l'ARNr 16S23 seul (0.38 mM dans 10 mM KPO₄ pH 6.5 et 50 mM KCl) puis en présence de quantités croissantes de sonde FcPRM. Nous nous sommes concentrés sur l'observation de la zone comprise entre 10 et 15 ppm qui correspond au domaine de résonance des protons iminos des bases G et U de l'ARN. Les signaux de ces nucléotides ont été suivis avant et après addition de la sonde FcPRM. Nous avons pu observer que les déplacements chimiques des protons iminos des nucléotides des bases U₁₆ et G₁₇ sont modifiés lors de l'addition de la sonde FcPRM. Un décalage progressif du signal du proton imino du nucléotide U₁₆ et une disparition du pic du proton de la

base G₁₇ ont été observés. Cette première expérience RMN nous a permis de mettre en évidence le fait que la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 interagissent ensemble.

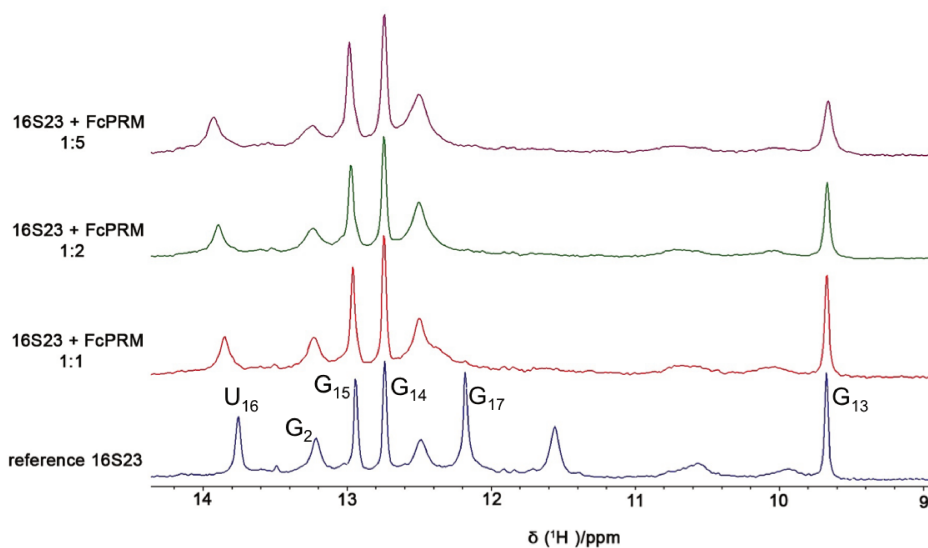


FIGURE II.32 – Observation de l'interaction entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 (0.38 mM dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl) par RMN ¹H à 288K . Sur cette figure sont superposés les spectres RMN ¹H de l'ARNr 16S23 seul (**reference 16S23**), et de l'ARNr 16S23 en présence de quantités croissantes (en éq.) de sonde FcPRM.

Après avoir montré que l'ARNr 16S23 était capable de reconnaître la sonde FcPRM, nous avons cherché à obtenir des informations sur son site de fixation sur l'ARN. Pour cela, nous avons suivi le déplacement des pics de l'ARNr 16S23 par RMN 2D TOCSY (figure II.33). La superposition des spectres TOCSY en absence puis en présence de la sonde FcPRM, permet de suivre les déplacements chimiques des protons H5-H6 des bases C et U de l'ARN et ainsi d'identifier de façon précise les bases impliqués dans l'interaction avec la sonde. Ces spectres TOCSY ont été obtenus à partir d'une solution d'ARNr 16S23 à 1.5 mM dans un tampon KPO₄ 100 % D₂O (pH 6.5) contenant 50 mM KCl (à 288 K, temps de mélange de 45 ms). La figure II.33 - a, montre le spectre de l'ARNr 16S23 seul (en bleu), puis en présence de la sonde FcPRM (en rouge). Nous avons pu observer que certaines bases voient leurs déplacements chimiques modifiés suite à l'addition de la sonde. Celles-ci sont représentées en rouge sur la structure secondaire de l'ARN (illustrée la figure II.33 - b). L'attribution de ces spectres 2D TOCSY a été réalisée grâce aux travaux antérieurs de Fourmy *et al.*¹¹¹ De façon intéressante, ces nucléotides sont les mêmes que ceux identifiés par l'équipe de Puglisi comme étant impliqués dans la formation du complexe ARNr 16S27/paromomycine¹¹¹ (entourés en bleu). Nos résultats sont également en adéquation avec ceux précédemment obtenus par l'équipe de Westhof. La structure aux rayons X du complexe paromomycine/ARNr 16S27 qu'ils sont parvenus à déterminer permet d'identifier ces mêmes nucléotides.⁵⁰ Ces expériences RMN ¹H 1D et 2D TOCSY nous permettent de conclure que la FcPRM partage le même site de fixation que la paromomycine sur l'ARNr 16S23.

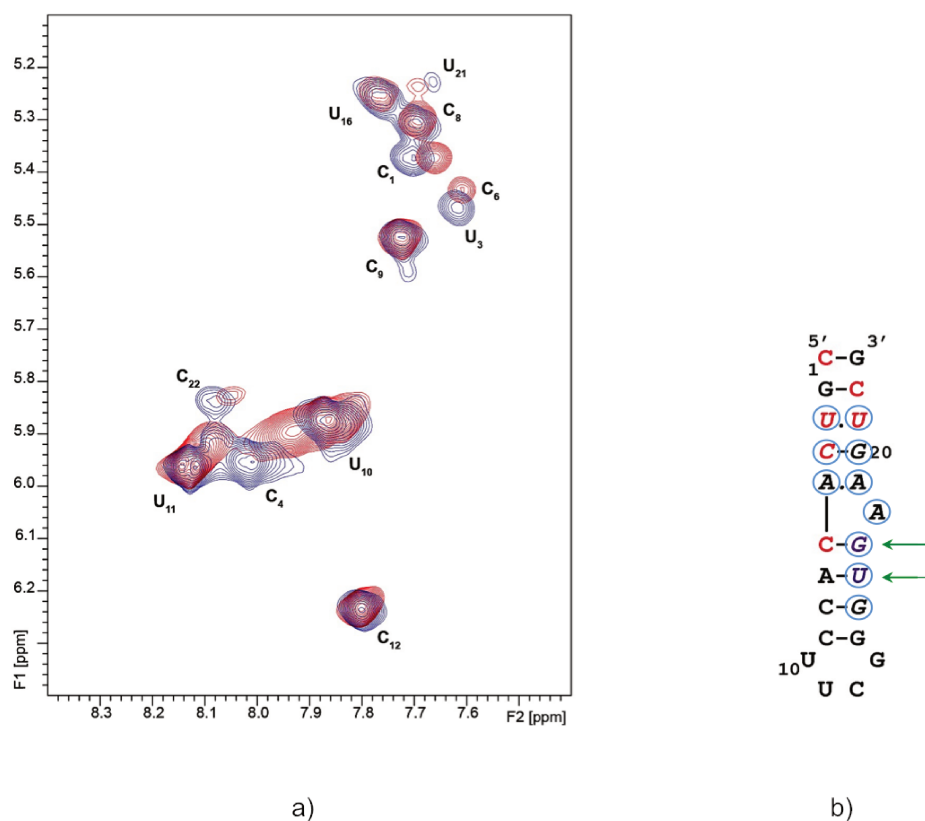


FIGURE II.33 – a) Superposition du spectre TOCSY de l'ARNr 16S23 seul (1.5 mM) (en bleu) et en présence de la sonde FcPRM (en rouge). Ces spectres ont été enregistrés à 288 K dans un tampon KPO_4 100 % D_2O (pH 6.5) contenant 50 mM KCl, avec un temps de mélange de 45 ms. b) Structure de l'ARNr 16S23 mettant en évidence les nucléotides impliqués dans l'interaction avec la sonde FcPRM. En rouge: nucléotides identifiés par l'expérience TOCSY représentée en a). Flèches vertes: nucléotides identifiés par l'expérience RMN ^1H précédemment réalisée. Entourés en bleu: nucléotides identifiés par l'équipe de Puglisi.

b) Caractérisation de l'interaction entre l'aptamère et la sonde FcPRM

L'interaction de la sonde FcPRM avec l'aptamère à la néomycine a ensuite été caractérisée par RMN ^1H (figure II.34) à 288 K dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5 contenant 50 mM KCl. Lorsque l'aptamère est seul en solution, des signaux larges sont observés ce qui est synonyme d'une interconversion rapide entre plusieurs conformations présentes en solution. En effet, le passage d'une conformation à l'autre s'effectue avec une vitesse "intermédiaire" par rapport au temps d'acquisition du spectre. Cette vitesse n'est pas assez lente pour que chaque conformation soit correctement distinguée, d'où l'apparition de signaux moyennés qui correspondent aux différentes conformations de l'aptamère en solution. Nous avons ensuite suivi l'évolution de ces signaux après l'addition de 1 eq. de néomycine. Comme le montre la figure II.34, les pics obtenus sont plus fins et mieux résolus. Ainsi, en interagissant avec la néomycine, l'équilibre entre les différentes conformations de l'aptamère est déplacé vers une l'obtention d'une conformation unique ce qui atteste d'un repliement de cet ARN.¹⁶² Ce spectre RMN a ensuite été comparé au spectre RMN ^1H d'un mélange équimolaire aptamère/FcPRM (0.4 mM dans le même tampon KPO_4). Après addition de la sonde FcPRM à l'aptamère à la néomycine (figure II.34), nous avons constaté l'apparition de nouveaux pics bien définis au niveau de la zone de résonance des protons iminos de l'aptamère. La molécule FcPRM est donc capable d'être reconnue par

cet aptamère à la néomycine. En raison des différences structurales entre la sonde FcPRM et la néomycine, le spectre obtenu est différent de celui obtenu pour le complexe aptamère/néomycine. De ce fait, nous pouvons dire que l'utilisation de la sonde FcPRM n'empêche pas l'observation du complexe aptamère/néomycine. Grâce à cette expérience, nous pouvons maintenant envisager d'utiliser la sonde FcPRM en combinaison avec cet aptamère afin de détecter la présence de néomycine par compétition.

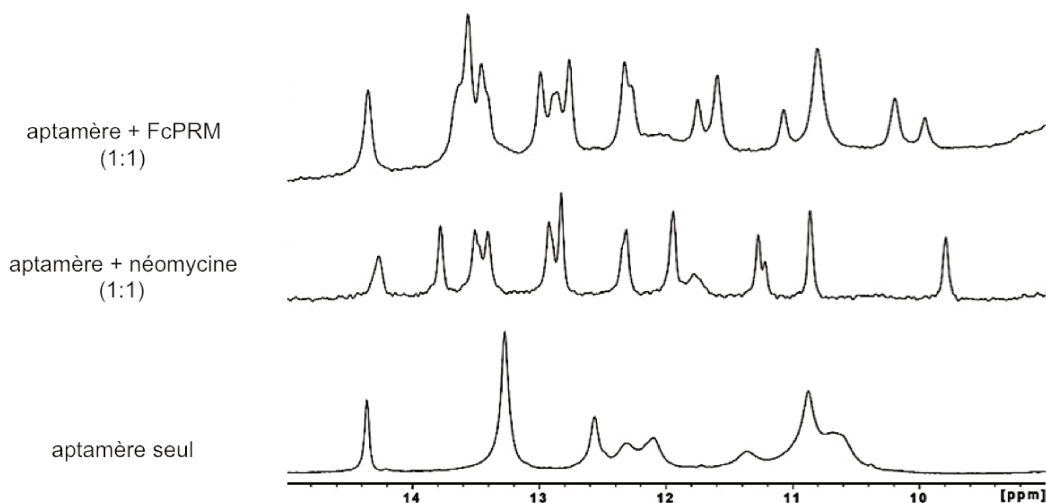


FIGURE II.34 – Spectres RMN ^1H de l'aptamère à la néomycine (0.4 mM) dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5 en présence de 50 mM KCl à 288K. De bas en haut: aptamère à la néomycine seul, aptamère en présence de 1 eq. de néomycine, aptamère en présence de 1 eq. de la sonde FcPRM.

Les expériences RMN ont fourni des informations structurales sur la sonde FcPRM. Cette sonde est bien reconnue par l'ARNr 16S23 et se fixe sur le même site de fixation que la paromomycine non marquée. Il a été également intéressant de constater que cette sonde est également reconnue par un aptamère à la néomycine. Après nous être assurés du site de fixation de la sonde FcPRM par RMN, nous avons ensuite envisagé d'utiliser cette sonde FcPRM dans des études par microcalorimétrie isotherme afin de déterminer son affinité pour l'ARNr 16S23.

III - 3) Caractérisation du complexe FcPRM/ARNr 16S23 par ITC

La microcalorimétrie isotherme (ITC) est souvent considérée comme une méthode de choix pour l'étude des interactions biomoléculaires. De nombreux exemples mentionnent son utilisation pour l'étude des interactions entre l'ARN et les aminoglycosides.¹⁶⁴ Afin de caractériser la formation du complexe FcPRM/ARNr 16S23, nous avons donc employé cette technique car elle permet d'accéder à tous les paramètres de liaison d'une interaction moléculaire en une seule expérience (stoechiométrie, enthalpie, entropie, constante d'affinité).

Les expériences de titration par ITC ont initialement été réalisées dans un tampon phosphate, identique à celui utilisé pour les expériences RMN, le but étant maintenant d'observer et de quantifier l'interaction entre ces molécules dans les mêmes conditions expérimentales. Avant toute expérience ITC, il est nécessaire de dialyser le ligand afin qu'il soit dans le même solvant que celui contenant l'ARN. L'ARN et le ligand doivent

être rigoureusement dans le même tampon: toute différence génère un échange de chaleur supplémentaire qui peut compliquer l'interprétation des résultats. Une première étape de dialyse permet donc de minimiser la contribution énergétique liée à l'énergie de dilution. Dans toutes les expériences ITC réalisées, le ligand FcPRM dialysé est placé dans une seringue afin d'être injecté dans la cellule de mesure contenant l'ARN à une température de 25°C. Les aires de chacun des pics du thermogramme ont été représentées en fonction du rapport des concentrations en ligand sur ARN. L'isotherme obtenue permet de déterminer la valeur du K_D (que l'on appellera K_D^* pour la sonde FcPRM).

La figure II.35 montre trois expériences de titration, réalisées dans le tampon phosphate. Les conditions expérimentales utilisées ainsi que les constantes de dissociation sont réunies dans le tableau II.2. Les expériences **a)** et **b)** correspondent à la même expérience de titrage réalisée en duplicata. Dans les deux cas, les points expérimentaux n'ont pu être parfaitement ajustés, probablement en raison de l'absence de plateaux bien définis en début et en fin de titrage. Les valeurs de K_D^* pour la sonde étant dans la gamme du micromolaire (ce qui est en adéquation avec les K_D des aminoglycosides pour cet ARN⁸⁷), nous avons ensuite affiné les conditions expérimentales. En jouant sur le nombre d'injections et sur les concentrations, nous avons obtenu le profil de titrage illustré sur la figure II.35 - **c)**. Comme pour les deux premiers essais, la stœchiométrie obtenue pour cette expérience est de $N = 3$. Les études précédentes réalisées entre autres par RMN,¹¹³ SPR⁸⁷ et cristallographie aux rayons X⁵⁰ ont cependant démontré l'existence d'un seul site spécifique de fixation pour la paromomycine sur l'ARN 16S23.^{113,165} Cette stœchiométrie peut être expliquée par l'utilisation du tampon phosphate. En effet, son enthalpie de protonation est prise en compte dans la valeur de l'enthalpie totale, calculée par l'appareil ITC et peut donc influencer les mesures. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un autre tampon pour ces expériences.

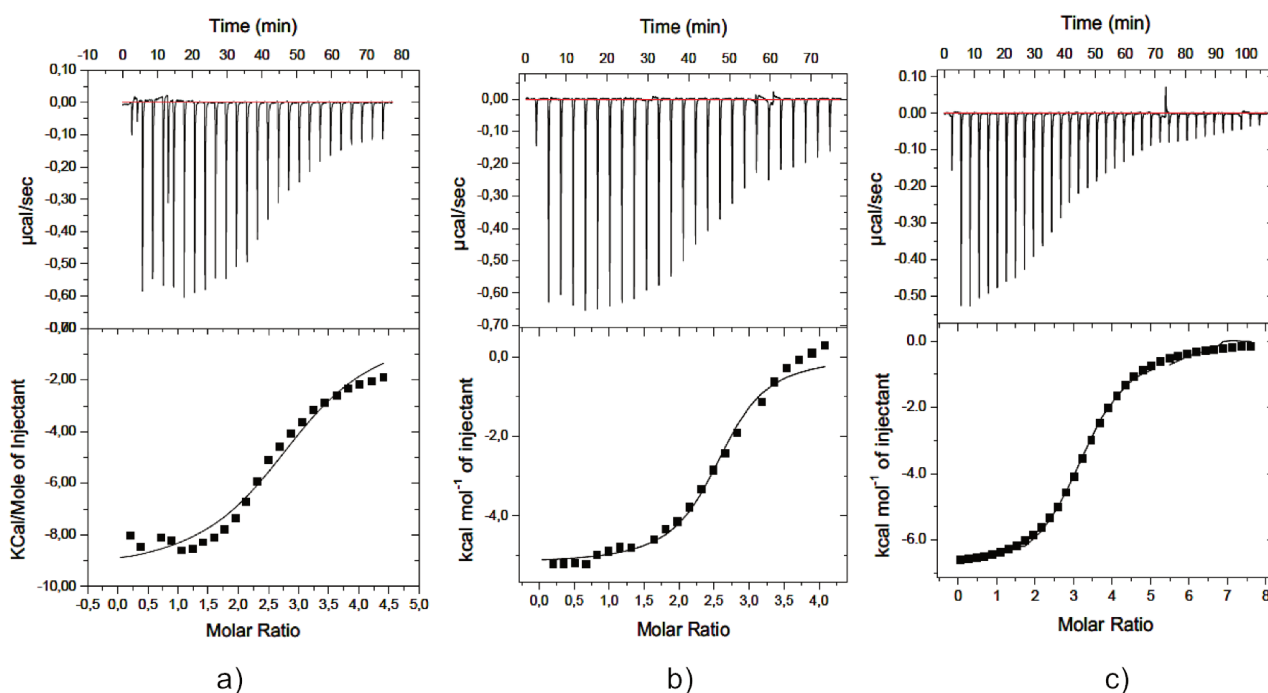


FIGURE II.35 – Expériences de titrage réalisées dans le tampon phosphate.

	a)	b)	c)
N	3.0	2.5	3.3
K_D^* (μM)	5.0	1.3	2.6
[ARNr 16S23] (μM)	25	25	20
[FcPRM] (μM)	550	550	750
Tampon	10 mM KPO ₄ pH 6.5, 50 mM KCl	10 mM KPO ₄ pH 6.5, 50 mM KCl	10 mM KPO ₄ pH 6.5, 50 mM KCl
Nombre d'injections	25	25	35
Volume par injection (μL)	1.54	1.54	1.1

TABLE II.2 – Résultats obtenus pour les expériences de titrage de la figure II.35.

Les premiers essais réalisés en présence d'un tampon phosphate se sont avérés peu concluants. Nous avons alors décidé d'utiliser un tampon MES tel que celui utilisé par l'équipe de Pilch¹⁰⁵ dans le cadre d'expériences ITC. En utilisant maintenant un tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA. En se plaçant dans les mêmes conditions de tampon et de force ioniques, nous sommes ainsi capables de nous assurer que tous les échanges de chaleur mesurés au cours des expériences de titrage ITC seront donc uniquement dus aux phénomènes d'interaction et à la dilution.¹⁰⁵ En présence de ce nouveau tampon (c.f partie expérimentale pour les détails expérimentaux), les résultats représentés sur la figure II.36 et dans le tableau II.3 ont été obtenus.

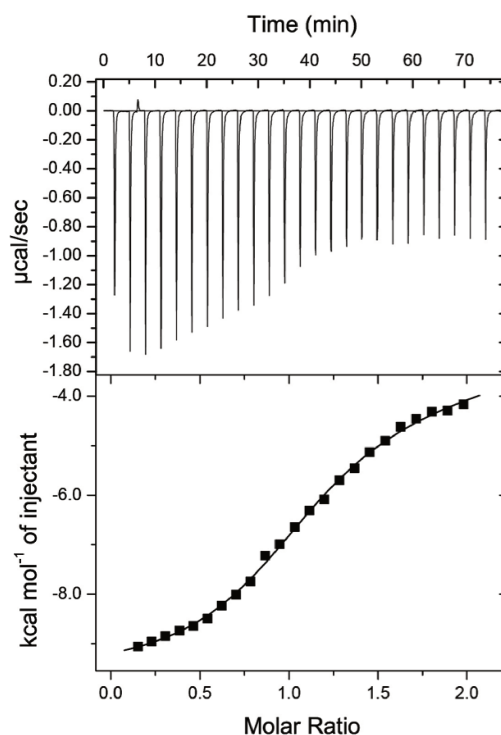


FIGURE II.36 – Expérience de titration de l'ARNr 16s23 par la sonde FcPRM dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA.

	K_D^*	N	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
Sites d'interaction de l'ARNr 16S23	$9.3 \pm 9.2 \cdot 10^{-7} \mu\text{M}$	1.1 ± 0.3	-9.6 ± 1.1	2.7
	$6.8 \pm 0.07 \text{ mM}$	4.2 ± 40	-83.1 ± 15.2	80.2

TABLE II.3 – Données thermodynamiques de la formation du complexe FcPRM/ARNr 16S23, obtenues pour l'expérience illustrée en figure II.36.

Cette expérience a été ajustée avec un modèle à deux sites d'interaction indépendants. En effet, au vu des résultats représentés dans le tableau II.3, deux "populations de sites" ont été identifiées sur l'ARNr 16S23. D'une part, une seule molécule peut se fixer avec une affinité de l'ordre du micromolaire. De l'autre, quatre molécules sont capables d'interagir avec l'ARN, avec une constante de dissociation environ 10^3 fois plus grande. Nous pouvons considérer qu'il s'agit d'interactions non spécifiques. Le site pour lequel $N = 1.1$, est donc le site d'interaction principal. Nous avons ainsi été en mesure de déterminer un K_D^* pour la sonde FcPRM vis-à-vis de l'ARNr 16S23 à $9.3 \mu\text{M}$. Par ailleurs, l'équipe du Dr. Eric Ennifar a précédemment étudié par ITC la formation du complexe ARNr 16S27/paromomycine.¹⁶⁶ Les résultats de leurs expériences de dosage sont représentés en figure II.37. Celles-ci ont été réalisées dans un tampon 25 mM cacodylate de sodium pH 7.0, en présence de 2 mM MgCl_2 et de 100 mM KCl (figure II.37 - a) ou 200 mM KCl (figure II.37 - b). En présence d'une concentration en KCl élevée, il leur a été possible de déterminer un K_D de la paromomycine égal à $7.9 \mu\text{M}$ ce qui est du même ordre de grandeur que nos résultats.

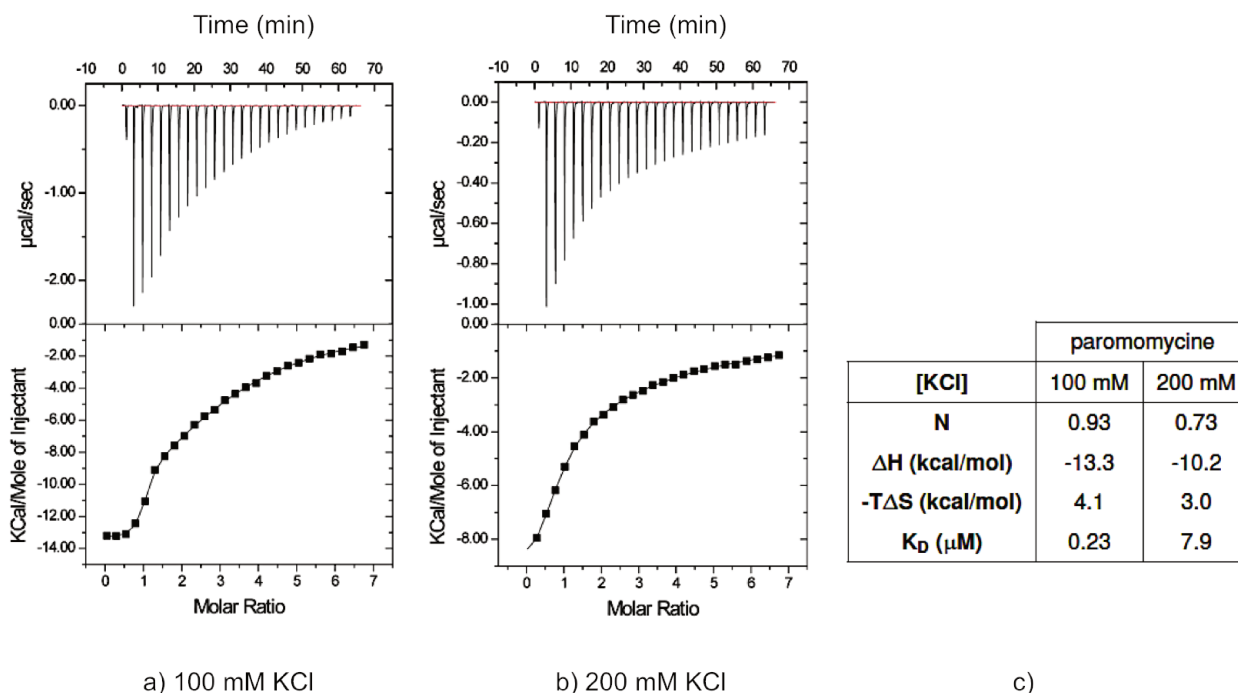


FIGURE II.37 – Profils ITC¹⁶⁶ enregistrés lors du dosage de l'ARNr 16S27 par la paromomycine dans un tampon 25 mM cacodylate de sodium pH 7.0, en présence de 2 mM MgCl_2 et de a) 100 mM KCl b) 200 mM KCl c) Paramètres de liaison obtenus.

Même si l'ITC est une technique très puissante grâce à sa capacité à fournir toutes les informations thermodynamiques d'une réaction en une seule expérience, certains inconvénients accompagnent son utilisation. Tout d'abord, il s'agit d'une méthode consommatrice de grandes quantités d'échantillons. Egalement, moduler certains paramètres tels que les volumes d'injection, le nombre d'injection, la nature du tampon, ... peut grandement influencer l'allure du profil de titration. Au cours de nos études par ITC, nous avons rencontré quelques difficultés, liée à l'utilisation des aminoglycosides. Les expériences de la figure II.38 illustrent les problèmes d'injection du ligand dans la cellule de mesure. Nous avons pu remarquer que la molécule adhérait parfois aux parois de la seringue, ce qui faussait les volumes injectés. Ce problème récurrent nous a conduit à réaliser un nettoyage drastique de l'appareil de façon quasi-systématique. Un nettoyage de la cellule de mesure avec un détergeant (DECON™ 90) s'est donc avéré utile avant chaque mesure. Qui plus est, cette étape de nettoyage nécessite ensuite de passer par une phase d'équilibration de l'appareil, parfois longue (1 à 2 heures), afin que la température soit stable avant de pouvoir relancer une mesure.

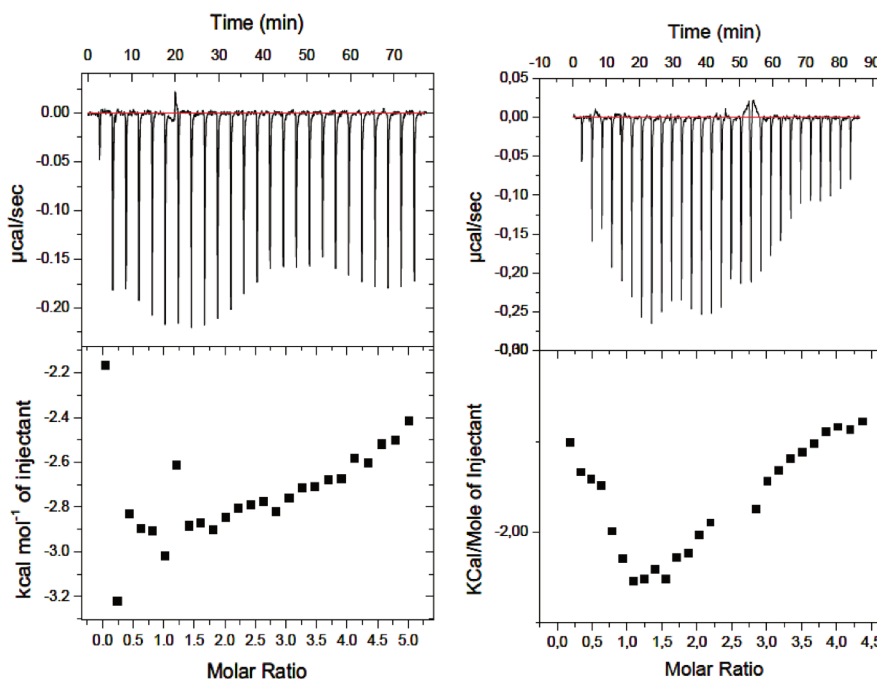


FIGURE II.38 – Profils de titration de l'ARNr 16S23 par la PRM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. a) à 20°C, avec [PRM]=500 μ M et [ARN]=20 μ M. b) à 20°C, avec [PRM]=1 mM et [ARN]=45 μ M.

IV - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons pu voir comment trois sondes électroactives ont pu être synthétisées en faisant appel à une stratégie de synthèse simple. L'approche ici employée ne nécessite pas de passer par de nombreuses étapes de protection et de déprotection successives. Cependant, la principale difficulté quant à l'obtention de ces composés réside dans leur mode de purification. Ce problème a pu être résolu grâce à l'utilisation d'une chromatographie sur gel de silice, bien qu'elle ne constitue pas la meilleure méthode du fait de la grande polarité des aminoglycosides. Parmi ces sondes, la FcPRM a été étudiée par RMN et par ITC afin de caractériser son interaction avec l'ARNr 16S23, un analogue du site A de l'ARNr 16S. Grâce aux études réalisées par RMN ^1H , nous avons pu observer la formation d'un complexe entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S. Une TOCSY 2D a ensuite été réalisée afin d'identifier clairement les nucléotides impliqués dans la formation de ce complexe. Les résultats obtenus par cette expérience semblent démontrer que la sonde FcPRM partage le même site de fixation que la paromomycine non marquée. Nous pouvons donc affirmer que cette sonde n'influence pas les phénomènes de reconnaissance avec l'ARNr. Une valeur de K_D de la sonde FcPRM pour l'ARNr 16S a également été déterminée par ITC autour de $9 \mu\text{M}$. Reste maintenant à savoir, si cette valeur est correcte. Par manque de temps, le comportement des deux autres sondes électroactives, Fc-néamine et Fc-DACP, n'a malheureusement pas été étudié en présence d'ARN. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux afin de les caractériser aussi bien par ITC que par voie électrochimique. C'est d'ailleurs sur cet aspect que va se concentrer le chapitre qui suit.

Détection et quantification des interactions ARN/ligands par voie électrochimique

Une comparaison des méthodes analytiques généralement utilisées pour la détection et la quantification des interactions ARN/ligand a été faite dans le chapitre introductif (cf. partie III - 8) chapitre 1, en page 54). Au vu des avantages et des inconvénients inhérents à chaque technique analytique, il est important de pouvoir continuer à les faire évoluer en les rendant toujours plus simples, rapides, performantes ... ou en proposant de nouvelles approches. Dans ce contexte, les techniques électroanalytiques apparaissent comme étant une alternative pertinente, d'autant que très peu d'exemples mentionnent leur utilisation pour le suivi d'une reconnaissance entre un ARN et des aminoglycosides. Les quelques exemples^{123-125,167} décrits jusqu'alors reposent exclusivement sur des méthodologies se déroulant à la surface d'une électrode et non pas en phase homogène. La technique électrochimique développée dans le cadre de cette thèse constitue une approche novatrice puisqu'elle ne nécessite pas de modification de l'ARN et permet d'étudier les phénomènes de reconnaissance ARN/amino glycosides en phase homogène.

I - Présentation des techniques électrochimiques et travaux antérieurs

Les méthodes électrochimiques peuvent être divisées en plusieurs catégories selon la nature de la grandeur physique contrôlée et de celle qui est mesurée.¹⁶⁸ On distingue :

- la chronoampérométrie, où le courant est mesuré en fonction du temps à un potentiel fixe imposé.
- la voltamétrie linéaire ou cyclique, durant laquelle le potentiel est balayé linéairement en fonction du temps et le courant mesuré.
- la potentiométrie, qui consiste à mesurer le potentiel en circuit ouvert (courant nul) à une électrode en fonction du temps.

Le dispositif expérimental classique en électrochimie consiste en un montage à trois électrodes plongées dans une solution électrolytique (figure III.1). L'électrode de travail (WE), où se déroule la transformation chimique, est portée à un potentiel donné par rapport à une électrode de référence, appelée Ref (électrode au calomel saturé, Ag/AgCl, ...). L'électrode de travail est chimiquement inerte et ne réagit donc ni avec la solution électrolytique, ni ne se transforme par l'application d'un potentiel à l'interface électrode/solution. L'application d'une surtension suffisante à la surface de la WE permet de déclencher un processus redox. Afin de mesurer

ces phénomènes par voie électrochimique, il est nécessaire de bien contrôler le potentiel. Il faut notamment éviter de faire passer le courant par l'électrode de référence, au risque de faire fluctuer son potentiel. De ce fait, une troisième électrode est généralement utilisée: la contre-électrode (CE). Ce montage à trois électrodes est piloté par un potentiostat (relié à un ordinateur) qui impose la différence de potentiel entre la WE et la Ref, et mesure le courant circulant entre la WE et la CE.

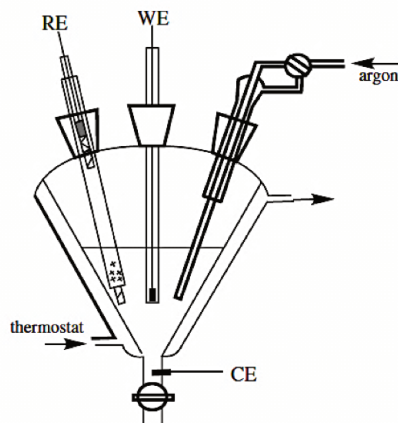


FIGURE III.1 – Cellule électrochimique à trois électrodes. Figure tirée de.¹⁶⁸

Bien qu'il existe de nombreuses techniques électrochimiques, la partie qui suit décrit uniquement celles utilisées dans le cadre de cette thèse. Pour leur description, nous nous placerons dans le cas d'un couple redox Nernstien, capable d'échanger rapidement et réversiblement un seul électron à une surface d'électrode selon l'équation: $Ox + e^- \xrightleftharpoons[k_{ox}]{k_{red}} Red$ et où c'est l'espèce Ox qui est initialement présente en solution. Le courant capacitif (i_C) correspond au mouvement des charges à l'interface électrode/solution d'électrolyte support, tandis que le courant faradique (i_F) correspond au transfert d'électrons entre l'électrode de travail et l'espèce électroactive en solution diffusant vers la surface de l'électrode.

I - 1) Chronoampérométrie

La chronoampérométrie est une technique électrochimique dans laquelle un saut de potentiel entre deux valeurs, E_1 et E_2 , est soudainement imposé à l'électrode de travail ($E = E_2 - E_1$).¹⁶⁸ Le potentiel E_1 est choisi de façon à ce que le courant faradique soit nul ou négligeable lorsqu'il est appliqué. Au bout d'un temps t_1 , le potentiel est porté à une valeur E_2 où se produit la réaction électrochimique (figure III.2).

Ainsi, le phénomène suivi en chronoampérométrie correspond au courant i généré à l'électrode en fonction du temps (i correspond à la somme du courant faradique i_F et du courant capacitif i_C). La valeur du potentiel appliquée est généralement choisie de telle sorte que la surtension soit suffisante pour se situer dans la zone de potentiel où le courant faradique est limité par le transport par diffusion de l'espèce Ox. Ainsi, dans des conditions stationnaires (pas d'agitation de la solution), le courant faradique suit (pour des temps suffisamment courts) une loi de décroissance en fonction du temps exprimé par l'équation 1 appelée loi de Cottrell.

$$i_a(t) = \frac{F D_{Ox} C^{\circ}_{Ox}}{\sqrt{\pi D_{Ox} t}} \quad (1)$$

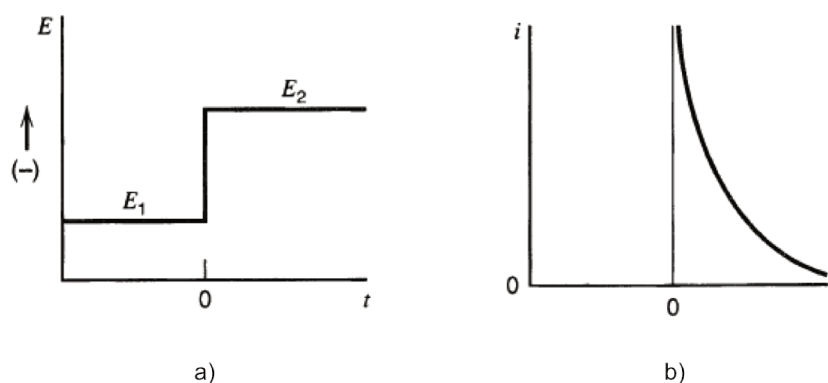


FIGURE III.2 – Figure tirée de,¹⁶⁸ illustrant le principe de la chronoampérométrie. a) Application d'un saut de potentiel à l'électrode. b) Courant suivi en fonction du temps.

où i_a est l'intensité de courant (en Ampères), F est la constante de Faraday (en $C.mol^{-1}$), D_{Ox} la constante de diffusion de l'espèce Ox (en $cm^2.s^{-1}$), C°_{Ox} la concentration de l'espèce Ox ($mol.cm^{-3}$) et t le temps (en s).

Pour des temps longs ou dans des conditions hydrodynamiques de convection (agitation de la solution), le courant devient constant. En effet, l'agitation contrôlée permet de renouveler les espèces à l'électrode beaucoup plus facilement que par la diffusion naturelle. De ce fait, la couche de diffusion δ (couche adjacente à la surface de l'électrode dans laquelle un gradient de concentration existe) ne s'étend pas et devient alors constante. Dans ce cas, le courant s'exprime selon l'expression:

$$i_a(t) = \frac{nFD_{Ox} C^{\circ}_{Ox}}{\delta}$$

où n est le nombre d'électrons échangés.

Que ce soit dans des conditions stationnaires ou hydrodynamiques, le courant mesuré est directement proportionnel à la concentration de Ox en solution. La chronoampérométrie peut donc être utilisée comme technique analytique pour suivre les variations de concentration d'une espèce.

I - 2) Voltamétrie cyclique

La voltamétrie cyclique (CV pour *Cyclic voltammetry*) est une autre technique électrochimique très largement utilisée pour détecter et caractériser des composés oxydables ou réductibles en solution mais aussi pour élucider des mécanismes de réactions chimiques couplées à des processus de transfert d'électron.¹⁶⁹ Sa force réside dans sa simplicité de mise en œuvre et la richesse des informations qu'elle fournit. Son principe consiste à mesurer le courant obtenu en réponse à une rampe linéaire de potentiel (entre un potentiel initial et un potentiel d'inversion), appliquée à la WE en fonction du temps. Le balayage du potentiel se fait suivant:

$$E = E_i \pm vt \quad (2)$$

avec E le potentiel d'électrode (en V), E_i le potentiel initial d'électrode et v la vitesse de balayage en $V.s^{-1}$.

Comme indiqué en figure III.3 - a, la rampe de potentiel est initialement appliquée en balayant à une vitesse v depuis une valeur E_i jusqu'à atteindre une valeur E_{max} . Puis, le potentiel décroît jusqu'à revenir à E_i avec la même vitesse de balayage. En balayant le potentiel dans un sens puis dans l'autre, on définit ainsi un cycle de mesure représenté par une courbe $E = f(t)$, décrivant une forme triangulaire. Généralement, la voltamétrie cyclique est utilisée dans des conditions stationnaires c'est-à-dire sans agitation de la solution. Dans ce cas, la courbe intensité-potential qui résulte de la réduction monoélectronique réversible et rapide d'une molécule Ox en solution décrit un signal caractéristique, appelé voltamogramme, représenté en figure III.3 - b.

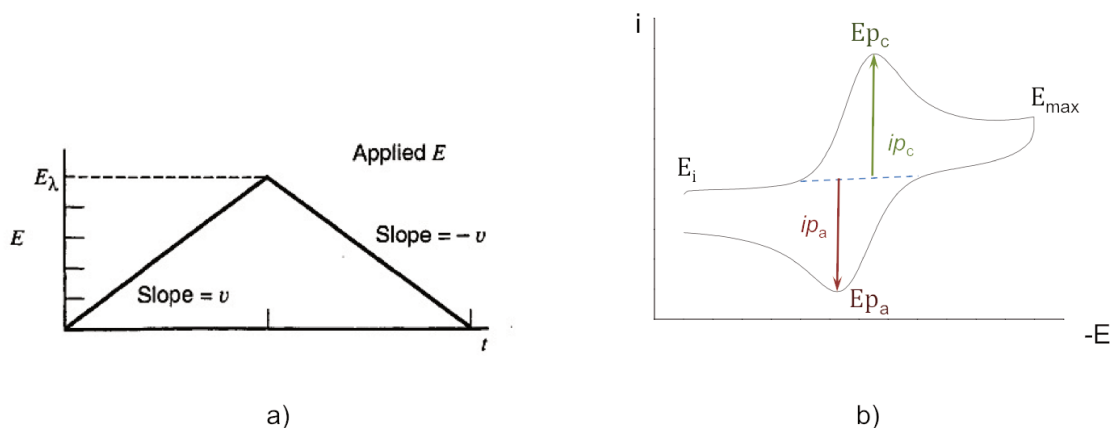


FIGURE III.3 – Principe de la voltamétrie cyclique. a) Application d'une rampe de potentiel symétrique en fonction du temps. b) Exemple de voltamogramme obtenu pour la réduction d'une espèce redox Nernstienne monoélectronique.

Au voisinage du potentiel standard E° de la molécule redox utilisée, l'espèce se réduit dans le sens aller et s'oxyde lors du balayage retour. Au delà du E° , les espèces Ox ou Red étant gouvernées par un régime de transport diffusif, le tracé de i en fonction de E donne une vague réversible. En résulte un courant de pic faradique cathodique (i_{p_c}), défini par l'équation 3.

$$i_{p_c} = 0.446 nFS C_{Ox}^{sol} \sqrt{D_{Ox}} \sqrt{\frac{nFv}{RT}} \quad (3)$$

avec n le nombre d'électrons échangés, D_{Ox} et D_{Red} les coefficients de diffusion des espèces oxydée et réduite ($cm^2 \cdot s^{-1}$), T la température (K) et S la surface de l'électrode (cm^2).

Le courant de pic est donc proportionnel à la concentration de l'espèce Ox en solution et à son coefficient de diffusion D_{Ox} . La valeur de i_p peut donc être utilisée comme une grandeur exploitable dans des applications analytiques, notamment pour discriminer deux espèces possédant des valeurs de D différentes comme nous le verrons dans la suite de ce chapitre. Pour un système Nernstien parfaitement réversible, l'écart de potentiel entre les pics aller et retour est égal à $2.3 \frac{RT}{nF}$ (soit environ 60 mV à 25°C). Il est supérieur à cette valeur pour les systèmes quasi-réversibles. Les systèmes irréversibles, quant à eux, ne présentent pas de pic retour. Notons également que pour un système réversible rapide, la valeur du potentiel de pic est indépendante de la vitesse de balayage et que l'intensité du pic (donc le courant faradique) est proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage v .¹⁶⁹ Cependant, le courant capacitif augmente proportionnellement avec la vitesse

de balayage. Une trop grande vitesse de balayage conduit donc à un moins bon rapport de signal entre le courant faradique et le courant capacitif. Lorsque le régime de transport de matière à l'électrode est gouverné par la diffusion naturelle, le courant reste assez faible pour de faibles concentrations en espèces électroactive. La sensibilité de la CV peut toutefois être améliorée grâce à l'utilisation d'électrodes sérigraphiées qui ont un faible courant capacitif (cf. paragraphe II - 1), page 98).

Pour un régime de convection contrôlée, obtenu par exemple par rotation de l'électrode ou par agitation de la solution, une couche de diffusion (δ) constante est établie et un CV de forme sigmoïdale est obtenu (figure III.4). Dans ce cas, l'intensité de courant de plateau est donnée par l'équation de Levich:

$$i_{pl} = \frac{nFD_{Ox} C^{\circ}_{Ox}}{\delta} \quad (4)$$

où δ = constante, n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday et C°_{Ox} la concentration de l'espèce Ox en solution (mol.cm^{-3}).

Là encore, le courant de plateau est proportionnel à la concentration de l'espèce Ox en solution et peut donc être exploité comme grandeur mesurable dans des applications analytiques.

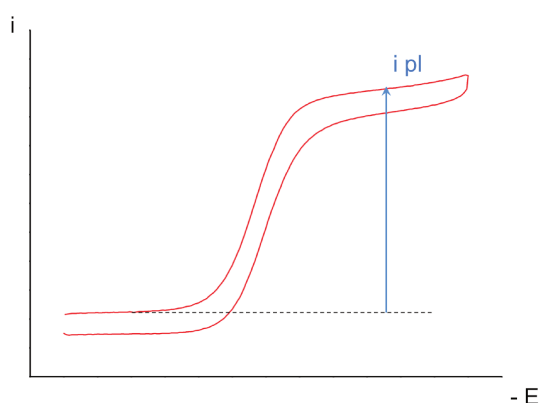


FIGURE III.4 – Voltamogramme obtenu en régime de convection contrôlée pour la réduction d'une espèce Ox réversible.

I - 3) Voltamétrie à vague carrée

La voltampérométrie différentielle à vague carrée (*Square wave voltammetry (SWV)*) est une technique de voltamétrie à impulsion. Comme indiqué en figure III.5, la rampe de potentiel appliquée est en forme de marches d'escalier surimposée d'une onde carrée. La variation de potentiel en fonction du temps consiste donc en une progression par palier de deux impulsions carrées de même amplitude, de même durée mais de signes opposés.¹⁶⁸

Cette technique se caractérise par plusieurs paramètres: un potentiel de pulse (E_{ampl}), un potentiel d'incrément (ΔE) et une fréquence de l'onde carrée (freq). Le courant est alternativement mesuré en fin de pulse aller (i_{dir}) et retour (i_{inv}). La différence entre ces deux courants ($\Delta i = i_{\text{dir}} - i_{\text{inv}}$) est ensuite reportée en fonction

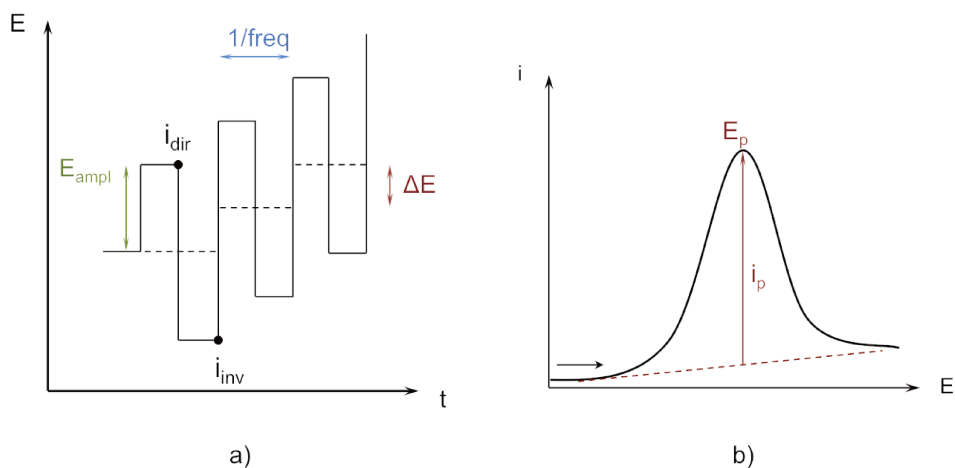


FIGURE III.5 – a) Séquence de balayage de potentiel utilisée en SWV. b) Exemple de courbe courant-potential obtenu.

du potentiel appliqué. Dans le cas d'une espèce redox capable d'échanger un électron de façon réversible, la courbe voltampérométrique enregistrée possède l'allure d'un pic gaussien dont l'intensité est proportionnelle à la concentration de l'espèce oxydée ou réduite en solution.

La SWV présente comme avantage par rapport à la CV, de mieux discriminer le courant capacitif du courant faradique ce qui conduit à un meilleur rapport signal sur bruit et donc à une meilleure sensibilité de détection.¹⁶⁸ Grâce à cette technique, il est alors possible d'atteindre des seuils de concentration en espèces redox très faibles jusqu'au nanomolaire.

I - 4) Stratégie de détection électrochimique d'une reconnaissance biomoléculaire en phase homogène: état de l'art

Nous l'avons vu dans le chapitre I, la plupart des méthodologies utilisées pour l'étude des interactions entre les acides nucléiques et de petites molécules font appel à des dispositifs de détection électroanalytique en phase hétérogène par l'intermédiaire d'ADN ou d'ARN immobilisé. Dans la littérature, il existe beaucoup moins d'exemples d'approches électrochimiques reposant sur une mesure d'interactions en phase homogène. La difficulté réside dans la capacité à mesurer sélectivement la fraction libre de la fraction liée. Une des stratégies qui a été envisagée pour sélectivement détecter la fraction libre par rapport à la fraction liée en phase homogène est de tirer parti d'électrodes modifiées.

Limoges *et al.*¹⁷⁰ ont par exemple, fait appel à cette stratégie afin de détecter une amphétamine au cours d'un immunodosage compétitif en phase homogène. Dans cette approche, un anticorps est mis à réagir de manière compétitive avec une amphétamine marquée par un centre cobalticinium et une amphétamine non marquée à doser. A l'issue de la réaction compétitive, la fraction libre de l'amphétamine marquée est détectée par voie électrochimique grâce à l'utilisation d'une électrode préalablement recouverte d'un film polymère anionique, le Nafion. En raison de sa taille et de son caractère cationique, seule la fraction libre de l'amphétamine marquée est capable de se préconcentrer à la surface de l'électrode modifiée par le biais d'interactions électrostatiques. A l'inverse, la fraction liée ne peut être détectée de part sa taille trop volumineuse. Par cette

technique il leur a ainsi été possible de détecter indirectement l'amphétamine dans des fluides biologiques à des concentrations micromolaires.

Dans un autre exemple, Cao *et al.*¹²⁷ sont parvenus à détecter électrochimiquement la formation d'un complexe entre un aptamère ADN et une protéine en solution. Le mode de détection repose également sur l'utilisation d'une électrode modifiée, cette fois par une macromolécule: le cucurbituril (figure III.6). Ce macrocycle est constitué d'unités glycolurile, reliées entre elles de façon à former une cavité hydrophobe dans laquelle va pouvoir venir interagir une petite molécule cationique telle que le bleu de méthylène. Ce genre de macromolécule est généralement employé pour l'étude des interactions hôte-invité en chimie supramoléculaire. L'électrode ainsi modifiée a été utilisée pour la détection d'une protéine, l'ostéopontine. La stratégie de détection repose sur le principe suivant. Initialement, une séquence d'ADN marquée au bleu de méthylène est mise en présence d'un aptamère complémentaire. En absence d'ostéopontine, le duplex d'ADN formé ne peut pas être digéré lorsqu'une exonucléase est ajoutée à la solution. Ainsi, le bleu de méthylène ne se lie pas au cucurbituril présent à la surface des électrodes et aucun signal n'est enregistré. Cependant, en présence d'ostéopontine, il se forme un complexe entre l'aptamère non marqué et la protéine. Le brin d'ADN marqué au bleu de méthylène étant seul en solution, il est alors dégradé par l'exonucléase. Le bleu de méthylène ainsi libéré, peut donc diffuser vers la surface de l'électrode et s'y préconcentrer. Cette technique permet indirectement de mesurer les phénomènes de reconnaissance en phase homogène.

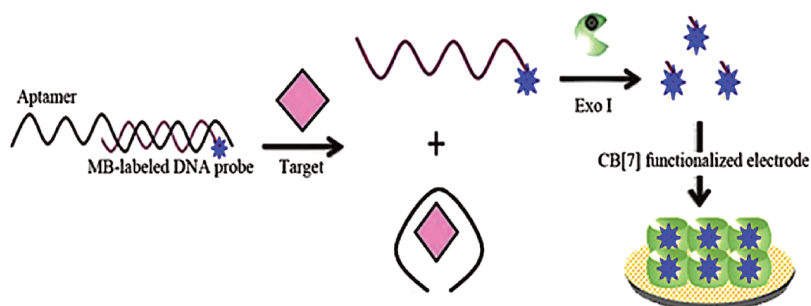


FIGURE III.6 – Principe de la méthode de détection en phase homogène selon l'approche développée par Cao *et al.* Le losange rose représente la protéine cible, l'ostéopontine. L'étoile bleue représente le bleu de méthylène. Tiré de.¹²⁷

Plus récemment, de nouvelles approches permettant d'étudier les interactions en phase homogène sans avoir recours à des électrodes modifiées ont été développées. L'équipe de Toh¹⁷¹ a mis au point une méthode de détection reposant sur la variation du coefficient de diffusion des molécules en solution. Pour cela, un aptamère marqué avec un groupement Fc a été utilisé pour détecter la présence d'une protéine en solution. Une fois que l'aptamère marqué au Fc est sous forme complexée à la protéine, il possède un coefficient de diffusion D plus petit que l'aptamère sous forme libre. En conséquence, la forme complexée de l'aptamère va diffuser plus lentement à la surface de l'électrode que lorsqu'il n'est pas complexé. La détection électrochimique repose donc sur la discrimination entre ces deux formes, ce qui permet de suivre et de quantifier la reconnaissance entre l'aptamère et la thrombine en phase homogène. La sensibilité de la méthode n'est cependant pas très bonne en raison d'une faible différence de coefficient de diffusion entre les formes lié et libre, ainsi que de la faible valeur du coefficient de diffusion de l'aptamère marqué.

Précédemment au laboratoire et en partenariat avec l'ITODYS, une approche similaire a été élaborée pour détecter une reconnaissance chirale entre un aptamère et sa molécule cible en phase homogène.¹⁷² Pour mettre au point cette méthode, une L-tyrosinamide marquée au Fc et son aptamère d'ADN long de 49 nucléotides ont été utilisés (figure III.7).

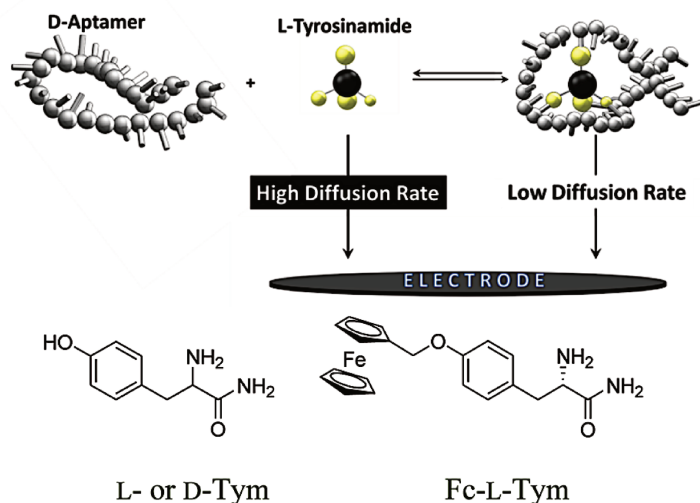


FIGURE III.7 – Principe général d'un dosage compétitif en phase homogène par électrochimie. Tiré de.¹⁷²

Il a été démontré que l'aptamère utilisé était capable de différencier la L-tyrosinamide de la D-tyrosinamide. Lorsque la Fc-L-tyrosinamide se retrouve en présence de son aptamère, un équilibre s'établit entre la forme libre et la forme liée de ce ligand. En raison de la grande taille de l'aptamère devant celle de la cible, le complexe ligand/récepteur formé diffuse beaucoup moins vite que le ligand libre. Le mode de détection repose donc sur un changement de coefficient de diffusion. Ce concept a même été élargi à une approche reposant sur une oxydation catalytique de la L-tyrosinamide, par l'intermédiaire d'un médiateur redox. Que ce soit en suivant l'activité catalytique ou en suivant électrochimiquement une variation d'activité catalytique ou un changement de coefficient de diffusion, les courants mesurés dépendent des quantités de ligand cible sous forme libre et liée.

Nous nous sommes donc inspirés de ce dernier exemple pour développer une méthode permettant de détecter des aminoglycosides par l'intermédiaire de différentes structures d'ARN.

II - Détection électrochimique de l'interaction ARNr 16S23/sonde électroactive

Notre premier objectif a été de tirer parti de la méthode précédemment développée au laboratoire¹⁷² et de l'appliquer à la détection électrochimique de la sonde FcPRM en présence d'un ARN. La partie qui suit se concentre donc sur la mise en œuvre d'un dispositif électroanalytique et sur la validation du schéma de principe tel qu'il est représenté dans la figure III.8.

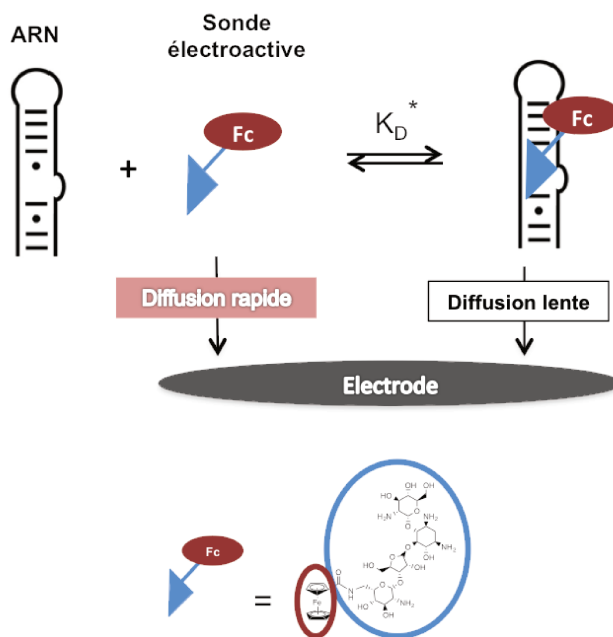


FIGURE III.8 – Principe général de détection de la reconnaissance ARN/sonde FcPRM par voie électrochimie en phase homogène et détail de la structure de la sonde FcPRM.

De façon similaire, notre principe de détection repose sur la différenciation entre la forme libre et la forme liée de la sonde électroactive FcPRM. Il est possible de distinguer une forme de l'autre grâce à la variation du coefficient de diffusion (D) de la sonde FcPRM en solution. En effet, une fois liée à l'ARN, la sonde FcPRM possède une masse moléculaire plus élevée que la forme libre. Le complexe ainsi formé diffuse plus lentement vers la surface de l'électrode et est donc moins facilement détectable que la forme libre de la sonde. Etant donné que l'intensité de courant mesurée dépend directement des concentrations en sonde libre et liée présentes en solution, il est ainsi possible de mesurer une valeur de constante de dissociation K_D^* par le biais d'expériences de titrage en CV. Cette technique tire parti des phénomènes de diffusion naturelle se déroulant en solution. Elle ne peut donc s'utiliser que pour la détection des interactions entre une molécule de grande taille et son ligand de taille plus petite. Cette méthodologie semble donc bien adaptée à l'étude des aminoglycosides et des ARN. La structure d'ARN utilisée faisant 23 nucléotides, sa taille est suffisamment grande pour entraîner une différence de vitesse de diffusion de la FcPRM, une fois le complexe formé.

Une fois la constante de dissociation (K_D^*) de la molécule marquée connue, le second objectif est de parvenir à étendre cette méthodologie analytique à la détection et à la quantification de molécules non marquées, le tout en phase homogène. En utilisant la FcPRM comme molécule reporter et en l'impliquant dans des réactions de compétition avec des aminoglycosides non marqués vis à vis d'un même ARN, il sera possible de mesurer indirectement les constantes d'affinité de ces molécules non marquées. Il est également possible d'étendre l'utilisation de cette approche par compétition pour des expériences de criblage de bibliothèques de molécules. Cette approche ainsi que les résultats qui lui sont associés seront présentés et discutés ultérieurement dans le chapitre IV.

Avant de pouvoir réaliser cet objectif, il a tout d'abord fallu caractériser électrochimiquement la molécule FcPRM puis étudier son interaction avec l'ARN afin de voir si elle pouvait être employée comme sonde électroactive.

II - 1) Caractérisation électrochimique de la sonde FcPRM

Le comportement électrochimique de la sonde FcPRM, lorsqu'elle est seule en solution, a tout d'abord été examiné. Toutes les expériences présentées dans ce paragraphe ont été réalisées en utilisant des solutions de sonde FcPRM solubilisées dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5 contenant 50 mM KCl. Toutes les mesures ont été réalisées à l'aide de cellules électrochimiques à trois électrodes miniaturisées, produites par sérigraphie au sein du laboratoire (figure III.9). Celles-ci présentent plusieurs avantages:

- chaque cellule électrochimique est à usage unique, ce qui permet de répéter un grand nombre d'expériences rapidement, sans besoin de renouveler la surface des électrodes par polissage.
- elles sont peu coûteuses et faciles à fabriquer.
- elles permettent de travailler avec de très faibles volumes d'échantillons que l'on dépose sous forme de gouttelettes (30 à 50 μL) à la surface des électrodes. Ceci permet donc de faire une grande économie sur la quantité d'ARN employée.
- les faibles courants capacitifs des électrodes sérigraphiées permettent un meilleur rapport signal/bruit et donc une meilleure sensibilité de détection des courants faradiques. Ceci permet d'atteindre de plus faibles concentrations lors des mesures.

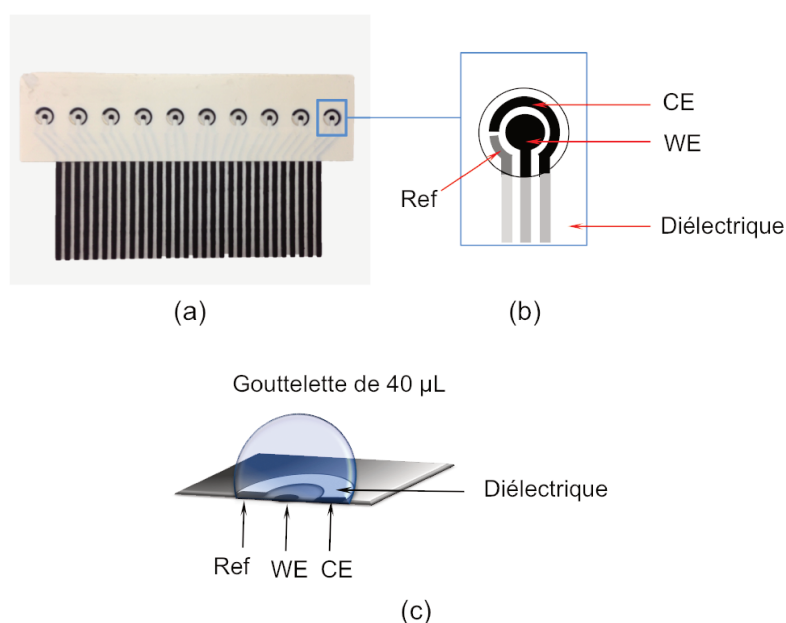


FIGURE III.9 – (a) Electrodes sérigraphiées utilisées au laboratoire. (b) et (c) Représentations schématiques d'une cellule électrochimique. WE: Electrode de travail ($S = 0.0177 \text{ cm}^2$), CE: Contre-électrode, Ref: Electrode de référence Ag/AgCl.

Comme représenté en figure III.9, ces électrodes sérigraphiées (SPEC pour *Screen-printed electrochemical cell*) réunissent sur une petite surface, les trois constituants d'une cellule électrochimique classique. Une WE de carbone de surface $S = 0.0177 \text{ cm}^2$, une CE de carbone et une pseudo-électrode de référence Ag/AgCl. Lors de la fabrication de ces électrodes, l'encre d'argent est la première à être déposée sur un film de polyéthylène téréphtalate avant d'être séchée pendant 15 min à 120°C . Une couche d'encre de carbone est ensuite déposée selon le même procédé et aboutit à la formation de la CE et de la WE par superposition sur la couche d'argent précédente. Cette encre de carbone contient une matrice polymère, mélangée à des particules de carbone de taille micrométrique qui polymérisent sous l'action de la chaleur. Cette réticulation, permet l'élaboration d'un réseau tridimensionnel conducteur. La sérigraphie se termine par le dépôt d'une dernière couche diélectrique hydrophobe de façon à encercler ces trois électrodes et à délimiter une sorte de micropuit d'environ 0.2 cm^2 de surface. Grâce à ce dispositif, les mesures électrochimiques ont pu être réalisées dans des gouttelettes. Pour tous les résultats présentés, il sera précisé lorsque les mesures ont été conduites dans des conditions stationnaires (sans agitation de la solution) ou dans des conditions hydrodynamiques (agitation de la solution à vitesse constante à l'aide du dispositif de gouttelette tournante que l'on évoquera ultérieurement).

Les intensités des courants de pic en CV pour différentes concentrations en FcPRM ont tout d'abord été examinées. Comme indiqué sur la figure III.10, le potentiel standard (E°) de la sonde FcPRM est centré autour de 0.4 V (vs. Ag/AgCl). La figure III.10 - a, représente un voltamogramme de la sonde FcPRM à $50 \mu\text{M}$ et où $\frac{i_{p_a}}{i_{p_c}}$ est très proche de 1 ($\frac{i_{p_a}}{i_{p_c}} = 1.1$). Ce voltamogramme possède l'allure d'un voltamogramme "classique" pour un groupement Fc, où le passage de la forme réduite (Fe^{II}) à oxydée (Fe^{III}) suit un transfert d'électron rapide et parfaitement réversible. Cependant, à plus faible concentration en sonde FcPRM, une dissymétrie des pics de courant anodique et cathodique a été observée. En calculant le rapport des courants de pics anodique et cathodique $\frac{i_{p_a}}{i_{p_c}}$, une valeur proche de 1.6 a été obtenue. Cette valeur, ainsi que l'allure du voltamogramme montrent que le transfert électronique n'est pas entièrement contrôlé par un transport diffusionnel (figure III.10 - b). Ce comportement suggère que la molécule sous forme réduite s'adsorbe à la surface de l'électrode, ce qui tend à accroître le courant anodique au détriment du courant cathodique.

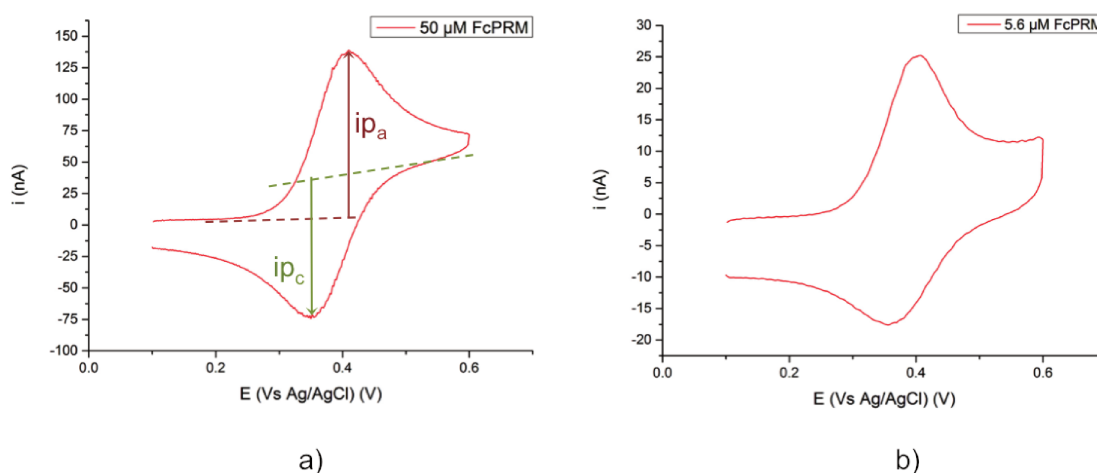


FIGURE III.10 – Voltammogrammes de la sonde FcPRM mesurés à deux concentrations, dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl . a) $[\text{FcPRM}] = 50 \mu\text{M}$. b) $[\text{FcPRM}] = 5.6 \mu\text{M}$.

Ces mesures initiales en CV ont été réalisées sur des électrodes sérigraphiées "nues", c'est-à-dire sans préparation préalable de leur surface. Afin de vérifier la relation de proportionnalité entre le courant i et la concentration C_{Red} en solution (comme le prédit l'équation théorique 3, dans le cas où l'on considère l'espèce Red du couple redox), nous avons examiné la variation de courant de pic anodique à différentes concentrations en sonde FcPRM (figure III.11). L'allure dispersées de ces points indique un manque de reproductibilité des mesures. Ce problème de reproductibilité est probablement lié aux phénomènes d'adsorption précédemment mentionnés.

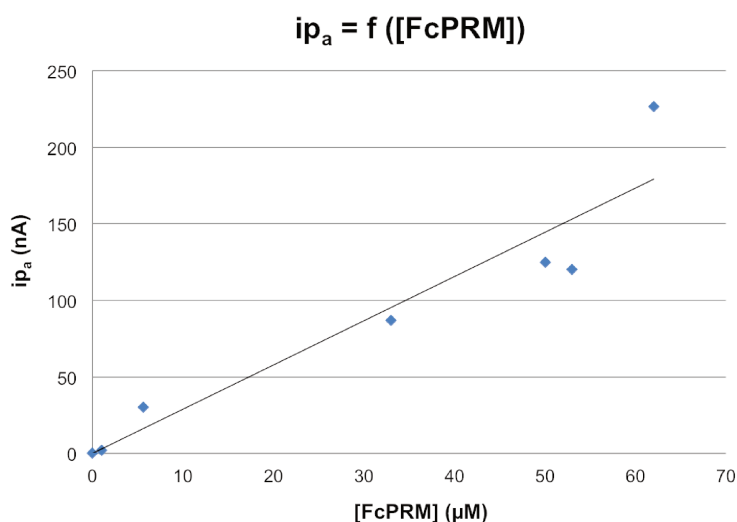


FIGURE III.11 – Courants représentés en fonction de la concentration en FcPRM, obtenus par CV sur électrodes sérigraphiées "nues" dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl.

Nous avons donc cherché à résoudre ce problème de reproductibilité en traitant la surface des électrodes par différents adjuvants. Plusieurs types de traitements de surface ont été testés et la figure III.12 montre les voltamogrammes obtenus.

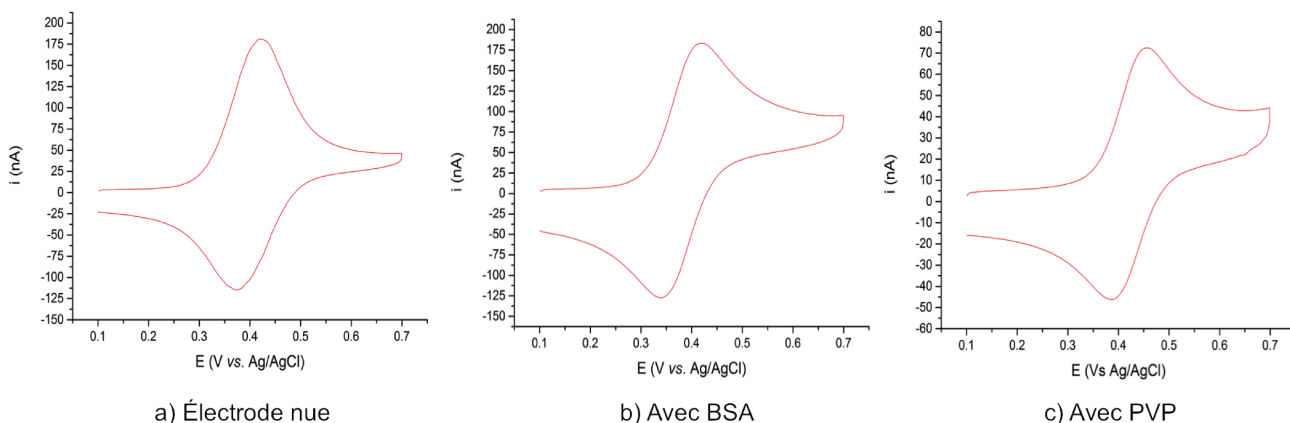


FIGURE III.12 – Allure des voltamogrammes de la sonde FcPRM (54 µM) dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl. a) sur électrode nue. b) avec BSA. c) avec PVP.

L'albumine de sérum bovin (BSA pour *Bovine serum albumin*) a tout d'abord été testée. Cette protéine inerte est couramment utilisée pour lutter contre les phénomènes d'adsorption en rendant la surface hydrophile. L'ensemble des surfaces des cellules électrochimiques ont donc été traitées par une monocouche de BSA et pour cela, une gouttelette d'une solution de BSA à 0.1 % a été déposée sur chaque cellule pendant 10 min. Les cellules sont ensuite rincées à deux reprises avec de l'eau ultra-pure, puis utilisées pour des mesures en voltamétrie cyclique. Dans ces conditions, une vague réversible beaucoup plus symétrique est obtenue (figure III.12 - b). Egalement, la séparation entre les deux courants de pics ($\Delta E = E_a - E_c$) est d'environ $\Delta E \approx 65$ mV (contre $\Delta E \approx 48$ mV en absence de BSA), ce qui est caractéristique d'un transfert électronique rapide et réversible, entièrement contrôlé par un transport diffusionnel. Comme l'atteste la courbe de calibration en figure III.13, l'utilisation de la BSA permet également d'obtenir une meilleure reproductibilité des mesures, et ce même en travaillant à de faibles concentrations.

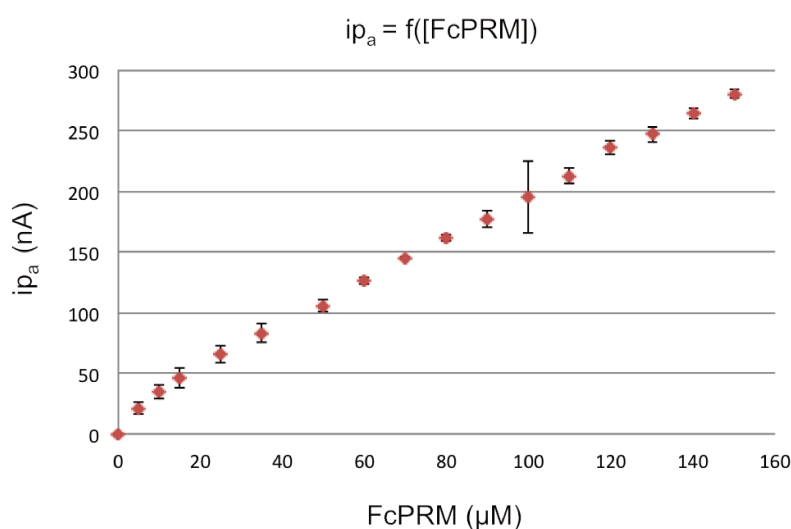


FIGURE III.13 – Courants représentés en fonction de la concentration en FcPRM, obtenus par CV sur électrodes sérigraphiées et pré-conditionnées à la BSA (réalisé en triplicata). Mesures réalisées dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5, en présence de 50 mM KCl.

Un autre adjuvant de traitement de surface, le polyvinylpyrrolidone (PVP), a également été testé (figure III.12 - c). Le PVP est un polymère hydrosoluble neutre, utilisé pour former des films sur les surfaces. Il présente comme avantage de permettre une bonne mouillabilité tout en étant chimiquement inerte. Il est intéressant de comparer les valeurs de courant obtenues selon le mode de préparation de la surface de l'électrode. Comme le montre le tableau III.1, à une même concentration en FcPRM, les courants mesurés sont légèrement plus intenses en présence de BSA que de PVP. La donnée importante à retenir ici est surtout la reproductibilité des mesures. Au vu des écarts types mesurés, les mesures effectuées en présence de BSA sont plus reproductibles qu'en présence de PVP.

	ip_a (en nA) pour [FcPRM] = 33 μM
Albumine de sérum bovin (BSA)	90 ± 8,1 nA (sur 6 mesures)
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	79 ± 27,1 nA (sur 10 mesures)

TABLE III.1 – Comparaison des courants selon l'utilisation de BSA ou de PVP pour une solution en sonde FcPRM à 33 μM dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5, 50 mM KCl.

Cette différence d'intensité de courant peut être expliquée par le fait que:

- le PVP passive partiellement l'électrode et donc a pour effet de réduire l'intensité du courant.
- la BSA est responsable d'un gain en courant en raison de son point isoélectrique situé aux alentours de 4.8 dans l'eau à 25 °C. La BSA est donc chargée négativement et autorise, via des interactions électrostatiques, une légère préconcentration de la sonde redox (chargée positivement) à la surface de l'électrode.

En raison de la bonne reproductibilité des mesures et du léger gain de sensibilité par rapport au PVP, nous avons décidé d'utiliser la BSA. Ainsi, toutes les mesures réalisées par la suite ont fait appel à cette étape de pré-conditionnement des électrodes par la BSA.

De façon générale, les aminoglycosides possèdent une solubilité limitée, que ce soit en solvant organique ou en solution aqueuse. Il est donc important de vérifier que les solutions mères de FcPRM sont stables dans le temps. De plus, en raison des conditions d'éluion utilisées pour la purification de la sonde FcPRM par chromatographie sur colonne (cf. chapitre II), il est probable le solide isolé contient de la silice. Une fois la sonde FcPRM solubilisée, il est donc indispensable de s'assurer de la concentration exacte de la solution mère avant d'entreprendre toute expérience électroanalytique. Une façon de s'assurer de la valeur de la concentration est d'utiliser l'équation théorique 3 qui relie l'intensité de courant à la concentration. Cependant, une donnée reste encore inconnue, le coefficient de diffusion D pour la sonde FcPRM.

Le coefficient de diffusion D de la sonde FcPRM a donc été déterminé à l'aide de la méthode qui suit. Les voltammogrammes d'une même solution en FcPRM, ont été successivement enregistrés dans des conditions stationnaires puis hydrodynamiques. Les mesures en conditions hydrodynamiques font appel à un dispositif rotatif dont nous décrivons le principe en partie III - 1). En tirant parti des équations d'intensité de courant pour chacun de ces deux régimes de diffusion, il a été possible d'en déduire une expression nous permettant d'avoir accès à la valeur du coefficient de diffusion D sans avoir à connaître précisément la concentration de FcPRM en solution. Rappelons que pour un voltammogramme en conditions stationnaires, l'intensité de courant de pic est donné par la relation:

$$ip_1 = 0.446 nFS C_{Red}^{sol} \sqrt{D_{Red}} \sqrt{\frac{nFv}{RT}}$$

Egalement, l'intensité de courant de pic dans des conditions hydrodynamiques de gouttelette tournante est donnée par la relation suivante (équation de Levich corrigée, explicitée en partie III - 1), page 114):

$$ip_2 = 0.465 nFS D_{Red}^{2/3} v^{-1/6} \omega^{1/2} C_{Red}^{sol}$$

En enregistrant successivement des voltammogrammes dans les deux régimes de transport pour une même solution de FcPRM et en faisant le rapport de ces deux équations, on obtient:

$$\begin{aligned} \frac{i_{p1}}{i_{p2}} &= \frac{0.446 nFS C_{Red}^{sol} \sqrt{D_{Red}} \sqrt{\frac{nFv}{RT}}}{0.465 nFS D_{Red}^{2/3} v^{-1/6} \omega^{1/2} C_{Red}^{sol}} \\ &= \frac{0.446 \sqrt{D_{Red}} \sqrt{\frac{nFv}{RT}}}{0.465 D_{Red}^{2/3} v^{-1/6} \omega^{1/2}} \\ &= D_{Red}^{-1/6} \times \frac{0.446 \sqrt{\frac{nFv}{RT}}}{0.465 v^{-1/6} \omega^{1/2}} \end{aligned}$$

en utilisant les paramètres suivants¹⁷³: v la vitesse de balayage (à 0.1 V.s⁻¹), ν la viscosité de la solution (0.01 cm².s⁻¹ à 25 °C), ω la vitesse de rotation de l'électrode tournante (2500 rpm, soit 262 rad.s⁻¹), F la constante de Faraday, R la constante des gaz parfaits et T la température (298 K).

On obtient alors l'expression suivante permettant de déterminer la constante de diffusion D :

$$D_{Red} = {}^{-1/6} \sqrt{\frac{i_{p1}}{0.0543 \times i_{p2}}} \quad (5)$$

La détermination de D a été effectuée dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA, à 25 °C et en faisant tourner l'électrode à une vitesse de 2500 rpm. Nous avons ainsi pu déterminer un coefficient de diffusion D pour la sonde FcPRM égal à $D = 2 \pm 1.10^{-6}$ cm².s⁻¹ (moyenne sur dix mesures).

Après avoir déterminé la valeur de D pour la sonde FcPRM, nous avons cherché à tirer parti d'une mesure par chronoampérométrie sur une gouttelette tournante afin de connaître la concentration d'une solution mère de FcPRM. A partir du courant stationnaire qui est mesuré à + 0.5 V vs. Ag/AgCl et en utilisant l'équation théorique de la page 104 qui relie l'intensité de courant à la concentration en espèce électroactive en solution, il devient alors possible de déterminer la concentration en solution FcPRM utilisée. La figure III.14 donne un exemple de chronoampérogramme obtenu lors d'une expérience de vérification de la concentration.

En lisant la valeur du courant de plateau, il est possible de déterminer la concentration de la solution en sonde FcPRM grâce à la relation rappelée ci-dessous:

$$i_{pl} = 0.465 nFS D_{Red}^{2/3} v^{-1/6} \omega^{1/2} C_{Red}^{sol}$$

d'où:

$$C_{Red}^{sol} = \frac{i_{pl}}{0.465 nFS D_{Red}^{2/3} v^{-1/6} \omega^{1/2}}$$

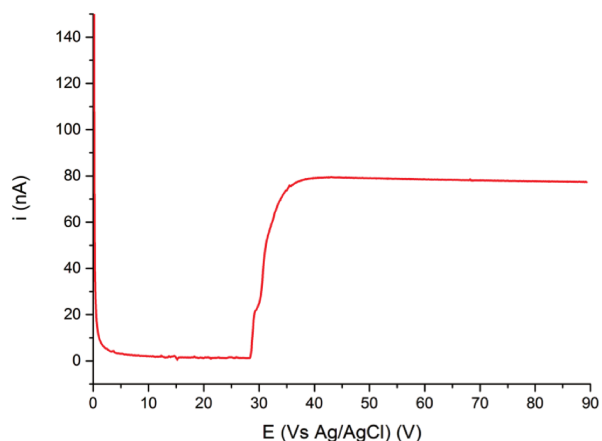


FIGURE III.14 – Exemple de chronoampérogramme utilisé pour déterminer la concentration d'une solution de FcPRM. Chronoampérogramme enregistré à un potentiel $E = + 0.5$ V vs. Ag/AgCl dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl contenant la sonde FcPRM à 50 μ M.

Egalement, nous avons vérifié la stabilité de la molécule FcPRM en solution dans le temps. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de sa réponse électrochimique avec le temps, une fois qu'elle est solubilisée dans le tampon MES. Nous avons initialement préparé une solution de sonde FcPRM à 400 μ M (dont la concentration a été déterminée par la méthode décrite ci-dessus). Cette solution a été conservée pendant plusieurs jours et sa concentration a été mesurée par chronoampérométrie sur gouttelette tournante à intervalles de temps réguliers. La figure III.15 rend compte de l'évolution de la concentration en sonde FcPRM avec le temps. Elle montre une décroissance monotonique qui suggère une instabilité de la sonde FcPRM en solution. Dès lors, une solution neuve de FcPRM a été préparée quotidiennement et sa concentration a été systématiquement vérifiée par chronoampérométrie en utilisant la gouttelette tournante. Ce protocole a été suivi de façon systématique afin de garantir l'exactitude des concentrations en FcPRM et éviter les biais dans les mesures de courant dûs à de fausses valeurs de concentration ou à une dégradation de la sonde en solution.

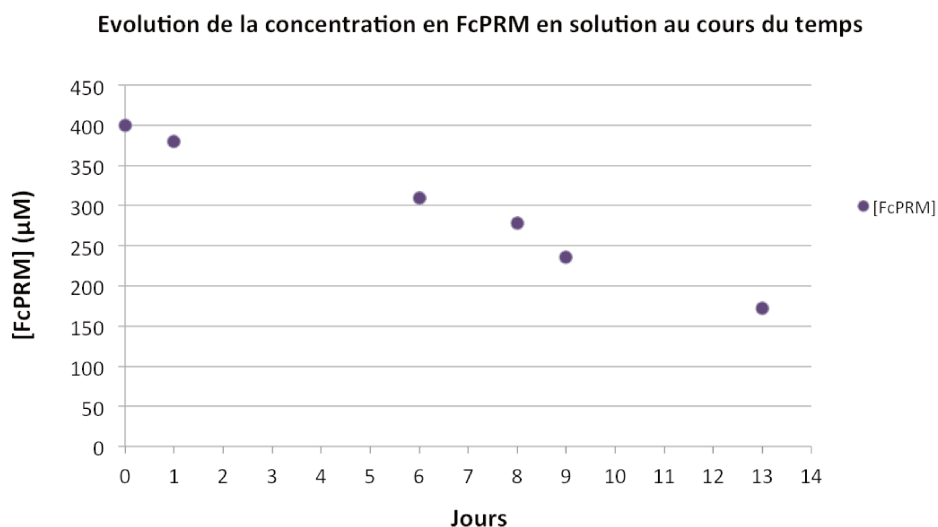


FIGURE III.15 – Suivi de la concentration d'une solution de FcPRM (tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl) au cours du temps.

Nous avons pu voir au cours de cette partie que plusieurs ajustements ont été nécessaires afin de pouvoir utiliser la sonde FcPRM. Son utilisation s'est accompagnée de plusieurs difficultés: irreproductibilité des valeurs de courant, incertitude sur la concentration en sonde et faible stabilité de celle-ci en solution. En mettant au point un protocole de préparation des électrodes et de vérification des concentrations, nous sommes parvenus à un meilleur contrôle des mesures. Malgré cela, des inconvénients inhérents à la préparation des électrodes sérigraphiées apportent également de la variabilité dans les mesures. Ces électrodes sont sérigraphiées au sein du laboratoire et de ce fait chaque lot est différent selon l'expérimentateur, la qualité des encres de sérigraphie utilisées, ...

Toutes ces difficultés ont finalement pu être minimisées grâce à l'établissement du protocole suivant:

1. Nettoyage des électrodes sérigraphiées à l'éthanol absolu avant toute manipulation. En vue des expériences à mener en présence d'ARN, un nettoyage des électrodes à l'éthanol absolu s'est avéré indispensable afin de garantir une surface de travail libre de toutes traces de RNases, susceptibles de dégrader l'ARN. Egalement, un matériel entièrement stérile et "RNase-free" (pipettes, cônes, paillasse, ...) a été utilisé.
2. Préparation d'une solution mère fraîche de sonde FcPRM dans le tampon MES quotidiennement, suivi de la vérification systématique de sa concentration par chronoampérométrie en conditions hydrodynamiques
3. Réalisation des expériences de titration dans une gouttelette déposée sur une cellule électrochimique sérigraphiée et normalisation des courants mesurés par rapport à celui de départ. Ceci permet de ne prendre en compte que l'amplitude de chute du signal lors des expériences de titration.
4. Répétition des expériences un grand nombre de fois avec différentes cellules électrochimiques sérigraphiées, afin de vérifier la validité des résultats.

Une fois les propriétés électrochimiques de la sonde FcPRM déterminées, nous avons pu envisager de caractériser son interaction avec différentes structures d'ARN. A l'exception des études cinétiques, la totalité des mesures électrochimiques présentées ont été réalisées par voltamétrie cyclique dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA, en balayant de 0.1 à 0.7 V (vs. Ag/AgCl) à $v = 0.1 \text{ V.s}^{-1}$.

II - 2) Détermination de la constante de dissociation entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23

Après avoir caractérisé la sonde FcPRM puis avoir élaboré un protocole permettant de contrôler les aspects quantitatifs de cette molécule libre en solution, nous nous sommes intéressés à son interaction avec l'ARNr 16S23. Le premier objectif a été de vérifier que la molécule FcPRM interagit avec cet ARNr et que cette interaction peut être détectée par voie électrochimique. En partant d'une concentration fixe en FcPRM et en additionnant progressivement de l'ARN, on peut s'attendre à ce que le courant diminue en raison d'une diminution du coefficient de diffusion de la sonde FcPRM, une fois liée à l'ARN.

Un test préliminaire a été réalisé en partant d'une gouttelette (38.5 μL) de solution tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA contenant 15 μM de sonde FcPRM, déposée à la surface d'une électrode sérigraphiée. Un premier voltamogramme de la sonde seule à cette concentration a été enregistré dans des conditions stationnaires. Ce voltamogramme montre un signal réversible du marqueur ferrocène dont l'intensité du pic anodique reflète la concentration en FcPRM. Dans cette même gouttelette, 8.3 eq. d'ARNr 16S23 (5.6 μL d'une solution stock à 982 μM , soit 124.5 μM) ont été additionnés et la réponse par CV a été de nouveau enregistrée. Le voltamogramme résultant (en rouge sur la figure III.16) montre toujours la présence d'une vague réversible centrée sur le potentiel standard du marqueur ferrocène (avec un léger décalage vers les potentiels cathodiques) mais avec des intensités de courants de pics anodique et cathodique significativement plus faibles.

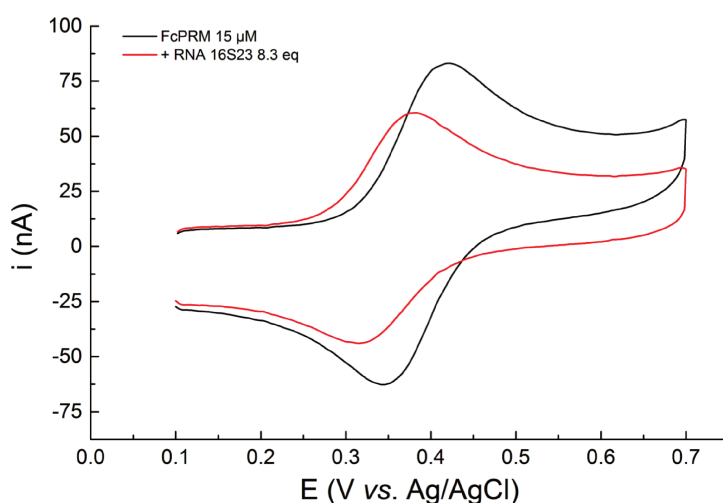


FIGURE III.16 – Observation de la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM par CV dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. Le voltamogramme noir représente la sonde seule en solution ($[\text{FcPRM}] = 15 \mu\text{M}$). Le voltamogramme rouge correspond à l'addition de 8.3 eq d'ARNr 16S23 à la solution de FcPRM.

Cette diminution du courant montre qu'il y a bien reconnaissance entre l'ARN et l'aminoglycoside cible et que le complexe ainsi formé est moins facilement détectable. Des expériences de dosage ont ensuite été réalisées en additionnant des quantités croissantes d'ARNr 16S23 à une solution de FcPRM à 15 μM . Comme en ITC, ces expériences ont été réalisées dans un tampon 10 mM MES pH 5.5 contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA. Les voltamogrammes ont été enregistrés en balayant entre 0.1 et 0.7 V (vs. Ag/AgCl) à $v = 0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$. Les voltamogrammes représentés sur la figure III.17 - a, ont été obtenus au cours d'une expérience de dosage qui s'est déroulée selon le protocole qui suit. Dans cette expérience, une gouttelette ($V_0 = 38.5 \mu\text{L}$) d'une solution de sonde FcPRM à 15 μM a été déposée à la surface d'une électrode sérigraphiée et un premier voltamogramme a été enregistré. L'enregistrement de ce voltamogramme est renouvelé jusqu'à parfaite stabilisation des courants de pics anodique et cathodique. Après l'obtention de pics stables, la procédure consiste à réaliser des ajouts successifs de microvolumes d'une solution d'ARNr 16S23 (à partir d'une solution mère à 982 μM) dans cette même gouttelette de solution en sonde FcPRM, et à suivre l'évolution du courant en résultant. Ces additions successives d'ARNr 16S conduisent à des effets de dilution de la concentration en

sonde FcPRM. Cette dilution de la concentration initiale en sonde FcPRM est corrigée lors de l'exploitation des résultats. Pour cela, les valeurs de courants de pics anodiques mesurés sont multipliés par un facteur correctif $D_{\text{factor}} = V_0/V_{\text{(après injection)}}$. On obtient alors des valeurs de courant, corrigées de la dilution grâce à l'opération suivante: $i_{\text{corr}} = i_{\text{p}_a} \times D_{\text{factor}}$. L'évolution des courants de pics non corrigés, puis corrigés des effets de la dilution suivent un profil tels que ceux montrés sur la figure III.17 - b. Enfin, les courants de pics anodiques corrigés ont été normalisés par rapport au courant de pic anodique initial de la sonde FcPRM seule en solution, afin de rendre compte de l'amplitude de chute du signal lié à la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM. Notons également qu'entre chaque addition d'ARN à la gouttelette, nous avons attendu quelques secondes pour que le signal se stabilise de manière à être à l'équilibre.

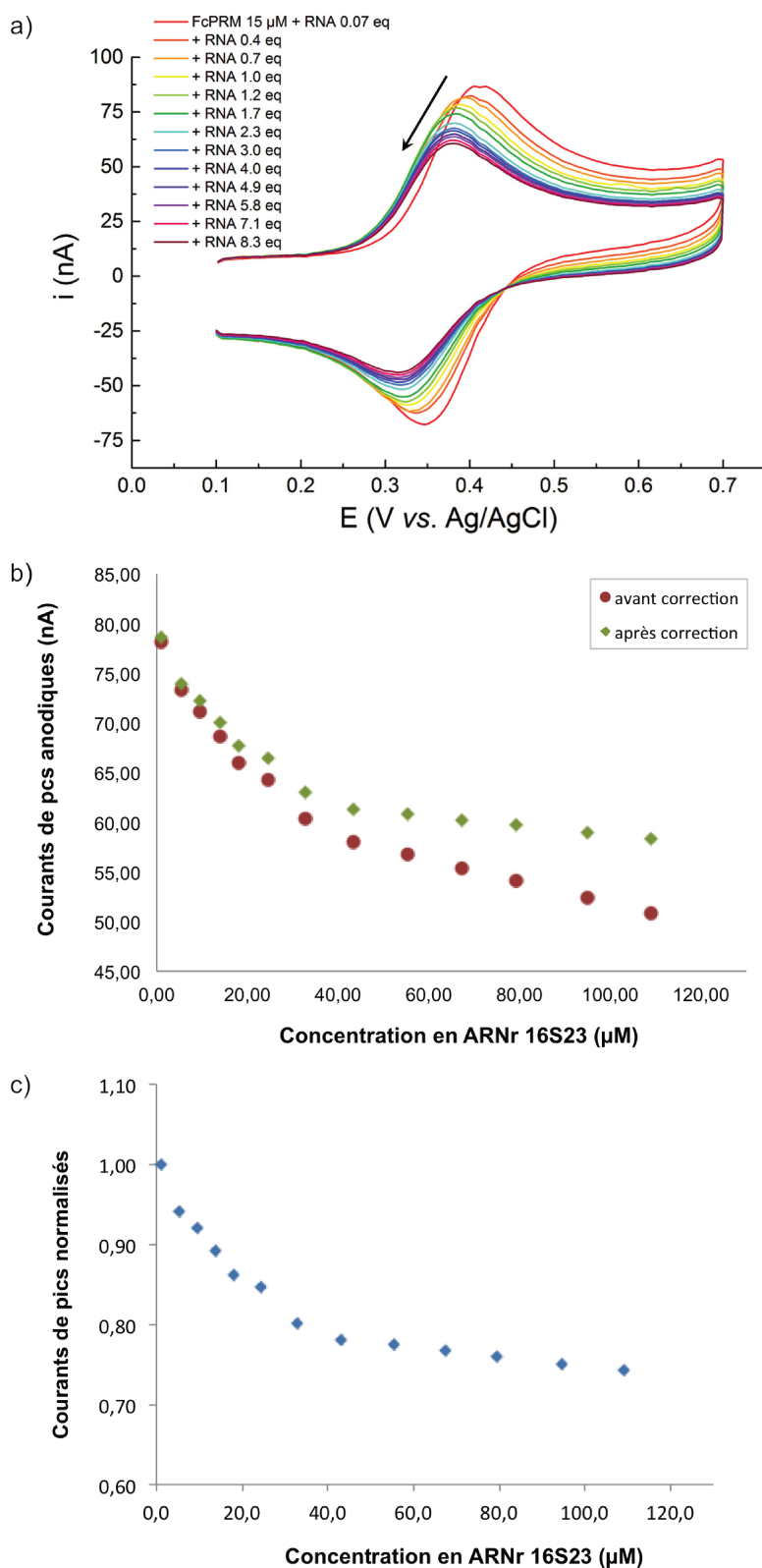
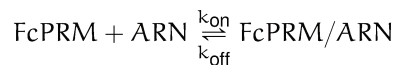


FIGURE III.17 – Expérience de titration de la sonde FcPRM par l'ARNr 16S23, suivie par voltamétrie cyclique. a) Voltammogrammes d'une solution de sonde FcPRM (15 μM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) en présence de concentrations croissantes en ARNr 16S23. b) Courbe de titrage obtenue à partir du report des valeurs de courants de pics anodiques en fonction de la concentration en ARNr 16S23. en rouge: courants bruts. en vert: courants corrigés de la dilution. c) Courbe de titrage obtenue à partir des valeurs de courants de pics anodiques corrigés et normalisés, représentés en fonction de la concentration en ARNr 16S23

A partir de cette courbe de dosage, il est possible d'extraire la constante de dissociation K_D^* caractéristique de la réaction équilibrée de reconnaissance entre l'ARNr 16S23 et la sonde FcPRM:



Pour cela, il est toutefois nécessaire d'établir la relation théorique entre le courant mesuré et la concentration en sonde FcPRM libre et liée présente en solution. Cela conduit donc à considérer un schéma réactionnel carré, tel que celui représenté en figure III.18. Il faut également tenir compte de la réaction équilibrée qui peut avoir lieu entre l'ARNr 16S23 et la forme oxydée de la sonde FcPRM (Fc^+PRM), générée dans la couche de diffusion-réaction au cours du balayage cyclique.

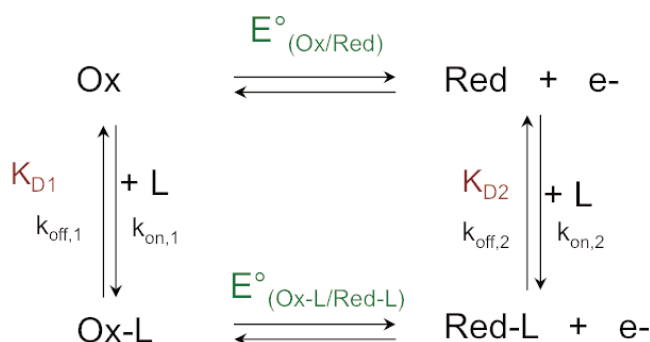


FIGURE III.18 – Equilibres réactionnels se produisant en solution.

avec Ox la forme oxydée de la sonde (Fc^+PRM), Red sa forme réduite (FcPRM), L représente l'ARN, Ox-L et Red-L représentent respectivement la sonde sous forme oxydée et réduite complexée à l'ARN (Fc^+/ARN et FcPRM/ARN).

A partir de ce schéma carré, deux situations peuvent être envisagées.¹⁷⁴ Ces équilibres réactionnels peuvent être considérés comme étant:

- statiques: les cinétiques d'association et de dissociation de la sonde FcPRM, réduite ou oxydée, en présence d'ARN sont lentes par rapport à l'échelle de temps de la mesure électrochimique. Dans ce cas, le courant mesuré est directement proportionnel aux deux formes libre et lié de FcPRM en solution.
- dynamiques: les cinétiques d'association et de dissociation de la sonde FcPRM, réduite ou oxydée, avec l'ARN sont rapides par rapport à l'échelle de temps de la mesure électrochimique. Dans ce cas, un signal moyenné représentant à la fois la forme libre et liée de la sonde FcPRM (sous forme réduite ou oxydée) est enregistré.

Si l'on considère un équilibre statique, l'intensité (I) du courant mesuré au cours de la titration est donc la somme des intensités des courants relatifs aux formes libre et liée de la sonde FcPRM. Sachant que l'équation générale de courant de pic est donnée par:

$$i_a = \underbrace{0.446 nFS \sqrt{\frac{nFv_a}{RT}}}_{\alpha} C_{\text{Red}} \sqrt{D_{\text{Red}}}$$

$$= \alpha C_{\text{Red}} \sqrt{D_{\text{Red}}}$$

L'expression de I s'écrit donc:

$$I = i_{\text{libre}} + i_{\text{liée}}$$

$$= \alpha \left(\sqrt{D_{\text{libre}}} C_{\text{libre}} + \sqrt{D_{\text{liée}}} C_{\text{liée}} \right)$$

En utilisant les expressions des fractions molaires (χ) pour les formes libre et liée de la sonde FcPRM, $\chi_{\text{libre}} = \frac{C_{\text{libre}}}{C_{\text{tot}}}$ et $\chi_{\text{liée}} = \frac{C_{\text{liée}}}{C_{\text{tot}}}$, l'expression de I devient:

$$I = \alpha \left(\sqrt{D_{\text{libre}}} \chi_{\text{libre}} C_{\text{tot}} + \sqrt{D_{\text{liée}}} \chi_{\text{liée}} C_{\text{tot}} \right)$$

$$= \alpha C_{\text{tot}} \left(\sqrt{D_{\text{libre}}} \chi_{\text{libre}} + \sqrt{D_{\text{liée}}} \chi_{\text{liée}} \right)$$

$$= \underbrace{\alpha C_{\text{tot}} \sqrt{D_{\text{libre}}}}_{I_0} \left(\chi_{\text{libre}} + \sqrt{\frac{D_{\text{liée}}}{D_{\text{libre}}}} \chi_{\text{liée}} \right)$$

$$= I_0 \left(\chi_{\text{libre}} + \sqrt{\frac{D_{\text{liée}}}{D_{\text{libre}}}} \chi_{\text{liée}} \right)$$

$$\frac{I}{I_0} = \chi_{\text{libre}} + \sqrt{\frac{D_{\text{liée}}}{D_{\text{libre}}}} \chi_{\text{liée}}$$

En posant, $\sqrt{\frac{D_{\text{liée}}}{D_{\text{libre}}}} = \frac{I_{\text{liée}}}{I_{\text{libre}}}$, on a alors:

$$\frac{I}{I_0} = \chi_{\text{libre}} + \left(\frac{I_{\text{liée}}}{I_{\text{libre}}} \right) (1 - \chi_{\text{libre}}) \quad (6)$$

Cette équation générale exprime la variation de courant due à une modification de la vitesse de diffusion d'une sonde électrochimique en solution.

L'expression de la constante de dissociation K_D^* pour l'équilibre de dissociation d'un complexe de stoechiométrie 1:1 entre l'ARNr 16S23 et la sonde FcPRM s'exprime de la façon suivante:

$$K_D^* = \frac{[\text{FcPRM}]_{\text{libre}} \times [\text{ARN}]_{\text{libre}}}{[\text{FcPRM/ARN}]}$$

avec $[\text{FcPRM}] = [\text{FcPRM}]_{\text{libre}} + [\text{FcPRM/ARN}]$

et $[\text{ARN}] = [\text{ARN}]_{\text{libre}} + [\text{FcPRM/ARN}]$

D'où:

$$K_D^* = \frac{([\text{FcPRM}] - [\text{FcPRM/ARN}]) \times ([\text{ARN}] - [\text{FcPRM/ARN}])}{[\text{FcPRM/ARN}]}$$

$$\underbrace{[\text{FcPRM/ARN}]^2}_{x^2} - \underbrace{(K_D + [\text{FcPRM}] + [\text{ARN}])}_{b} \cdot [\text{FcPRM/ARN}] + \underbrace{([\text{FcPRM}] \cdot [\text{ARN}])}_{c} = 0$$

On reconnaît un polynôme du second degré que l'on peut alors résoudre:

$$\Delta = (K_D^* + [FcPRM] + [ARN])^2 - 4([FcPRM][ARN])$$

Ce polynôme possède deux solutions, dont seulement une est possible:

$$[FcPRM]/[ARN] = \frac{K_D^* + [FcPRM] + [ARN] - \sqrt{\Delta}}{2}$$

En introduisant cette expression dans l'équation 6, on peut alors en déduire l'expression finale 7 qui exprime la valeur du courant en fonction des concentrations en espèces initialement présentes en solution lorsque l'on se place dans le cas d'un équilibre statique:

$$\frac{I}{I_{libre}} = \left(1 - \frac{K_D^* + [FcPRM] + [ARN] - \sqrt{(K_D^* + [FcPRM] + [ARN])^2 - 4[FcPRM][ARN]}}{2[FcPRM]} \right) \left(1 - \left(\frac{I_{liée}}{I_{libre}} \right) \right) \quad (7)$$

avec I l'intensité de courant de pic de la sonde FcPRM enregistrée à une concentration donnée d'ARN, I_{libre} l'intensité de courant de pic obtenue pour la sonde FcPRM seule, $I_{liée}$ l'intensité de courant de pic obtenue pour une concentration infinie d'ARN, $[FcPRM]$ et $[ARN]$ les concentrations totales en sonde et en ARN dans la gouttelette de mesure.

Compte tenu du schéma carré précédemment décrit, l'autre option est d'envisager un équilibre réactionnel dynamique. Dans ce cas, le signal moyenné représentatif des formes libre et liée en solution doit être pris en considération dans l'expression du K_D^* . On peut le démontrer d'une façon similaire à l'équilibre statique précédent, où $I = i_{libre} + i_{liée}$. La différence ici, consiste à introduire une espèce "intermédiaire" illustrant la réaction d'association et de dissociation très rapide se produisant en solution. De ce fait, cette espèce possède un coefficient de diffusion apparent D_{app} qui prend en compte les deux formes de la sonde: $D_{app} = \chi_{libre} D_{libre} + \chi_{liée} D_{liée}$. L'expression du courant devient alors:

$$\begin{aligned} I &= \alpha C_{libre} \sqrt{D_{app}} + \alpha C_{liée} \sqrt{D_{app}} \\ &= \alpha \sqrt{D_{app}} (C_{libre} + C_{liée}) \\ &= \alpha \sqrt{D_{libre} \chi_{libre} + D_{liée} \chi_{liée}} (C_{libre} + C_{liée}) \\ &= \alpha \sqrt{D_{libre} \chi_{libre} + D_{liée} \chi_{liée}} (\chi_{libre} C_{tot} + \chi_{liée} C_{tot}) \\ &= \alpha C_{tot} \sqrt{D_{libre}} \sqrt{\chi_{libre} + \frac{D_{liée}}{D_{libre}} \chi_{liée}} (\chi_{libre} + \chi_{liée}) \\ &= I_0 \sqrt{\chi_{libre} + \frac{D_{liée}}{D_{libre}} \chi_{liée}} (\chi_{libre} + \chi_{liée}) \end{aligned}$$

On obtient alors:

$$\frac{I}{I_0} = \sqrt{\chi_{libre} + (1 - \chi_{libre})} \times \left(\frac{I_{liée}}{I_{libre}} \right)^2 (\chi_{libre} + \chi_{liée}) \quad (8)$$

On procède de façon similaire à la démonstration en conditions d'équilibre statique, en introduisant l'expression du K_D^* dans l'équation 8. Finalement, on parvient à l'équation 9) qui est valable pour des conditions d'équilibre dynamique:

$$\frac{I}{I_{\text{libre}}} = \sqrt{\left(1 - \frac{K_D^* + [\text{FcPRM}] + [\text{ARN}] - \sqrt{(K_D^* + [\text{FcPRM}] + [\text{ARN}])^2 - 4[\text{FcPRM}][\text{ARN}]}}{2[\text{FcPRM}]}\right) \left(1 - \left(\frac{I_{\text{liée}}}{I_{\text{libre}}}\right)^2\right) + \left(\frac{I_{\text{liée}}}{I_{\text{libre}}}\right)^2} \quad (9)$$

avec I l'intensité de courant de pic de la sonde FcPRM enregistrée à une concentration donnée d'ARN, I_{libre} l'intensité de courant de pic obtenue pour la sonde FcPRM seule, $I_{\text{liée}}$ l'intensité de courant de pic obtenue pour une concentration infinie d'ARN, $[\text{FcPRM}]$ et $[\text{ARN}]$ les concentrations totales en sonde et en ARN dans la gouttelette de mesure.

L'ajustement par régression non-linéaire des équations 7 ou 9 aux résultats expérimentaux doit donc nous permettre d'extraire une valeur de K_D^* . Les voltamogrammes de l'expérience de titration précédemment illustrés en figure III.17 ont été analysés en utilisant ces deux types d'ajustement. La figure III.19 montre le profil des courbes obtenues dans les deux cas.

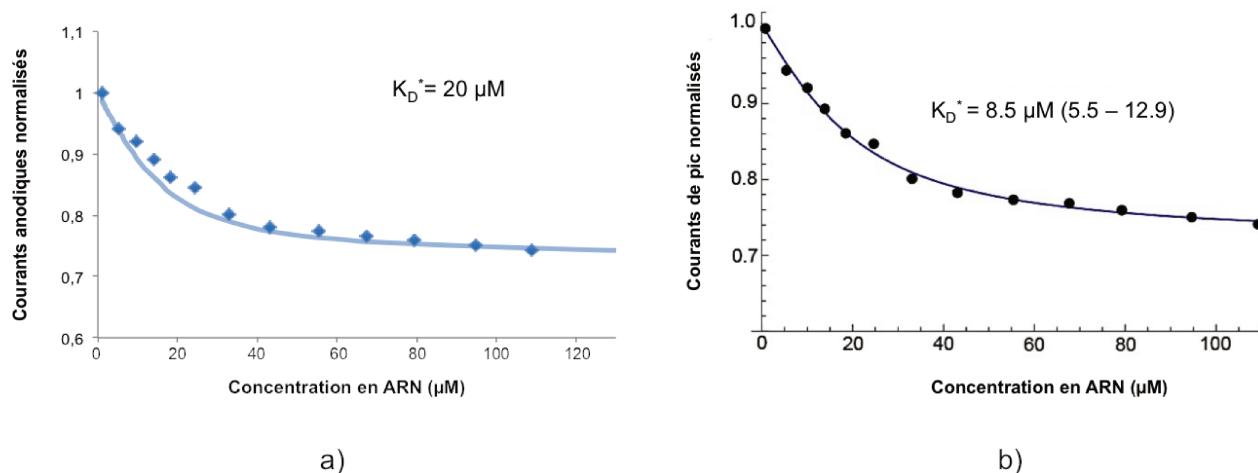


FIGURE III.19 – Courbes de dosage obtenues (pour une solution en FcPRM égale à $15 \mu\text{M}$ dans un tampon $10 \text{ mM MES pH } 5.5$, 150 mM NaCl , 0.1 mM EDTA) par régression non-linéaire des valeurs de pics de courants anodiques normalisés puis représentés en fonction de la concentration en ARN. a) Equilibre statique (équation 7). b) Equilibre dynamique (équation 9).

Le meilleur ajustement des données est obtenu avec l'équation 9. Nous avons donc fait le choix d'analyser nos données avec cette équation et de considérer que la réaction suit un équilibre dynamique. Comme nous le verrons plus tard (voir paragraphe III - 2), le choix de cette équation a été validé à travers des expériences visant à mesurer la cinétique d'association et de dissociation de l'ARN (voir page 116). Partant de cette équation, les régressions non-linéaires des points expérimentaux ont été réalisées à l'aide du logiciel Mathematica (Wolfram), et les valeurs de constantes de dissociation sont indiquées avec un intervalle de confiance¹⁷⁵ à 95 % (entre parenthèses). De cette première expérience de titrage, il a été possible de déterminer une valeur de K_D^* égale à $8.5 \mu\text{M}$.

Afin de vérifier la reproductibilité de la méthode proposée, l'expérience a été répétée plusieurs fois à différentes concentrations en sonde FcPRM. La figure III.20 montre les résultats obtenus pour deux autres concentrations en sonde FcPRM. Les trois valeurs de K_D^* finalement obtenues sont très proches les unes des autres.

De plus, ces valeurs sont assez similaires au K_D^* précédemment déterminé par ITC (K_D^* (ITC) = 9.3 μM). Ces résultats valident donc la méthode électrochimique proposée. Pour la suite des expériences, une valeur moyenne $K_D^* = 7.8 \pm 1.4 \mu\text{M}$ a été retenue pour la sonde FcPRM.

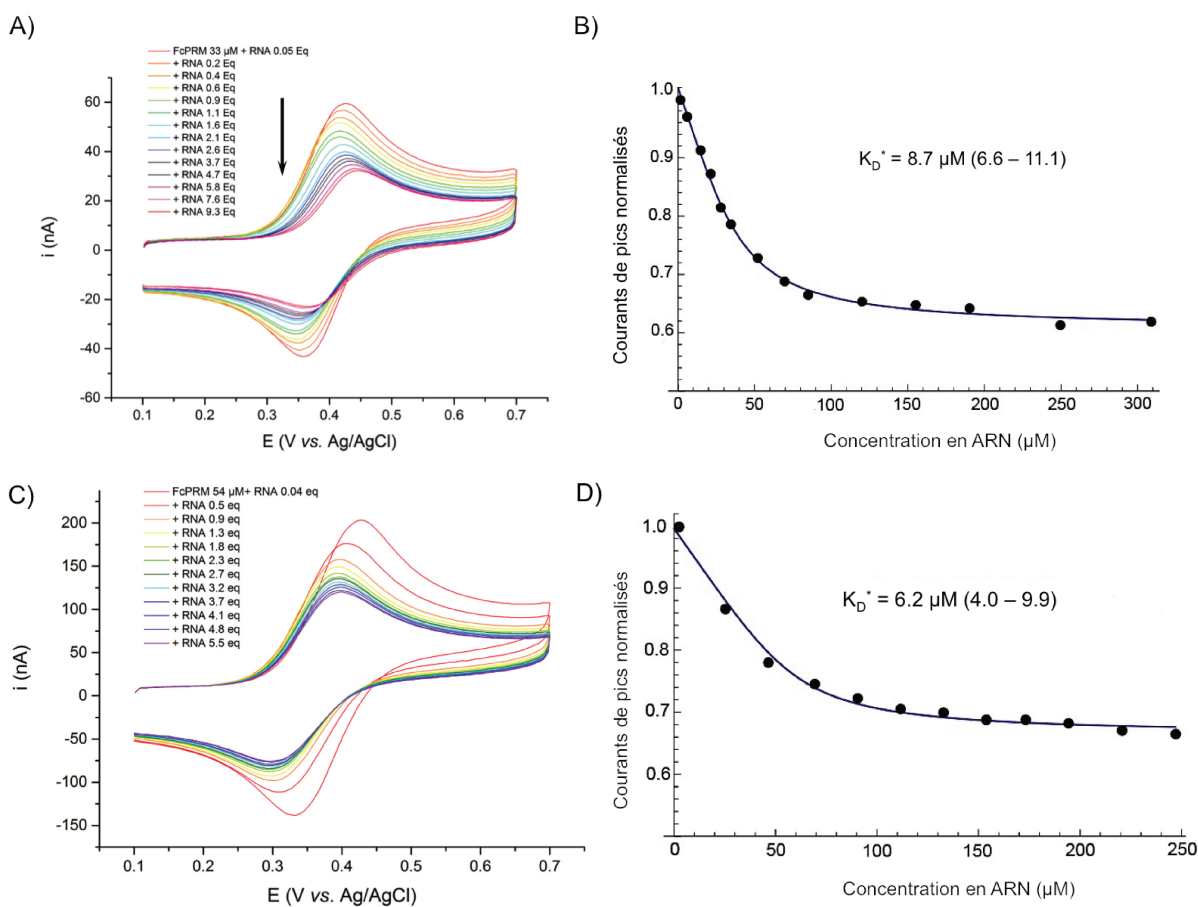


FIGURE III.20 – Expériences de dosage réalisées à différentes concentrations en sonde FcPRM. A) et B) Voltammogrammes résultant d'une expérience de titration à partir d'une concentration en FcPRM de 33 μM (tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) et courbe de titrage associée. Les points représentent les valeurs de courants de pics anodiques. La courbe en trait plein correspond à un ajustement non-linéaire de ces données. Le K_D^* associé est indiqué avec un intervalle de confiance de 95 % indiqué entre parenthèses. C) et D) Voltammogrammes résultant d'une expérience de titration à partir d'une concentration en FcPRM de 54 μM (tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) et courbe de titrage associée. Le K_D^* associé est indiqué avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.

Il est intéressant de noter sur les figures III.17 et III.20 - C l'apparition d'un décalage progressif de la vague réversible du FcPRM vers des valeurs de potentiel plus réducteurs au fur et à mesure des ajouts d'ARNr 16S23 dans la solution. En effet, la valeur de potentiel formel de la sonde libre et la valeur de potentiel de formel de la sonde liée (en présence de large excès d'ARN) sont séparés d'environ 30 mV ($E^{\circ'} = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2}$). Ce décalage en potentiel n'est cependant pas toujours reproductible, comme en attestent les voltammogrammes de la figure III.20 - A. Nous avons attribué ce manque de reproductibilité au fait que nous employons une pseudo-électrode de référence en Ag et que le potentiel de cette dernière n'est pas forcément très stable.

Afin de mesurer plus rigoureusement ce décalage de potentiel avec l'ajout d'ARN, une expérience de titration a été réalisée en présence d'une électrode de référence au calomel saturé (SCE). Nous avons utilisé une référence SCE avec un pont électrolytique afin de séparer la référence du milieu et ainsi garder constante la concentration en sels. Comme le montre la figure III.21, l'utilisation de cette électrode de référence entraîne également un décalage, bien que moins marqué, vers des potentiels négatifs ($\Delta E^{\circ'} = 20$ mV). Nous pouvons interpréter cette variation de potentiel formel comme étant liée à une différence d'affinité relative entre la forme oxydée de FcPRM ($Fc^{+}PRM$) et celle réduite vis à vis de l'ARN selon la relation suivante: $\Delta E = -\frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{K_{D_{Ox}}}{K_{D_{Red}}} \right)$. Ainsi, à partir de la valeur de $\Delta E^{\circ'} = 30$ mV précédemment obtenue, il est possible d'en déduire que la forme oxydée de la sonde ($Fc^{+}PRM$) possède une affinité pour l'ARNr 16S23 environ 2.6 fois supérieure à la forme réduite FcPRM. Cette différence d'affinité en faveur de la forme oxydée peut s'expliquer par le gain d'une charge positive sur la sonde FcPRM, laquelle tendrait à stabiliser le complexe ARN/sonde.

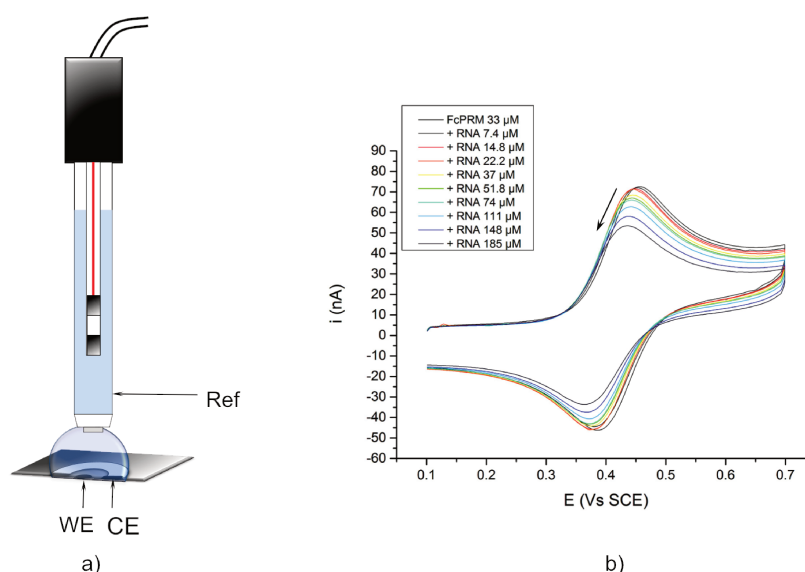


FIGURE III.21 – Titrage de FcPRM par l'ARNr 16S23 suivi par CV en utilisant une référence SCE.

Tous les résultats présentés jusqu'à maintenant nous ont permis de valider la preuve de concept de cette méthode électroanalytique. Nous avons également pu montrer qu'il était possible, en se plaçant dans des conditions à l'équilibre, de déterminer la constante d'affinité de l'interaction entre l'ARNr et la sonde FcPRM. Afin de mieux comprendre la dynamique de reconnaissance entre ces deux molécules, nous avons ensuite cherché à acquérir des informations sur la cinétique de formation du complexe ARNr/sonde FcPRM. C'est sur ce point que va se concentrer la partie qui suit.

III - Etudes cinétiques

III - 1) Principe des mesures cinétiques dans des conditions de gouttelette tournante

Afin de mesurer le k_{on} du complexe ARNr 16S23/FcPRM, nous avons tiré parti d'une méthode cinétique précédemment développée au laboratoire.¹⁷³ Le dispositif illustré sur la figure III.22, appelé "gouttelette tournante", a été utilisé avec des électrodes sérigraphiées afin de tenter d'obtenir des informations sur la cinétique de complexation ARNr 16S23/FcPRM. Il permet de travailler dans des conditions hydrodynamiques où la so-

lution est agitée à une vitesse de rotation constante, grâce à l'utilisation d'un embout rotatif fait d'une électrode disque/anneau carbone/Pt. Ce dispositif ne fait pas office d'électrode de travail. Il est seulement utilisé comme un moyen d'homogénéiser rapidement une solution en l'apposant à la surface d'une gouttelette déposée sur une électrode sérigraphiée (figure III.22). Ainsi, la gouttelette est prise en sandwich entre cet embout tournant et la surface immobile constituée des SPEC. Cet embout tournant est en charge de l'agitation tandis que la SPEC réalise les mesures électrochimiques. Le protocole consiste à mettre en rotation une gouttelette de solution de sonde FcPRM, puis à injecter manuellement à un instant t un microvolume de solution contenant l'ARN. En raison de l'agitation, le volume injecté est alors rapidement homogénéisé en l'espace d'une seconde. Ce dispositif fournit donc un moyen d'homogénéisation rapide et pratique que l'on peut mettre à profit pour tenter d'extraire les données cinétiques d'une réaction. Dans ces conditions expérimentales, dites hydrodynamiques, la couche de diffusion (δ) est d'épaisseur constante et un voltamogramme d'allure sigmoïdale est enregistré.

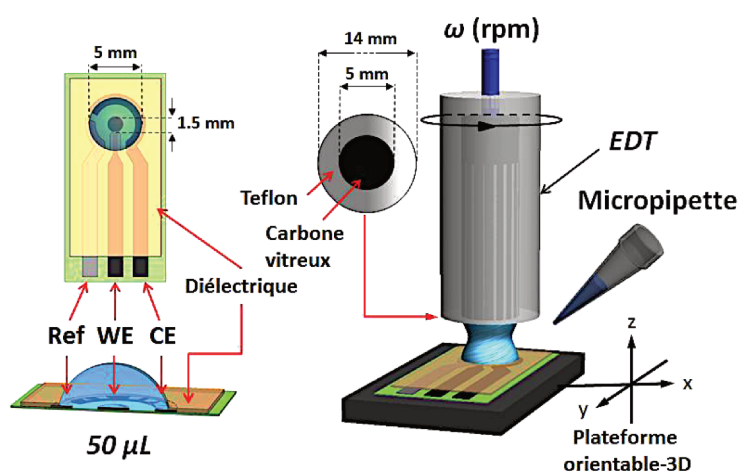


FIGURE III.22 – Représentation schématique du dispositif permettant de travailler en régime hydrodynamique. ¹⁷³EDT: Electrode à disque tournant.

Comme mentionné dans la partie I - 2) de ce chapitre, le courant est une fonction en racine de D lorsque l'on est dans des conditions stationnaires alors qu'il dépend de $D^{2/3}$ dans les conditions hydrodynamiques de la gouttelette tournante. En variant selon $D^{2/3}$, il devient plus facile de discriminer la fraction libre de la fraction liée. D'autre part, la sensibilité est améliorée. Cette approche permet de mesurer un courant stationnaire, sous la forme d'un plateau, ce qui est plus simple à lire et à interpréter. Ces mesures sont plus précises car elles permettent généralement de mieux s'affranchir des interférences associées à l'adsorption des espèces sur la surface des électrodes.

Pour une électrode tournante classique, l'expression du courant de plateau est donnée par l'équation de Levich:

$$i_{pl} = \frac{nFD_{Red} C^{\circ}_{Red}}{\delta}$$

avec $\delta = 1.61 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2}$

où n est le nombre d'électrons échangés, F la constante de Faraday et C°_{Red} la concentration de l'espèce Red en solution (mol.cm^{-3}).

Dans le cas de la gouttelette tournante, cette équation de Levich doit être corrigée d'un facteur lié à la géométrie du système ce qui conduit à une expression où la constante dans le facteur δ est remplacé par 2.15. L'équation de Levich s'exprime alors de la façon suivante¹⁷³:

$$i_{pl, \text{corrigé}} = \frac{nF D_{\text{Red}} C_{\text{Red}}^{\circ}}{\delta_{\text{corrigé}}}$$

$$\text{avec } \delta = 2.15 D^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2}$$

$$\text{soit } i_{pl, \text{corrigé}} = 0.465 nFS D_{\text{Red}}^{2/3} \nu^{-1/6} \omega^{1/2} C_{\text{Red}}^{\text{sol}}$$

Nous allons maintenant voir comment ce dispositif a été utilisé pour tenter de déterminer des constantes cinétiques de formation du complexe FcPRM/ARNr 16S.

III - 2) Procédure de détermination des constantes cinétiques de reconnaissance

L'objectif de ces études est de suivre l'évolution du signal illustrant la consommation du réactif ou la formation du produit de la réaction au cours du temps. De ce fait, la notion de résolution temporelle est de première importance puisqu'elle va déterminer la nature des phénomènes pouvant être observés ou non selon le dispositif utilisé. Afin de pouvoir mesurer une cinétique de réaction, il est nécessaire que la constante de temps de la méthode soit inférieure au temps de demi-réaction ($t_{1/2}$) ou d'être capable de déconvoluer le temps de réponse global de l'appareillage du temps de réaction.

Pour tenter de déterminer la cinétique de la réaction ARNr/sonde FcPRM, nous avons utilisé le dispositif de gouttelette tournante. Afin de contrôler de façon précise la position de l'électrode sérigraphiée située sous cet embout rotatif, une platine de positionnement micrométrique a été utilisée. En fixant l'électrode sérigraphiée sur cette platine, on peut contrôler son positionnement vis-à-vis de l'embout tournant selon les trois axes x , y et z . Nous avons procédé comme suit:

1. L'électrode de travail, immobilisée sur le dispositif de micromanipulation, est positionnée en face de l'embout tournant.
2. Une fois l'électrode bien positionnée, une gouttelette de 38 μL de tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5 contenant 50 mM de KCl est déposée à sa surface. La gouttelette est ensuite surélevée selon l'axe z grâce au dispositif de micromanipulation, jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec le dispositif rotatif. L'écart entre cet embout et l'électrode sérigraphiée fixe, est d'environ 2.5 mm et permet à la gouttelette d'être prise en sandwich entre l'électrode sérigraphiée et l'embout tournant.
3. L'embout tournant est mis en rotation à 2500 rpm, puis l'électrode de travail sérigraphiée est polarisée à un potentiel constant de + 0.5 V (Vs Ag/AgCl) de manière à oxyder facilement le groupement ferrocène en ferricinium, et ainsi enregistrer son courant au cours du temps par chronoampérométrie.
4. Une fois que le courant de l'électrode polarisée est bien stable, 2 μL d'une solution mère de FcPRM à 40 μM sont injectés manuellement dans la gouttelette en rotation (concentration finale en FcPRM: 2 μM dans la gouttelette). Après une augmentation rapide, le courant tend rapidement à se stabiliser. De cette évolution rapide du courant, on peut extraire le temps caractéristique de la cinétique de mélange de la sonde FcPRM dans la gouttelette.

5. Une fois le courant stabilisé, 2 μL d'une solution mère d'ARNr 16S23 à 210 μM sont ajoutés dans la gouttelette en rotation (la concentration finale en ARNr est de 10 μM dans la gouttelette). Cet ajout induit une décroissance exponentielle du courant en fonction du temps jusqu'à retrouver un courant stable mais moins intense. La vitesse de décroissance du courant en fonction du temps est ici caractéristique de la formation du complexe FcPRM/ARN (k_{on}). Ceci n'est valable qu'à condition que cette cinétique de décroissance soit suffisamment lente par rapport à la cinétique de mélange de l'ARN.

A partir de ce protocole, le chronoampérogramme de la figure III.23 a été obtenu. Celui-ci montre l'évolution du courant à la suite de l'injection séquentielle d'une solution en sonde FcPRM puis d'ARN dans une même gouttelette de tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl.

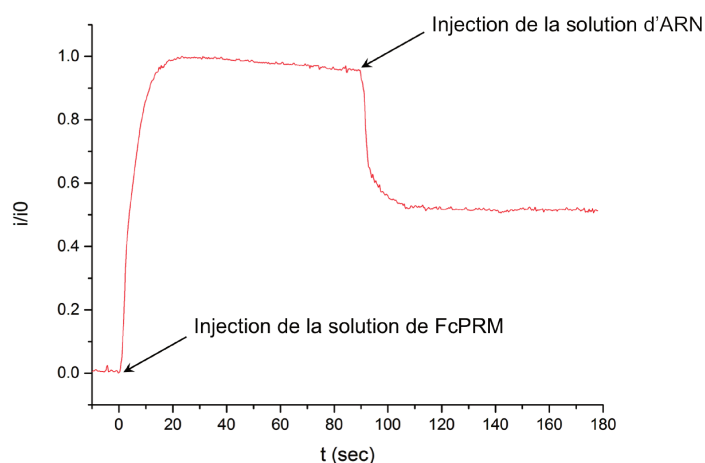


FIGURE III.23 – Exemple de chronoampérogramme permettant de suivre l'évolution du courant en fonction du temps suite à l'addition successive de solution en sonde FcPRM (2 μM dans la goutte) puis d'ARNr (10 μM dans la goutte).

Dans un premier temps, l'injection de la sonde FcPRM dans une gouttelette de tampon KPO_4 en rotation conduit à une augmentation de l'intensité du courant jusqu'à atteindre un plateau d'une valeur maximale i_{max} . Pour extraire la constante cinétique de mélange, il suffit d'ajuster par régression non-linéaire la loi exponentielle suivante:

$$i(t) = i_{\text{max}} \left[1 - e^{(-t/\tau_{\text{mél}})} \right] \quad (10)$$

On en déduit alors une constante de temps $\tau_{\text{mél}}$ représentative de la durée que met la sonde FcPRM à s'homogénéiser dans la solution tampon. La figure III.24 montre un exemple de la mesure cinétique de mélange, suite à l'injection de 2 μL d'une solution mère de FcPRM à 40 μM (concentration finale en FcPRM dans la gouttelette en rotation: 2 μM) dans une gouttelette de 38 μL de tampon KPO_4 . De l'ajustement par régression non-linéaire de la loi exponentielle 10, on parvient à déterminer un temps $\tau_{\text{mél}} \approx 3 \pm 0.5$ sec (moyenne sur 5 mesures). Ce temps de mélange $\tau_{\text{mél}}$ définit la résolution temporelle de la méthode.

Après injection de la sonde FcPRM et l'obtention d'un courant stabilisé, l'étape suivante consiste à mesurer la variation de signal suite à l'injection d'ARNr 16S23. Pour cela, 2 μL d'une solution d'ARNr 16S23 à 210 μM

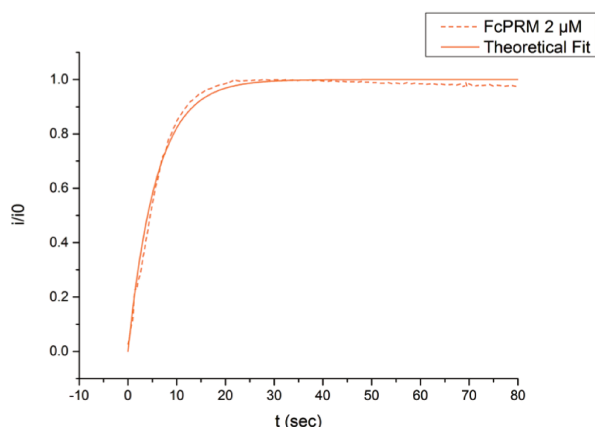


FIGURE III.24 – Variation du courant obtenue après injection de 2 µL d'une solution stock FcPRM à 40 µM, dans 38 µL de tampon KPO₄. Le courant enregistré est représenté en pointillés et l'ajustement en trait plein.

ont été additionnés à cette même goutte en rotation. Comme le montre la figure III.25, nous observons une diminution rapide du courant de plateau immédiatement après l'ajout d'ARN ce qui indique qu'il y a bien la formation d'un complexe ARNr 16S23/FcPRM dont le coefficient de diffusion plus faible, induit une chute du courant d'oxydation du marqueur ferrocène.

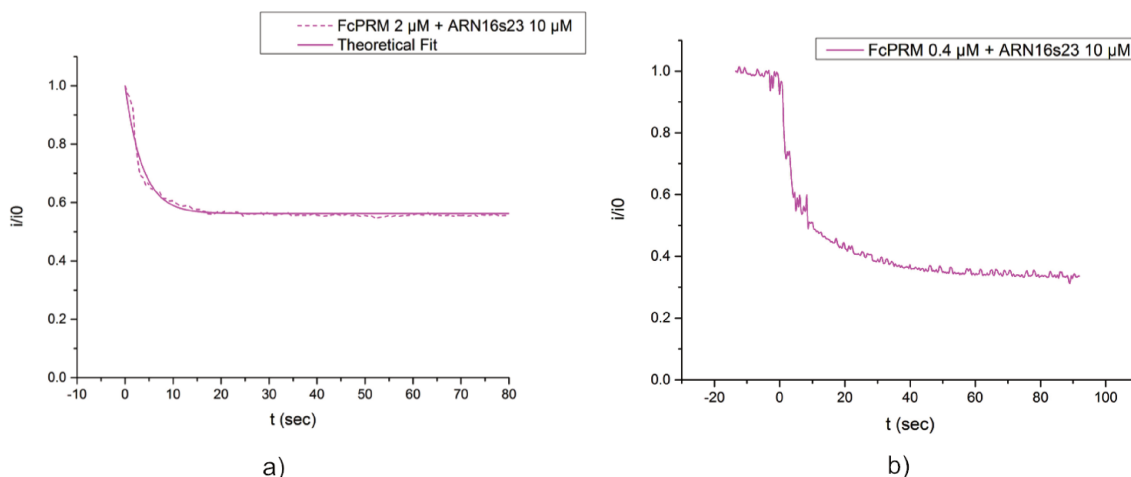


FIGURE III.25 – Chronoampérogrammes illustrant la formation du complexe FcPRM/ARNr 16S23 dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5, 50 mM KCl. Les pointillés représentent les données expérimentales et le trait plein représente l'ajustement. a) En présence de FcPRM, 2 µM. b) En présence de FcPRM, 0.4 µM.

La chute de courant est caractéristique d'une décroissance exponentielle que l'on peut donc aisément ajuster par régression non-linéaire à l'équation 11:

$$i(t) = 1 - \alpha (1 - e^{(-t/\tau)}) \quad (11)$$

avec $\alpha = i_{t_1} - i_{t_2}$ où i_{t_1} est la valeur du courant stationnaire après addition de la sonde FcPRM et i_{t_2} est la valeur du courant stationnaire après addition de l'ARN.

Une constante de temps $\tau \approx 2 \pm 0.02$ sec (moyenne sur 5 mesures) a pu être déterminée. Cette valeur de

τ est très similaire au temps $\tau_{\text{mél}}$ qui caractérise la cinétique de mélange de la sonde en solution. Ce résultat indique que la cinétique de la réaction de complexation entre l'ARNr 16S23 et la sonde FcPRM est trop rapide par rapport à la cinétique de mélange. On ne parvient donc pas à la mesurer dans ces conditions. Pour tenter de ralentir la cinétique bimoléculaire de la réaction de complexation, nous avons répété les expériences à une concentration plus faible en sonde FcPRM (cf. figure III.25 - b). Malgré cela, la cinétique de mélange de la réaction s'est avérée encore trop rapide. Bien que ces essais de détermination de constantes cinétiques n'aient pas été concluants, ces résultats restent toutefois intéressants puisqu'ils valident l'hypothèse du schéma carré considéré comme dynamique (cf. II - 2), page 105). Au vu de la valeur de K_D^* (autour de 10 μM) déterminée précédemment, tout ce que nous pouvons affirmer grâce à ces études cinétiques est que $k_{\text{on}} > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ et donc $k_{\text{off}} > 10 \text{ s}^{-1}$.

Indépendamment des mesures cinétiques, il est apparu intéressant de tirer parti de ce dispositif de gouttelette tournante afin de vérifier la valeur de K_D précédemment déterminée en conditions stationnaires. Pour cela, nous avons réalisé l'expérience de titration reportée sur la figure III.26 (expérience réalisée en présence de 50 μM en sonde FcPRM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl et 0.1 mM EDTA). Dans ces conditions hydrodynamiques, un K_D similaire à celui déterminé en conditions stationnaires est obtenu. Cela nous permet de valider la fiabilité de la méthode de détection et de quantification des interactions ARN/FcPRM par voie électrochimique.

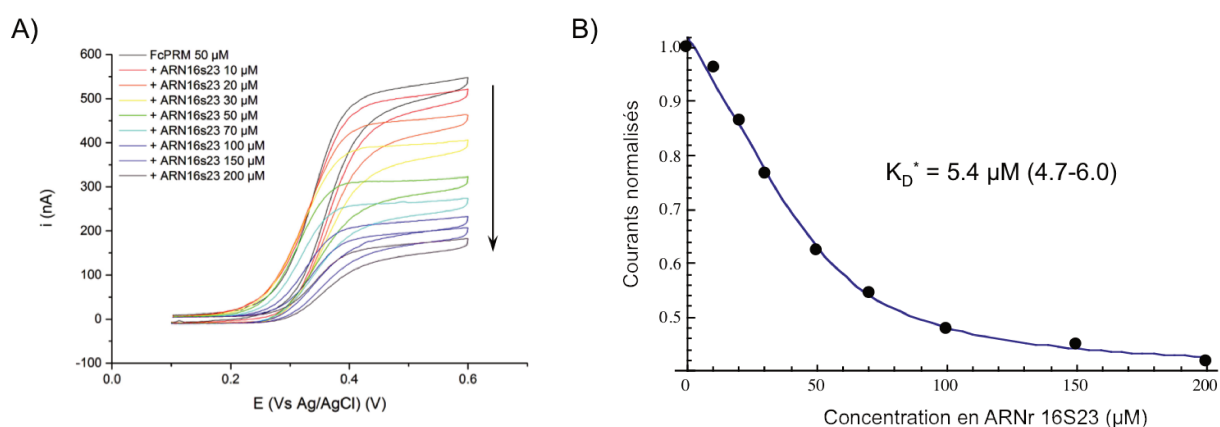


FIGURE III.26 – A) Titrage de la sonde FcPRM (50 μM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) par l'ARNr 16S23 suivi en CV en conditions hydrodynamiques. B) Valeur de K_D^* obtenue pour cette expérience, indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.

Malgré les nombreux avantages liés à l'utilisation de la gouttelette tournante, cette méthode présente quelques inconvénients. Nous avons pu nous confronter à un problème d'évaporation plus ou moins rapide des gouttelettes au cours des expériences. En effet, la rotation rapide de ces solutions de quelques dizaines de microlitres n'étant pas confinée dans un environnement contrôlé, une évaporation du solvant peut être observée. Cette méthodologie n'est donc applicable que pour des mesures relativement courtes. Un autre aspect important à souligner est également la variabilité des mesures selon l'opérateur. Les mesures cinétiques réalisées nécessitent une certaine pratique et une maîtrise des techniques d'injection si l'on veut pouvoir obtenir des résultats reproductibles. De ce fait, nous avons décidé de rester dans des conditions de

mesure stationnaires.

IV - Extraction des grandeurs thermodynamiques ΔH

La méthode employée pour déterminer les K_D étant validée par différentes conditions de mesures, nous avons ensuite décidé d'approfondir les aspects thermodynamiques de la reconnaissance ARN/FcPRM. Pour cela, des expériences de titrage électrochimiques ont été réalisées à différentes températures de manière à extraire les valeurs d'enthalpie ΔH en faisant appel à la relation de Van't Hoff. Pour réaliser les expériences à différentes températures, les électrodes sérigraphiées ont été maintenues à plat sur la surface d'une plaque chauffante à effet Peltier. Ainsi, les gouttelettes déposées à la surface des électrodes sont maintenues à la température souhaitée pour les expériences de titrage. Des expériences de titrage à 5°C et 15°C ont ainsi été réalisées. Celles-ci ont été réalisées dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA afin de se placer dans des conditions expérimentales identiques à celles des expériences réalisées par ITC et ainsi comparer ces résultats avec les K_D obtenus à 25°C.

Le protocole pour ces expériences de dosage reste le même que celui décrit tout au long de ce chapitre. En partant d'une concentration en sonde FcPRM fixe (à 34 ou 32 μM , selon l'expérience), des quantités croissantes d'ARNr 16S23 sont additionnées et l'évolution des pics de courant est suivie par CV. Les voltammogrammes et les courbes de titrage obtenus à 5°C et 15°C sont reportés en figure III.27 et proviennent de duplicata d'expérience. Les valeurs de K_D^* à 5°C et 15°C sont de 30 μM et 15 μM respectivement.

La figure III.28 - a) rassemble les courbes de titration obtenues par CV à 5°C, 15°C et 25°C. Nous pouvons tout d'abord observer que les courbes de titrages ne diffèrent pas significativement les unes des autres, et ce malgré la différence de température appliquée au cours de la réaction de titration. Nous avons ensuite tracé à partir de ces trois valeurs de K_D , le graphe $\ln(K_D) = f(\frac{1}{T})$, illustré en figure III.28 - b. Les données indiquent une relation linéaire décroissante dont la pente permet d'extraire une valeur d'enthalpie ΔH . Selon la loi de Van't Hoff, la pente de cette droite est exprimée par $-\frac{\Delta H}{R}$. Par le calcul on abouti alors à une valeur d'enthalpie $\Delta H = + 41.5 \text{ kJ.mol}$. De façon surprenante, la réaction est ici endothermique ce qui va à l'encontre des valeurs d'enthalpie négatives mesurées en ITC. A ce jour, nous n'avons malheureusement aucune interprétation quant à cette valeur incohérente d'enthalpie.

V - Détection électrochimique de l'interaction entre un aptamère/sonde électroactive: application à un autre système

V - 1) Détermination de la constante de dissociation entre l'aptamère à la néomycine et la sonde FcPRM

La méthode de détection et de quantification électrochimique de la formation d'un complexe ARN/sonde FcPRM a ensuite été appliquée à l'étude d'un aptamère à la néomycine qui a été développé par l'équipe du Prof. B. Suess.^{176,177} Nous avons déjà présenté et caractérisé cet aptamère dans le chapitre II. En effet, nous

V - . DÉTECTION ÉLECTROCHIMIQUE DE L'INTERACTION ENTRE UN APTAMÈRE/SONDE ÉLECTROACTIVE: APPLICATION À UN AUTRE SYSTÈME

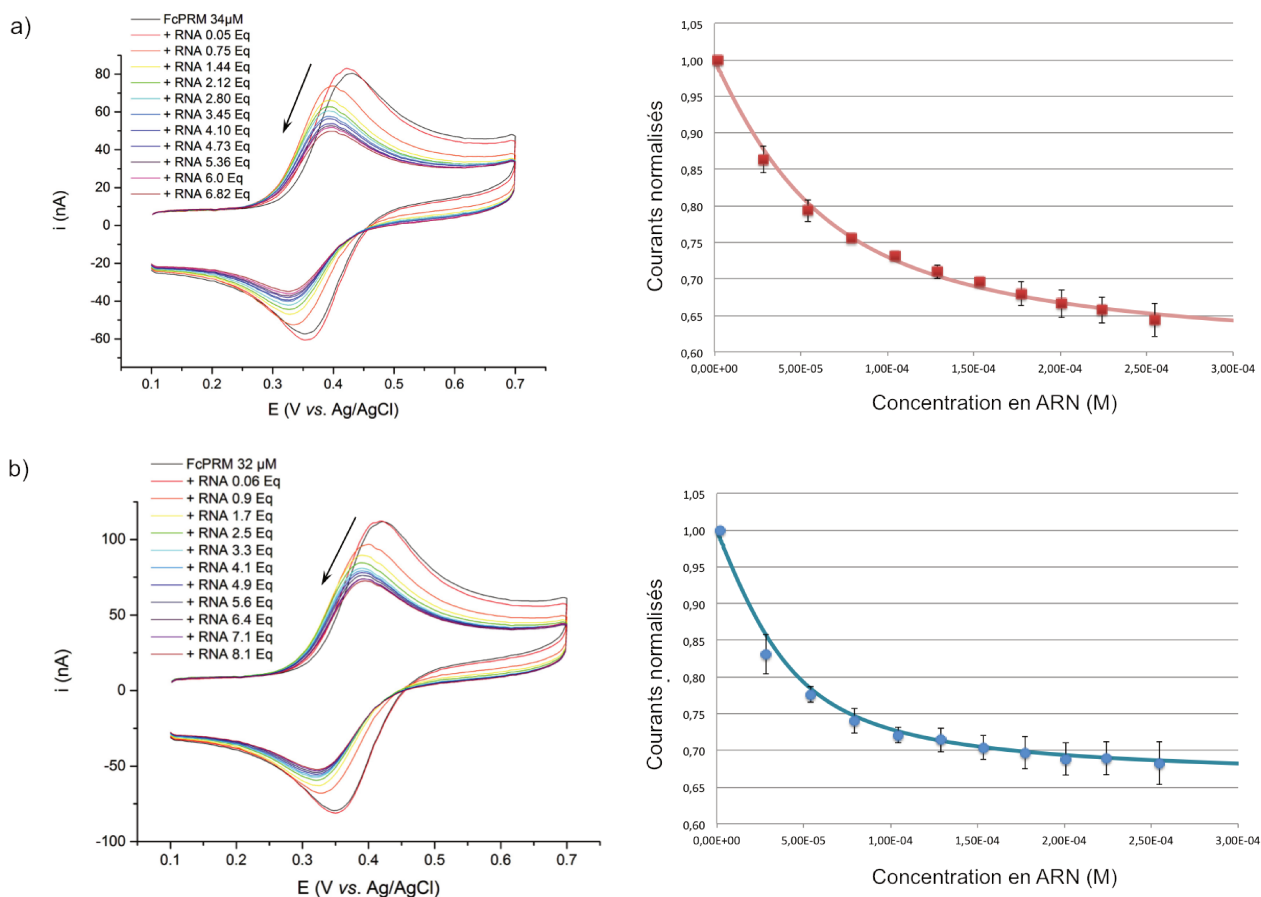


FIGURE III.27 – a) Gauche: voltammogrammes obtenus au cours de la réaction de titrage de la sonde FcPRM à 34 μM par l'ARNr 16S23 à 5°C dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. Droite: courbe de titrage résultante et son ajustement non-linéaire permettant de déterminer le K_D . b) Gauche: voltammogrammes obtenus au cours de la réaction de titrage de la sonde FcPRM à 32 μM par l'ARNr 16S23 à 15°C dans le même tampon MES. Droite: courbe de titrage résultante et son ajustement non-linéaire permettant de déterminer le K_D .

avons préalablement pu observer sa complexation avec la sonde FcPRM par RMN ^1H dans un tampon KPO_4 . Plusieurs raisons nous ont conduit à étudier cet aptamère par voie électrochimique. La première repose sur la valeur supposée de sa constante d'affinité. En effet, les aptamères sont sélectionnés *in vitro* selon leur affinité pour une cible spécifique. De ce fait, leurs valeurs de K_D sont plus faibles que pour d'autres ARN non sélectionnés. Il nous a semblé intéressant d'étudier cet aptamère pour des considérations analytiques. En effet, il serait intéressant de voir si des K_D plus faibles que ceux déterminés jusqu'alors peuvent être détectés par cette méthode. L'autre raison quant à son utilisation, repose sur son analyse d'un point de vue cinétique. Les expériences précédemment réalisées en présence de l'ARNr 16S23 n'ont malheureusement pas permis de fournir des renseignements sur la cinétique de formation du complexe ARN/FcPRM. Une solution alternative peut consister à utiliser cet aptamère en remplacement de l'ARNr 16S23. En faisant l'hypothèse que cet aptamère ne possède pas la même cinétique de complexation pour la sonde FcPRM que l'ARNr 16S23, on pourrait espérer avoir accès à des informations cinétiques sur la formation du complexe aptamère/sonde FcPRM.

Dans un premier temps, nous avons essayé de déterminer le K_D^* de la sonde FcPRM pour cet aptamère à

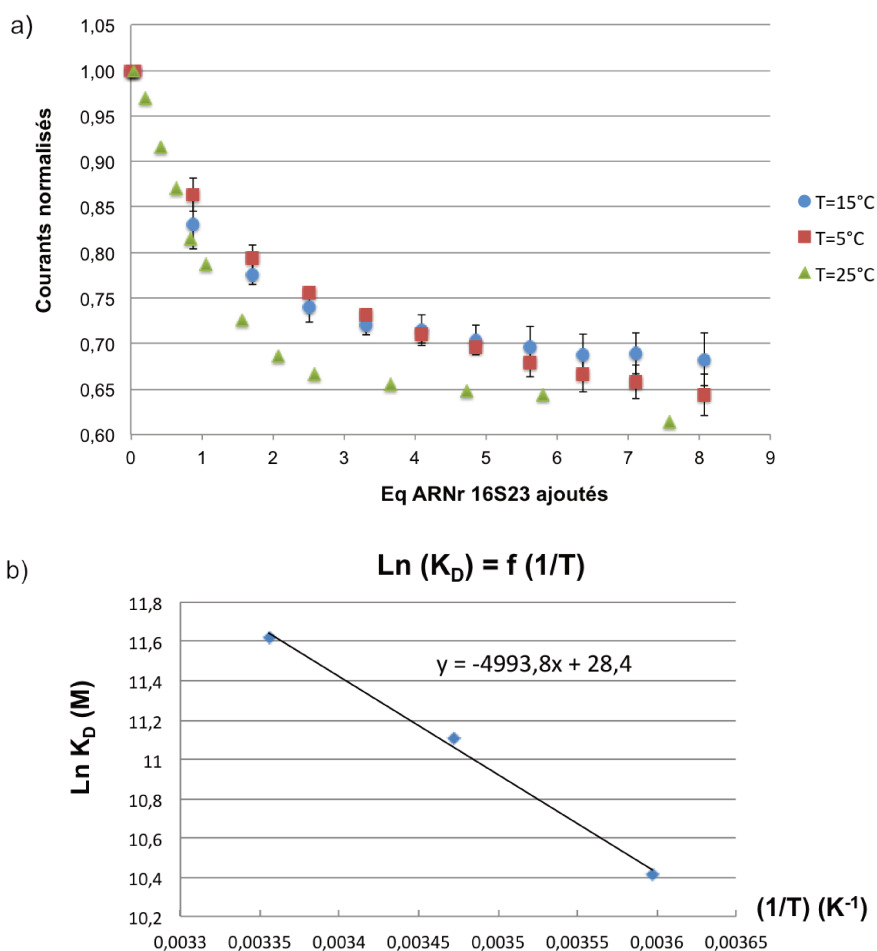


FIGURE III.28 – a) Courbes de titrages de la sonde FcPRM (environ 30 μM) par l'ARNr 16S23 dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, EDTA 0.1 mM suivis en CV à 5°C, 15°C et 25°C. b) Graphe représentant $\text{Ln}(K) = f(\frac{1}{T})$ à trois températures différentes.

la néomycine. Ces expérience de titration on été réalisées dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA. L'expérience de titration montrée sur la figure III.29 a été réalisée en ajoutant des quantités croissantes d'aptamère à la néomycine à une concentration en sonde FcPRM autour de 10 μM . Une fois encore, une diminution progressive de la vague réversible de la sonde FcPRM a été observée, confirmant la formation d'un complexe entre l'aptamère et la sonde. Par régression non-linéaire des courants de pics anodiques, nous avons été en mesure de déterminer un K_D^* de la sonde FcPRM pour cet aptamère égal à 480 nM.

Cette même expérience de titrage a été répétée en conditions hydrodynamiques. De la même façon, l'aptamère à la néomycine possède un K_D^{FcPRM} très proche de la valeur de K_D^{FcPRM} mesurée par les expériences de titrage en conditions stationnaires. Ceci valide une fois de plus cette méthode analytique.

Grâce à cette bonne valeur de K_D^* , on pourrait envisager d'utiliser cet aptamère à la néomycine comme moyen de détecter la néomycine en solution, même en très faibles quantités. Ceci pourrait offrir des perspectives intéressantes afin de développer une méthodologie de biocapteurs, utiles pour déceler des substances en solution telles que des composés possédant une activité pharmacologique.

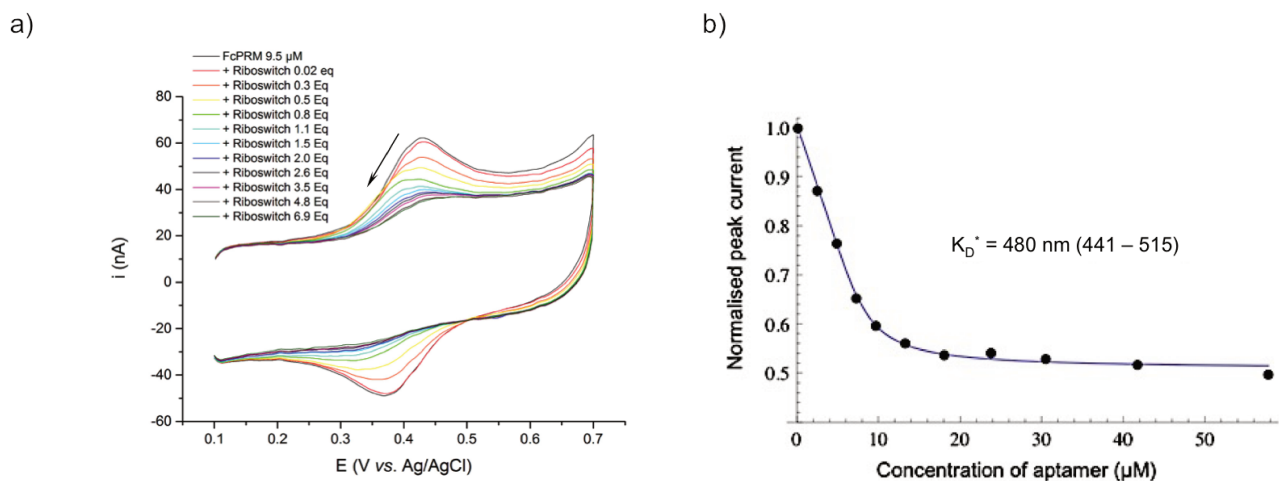


FIGURE III.29 – a) Voltammogrammes obtenus au cours de la titration de la sonde FcPRM (9.5 μM) par l'aptamère à la néomycine dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, en conditions stationnaires. b) Courbe de titrage obtenue par régression non-linéaire des courants de pics anodiques. La valeur de K_D^* obtenue, est indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.

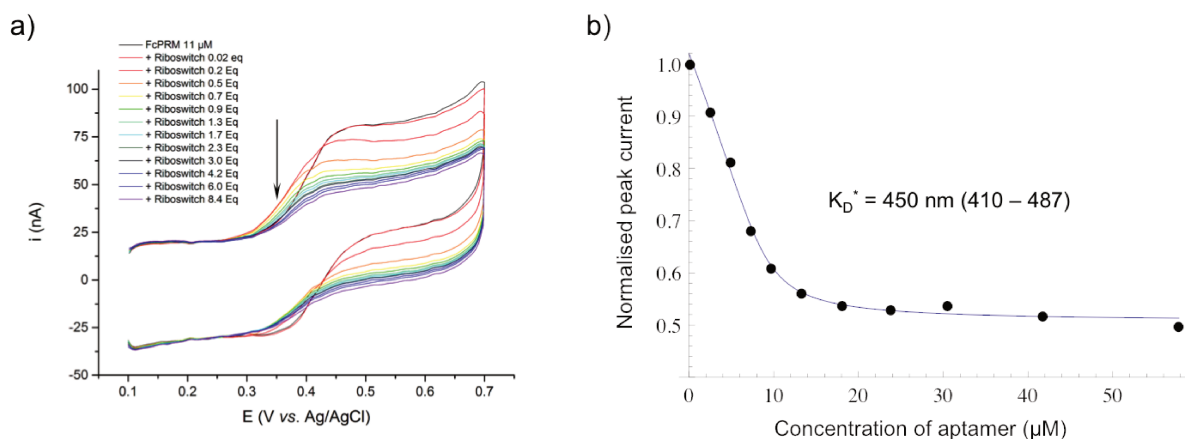


FIGURE III.30 – a) Voltammogrammes obtenus au cours de la titration de la sonde FcPRM (11 μM) par l'aptamère à la néomycine dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, en conditions hydrodynamiques. b) Courbe de titrage obtenue par régression non-linéaire des courants de pics anodiques. La valeur de K_D^* obtenue, est indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.

V - 2) Etudes cinétiques

Des études cinétiques ont également été réalisées pour tenter de mesurer la cinétique de formation du complexe sonde FcPRM/aptamère anti-néomycine. Le dispositif de gouttelette tournante précédemment décrit a été utilisé de façon identique. En partant directement d'une solution de FcPRM à 3 μM contenue dans le tampon MES, nous avons ensuite injecté manuellement 2.4 μM d'aptamère à la néomycine à la gouttelette en rotation.

Comme le montre la figure III.31, il est encore possible de détecter un signal possédant un rapport signal/bruit satisfaisant, même en travaillant à une très faible concentration en molécule électroactive (quelques micromolaires). Cela illustre la sensibilité de la méthode qui semble donc être dans une gamme pouvant aller

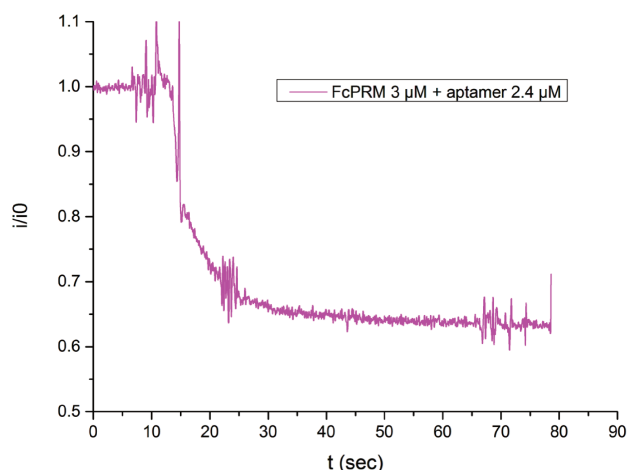


FIGURE III.31 – Suivi de la formation du complexe entre la sonde FcPRM et l'aptamère à la néomycine par chronoampérométrie.

de quelques centaines de nanomolaires jusqu'au micromolaire. Après addition de l'aptamère à la solution en sonde FcPRM, la décroissance du courant est très rapide. De nouveau, la cinétique de la réaction de complexation est trop rapide devant la cinétique de mélange. Malgré l'utilisation d'un ARN différent, nous n'avons pas réussi à obtenir des informations cinétiques sur la formation d'un complexe ARN/sonde FcPRM en raison d'une mauvaise résolution temporelle de la méthode pour ce système de molécules.

VI - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons réalisé la preuve de concept d'une méthode de détection et de quantification d'interaction en phase homogène. Afin d'élaborer cette méthode nous avons montré qu'il était possible de mesurer le K_D^* d'une sonde électroactive, la FcPRM, pour deux ARN différents. L'obtention de valeurs de constantes de dissociation dans différentes conditions de mesures (stationnaires ou hydrodynamiques) ont corroboré les résultats obtenus par ITC (chapitre 2). Il semble donc que cette technique analytique en phase homogène soit valide. Rappelons cependant que nous n'avons pas pu extraire d'informations cinétiques, bien que cela soit envisageable. Toutefois, la sonde FcPRM n'interfère pas dans les phénomènes de reconnaissance avec l'ARNr 16S et l'aptamère à la néomycine. Par ailleurs, des valeurs de K_D^* submicromolaires ont pu être déterminées. Maintenant que nous avons réalisé la preuve de concept de cette méthode électroanalytique, nous allons utiliser cette sonde FcPRM comme molécule reporter afin de mesurer indirectement le K_D de molécules non marquées par des expériences de compétition. Le chapitre qui suit va donc présenter les résultats obtenus pour ces expériences.

Chapitre IV

Compétition et parallélisation: vers un criblage électrochimique

I - Principe des expériences de dosage compétitif en phase homogène

La méthodologie développée dans le chapitre précédent a permis de déterminer le K_D d'un aminoglycoside marqué avec un groupement ferrocène vis à vis d'un ARN, en phase homogène. A partir de là, on peut étendre l'approche à la détection d'aminoglycosides non marqués *via* des expériences de compétition en phase homogène. Les méthodes dites "compétitives" consistent à déplacer une cible marquée de son récepteur par ajout de cible non marquée en solution (figure IV.1). Ces stratégies de dosage compétitif permettent non seulement de mesurer indirectement l'affinité de ligands non marqués vis-à-vis d'un récepteur, mais aussi de quantifier analytiquement la concentration d'un ligand dans un échantillon. Développer une stratégie de dosage compétitif par voie électrochimique peut s'avérer particulièrement intéressant pour deux raisons. Premièrement, on peut espérer tirer parti de cette approche pour développer une méthode analytique afin de détecter les aminoglycosides dans des fluides biologiques, environnementaux ou agroalimentaires (lait, plasma, urines, ...). La deuxième raison, concerne des perspectives d'utilisation de la méthode pour du criblage haut-débit d'analogues d'aminoglycosides ou de tout autre ligand susceptible de cibler l'ARNr 16S ou d'autres ARN. Cela pourrait permettre d'évaluer simultanément des molécules les unes par rapport aux autres et ainsi conduire à la découverte de nouveaux ligands d'ARN.¹⁷⁸

Les expériences de dosage compétitif que nous allons présenter fonctionnent selon le schéma de principe illustré en figure IV.1. Puisque la molécule compétitrice possède des propriétés d'interaction avec l'ARN similaires à celles de la sonde redox, elle pourra donc la remplacer au niveau de son site de fixation sur l'ARN et ainsi libérer la sonde redox en solution. En relevant les valeurs de courant de pics obtenus après des additions successives d'aminoglycoside non marqué sur le complexe FcPRM/ARNr 16S23, il sera ainsi possible d'obtenir une valeur de constante de dissociation pour cette molécule non marquée. Cette valeur est donc une valeur de K_D relative, obtenue à partir de la valeur de K_D^* (constante de dissociation obtenue pour la sonde électroactive).

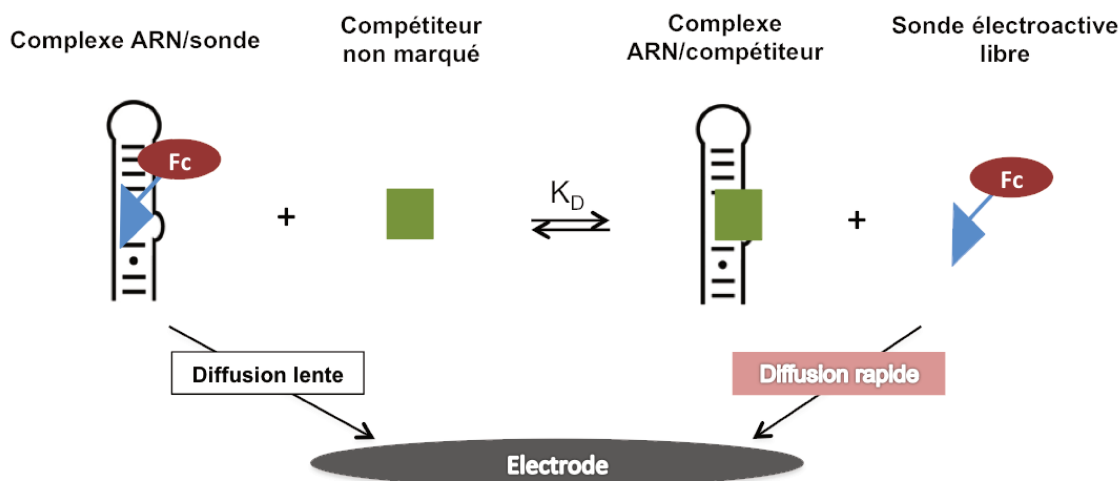


FIGURE IV.1 – Principe d'un dosage par compétition en électrochimie

La figure IV.2, illustre les différentes réponses attendues en CV (dans des conditions stationnaires). Les flèches indiquent la variation du courant en passant d'une étape à une autre. Dans le cadre de ces expériences de compétition, les réponses enregistrées sont séquentiellement obtenues comme suit:

1. En partant d'une gouttelette de solution en molécule marquée FcPRM à une concentration fixe, un premier voltamogramme est enregistré jusqu'à stabilisation complète des courants de pics anodique et cathodique. Il est important d'attendre une stabilisation du signal enregistré car celui-ci fournit la valeur de courant de pic initiale de la sonde FcPRM libre en solution. Cette valeur est ensuite utilisée pour normaliser les valeurs de courant résultant des ajouts successifs d'ARN et de ligand compétiteur dans cette même gouttelette (figure IV.2 - a).
2. Une fois le signal stabilisé, on injecte dans la même gouttelette une solution d'ARN suffisamment concentrée de façon à faire significativement diminuer l'intensité du courant. Le signal enregistré ne doit pas être totalement éteint car il est nécessaire de conserver une fraction libre encore détectable en solution. A cette étape (cf. figure IV.2 - b), le courant diminue en raison de la formation du complexe FcPRM/ARN.
3. Après avoir enregistré un signal stable, on injecte des quantités croissantes en molécule compétitrice non marquée. L'équilibre thermodynamique ARN/sonde FcPRM est déplacé vers la libération de la sonde FcPRM en solution. Le signal alors enregistré correspond à une ré-augmentation du signal réversible du ferrocène (cf. figure IV.2 - c).

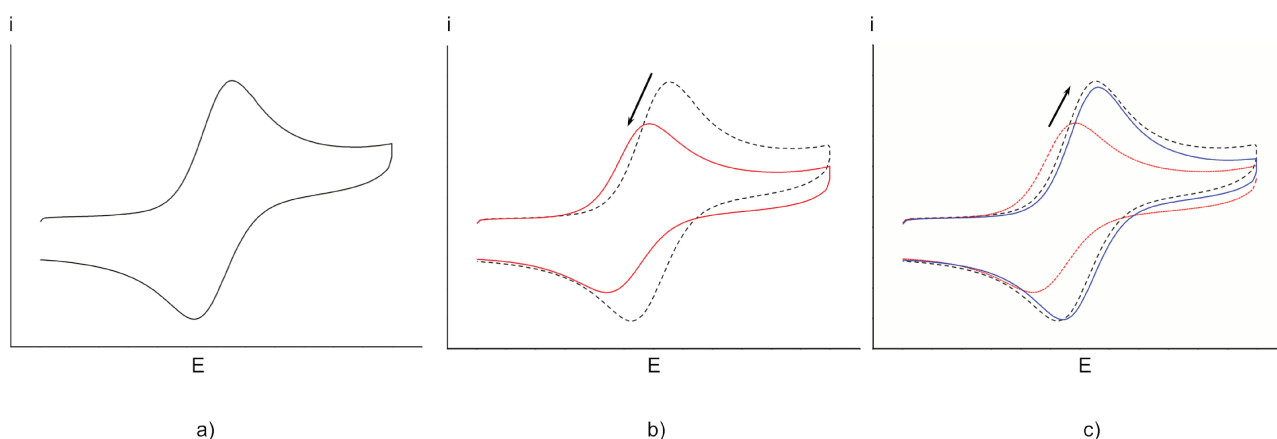


FIGURE IV.2 – Evolutions attendues des voltamogrammes au cours d'expériences de compétition. a) Voltamogramme de la sonde FcPRM seule. b) Chute du courant en réponse à la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM. c) Augmentation du courant résultant de la libération de la sonde FcPRM en solution. Sur les graphes **b** et **c**, la courbe en pointillés correspond à celle du graphe **a**, ce qui permet de mieux visualiser la diminution ou l'augmentation du courant par rapport à la valeur initiale.

II - Dosages compétitifs d'aminoglycosides non marqués

Toutes les expériences de dosage compétitif ont été réalisées sur des électrodes sérigraphiées à température ambiante dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, contenant 150 mM KCl et 0.1 mM EDTA. Les voltamogrammes ont été enregistrés en balayant entre 0.1 et 0.7 V (vs. Ag/AgCl) à $v = 0.1 \text{ V.s}^{-1}$.

II - 1) Expériences de compétition vis-à-vis de l'ARNr 16S23

Dans un premier temps, le dosage compétitif électrochimique a été mis au point sur l'ARNr 16S23, l'objectif étant de mesurer indirectement des K_D de divers aminoglycosides par compétition avec la sonde FcPRM dont la constante de dissociation (K_D^*) est maintenant connue. La paromomycine a été le premier aminoglycoside non marqué à avoir été testé (figure IV.3). Pour réaliser cette expérience, une solution de sonde FcPRM à 29 μM (dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA) a été préparée et caractérisée par CV. A cette gouttelette ($V_0 = 38.6 \mu\text{L}$), 0.56 μL d'une solution mère d'ARN à 1.43 mM (soit 20.4 μM dans la goutte) a ensuite été ajoutée, de telle sorte que les pics d'oxydation et de réduction de la sonde diminuent. Des quantités croissantes de molécule compétitrice sont ensuite introduites en solution. L'équilibre thermodynamique du complexe FcPRM/ARN est alors déplacé par compétition avec l'aminoglycoside non marqué et entraîne la libération de la sonde en solution. Ceci aboutit à une augmentation de l'intensité du signal réversible du ferrocène.

De façon similaire aux expériences de titration réalisées dans le chapitre 3, les valeurs de courant des pics anodiques ont été extraites, corrigées des effets de la dilution et reportées après normalisation en fonction de la concentration en aminoglycoside compétiteur (figure IV.3 - b). Pour pouvoir extraire le K_D de la paromomycine de ces données expérimentales, il est nécessaire de prendre en compte l'équation théorique 2 (voir ci- après) qui décrit les variations de courant dans le cadre d'un dosage compétitif.¹⁷⁹ Pour aboutir à cette expression, il

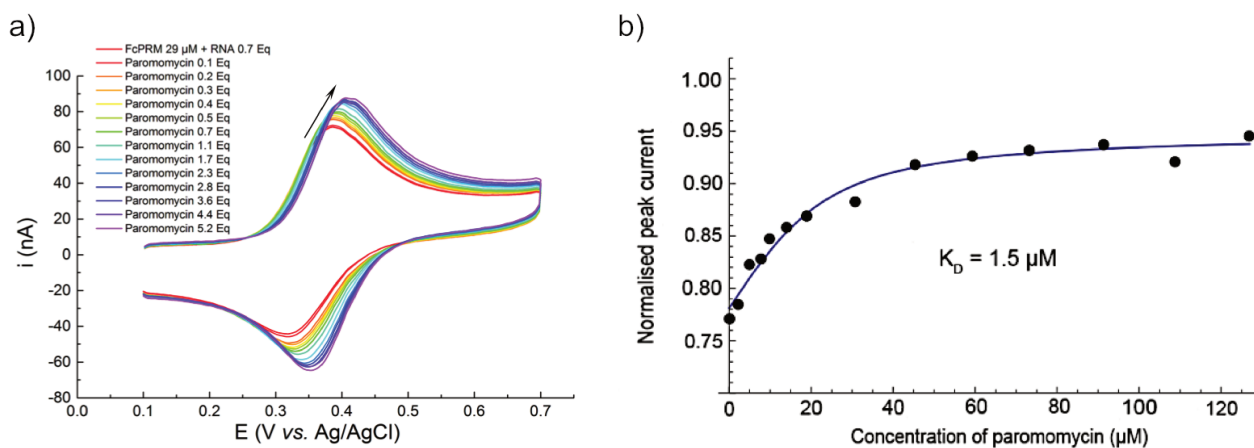
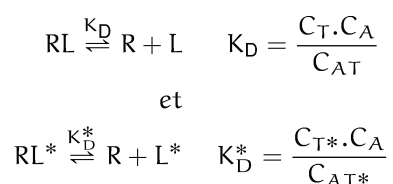


FIGURE IV.3 – Expérience de compétition entre la sonde FcPRM (29 μ M) et la PRM pour l'ARNr 16S23 (20 μ M) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltammogrammes obtenus suivant des additions de paromomycine sur le complexe FcPRM/ARNr 16S23. b) Courants anodiques normalisés et représentés en fonction de la concentration en PRM permettant de déterminer le K_D .

faut considérer deux équilibres réactionnels pour la formation d'un complexe entre un récepteur et son ligand, ainsi que leur constante de dissociation associée.



où R symbolise le récepteur, L et L* symbolisent respectivement le ligand non marqué et le ligand marqué, K_D et K_D^* représentent respectivement les constantes de dissociation de la molécule compétitrice et de la molécule marquée, C_T et C_{T^*} représentent les concentrations en molécule cible non marquée (aminoglycoside compétiteur) et marquée (la sonde FcPRM), C_A représente la concentration en ARN libre et enfin C_{AT} et C_{AT^*} représentent les concentrations en complexe molécule compétitrice/ARN et en complexe FcPRM/ARN.

D'après la loi de conservation des masses:

$$\begin{aligned}
 C_A^0 &= C_{AT} + C_{AT^*} + C_A \\
 C_T^0 &= C_T + C_{AT} \\
 C_{T^*}^0 &= C_{T^*} + C_{AT^*}
 \end{aligned}$$

On aboutit alors à une équation du troisième degré:

$$C_A^3 + aC_A^2 + bC_A + c = 0 \tag{1}$$

avec

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

L'équation 1 possède trois solutions possibles. Cependant, seule une solution est acceptable:

$$\begin{aligned} C_A &= -\frac{a}{3} + \frac{2}{3}\sqrt{(a^2 - 3b)} \times \cos\frac{\theta}{3} \\ \text{avec } \theta &= \arccos\frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2\sqrt{(a^2 - 3b)^3}} \end{aligned}$$

Si bien qu'à l'équilibre:

$$\begin{aligned} C_{AT} &= \frac{C_T^0(2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}{3K_D + (2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)} \\ C_{AT^*} &= \frac{C_{T^*}^0(2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)}{3K_D^* + (2\sqrt{(a^2 - 3b)}\cos\frac{\theta}{3} - a)} \end{aligned}$$

En définissant la fraction libre de la sonde en solution:

$$\chi_{I^*} = \frac{C_{T^*} - C_{AT^*}}{C_{T^*}^0}$$

et en considérant que le dosage compétitif repose sur une différence de mobilité entre la sonde sous forme libre et sous forme liée, il est alors possible d'écrire l'expression du courant normalisé à partir de l'équation 2 suivante:

$$\frac{I}{I_{\text{libre}}} = \sqrt{1 - \left(\frac{2\sqrt{a^2 - 3b} \cos(\frac{\theta}{3}) - a}{3K_D + 2\sqrt{a^2 - 3b} \cos(\frac{\theta}{3}) - a} \right) \left(1 - \left(\frac{I_{\text{liée}}}{I_{\text{libre}}} \right)^2 \right)} \quad (2)$$

où I_{libre} est la valeur du courant de pic enregistrée pour la sonde sonde FcPRM initialement seule en début d'expérience (sans ARN, ni compétiteur) et $I_{\text{liée}}$ est la valeur du courant de pic obtenue pour une concentration en ARN à l'infini.

L'équation 2 est générale pour la description d'un dosage compétitif électrochimique basé sur la différence de mobilité entre la sonde libre et liée à l'ARN. Afin d'ajuster par régression non-linéaire les données expérimentales de la figure IV.3 - b et ainsi en extraire le K_D de la paromomycine, il est nécessaire d'injecter dans l'équation la valeur de la constante de dissociation de la sonde FcPRM. Compte tenu des résultats obtenus dans le chapitre 3, K_D^* a été pris comme égal à 7.8 μM (cf. chapitre 3). $[\text{FcPRM}]$ et $[\text{ARN}]$ sont également considérés comme des valeurs connues, fixées par les conditions expérimentales utilisées. Un K_D de 1.5 μM a pu ainsi être déterminé pour la paromomycine vis-à-vis de l'ARNr 16S23. Cette valeur est légèrement plus basse que celle de K_D^* . Ceci peut en partie s'expliquer par la présence du groupement ferrocène qui, en substituant un ammonium de la paromomycine, entraîne la disparition d'une charge positive pouvant contribuer

à stabiliser le complexe ARN/aminoglycoside. La contribution électrostatique ne redevient équivalente que lorsque la sonde FcPRM est oxydée en Fc^+ , permettant ainsi de récupérer une charge positive additionnelle. Cette expérience de compétition confirme ainsi que le groupement ferrocène n'influe pas significativement sur l'interaction aminoglycoside/ARN.

Ces expériences ont ensuite été répétées avec d'autres compétiteurs afin de déterminer leur K_D et tenter de les classer par ordre d'affinité vis-à-vis de l'ARNr 16S23. La figure IV.4, regroupe les expériences de compétition réalisées pour la néomycine et la néamine.

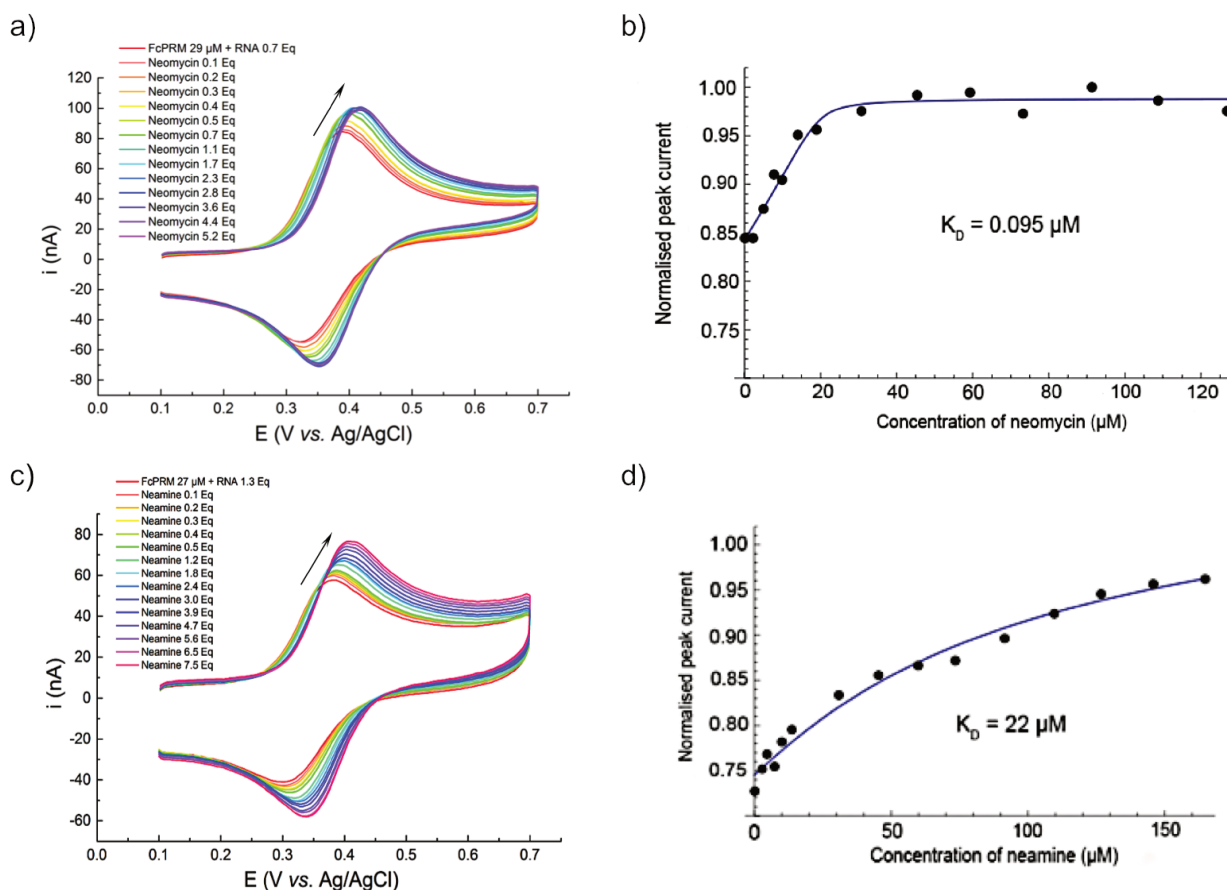


FIGURE IV.4 – Expériences de compétition impliquant deux aminoglycosides non marqués: la néomycine et la néamine. Ces mesures ont été réalisées dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltamogrammes obtenus suite à l'addition de néomycine à une solution de tampon MES contenant 29 μM de FcPRM et 20 μM d'ARNr 16S23. b) Courbe de dosage compétitif associée à la figure a, obtenue après ajustement non-linéaire des courants de pics anodiques. c) Voltamogrammes obtenus suite à l'addition de néamine à une solution de tampon MES contenant 27 μM de FcPRM et 35 μM d'ARNr 16S23. d) Courbe de dosage compétitif obtenue après ajustement non-linéaire des courants de pics anodiques de la figure b.

Des valeurs de K_D égales à 0.095 μM et 22 μM ont été respectivement obtenues pour la néomycine et la néamine. Ces valeurs de K_D nous ont permis d'élaborer un classement en accord avec ceux précédemment mentionnés dans la littérature. En effet, les aminoglycosides ont déjà été classés par ordre de K_D pour l'ARNr 16S. Ces différents classement ont été élaborés à l'aide de diverses méthodes telles que l'ITC,⁴⁶ la SPR^{87,180}

et la RMN ^{19}F .¹¹³ Même s'il est difficile de comparer la valeur absolue de ces affinités, obtenues par différentes méthodes analytiques et avec différentes conditions expérimentales (température, tampon, force ionique, . . .), nous pouvons toutefois retenir une tendance globale dans le classement des aminoglycosides. Comme explicité dans le chapitre 1, pour toutes ces techniques y compris la nôtre, le classement reste le même. La néomycine est la plus affine des trois molécules testées, vient ensuite la paromomycine et enfin la néamine (figure IV.5). Notons que ces expériences de dosage compétitif ont du être répétées plusieurs fois avant de parvenir à des résultats exploitables. En effet, les expériences se déroulant dans un espace non confiné, nous avons rencontré des difficultés liées à l'environnement extérieur (température et hygrométrie de la pièce pouvant entraîner une évaporation de la gouttelette). Toutefois, en retrouvant le classement précédemment publié à partir d'autres techniques, nous sommes en mesure de confirmer la validité de notre approche électrochimique compétitive. Ceci offre alors la perspective de pouvoir utiliser la sonde FcPRM pour des expériences de criblage, afin d'étudier par exemple, les interactions entre diverses structures d'ARN et divers ligands.

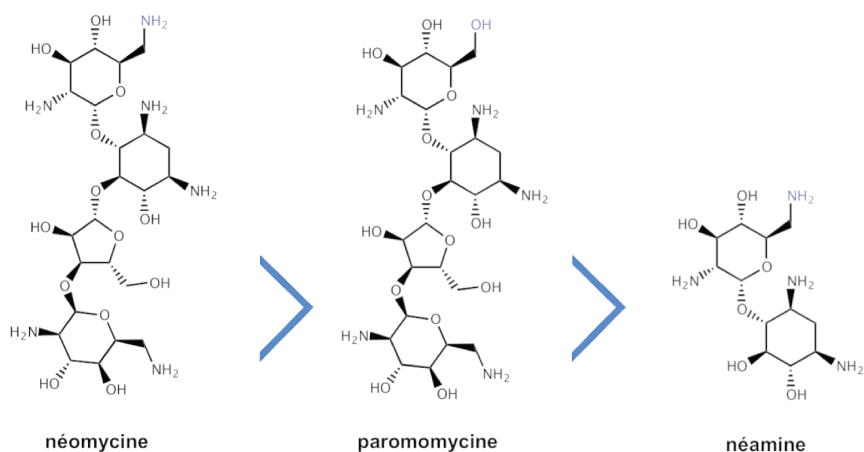


FIGURE IV.5 – Classement par ordre d'affinité pour l'ARNr 16S23 pour les trois aminoglycosides testés. La plus affine étant à gauche.

II - 2) Expériences de compétition entre la sonde FcPRM et la néomycine vis-à-vis de l'aptamère à la néomycine

Après avoir validé le principe de mesure d'une interaction par compétition en phase homogène en présence de l'ARNr 16S23, nous nous sommes intéressés à l'aptamère anti-néomycine. D'une façon similaire, nous avons réalisé une expérience de compétition entre la sonde FcPRM et la néomycine vis-à-vis de cet aptamère. Connaissant le K_D^* de la sonde FcPRM pour cet aptamère (déterminé en chapitre 3, $K_D^* = 480 \text{ nM}$), il devient possible de déterminer un K_D pour la néomycine. La figure IV.6 illustre les résultats obtenus à la suite de cette expérience. A partir d'une solution de FcPRM à $10 \mu\text{M}$ contenue dans une gouttelette de tampon $10 \text{ mM MES pH } 5.5$, 150 mM KCl , 0.1 mM EDTA ($V_0 = 38 \mu\text{L}$), nous avons additionné $0.65 \mu\text{L}$ d'une solution d'aptamère à $475 \mu\text{M}$. Ainsi, la concentration en aptamère dans la gouttelette est de $8 \mu\text{M}$ (0.8 eq.). La formation du complexe FcPRM/aptamère est alors décrite par la chute du courant enregistrée en CV. A la suite d'additions successives de néomycine sur ce complexe, une augmentation du signal réversible du ferrocène est observée. De nouveau, cela illustre la libération de la sonde FcPRM en solution. Par régression non-linéaire de

ces courants anodiques (corrigés de la dilution puis normalisés par rapport au courant de pic enregistré pour la sonde FcPRM seule en solution), nous avons ainsi pu déterminer un K_D à 8.3 nM. Le K_D de la néomycine pour cet aptamère a déjà été mesuré par l'équipe du Prof. Beatrix Suess¹⁷⁷ et une valeur égale à 9.2 ± 1.3 nM a été déterminée. Ce résultat a été obtenu par des expériences de titration réalisées en ITC à 37°C dans un tampon 20 mM sodium cacodylate, 200 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM spermidine, pH 6.8. Bien qu'il ne s'agisse pas d'une expérience de compétition et que la technique utilisée ainsi que les conditions expérimentales soient différentes des nôtres, cela fournit néanmoins une valeur indicative de K_D qui s'avère être similaire.

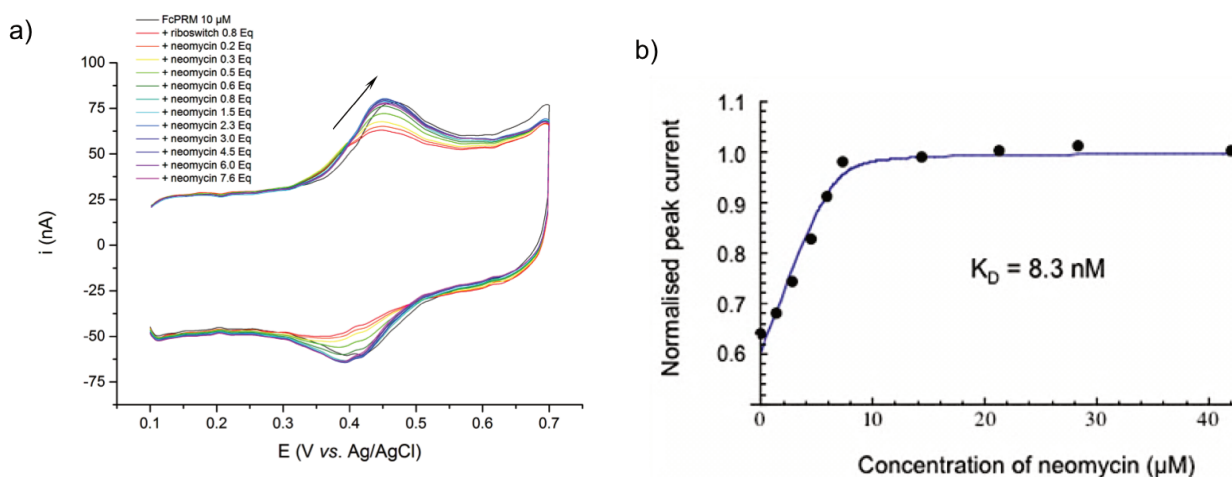


FIGURE IV.6 – Expérience de compétition entre la sonde FcPRM (10 μ M) et la néomycine pour l'aptamère à la néomycine (8 μ M) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltammogrammes enregistrés au cours du dosage compétitif. b) Courbe de dosage compétitif obtenue par régression non-linéaire des courants anodiques.

Une façon de tirer parti de ces études par compétition consiste à évaluer le seuil minimum de détection d'un aminoglycoside en solution. En effet, l'utilisation de ces composés en clinique est fortement limitée par leur toxicité.⁵⁷ De ce fait, la recherche de méthodes simples de dosage de ces molécules dans des fluides biologiques est pertinent. L'aptamère anti-néomycine possède une constante d'affinité plus élevée que l'ARNr 16S23 ce qui est favorable à la détection de faibles concentrations en aminoglycosides. De ce fait, nous avons cherché à évaluer la concentration minimum en néomycine qu'il est possible de détecter à l'aide de la méthodologie électrochimique dans des conditions de dosage compétitif. Les résultats de cette expérience sont reportés sur la figure IV.7.

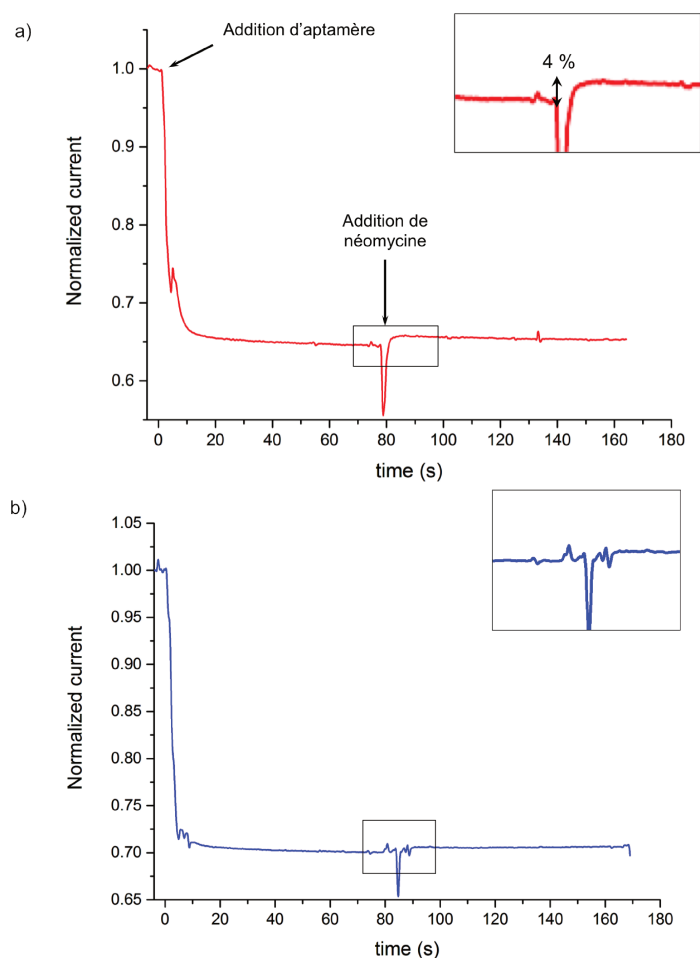


FIGURE IV.7 – Détection par chronoampérométrie de faibles concentrations en néomycine dans une gouttelette de 41.3 μL contenant 10 μM d'aptamère à la néomycine et 10 μM de sonde FcPRM dans un tampon 10 mM MES, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. La zone agrandie illustre la remontée de courant suite à l'injection de a) 0,45 μL de néomycine à partir d'une solution mère à 100 μM (soit 1.1 μM dans la goutte). b) 0.2 μL de néomycine à partir d'une solution mère à 100 μM (soit 0.5 μM dans la goutte). Les pics apparaissant aux alentours de 80 secondes sur les chronoampérogrammes proviennent de la perturbation de la gouttelette en rotation au moment où le cône de pipette est introduit pour additionner l'aptamère.

L'expérience que nous avons réalisée consiste à suivre l'évolution du courant de la sonde FcPRM par chronoampérométrie dans des conditions de gouttelette tournante, en présence d'aptamère et d'ajouts très faiblement concentrés en néomycine. Nous nous sommes placés dans des conditions de gouttelette tournante car cela permet de détecter plus précisément de faibles variations de courant. Tout d'abord, une gouttelette de 40 μL de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA contenant 10 μM de sonde FcPRM a été déposée à la surface d'une électrode sérigraphiée (préalablement nettoyée à l'éthanol puis traitée à la BSA 0.1 %). L'électrode de travail est alors polarisée à un potentiel constant de + 0.5 V (vs. Ag/AgCl) et le courant résultant de l'oxydation du Fc est mesuré. Une fois que le courant enregistré est stable, 0.85 μL d'une solution d'aptamère à 475 μM sont injectés manuellement à un instant t_1 dans la gouttelette en rotation (2500 rpm) (cf. figure IV.7 - a). Une diminution significative du courant est alors observée, synonyme de la formation du complexe FcPRM/aptamère en solution. Après que le courant enregistré soit de nouveau stable, 0.45 μL d'une solution de néomycine à 100 μM sont injectés afin d'aboutir à une concentration en néomycine à 1.1 μM dans

la gouttelette. La partie agrandie du chronoampérogramme de la figure IV.7 - a, montre bien une variation du courant à la suite de l'addition de néomycine à l'instant t_2 . L'utilisation d'une infime quantité en néomycine ($1.1 \mu\text{M}$ dans la gouttelette) est donc suffisante pour enregistrer une modification du signal puisque cette faible concentration permet de faire varier le courant de $4 \pm 0.02 \%$ (moyenne sur 3 mesures).

Nous avons répété l'expérience en présence d'une quantité plus faible en néomycine afin de voir s'il était également possible d'observer une remontée du courant. En partant des mêmes conditions expérimentales (FcPRM et aptamère en proportions stoechiométriques à $10 \mu\text{M}$ et tampon MES), $0.2 \mu\text{L}$ de néomycine à partir d'une solution mère à $100 \mu\text{M}$ ont été additionnés (soit $0.5 \mu\text{M}$ dans la goutte) et le chronoampérogramme de la figure IV.7 - b a pu être obtenu. En travaillant à une concentration inférieure à $1 \mu\text{M}$ en néomycine, il n'est pas possible d'observer une augmentation significative du courant. Cette valeur de $1 \mu\text{M}$ correspond donc à la limite de détection de la méthode.

III - Mesures parallélisées en électrochimie

III - 1) Mesures parallélisées sur cellules électrochimiques sérigraphiées

Après avoir démontré la validité de la méthode de détection par dosage compétitif, un autre objectif a été d'étendre cette approche à des expériences de criblage haut-débit. Dans un premier temps, nous avons étudié six aminoglycosides en parallèle. La gentamycine C_1 , la streptomycine et la kanamycine ont été utilisés pour compléter les résultats obtenus avec les aminoglycosides précédents et ainsi établir un classement général par ordre d'affinité pour l'ARNr 16S23.

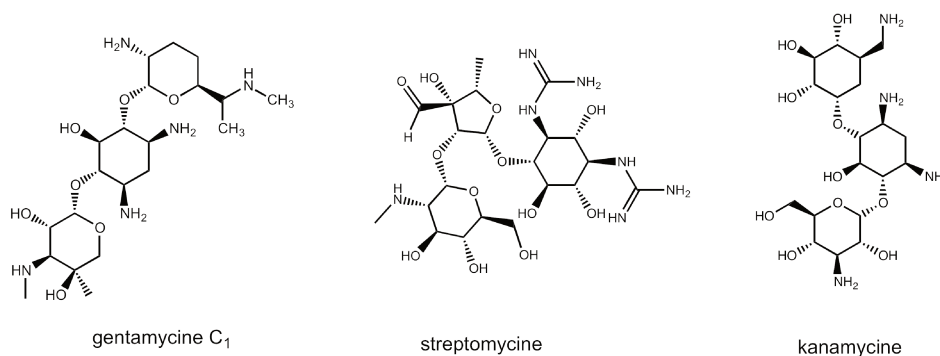


FIGURE IV.8 – Aminoglycosides utilisées lors d'expériences de compétition.

Nous avons donc réalisé des expériences de compétition en présence de la sonde FcPRM sur seulement quelques points de concentrations. Le but étant d'évaluer rapidement la nature du compétiteur le plus affin vis-à-vis de l'ARNr 16S23. Ces expériences de CV ont été réalisées en conditions stationnaires à l'aide d'électrodes sérigraphiées. Les mesures ont été réalisées grâce à l'utilisation d'un interrupteur dix positions permettant de passer aisément d'une électrode à l'autre afin de multiplier un grand nombre d'expériences. Le protocole qui suit a été appliqué:

1. Les électrodes sérigraphiées sont nettoyées à l'éthanol absolu afin de les rendre RNase-free.

2. S'en suit un traitement de la surface des électrodes par une solution de BSA 0.1 %. Une gouttelette de cette solution de BSA est déposée à la surface des électrodes pendant 10 min avant d'être rincée deux fois avec de l'eau ultra-pure.
3. Une gouttelette de 38.9 μL de solution de FcPRM à 22 μM dans un tampon 10 MES pH 5.5, 150 mM KCl et 0.1 mM EDTA est déposée à la surface d'une électrode sérigraphiée, et son signal est enregistré par CV.
4. Une fois le voltammogramme de la sonde FcPRM stabilisé, 1.6 μL d'ARNr 16S23 provenant d'une solution mère à 560 μM sont additionnés à cette même gouttelette. La concentration en ARNr 16S23 est donc de 22 μM dans la gouttelette. Une fois encore, les voltammogrammes sont enregistrés jusqu'à complète stabilisation des vagues réversibles du ferrocène.
5. A cette même gouttelette, trois injections successives d'une solution de compétiteur sont réalisées. Dans une première injection, on ajoute 1 μL d'une solution de compétiteur depuis une solution mère à 290 μM . Puis, on réalise deux injections successives de 0.5 μL provenant d'une solution mère à 1.4 mM. Après chacune de ces injections, le compétiteur est à 7 μM (0.3 eq), 24 μM (1.1 eq) et 40 μM (1.8 eq) dans la gouttelette. On procède à l'addition suivante qu'après parfaite stabilisation du voltammogramme enregistré.

En suivant ce protocole, des voltammogrammes tels que ceux montrés en figure IV.9 ont pu être obtenus. Dans cet exemple, on peut observer une ré-augmentation progressive du courant suite aux additions de compétiteurs dans la même gouttelette. En extrayant les valeurs de courants de pic anodique que l'on corrige des effets de la dilution, on parvient à déterminer un gain de courant (en %) à partir du calcul suivant:

$$\text{gain de courant}(\%) = \frac{I - I_{\text{lié}}}{I_0 - I_{\text{lié}}} \times 100$$

où I_0 correspond au courant de pic anodique de la sonde FcPRM seule en solution, $I_{\text{lié}}$ correspond au courant de pic du complexe FcPRM/ARNr 16S23 en solution et I est le courant de pic anodique mesuré après chaque addition du ligand compétiteur.

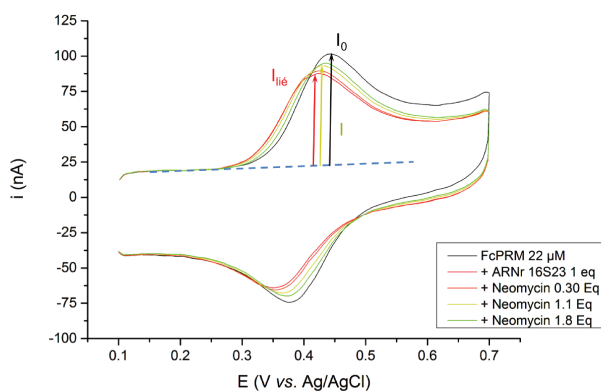


FIGURE IV.9 – Exemple de réaction de compétition entre la néomycine et la FcPRM (22 μM) vis-à-vis de l'ARNr 16S23 (22 μM) dans un tampon 10 MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. La remontée du courant résulte de trois injections successives en néomycine dans la gouttelette de mesure: 0.3 eq., 1.1 eq. et 1.8 eq.

Nous avons effectué ces expériences en triplicata pour les six aminoglycosides. Chaque expérience a été enregistrée sur une électrode sérigraphiée différente, et les résultats obtenus sont rassemblés sur le graphe de la figure IV.10. Sur le graphe sont indiquées les valeurs de gain de courant pour chaque aminoglycoside testé après chacune des trois injections de compétiteur. Bien que de faibles gains de courant ont été mesurés, nous pouvons toutefois affirmer que la néomycine est la plus affine des molécules. L'ajout de 0.3 eq en néomycine au complexe FcPRM/ARNr 16S23 fournit la meilleure remontée du courant parmi les six aminoglycosides. A l'inverse, la streptomycine semble être le moins affin des compétiteurs testés. En effet, le courant ne parvient pas à remonter significativement et reste très faible (environ 3 %) même après l'addition de 1.8 eq. de streptomycine en solution. Ces deux résultats coïncident avec ceux précédemment obtenus par l'équipe de Wong à l'aide d'expériences SPR⁸⁷ (cf. figure IV.11). En dehors de la néomycine et de la paromomycine, nous n'avons cependant pas réussi à discriminer précisément tous les autres compétiteurs les uns par rapport aux autres. Parmi les aminoglycosides restants, aucun ne fournit de réponse significativement différente. Dans ces conditions, la néamine, la kanamycine et la gentamycine semblent avoir des effets similaires.

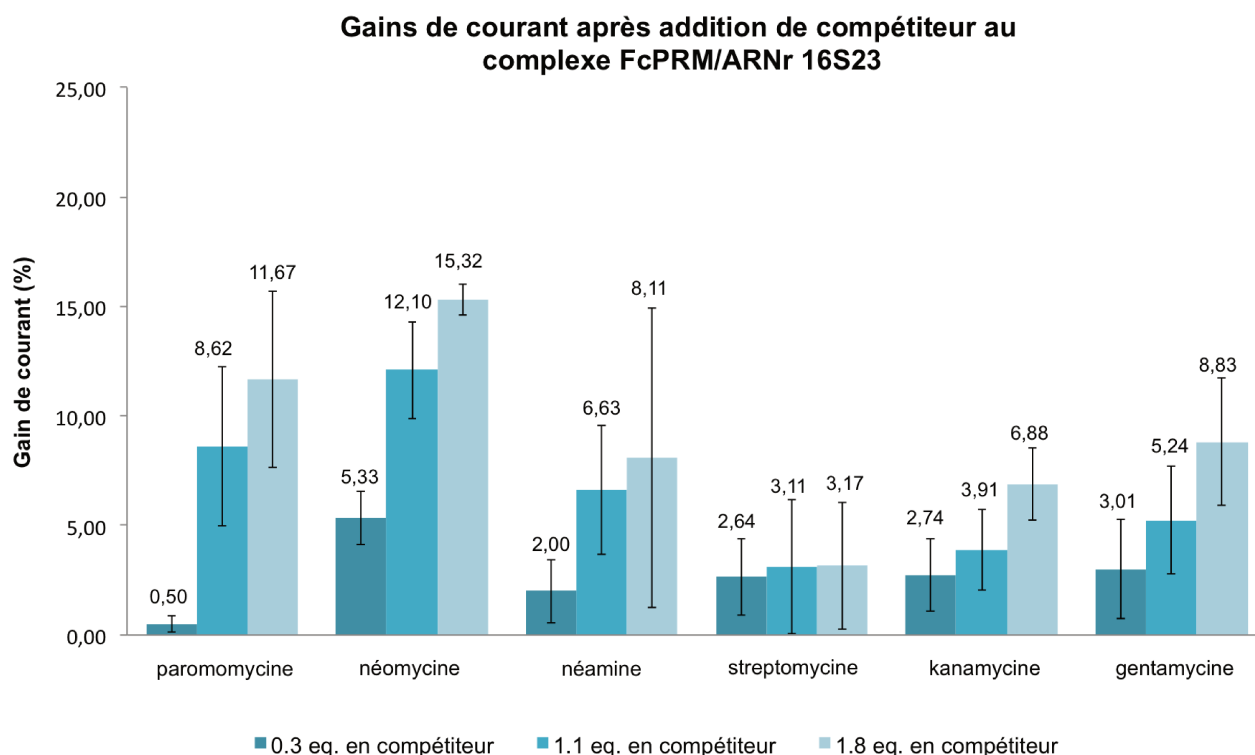


FIGURE IV.10 – Gains de courant mesurés après l'addition de trois concentrations en ligands compétiteurs (0.3 eq, 1.1 eq. et 1.8 eq) à une gouttelette de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA contenant 22 μ M de FcPRM et 22 μ M d'ARNr 16S23.

Afin de fournir des explications quant à l'obtention de ces résultats, nous nous sommes questionnés sur l'exactitude des concentrations en molécules utilisées. Comme mentionné dans la chapitre 3, la concentration en solution FcPRM est vérifiée de façon systématique par chronoampérométrie (cf. page 103) ce qui nous permet de nous assurer de la valeur de sa concentration en solution. Nous nous sommes donc questionnés sur la concentration en ARNr 16S23 dans la gouttelette. La chute de courant résultant de la formation du complexe 1:1 FcPRM/ARNr 16S23 est d'environ 25 %, ce qui correspond à la chute de courant généralement

observée. Nous ne pouvons donc pas expliquer ces résultats par une éventuelle dégradation de l'ARN qui aurait faussé sa concentration en solution. Notons cependant que le classement établi par l'équipe de Wong se base sur des expériences de titration en phase hétérogène par SPR. Les K_D de ces six aminoglycosides ont ainsi été mesurés dans un tampon 10 mM HEPES pH 7.4 contenant 150 mM NaCl et 3 mM EDTA. Puisque nos mesures se déroulent dans des conditions différentes (tampon, force ionique, . . .) et en phase homogène, les phénomènes d'interaction peuvent donc être quelque peu différents.

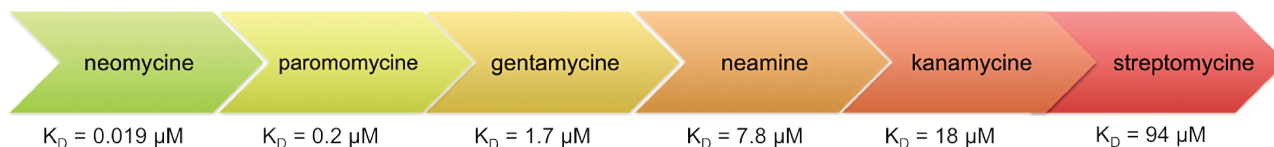


FIGURE IV.11 – Classement de six aminoglycosides par ordre d'affinité pour l'ARNr 16S. Obtenu par l'équipe Wong *via* SPR.⁸⁷

Nous avons ainsi pu tester différents aminoglycosides en parallèle à l'aide de barrettes de dix cellules électrochimiques sérigraphiées. Même si ces électrodes permettent de reproduire rapidement et facilement un grand nombre d'expériences, ce dispositif n'est pas automatisé. Cela nécessite donc de passer manuellement d'une électrode à l'autre après chaque expérience. Afin de faciliter les mesures et de tenter de développer une méthode de criblage massif en parallèle, nous nous sommes tournés vers l'utilisation d'un dispositif automatisé et c'est sur ce point que va se concentrer la partie suivante.

III - 2) Mesures parallélisées sur microplaque 48 puits

Pour tenter d'élargir notre méthode de détection par compétition à une méthode de criblage haut-débit, nous avons fait appel à un prototype permettant de suivre en parallèle et de manière automatisée le contenu de 48 solutions par voltamétrie cyclique à vague carrée.¹⁸¹ Ce prototype, développé par la start-up Easy Life Science, est montré en figure IV.12. Il est constitué de deux éléments différents. Le premier est un consommable à usage unique formé par une plaque contenant 48 puits cylindriques au fond desquels se trouvent trois électrodes sérigraphiées: une pseudo-électrode de référence Ag/AgCl ($A = 7 \text{ mm}^2$), une contre électrode de carbone ($A = 15 \text{ mm}^2$) et une électrode de travail, en carbone également ($A = 4.8 \text{ mm}^2$) (figure IV.12 -a). Chaque puits peut contenir un volume de 30 à 70 μL et peut être fermé hermétiquement à l'aide de bouchons afin d'empêcher toute évaporation de la solution lors des mesures. Le deuxième élément est un appareil de mesure dans lequel vient s'ajuster ce consommable (figure IV.12 -b). La plaque est placée sur une surface chauffante à effet Peltier, intégrant de part et d'autre les connecteurs permettant le contact électrique afin d'enregistrer les signaux. Le dispositif est ainsi connecté et il est possible d'interroger simultanément l'ensemble des cellules de la plaque toutes les 40 secondes.

Grâce à ce prototype, nous avons pu envisager de réaliser des expériences de criblage en présence des six aminoglycosides précédemment testés sur les barrettes de 10 électrodes sérigraphiées. De façon identique aux électrodes sérigraphiées, les plaques doivent être pré-traitées avant d'être utilisées. Nous avons tout d'abord nettoyé tous les puits à l'éthanol absolu afin de les rendre RNase-free. Puis, un volume de 70 μL de BSA 0.1 % est injecté dans chaque puits de façon à le remplir complètement. La BSA est laissée pendant 10

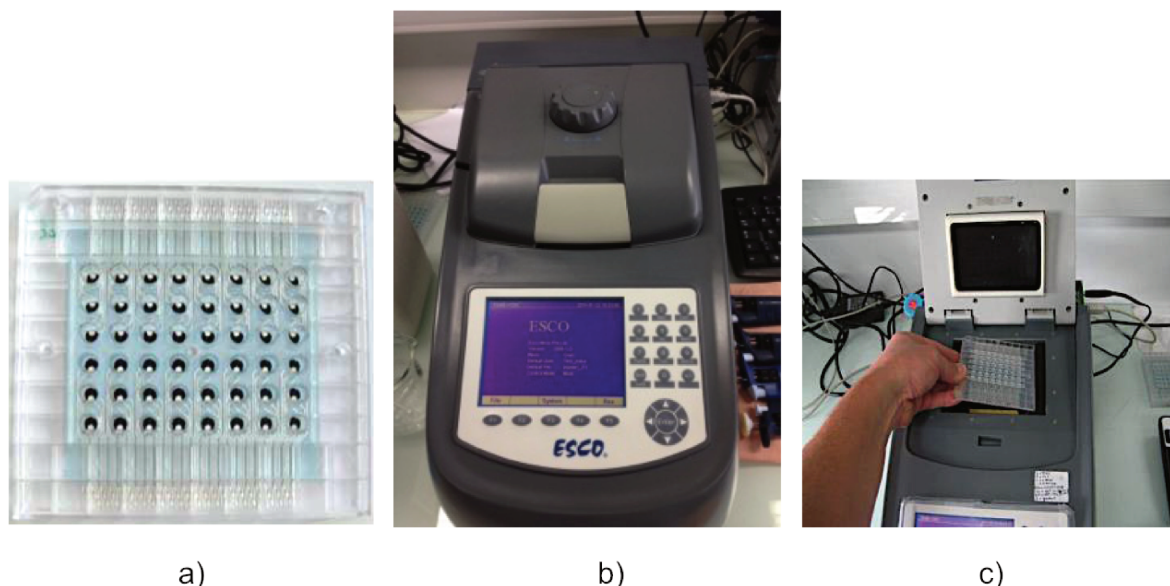


FIGURE IV.12 – Dispositif utilisé pour les expériences de criblage. Tiré de.¹⁸¹ a) Plaquette de 48 micropuits au fond desquels se trouvent les électrodes sérigraphiées. b) Multipotentiohistat utilisé pour les mesures. c) Le consommable se place à plat sur la plaque chauffante du prototype afin de réaliser simultanément 48 mesures.

min, avant d'être rincée deux fois à l'eau ultra-pure. Enfin, tous les puits sont séchés à l'air comprimé. Une fois traitées, les plaques peuvent être utilisées pour les expériences.

Pour ces expériences de compétition sur microplaque, nous avons utilisé le protocole suivant. Un volume de 40 μL de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA contenant 17 μM de FcPRM a tout d'abord été injecté dans chaque puits. Les puits sont alors refermés par un bouchon hermétique, et l'acquisition est lancée pendant 10 min. Comme pour les expériences de compétition précédemment présentées, l'étape suivante consiste à additionner l'ARNr 16S23 afin de faire diminuer le courant. Une injection de 0.5 μL d'ARNr 16S23 à partir d'une solution mère à 1.38 mM est donc réalisée dans chaque puits, ce qui permet d'aboutir à une concentration finale de 17 μM d'ARN en solution. Les puits sont ensuite refermés et l'acquisition se poursuit pendant 10 min où l'on peut voir en temps réel la chute du courant. Enfin divers ligands compétiteurs sont ajoutés dans les puits et on mesure la remontée de courant qui en résulte. La plaque comportant 48 puits, nous avons réparti la plaque en attribuant trois puits par compétiteur de façon à répéter rapidement et simplement un grand nombre d'expériences dans les mêmes conditions. Dans cette dernière injection, 0.5 μL d'une solution mère d'aminoglycoside compétiteur à 1.95 mM sont injectés afin d'ajouter 24 μM de ligand en solution. Après avoir refermé les puits, on mesure la réponse électrochimique sur une dizaine de minutes.

Les expériences ont été enregistrées par SWV (*Square Wave Voltammetry*) ce qui offre une meilleure sensibilité de mesure que la CV. Elle présente un signal plus facile à lire: la courbe en forme de Gaussienne correspond au signal typiquement obtenu pour une molécule électroactive capable d'échanger ses électrons de façon rapide et réversible (figure IV.13). Grâce à ce dispositif, les 48 puits sont scannés simultanément par SWV toutes les 40 secondes. Les signaux enregistrés pour chacun des puits sont ensuite traités individuellement (en corrigeant la ligne de base) afin de mesurer l'aire sous le pic des voltammogrammes.

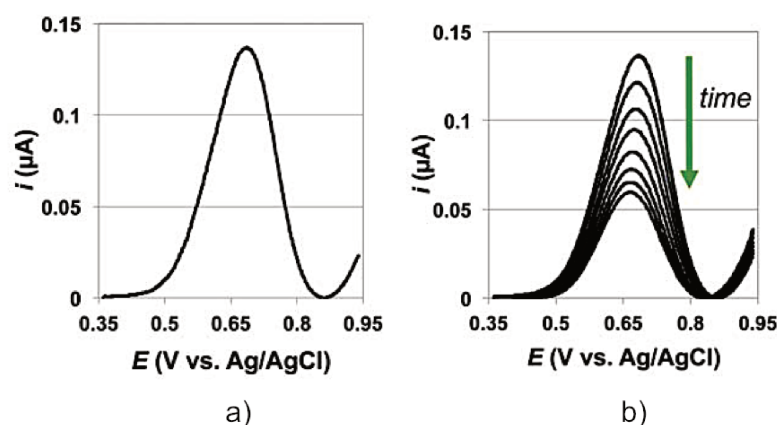


FIGURE IV.13 – Tiré de.¹⁸¹a) Signal initial théorique de la sonde redox seule en solution, suivi par SWV. b) Diminution progressive du courant suite à la complexation de la sonde redox avec un ADN, suivi en SWV.

La figure IV.14 - a, montre les signaux enregistrés lors d'une expérience de compétition où les six aminoglycosides ont été testés en parallèle selon le protocole d'expérience précédemment détaillé. Ces mesures en SWV ont été enregistrées à une fréquence de 100 Hz et avec potentiel de pulse de 100 mV. L'interface du logiciel comporte une représentation schématique de la plaque 48 puits. Il est ainsi possible d'afficher (ou non) certains puits afin de suivre leur évolution en temps réel. Nous l'avons mentionné, l'expérience se déroule en trois étapes successives. Un voltamogramme de la sonde FcPRM seule à 17 μL dans le tampon MES est tout d'abord enregistré. Puis, on additionne séquentiellement 1 eq. d'ARNr 16S23 et enfin 1.4 eq d'aminoglycoside compétiteur. La figure IV.14 - b, montre les voltamogrammes obtenus après chacune de ces étapes et après correction des effets de la dilution. On définit I_0 comme étant l'intensité du courant de pic de la sonde FcPRM seule en solution, $I_{lié}$ l'intensité du courant de pic pour le complexe FcPRM/ARNr 16S23 et I l'intensité de courant mesurée à la suite de l'addition de 1.4 eq de compétiteur. Pour ces expériences, nous nous sommes placés dans des conditions où un excès de ligand compétiteur est ajouté afin de pouvoir observer une remontée significative du courant.

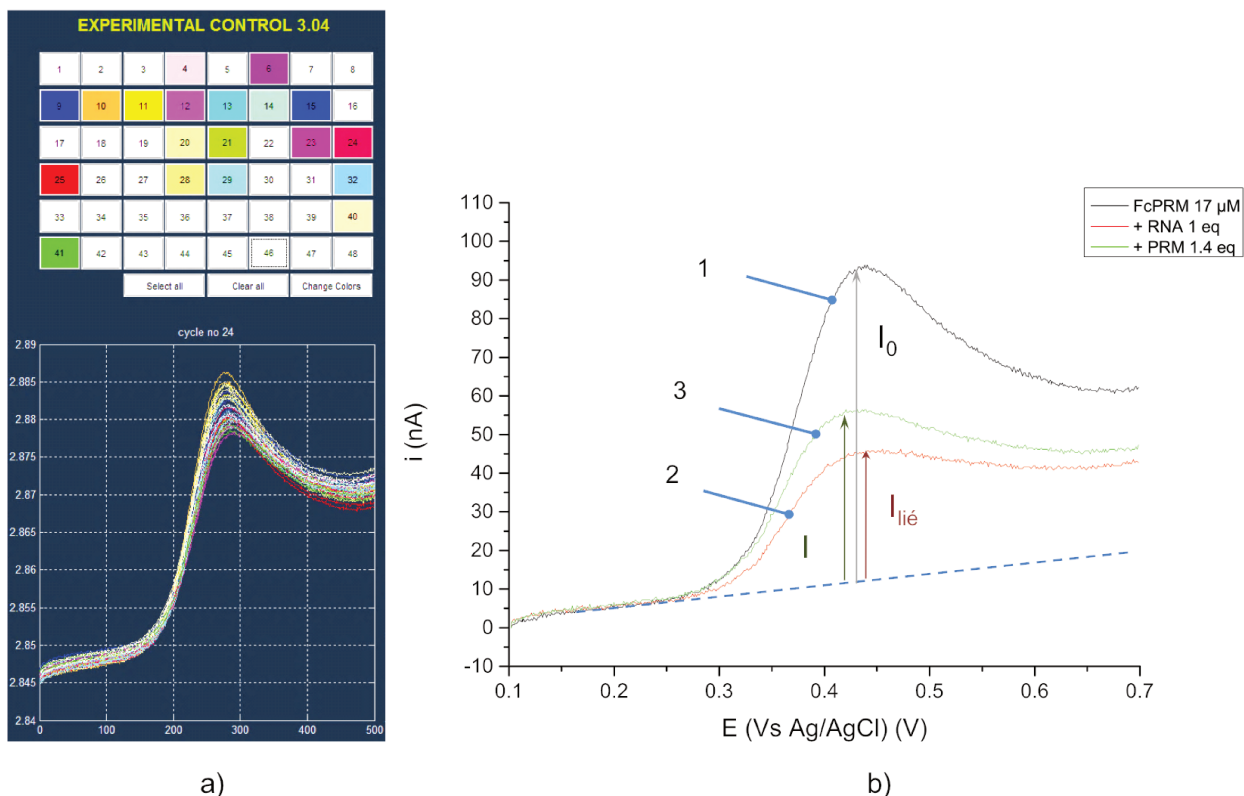


FIGURE IV.14 – Expérience de compétition pour six aminoglycosides en parallèle, suivie par SWV. a) Interface de contrôle permettant de suivre en temps réel l'évolution du courant dans chaque puits. b) Exemple d'expérience de compétition réalisée sur microplaque entre la paromomycine ($24 \mu\text{M}$) et la sonde FcPRM ($17 \mu\text{M}$) vis-à-vis de l'ARNr 16S23 ($17 \mu\text{M}$) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. L'ordre de lecture des voltammogrammes est légendée. I_0 , $I_{\text{lié}}$ représentent respectivement les intensités de courant de pic pour la sonde seule et pour le complexe FcPRM/ARNr 16S23. I représente l'intensité de courant suivant l'addition de $24 \mu\text{M}$ de paromomycine.

Chaque compétiteur a été testé en triplicata dans trois puits différents sur la même plaque et les résultats sont regroupés dans le tableau IV.1, où y figurent les pourcentages de remontées du courant suivant l'ajout des différents compétiteurs. Les données regroupées dans le tableau IV.1 ont été obtenues après avoir effectué le calcul suivant:

$$\text{gain de courant}(\%) = \frac{I - I_{\text{lié}}}{I_0 - I_{\text{lié}}} \times 100$$

Le résultat est exprimé en % ce qui donne le regain de signal suite à l'addition de $24 \mu\text{M}$ de ligand compétiteur à un complexe 1:1 FcPRM/ARNr 16S23 ($17 \mu\text{M}$) dans une solution tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA.

Aminoglycoside compétiteur	Remontée de courant (%)
paromomycine	33 ± 4
neomycine	23 ± 2
neamine free-base	22 ± 5
streptomycine	25 ± 12
kanamycine	30 ± 4
gentamycine	25 ± 2

TABLE IV.1 – Remontée du courant suivant l'addition de 24 μ M de ligand compétiteur à un complexe 1:1 de sonde FcPRM/ARNr 16S23.

A l'exception de la paromomycine qui fournit le meilleur gain de courant, les autres valeurs sont globalement similaires. Nous n'avons pas été en mesure de différencier spécifiquement les aminoglycosides testés. En effet, les six aminoglycosides permettent tous de faire remonter le courant d'environ 25 %. De plus, la paromomycine apparaît comme étant la molécule la plus efficace pour déplacer l'équilibre thermodynamique du complexe FcPRM/ARN, ce qui va à l'encontre des résultats obtenus sur électrodes sérigraphiées. Ces résultats peuvent en partie être expliqués par le fait que les aminoglycosides s'adsorbent parfois sur les parois du puits et donc que les résultats tendent à varier d'un puits à l'autre. Le grand rapport surface/volume de ces puits pourrait accentuer l'adsorption de la sonde marquée et de l'ARN, et pourrait expliquer l'obtention de signaux de faible amplitude et traduire un manque de reproductibilité. Les plaques sont composées de polypropylène. Des phénomènes d'adsorption non spécifiques peuvent être observés en présence de ce matériau¹⁸² qui dans ce dispositif, compose les rebords des puits. Ceci peut donc expliquer l'obtention de ces résultats anormaux, et ce malgré un pré-conditionnement des puits de la microplaque à la BSA mais également au PVP. Nous n'avons pas encore eu l'occasion d'explorer toutes les solutions qui pourraient contribuer à contourner ces difficultés. Rappelons aussi que le classement des aminoglycosides n'a été effectué que sur une seule valeur de concentration (contrairement aux expériences décrites dans le paragraphe précédent) ce qui est moins discriminant pour élaborer un classement. Ce dispositif permet toutefois d'enregistrer rapidement et simultanément le contenu de 48 solutions par voltamétrie cyclique à vague carrée avec une bonne sensibilité (micromolaire).

IV - Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en place et validé une méthodologie permettant de détecter et de quantifier des interactions ARN/molécules non marquées en milieu homogène grâce à l'utilisation de la sonde FcPRM comme molécule reporter. Cette méthode peut être appliquée à la détection de très faibles quantités d'aminoglycoside en solution, ce qui ouvre une perspective d'application intéressante dans le domaine du criblage à haut débit de ligands dirigés contre des ARN.

Bien que prometteuses, les expériences de criblage automatisés sur microplaque n'ont pour le moment

pas fourni de résultats concluants. A l'heure actuelle, ces expériences devraient être répétées afin de trouver les conditions optimales d'enregistrement. Il faudrait améliorer la reproductibilité en essayant de résoudre le problème d'adsorption dans les microplaques. Toutefois, ce dispositif présente des perspectives d'utilisation intéressantes telles que:

- des expériences de dosage: en remplissant une série de puits par une même solution en FcPRM de concentration connue, on peut alors additionner à chaque puits des quantités différentes d'ARN afin d'aboutir rapidement à une courbe de titrage.
- tester différents milieux (tampon, force ionique) et observer leurs effets lors de mesures de K_D .
- cribler différents ligands en présence d'une même séquence d'ARN (l'inverse est également possible).
- appliquer ce dispositif pour réaliser des tests à réponse positive ou négative comme dans le cas des biocapteurs (par exemple pour déceler la présence ou l'absence d'aminoglycosides dans des biofluides).

Même si les expériences de compétition réalisées sur microplaques demandent à être optimisées, tous les résultats présentés dans ce chapitre montrent que la méthode développée est simple, rapide et adaptée à des mesures parallélisables. Tous ces arguments sont prometteurs et tendent à faire de l'électrochimie une méthode de choix pour l'étude des interactions ARN/ligand.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, une approche électrochimique permettant de détecter et de quantifier des interactions ARN/ligands a été élaborée. Cette méthode présente comme avantage d'être originale car contrairement aux autres approches électroanalytiques, elle se déroule en phase homogène. Ses autres intérêts reposent sur sa simplicité et sa rapidité d'utilisation. Elle est également peu coûteuse et sa capacité à être miniaturisable en fait une technique de choix pour l'adapter à des méthodes de criblage. Cette méthode a pu être élaborée grâce à la combinaison de connaissances pluridisciplinaires mêlant synthèse organique, biologie des ARN et chimie analytique.

Des molécules marquées par un groupement redox ont tout d'abord été synthétisées. Pour cela, nous avons tiré parti de l'architecture des aminoglycosides qui sont des ligands naturels des ARN. La stratégie de synthèse que nous avons proposée présente comme avantage d'être simple, puisqu'elle ne nécessite pas de passer par une stratégie de synthèse multi-étapes (sauf dans le cas de la sonde Fc-DACP). Egalement, notre approche s'est tournée vers la fonctionnalisation d'une position connue comme n'ayant que peu d'implication dans les phénomènes de reconnaissance avec les ARN. Trois sondes marquées par un groupement ferrocène ont ainsi pu être obtenues.

Par la suite nous nous sommes plus amplement intéressés à la caractérisation d'un complexe formé entre un ARN (ARNr 16S23 ou aptamère à la néomycine) et une des trois sondes synthétisées, la sonde FcPRM. Le complexe formé a été caractérisé par RMN ^1H 1D et par des expériences 2D TOCSY. Ces dernières ont mis en évidence que la sonde FcPRM était capable d'être reconnue par ces deux ARN. Plus précisément pour l'ARNr 16S23, il a été montré que la sonde FcPRM se fixait sur cet ARN au même endroit que son analogue non marqué, la paromomycine. Ce complexe FcPRM/ARNr 16S23 a ensuite été étudié par ITC et un K_D égal à $9.3 \mu\text{M}$ a été déterminé. Ces premiers résultats ont permis d'envisager l'utilisation de cette molécule comme sonde permettant de détecter les interactions ARN/aminoglycosides par voie électrochimique.

L'élaboration d'une méthodologie de détection par voie électrochimique s'est déroulée en deux étapes. La première a consisté à fournir la preuve de concept de la méthode en démontrant qu'il était possible de détecter et de mesurer l'interaction entre un ARN et la sonde FcPRM en phase homogène. Pour cela, des expériences de titration entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 ont été réalisées et un K_D proche de $8 \mu\text{M}$ a été obtenu. Les résultats électrochimiques permettant de corroborer ceux précédemment obtenus par ITC, la méthode a pu être validée puis élargie à l'étude du complexe FcPRM/aptamère à la néomycine. Cette fois, un K_D submi-

cromolaire à été déterminé.

La méthode de mesure d'interaction ligand/ARN par voie électrochimique a ensuite été élargie à l'étude d'aminoglycosides non marqués. Pour cela, des expériences de compétition ont été réalisées et les K_D de six aminoglycosides non marqués ont été indirectement déterminées grâce à l'utilisation de la FcPRM comme sonde reporter. Ces réactions de compétition ont ensuite été appliquées à des essais de criblage à l'aide de microplaques électrochimiques et d'un appareillage de détection électrochimique automatisé et multiplexé. Les études préliminaires étant peu concluantes, des travaux complémentaires doivent être menés afin de solutionner les problèmes rencontrés.

Il serait également intéressant d'autres sondes électroactives telles que celles qui ont été synthétisées au cours de ces travaux de thèse. La sonde Fc-néamine et la sonde Fc-DACP devraient posséder des K_D différents de celui de la FcPRM. On pourrait alors imaginer tirer profit de ces différentes sondes afin de caractériser un plus large éventail de ligands dont les affinités se situent dans des gammes différentes.

Partie expérimentale

I - Synthèse Organique

I - 1) Généralités

Tous les réactifs ont été achetés chez Sigma-Aldrich et ont été utilisés sans purification préalable. Lors des étapes de synthèse nécessitant des conditions anhydres, les solvants utilisés ont été achetés anhydres ou distillés sur sodium-benzophénone (THF). Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été réalisées sur des plaques de gel silice 60F₂₅₄ et révélées sous lampe UV ou à l'aide d'acide phosphomolybdique (PMA) ou de ninhydrine.

Les purifications sur silice ont été réalisées selon des techniques de chromatographie éclair, sous moyenne pression, avec de la silice SDS 60 (35-70 μm d'épaisseur). L'ammoniaque utilisé pour les purifications par chromatographie est à 28 % en solution aqueuse.

Les spectres RMN ¹H ont été enregistrés sur un appareil Bruker Avance 250, 400 ou 500 MHz. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au pic de solvant résiduel de D₂O (δ = 4.79 ppm), du CDCl₃ (δ = 7.26 ppm) et du MeOD-d₄ (δ = 3.31 ppm). Les déplacements chimiques pour les spectres de RMN ¹³C sont exprimés par rapport au pic de solvant résiduel du CDCl₃ (δ = 77.16) et MeOH-d₄ (δ = 49.00). Les constantes de couplage *J* sont reportées en Hertz (Hz). Les multiplicités des signaux RMN sont reportées en utilisant les abréviations suivantes: s (singulet), br (large), d (doublet), dd (doublet de doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). Sauf indication contraire, les spectres RMN ont été enregistrés à 300 K.

Les spectres de masse (MS) ont été réalisés sur un appareil (LCQ Advantage, ThermoFischer Scientific) équipé d'une trappe ionique en utilisant une source d'ionisation par électronébulisation (ESI) en mode de détection positive.

Quelques réactions ont été suivies par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC). Les analyses ont été réalisées sur un appareil Shimadzu LC 10 AD en utilisant une colonne C18 Stability 100/5 μM (Cluzeau). Les solvants utilisés sont:

- solvant A: eau + acide trifluoroacétique 0.1 %
- solvant B: acétonitrile + acide trifluoroacétique 0.1 %

La méthode d'élution développée est la suivante: gradient de 0 à 100 % en acétonitrile + 0.1 % acide trifluoroacétique pendant 20 minutes. Le débit utilisé est de 1 mL/min et la détection a été réalisée à 210, 340 et 450 nm.

I - 2) Produits synthétisés

a) Synthèse de Fc-COOH - Composé 7

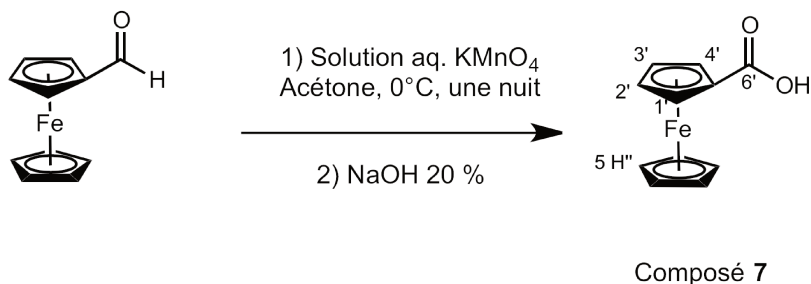


FIGURE V.1 – Synthèse du composé 7.

Le ferrocène carboxaldéhyde (2 g, 9.4 mmol, 1 eq.) est dissous dans l'acétone (90 mL) à 0°C. Une solution de KMnO_4 aqueux (5.2 g, 33 mmol, 3.5 eq. dans $V = 20$ mL) est ensuite ajoutée. Après agitation pendant une nuit, on observe la formation d'un précipité noir. Une solution de NaOH (20 % w/v) ($V = 4.5$ mL) est ajoutée et le mélange est laissé sous agitation pendant 30 minutes. Le mélange est filtré sur célite et lavé avec NaOH (10 % w/v) ($V = 20$ mL), on récupère un filtrat orange (pH 6). Le filtrat est extrait avec Et_2O (3 x 100 mL). La phase aqueuse est récupérée (pH 8) et acidifiée jusqu'à pH 2 (avec HCl 2M) ($V = 30$ mL). La phase aqueuse est ensuite extraite avec Et_2O (3 x 150 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 et évaporées sous pression réduite. Le composé 7 est obtenu sous la forme d'un solide orange foncé (1.5 g, 6.5 mmol, rendement = 69 %).

CCM Rf: 0.5 (Cyclohexane/EtOAc (80:20, v/v))

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.3 (s, 2H, H_4' , H_1'), 4.6 (s, 2H, H_2' , H_3'), 4.4 (s, 5H, $5\text{H}''$).

Les résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature.¹⁴⁷

b) Synthèse de Fc-NHS - Composé 8

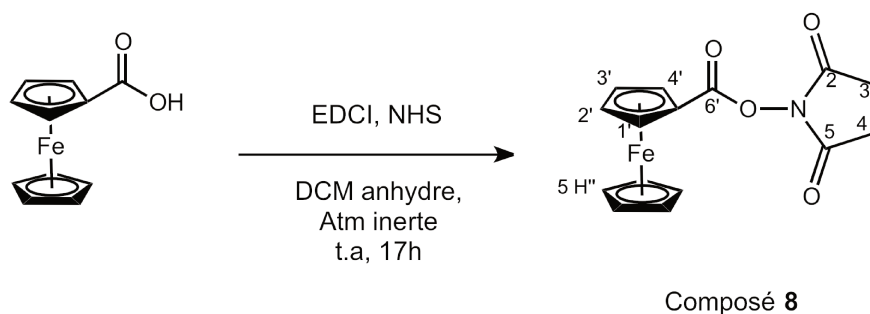


FIGURE V.2 – Synthèse du composé 8.

Le ferrocène acide carboxylique (500 mg, 2.2 mmol, 1.0 eq) est ajouté dans un ballon et dissous dans du DCM anhydre (7 mL) sous atmosphère inerte. Le *N*-hydroxysuccinimide (292 mg, 2.5 mmol, 1.1 eq) et EDCI (388 mg, 2.5 mmol, 1.1 eq) sont ensuite ajoutés. Le mélange réactionnel de couleur orange est ensuite laissé sous agitation pendant une nuit sous argon. Le mélange réactionnel est ensuite lavé trois fois à l'eau (3 x 8 mL) pour retirer le sous-produit uréique ainsi formé. La phase aqueuse est extraite trois fois au DCM (3 x 15 mL). Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur MgSO₄ et évaporées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié par colonne flash en éluant avec un mélange Et₂O/cyclohexane (8:2, v/v) afin d'obtenir le composé 8 sous forme d'un solide orange (577 mg, 1.8 mmol, rendement = 82 %).

CCM: Rf: 0.38 (Et₂O/cyclohexane (8:2, v/v))

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 4.95 (s, 2H, H2', H3'), 4.57 (s, 2H, H1', H4'), 4.40 (s, 5H, 5H''), 2.87 (dd, 4H, *J* = 7.7 Hz et 4.2 Hz, H3a, H3b, H4a, H4b).

Les résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature.¹²³

c) Préparation de la paromomycine "free-base" - Composé 9

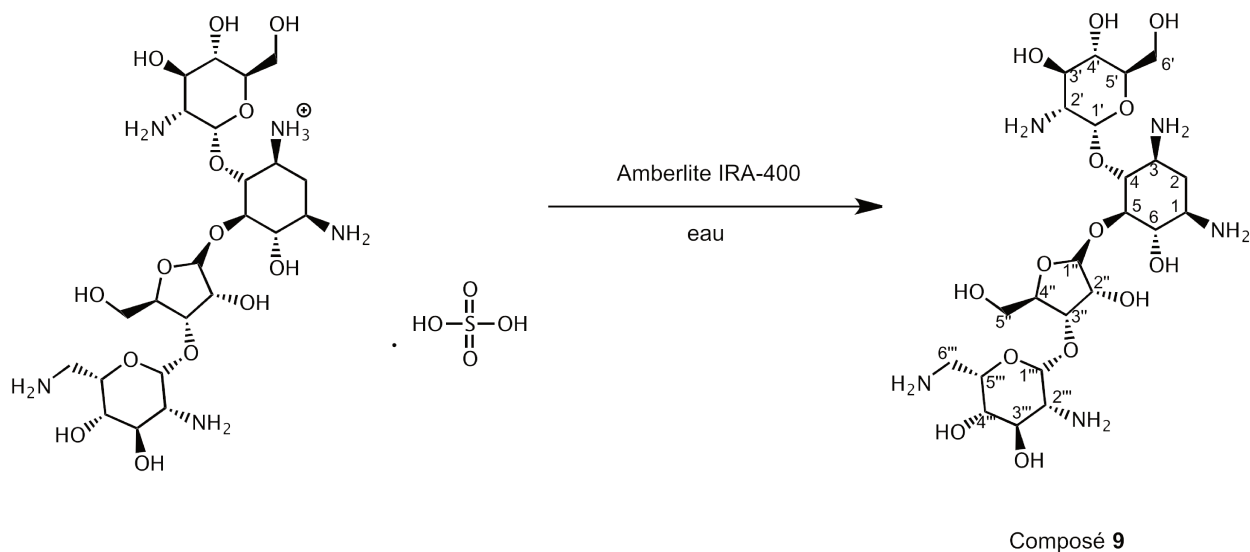


FIGURE V.3 – Synthèse du composé 9.

Le sulfate de paromomycine commercial (714 mg, 1 mmol) est dissous dans de l'eau distillée (5 mL). Parallèlement, une résine Amberlite IRA 400 (OH⁻) est placée dans une colonne en verre de 3 cm de diamètre et lavée à l'eau distillée (1 L). La solution de paromomycine sulfate est éluée de la résine échangeuse de cations à l'eau distillée. Seules les fractions à pH > 9.0 sont conservées, rassemblées et lyophilisées afin d'obtenir le composé 9 sous la forme d'un solide blanc (372 mg, 0.6 mmol, rendement = 60 %).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.40 (m, 2H, H1', H1''), 5.01 (d, 1H, *J* = 1.7 Hz, H1'''), 4.47 (t, 1H, *J* = 5.7 Hz, H3''), 4.32 (m, 1H, H2''), 4.19 (m, 1H, H4''), 4.06 (t, 1H, *J* = 3.3 Hz, H3'''), 3.98 (m, 1H, H5'), 3.86-3.93 (m, 3H, H6'a, H6'b, H5'''), 3.76-3.81 (m, 2H, H5''a, H5''b), 3.68-3.72 (m, 2H, H4''', H5), 3.65 (t, 1H, *J* = 9.8 Hz, H3'), 3.42-3.50 (dt, 2H, *J* = 22.1 Hz et 9.4 Hz, H4, H6), 3.31 (t, 1H, *J* = 9.7 Hz, H4'), 3.06 (m, 2H, H6''b, H2'''), 2.92 (m, 2H, H3 ou H1b, H6''a), 2.79 (d, *J* = 3.7 Hz, H2'), 2.77 (m, H1 ou H3), 1.99 (dt, 1H, *J* = 13.0 Hz et 4.4 Hz, H2a), 1.23 (q, 1H, *J* = 12.5 Hz, H2b).

Ces résultats sont en accord avec ceux publiés dans la littérature.¹⁴⁸

d) Synthèse du composé 11

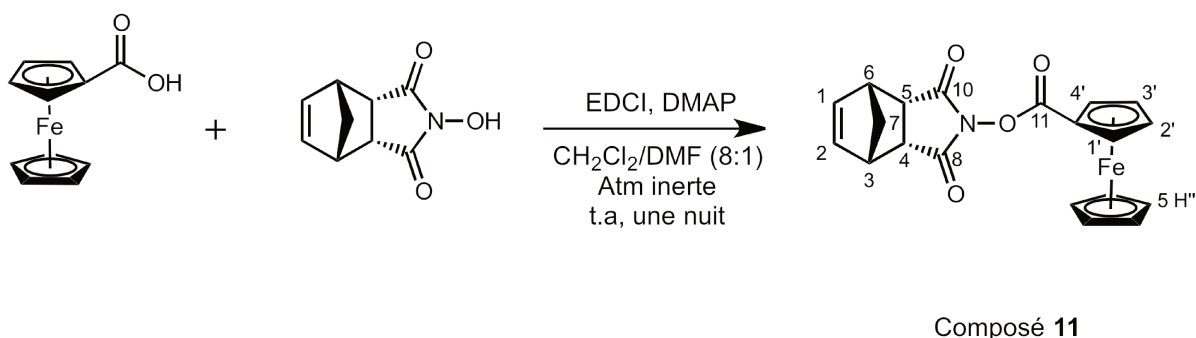


FIGURE V.4 – Synthèse du composé 11.

Le ferrocène **7** (1.6 g, 7.0 mmol, 1.0 eq) et l'*endo*-N-Hydroxy-5-norbornene-2,3-dicarboximide (NBD) (1.1 g, 6.1 mmol, 0.9 eq) sont dissous dans un mélange CH₂Cl₂/DMF (8:1, v/v, volume total: 45 mL). L'EDCI (1.2 g, 6.3 mmol, 0.9 eq) et le DMAP (5.0 mg, 0.04 mmol, 0.006 eq) sont ensuite additionnés et le mélange réactionnel est agité sous Argon pendant une nuit à température ambiante. La solution est filtrée et le solvant est évaporé. Le solide obtenu est dissous dans de l'EtOAc (100 mL) et la solution est lavée plusieurs fois avec une solution Na₂CO₃ 10 % (15 mL). La phase organique est évaporée et séchée sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié sur colonne flash en utilisant un éluant EtOAc/cyclohexane (1:1, v/v) pour aboutir à l'ester ferrocène-NBD (composé **11**) sous forme d'une huile marron (1.1 g, 2.8 mmol, rendement = 46 %).

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 6.31 (br s, 2H, H1, H2), 4.90 (s, 2H, H2'', H3''), 4.60 (s, 2H, H1'', H4''), 4.40 (s, 5H, 5 H'''), 3.51 (s, 2H, H3, H6), 3.39 (br s, 2H, H4, H5), 1.84 (s, 1H, H7a), 1.52 (s, 1H, H7b).

¹³C RMN (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 170.4 (C8, C10), 165.2 (C11), 134.9 (C1, C2), 77.7 (C5''), 72.7 (C2'', C3''), 70.8 (5 C'''), 70.7 (C4'', C1''), 51.40 (C7), 44.8 (C4, C5), 43.7 (C6), 43.2 (C3).

MS (ESI⁺): 392.30 [M+H]⁺

e) Synthèse de Fc-PRM - Composé 12

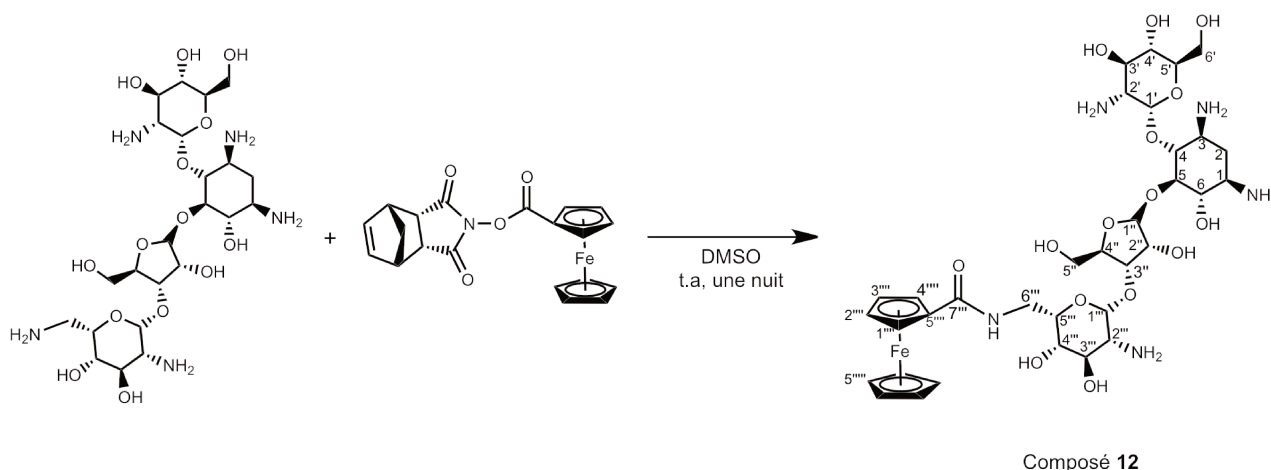


FIGURE V.5 – Synthèse du composé 12.

La paromomycine "free-base" (940 mg, 1.5 mmol, 1 eq) est dissoute dans du DMSO (15 mL). Séparément, le Fc-NBD (475 mg, 1.2 mmol, 0.8 eq) est dissous dans du DMSO (15 mL). Les deux solutions sont ensuite combinées et le mélange réactionnel de couleur orange est ensuite laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le brut réactionnel est évaporé sous pression réduite et aboutit à l'obtention d'une huile marron. Celle-ci est ensuite extraite par de l'eau distillée (100 mL). La phase aqueuse est séchée par lyophilisation pour donner un solide orange. Le produit brut est ensuite purifié par colonne en utilisant un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (2:2:1, v/v/v). La sonde Fc-PRM (composé 12) est ainsi obtenue sous forme d'un solide orange (317 mg, 0.38 mmol, rendement = 32 %).

CCM: Rf: 0.35 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (2:2:1, v/v/v))

$^1\text{H RMN}$ (D_2O , 400 MHz, 313 K): δ (ppm) 5.73 (s, 1H, H1'), 5.35 (s, 1H, H1''), 5.25 (s, 1H, H1'''), 4.86 (s, 2H, H3''', H1'''), 4.61 (s, 2H, H2''', H4'''), 4.43 (t, 1H, $J = 5.2$ Hz, H3''), 4.35 (s, 1H, H2''), 4.34 (s, 5H, 5 H'''), 4.30 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz, H3'''), 4.24 (m, 1H, H4''), 4.22 (s, 1H, H5'''), 3.97 (dd, 1H, $J = 10.5$ Hz et 4.6 Hz, H6'b), 3.96 (s, 1H, H3'), 3.89 (m, 2H, H5, H6), 3.88 (s, 1H, H5''b), 3.81 (m, 2H, H4''', H5'), 3.80 (s, 1H, H6'a), 3.69 (m, 2H, H6''b, H5'a), 3.61 (s, 1H, H2'''), 3.60 (s, 1H, H6''a), 3.55 (t, 1H, $J = 9.5$ Hz, H4), 3.51 (t, 1H, $J = 9.3$ Hz, H4'), 3.50 (s, 1H, H1), 3.40 (dd, 1H, $J = 10.8$ Hz et 3.7 Hz, H2'), 3.34 (m, 1H, H3), 2.49 (d, 1H, $J = 13.0$ Hz, H2b), 1.80 (q, 1H, $J = 12.5$ Hz, H2a).

$^{13}\text{C RMN}$ (D_2O , 400 MHz, 313 K): δ (ppm) 177.60 (C7'''), 99.0 (C1'), 98.80 (C1'''), 98.60 (C1''), 87.70 (C5), 84.80 (C4''), 80.70 (C6), 78.80 (C3''), 76.90 (C5', C5'''), 76.60 (C2''), 76.20 (C5'''), 75.60 (C4), 74.85 (C2''', C4'''), 73.30 (5 C'''), 72.50 (C4'), 72.00 (C3'), 71.80 (C3'''), 71.30 (C1'''), 70.80 (C3'''), 69.80 (C4'''), 63.82 (C5''), 63.62 (C6'), 57.03 (C2'), 54.32 (C2'''), 53.00 (C3), 43.10 (C6'''), 31.68 (C2).

MS (ESI⁺): 828.50 [M+H]⁺

Solide amorphe jaune

f) Synthèse de Chlorhydrate de néamine - Composé 13

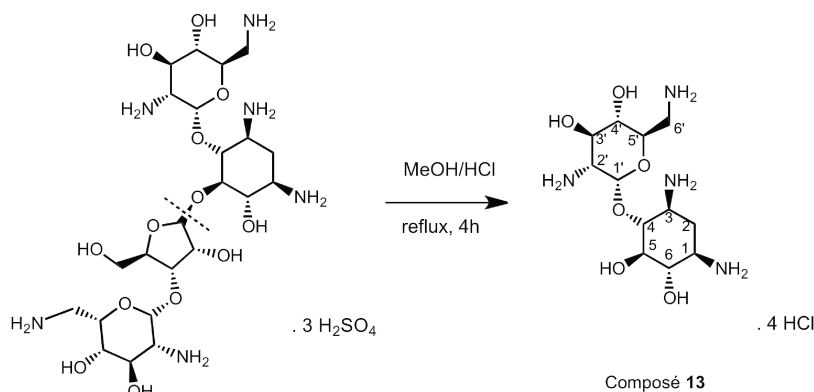


FIGURE V.6 – Synthèse du composé 13.

La néomycine trisulfatée (10 g, 11 mmol) commerciale est dissoute dans du MeOH (230 mL) en présence d'une solution de HCl concentré (25 mL, 12.1 N) ajoutée goutte à goutte. Le mélange réactionnel est porté au reflux du méthanol pendant 4h. Le mélange est ensuite laissé refroidir à température ambiante et la solution est alors évaporée. Le composé **13** est obtenu sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 43 % (2.2 g, 4.7 mmol).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.91 (d, 1H, $J = 3.9$ Hz, H1'), 3.97 (m, 3H, H3', H5', H5), 3.60 (m, 1H, H4), 3.45 (m, 4H, H6, H2', H4', H6'), 3.33 (m, 2H, H1, H3), 2.48 (dt, 1H, $J = 12.5$ Hz et 4.0 Hz, H2a), 1.92 (q, 1H, $J = 12.5$ Hz, H2b).

Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment décrits dans la littérature.¹⁶⁵

g) Synthèse de néamine "free-base - Composé 14

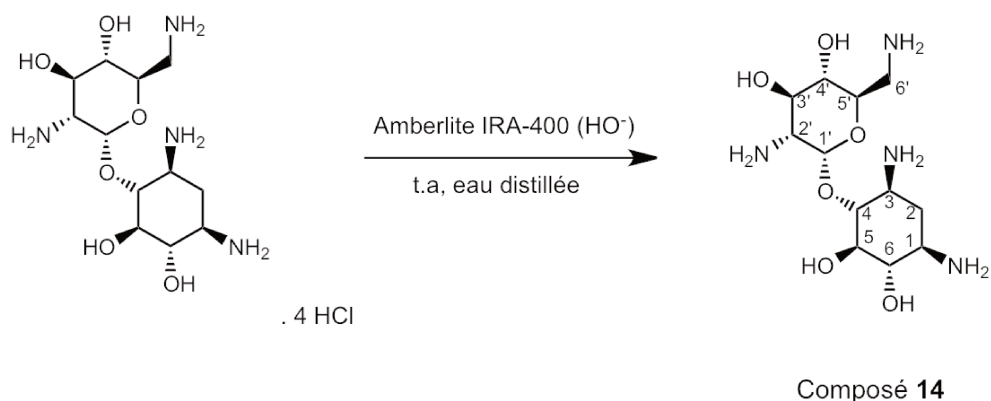


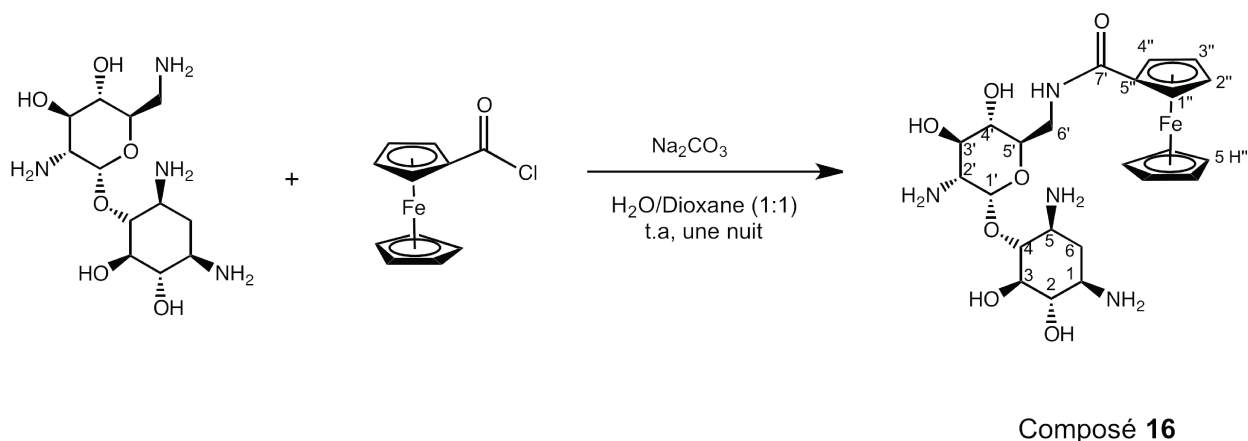
FIGURE V.7 – Synthèse du composé 14.

Le chlorhydrate de néamine (500 mg, 1.07 mmol), est dissous dans l'eau distillée (5 mL). Une résine amberlite IRA-400 (OH⁻) est chargée dans une colonne en verre de 3 cm de diamètre et lavée à l'eau distillée (1 L). La solution de chlorhydrate de néamine est alors placée sur la résine et éluée à l'eau distillée. Seules les fractions au pH > 9.0 sont conservées, rassemblées et lyophilisées donnant ainsi la néamine "free-base" sous forme de solide blanc (205 mg, 0.64 mmol, rendement = 60 %).

¹H RMN (D₂O, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.21 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H1'), 3.70 (m, 1H, H5'), 3.45 (m, 2H, H3', H5'), 3.23 (q, 2H, *J* = 11.3 Hz, H4, H4'), 3.10 (t, 1H, *J* = 9.4 Hz, H6), 2.95 (dd, 1H, *J* = 13.5 Hz et 2.5 Hz, H6'), 2.75 (m, 4H, H3, H6', H2', H1), 1.90 (dt, 1H, *J* = 12.5 Hz et 4.0 Hz, H2a), 1.13 (q, 1H, *J* = 12.5 Hz, H2b).

Ces résultats sont en accord avec ceux mentionnés dans la littérature.¹⁸³

h) Synthèse de Fc-néamine - Composé 16

FIGURE V.8 – Synthèse du composé **16**.

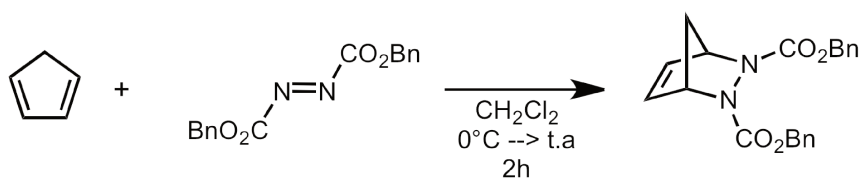
La néamine free-base (78 mg, 0.24 mmol, 2 eq) et le ferrocène chlorure d'acyle (30 mg, 0.12 mmol, 1 eq) sont dissous dans un mélange H₂O/dioxane (1:1, v/v) en présence de Na₂CO₃ (51 mg, 0.48 mmol, 4 eq). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le solvant est alors évaporé sous pression réduite et le brut réactionnel est purifié sur colonne en utilisant un mélange CHCl₃/MeOH/NH₄OH (5:3:1, v/v/v) comme éluant. Le composé **16** est alors isolé sous forme d'une huile marron (15 mg, 0.03 mmol, rendement = 25 %).

¹H RMN (D₂O, 400 MHz, 313 K): δ (ppm) 5.43 (d, 1H, *J* = 4.0 Hz, H1'), 4.84 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H3''), 4.62 (s, 5H, 5 H'''), 4.58 (d, 1H, *J* = 3.5 Hz, H4''), 4.32 (s, 2H, H1'', H2''), 3.93 (m, 1H, H5'), 3.77-3.80 (m, 2H, H3', H6'b), 3.57-3.62 (m, 2H, H6'a, H5), 3.42-3.44 (m, 3H, H6, H4, H4'), 3.15-3.18 (m, 2H, H2', H1), 3.00 (m, 1H, H3), 2.18 (dt, 1H, *J* = 12.5 Hz et 4.2 Hz, H2b), 1.46 (q, 1H, *J* = 12.5 Hz, H2a).

¹³C RMN (D₂O, 400 MHz, 313 K): δ (ppm) 34.90 (C2), 43.00 (C6'), 52.00 (C3), 53.60 (C1), 57.90 (C2'), 71.50 (C3''), 73.20 (C1'', C2''), 74.04 (C3'), 74.40 (C4'), 74.80 (C4''), 74.80 (C5'), 75.20 (5 C'''), 76.70 (C6), 78.40 (C5), 88.25 (C4), 101.80 (C1'), 177.6 (C7').

MS (ESI⁺): 535,6 [M+H]⁺

i) Synthèse de 2,3-diazabicyclo[2.2.1]hept-5-ene-2,3- dibenzyle dicarboxylate - Composé 19



Composé 19

L'azodicarboxylate (16 g, 54 mmol, 1 eq) est dissous dans du DCM anhydre (32 mL) et la solution est lentement refroidie à 0 °C. Du cyclopentadiène fraîchement distillé (8.2 g, 124 mmol, 2.3 eq) est alors ajouté goutte à goutte à la solution jusqu'à disparition complète de la couleur orangée. La température du milieu réactionnel est alors laissée remonter progressivement à température ambiante et laissée sous agitation pendant 2h. Le solvant est alors évaporé et l'huile formée est dissoute dans du cyclohexane (100 mL). Le mélange est alors laissé sous agitation pendant une nuit. Le solide blanc obtenu est filtré et séché sous pression réduite donnant alors le composé **19** (18 g, 49 mmol, rendement = 90 %).

¹H RMN (CDCl₃, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 7.23 (br s, 10H, H11, H12, H13, H14, H15, H11', H12', H13', H14', H15'), 6.39 (br s, 2H, H5, H6), 5.12 (br s, 6H, H1, H4, H9a, H9b, H9'a, H9'b), 1.67 (s, 2H, H7a, H7b).

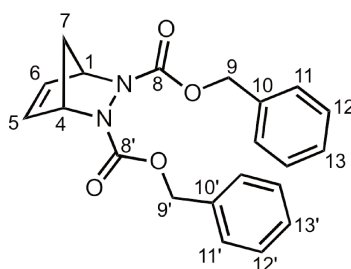
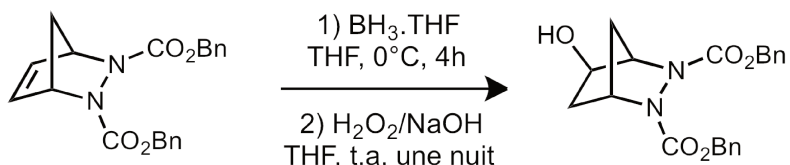


FIGURE V.9 – Composé 19.

Ces résultats sont en accord avec la littérature¹⁸⁴

j) Synthèse de (±)-(1R,4S,5S)-5-hydroxy-2,3-diazabicyclo[2.2.1]heptane-2,3-dibenzyle dicarboxylate -
Composé 20



Le composé **19** (5 g, 14 mmol, 1 eq) est dissous dans du THF (40 mL) sous atmosphère inerte. Le mélange réactionnel est lentement refroidi à 0 °C et du BH₃.THF 1M (16 mL, 16 mmol, 1.1 eq) est alors additionné. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à 0 °C pendant 4h. Un mélange de peroxyde d'hydrogène 30 % dans l'eau (27.4 mL) et de NaOH 3 M (68.5 mL) est alors additionné goutte à goutte à la réaction. La solution blanchâtre est laissée sous agitation à température ambiante pendant une nuit sous atmosphère inerte. La phase aqueuse est extraite plusieurs fois avec du DCM (3 x 100 mL). Les phases organiques sont combinées et lavées avec une solution aqueuse saturée NaCl (5 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées. Le produit brut est purifié par colonne flash sur gel de silice (éluant: Cyclohexane/EtOAc 1:1, v/v) pour aboutir au composé **20** (2.4 g, 6.3 mmol, rendement = 45 %).

¹H RMN (CDCl₃, 250 MHz, 300 K): δ (ppm) 7.31 (br s, 10H, H11, H12, H13, H14, H15, H11', H12', H13', H14', H15'), 5.16 (br s, 4H, H9a, H9b, H9'a, H9'b), 4.59 (br s, 1H, H1), 4.37 (br s, 1H, H4), 4.12 (br s, 1H, H5), 2.03 (dd, 1H, *J* = 13.2 Hz et 6.5 Hz, H6), 1.96 (d, 1H, *J* = 10.6 Hz, H7), 1.63 (d, 1H, *J* = 10.6 Hz, H7), 1.50 (br d, 1H, *J* = 13.2 Hz, H6).

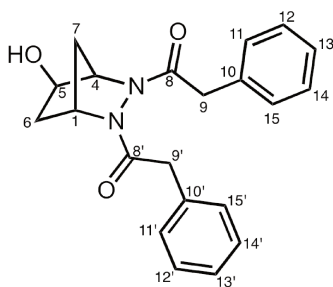


FIGURE V.10 – Composé **20**.

Ces résultats sont en accord avec la littérature.¹⁸⁴

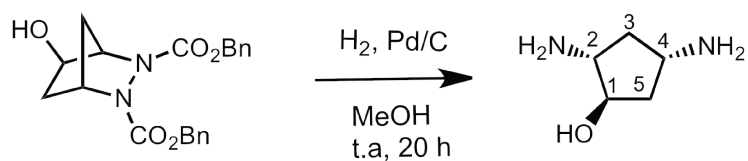
k) Synthèse de (\pm)-2,4-diaminocyclopentanol - Composé 5

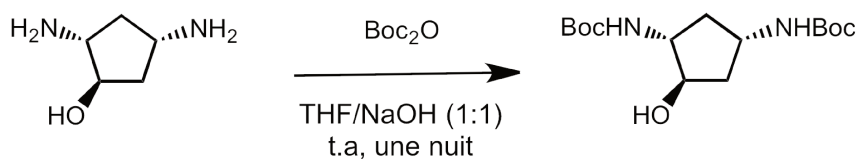
FIGURE V.11 – Synthèse du composé 5.

Le composé **20** (518 mg, 1.4 mmol, 1 eq) est dissous dans du MeOH (10 mL) en présence de Pd/C 10 % (276 mg) sous atmosphère d'hydrogène. Après 19h de réaction, le mélange réactionnel est filtré sur celite puis lavé trois fois avec un mélange DCM/MeOH (1:1, v/v 3 x 30 mL). Le solvant est ensuite évaporé pour donner le composé **5** sous forme d'une huile incolore (110 mg, 0.95 mmol, rendement = 68 %).

1H RMN (MeoD- d_4 , 250 MHz, 300 K): δ (ppm) 3.91 (q, 1H, $J = 7.1$ Hz, H1), 3.46 (quint, 1H, $J = 7.5$ Hz, H4), 3.02 (q, 1H, $J = 7.5$ Hz, H2), 2.37 (dt, 1H, $J = 13.0$ Hz et 7.5 Hz, H3), 1.85 (m, 2H, H5a, H5b), 1.21 (dt, 1H, $J = 13.0$ Hz et 8.30 Hz, H3).

Ces résultats sont en accord avec la littérature.¹⁸⁴

I) Synthèse de (±)-2,4-di-tert-butyl-dicarbamate-cyclopentan-1-ol - Composé 21



Le composé **5** (425 mg, 3.7 mmol, 1 eq) est solubilisé dans un mélange de THF/NaOH aq (1.5 M) ($V_t = 60$ mL, 1:1, v/v), puis Boc_2O (2.4 g, 11.0 mmol, 3 eq.) est ajouté progressivement. Un précipité blanc apparaît dans le mélange réactionnel et la réaction est laissée sous agitation pendant une nuit. Le THF est évaporé puis EtOAc (25 mL) et de l'eau (12 mL) sont additionnés. La phase aqueuse est ensuite extraite 3 fois avec EtOAc (3 x 15 mL). Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées. Le produit brut est purifié par chromatographie éclair sur gel de silice (éluant: EtOAc/Cyclohexane, 6:4, v/v). Le composé **21** est isolé sous la forme d'un solide blanc avec un rendement de 16 % (179 mg, 0.6 mmol).

$^1\text{H RMN}$ (MeoD- d_4 , 250 MHz, 300 K): δ (ppm) 3.99 (m, 2H, H2, H4), 3.62 (dt, 1H, $J = 7.7$ Hz et 5.0 Hz, H1), 2.44 (dt, 1H, $J = 13.4$ Hz et 7.9 Hz, H3), 1.90 (m, 1H, H5), 1.78 (m, 1H, H5), 1.44 (s, 9H, Me Boc), 1.43 (s, 9H, Me Boc), 1.30 (dt, 1H, $J = 13.9$ Hz et 7.8 Hz, H3).

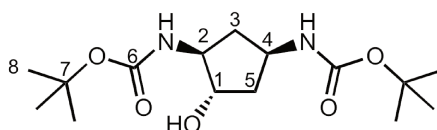
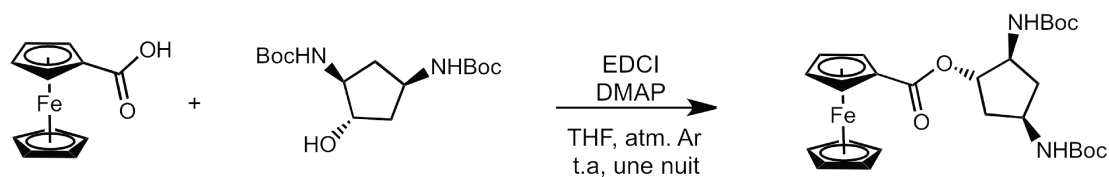


FIGURE V.12 – Composé 21.

Ces résultats sont en accord avec la littérature.¹⁸⁴

m) Synthèse de (\pm)-2,4-di-tert-butyl-dicarbamate-cyclopentan-1-Ferrocenyl ester - Composé **22**

Sous atmosphère d'argon, l'acide ferrocène carboxylique (30 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) et le composé **21** (40 mg, 0.13 mmol, 1.0 eq) sont dissous dans du THF (1 mL). La solution obtenue de couleur orangée est laissée sous agitation pendant 1h. EDCI (31 mg, 0.16 mmol, 1.2 eq) et CH_2Cl_2 (1 mL) sont ensuite ajoutés et la réaction est placée sous agitation à température ambiante pendant une nuit. Le DCM (5 mL) et du chlorure d'ammonium NH_4Cl (1.6 mL) sont ajoutés et la phase aqueuse est alors extraite plusieurs fois au DCM. Les phases organiques sont ensuite rassemblées, séchées sur MgSO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le produit brut est ensuite purifié par colonne flash sur gel de silice (éluant: Cyclohexane/ AcOEt (75:25, v/v)) pour aboutir au composé **22** sous la forme d'un solide jaune (25 mg, 0.047 mmol, rendement = 36 %).

CCM: Rf: 0.52 (éluant: Cyclohexane/ AcOEt (75:25, v/v))

$^1\text{H RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.16 (td, 1H, $J = 7.5$ Hz et 5.0 Hz, H1), 4.91 (s, 2H, H2'', H3''), 4.52 (s, 2H, H1'', H4''), 4.35 (s, 5H, 5 H''), 4.12 (m, 1H, H4), 3.89 (m, 1H, H2), 2.65 (dd, 1H, $J = 14.7$ Hz et 8.4 Hz, H5), 2.13 (dt, 1H, $J = 14.0$ Hz et 8.0 Hz, H3), 1.48 (dt, 1H, $J = 14.0$ Hz et 8.0 Hz, H5), 1.46 (s, 9H, Me Boc), 1.43 (s, 9H, Me Boc), 1.42 (dt, 1H, $J = 13.9$ Hz et 7.7 Hz, H3).

$^{13}\text{C RMN}$ (CDCl_3 , 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 179.53 (C6''), 161.08 (C6 ou C6'), 159.50 (C6 ou C6'), 80.00 (C7 ou C7'), 79.89 (C7 ou C7'), 77.72 (C5''), 77.19 (C1), 73.46 (C1'', C4''), 71.38 (C2'', C3''), 70.99 (5 C'''), 48.20 (C4), 56.32 (C2), 37.90 (C5), 31.07 (C3), 28.50 (Me Boc), 28.20 (Me Boc).

MS (ESI⁺): 530.1 [M+H]⁺

Solide amorphe marron

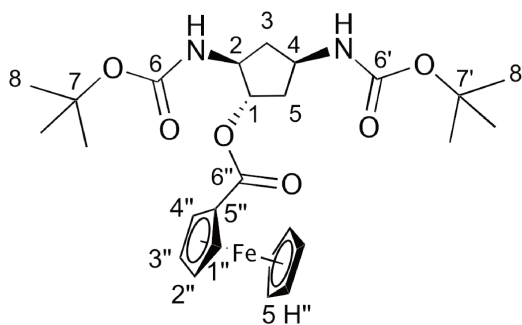
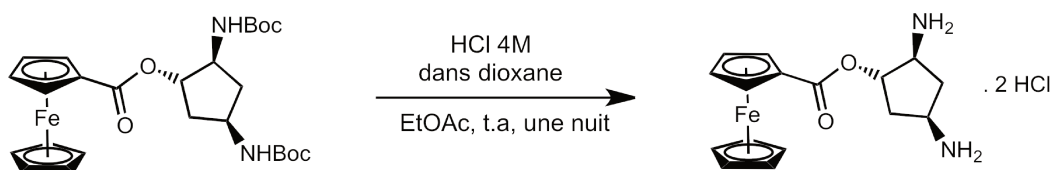


FIGURE V.13 – Composé **22**.

n) Synthèse de Fc-DACP.2HCl - Composé 23



Le composé **22** (12 mg, 0.02 mmol) est solubilisé dans EtOAc (5 mL) en présence d'acide chlorhydrique 4M dans le dioxane (2 mL). Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant une nuit. La solution est ensuite concentrée sous pression réduite et du cyclohexane (5 mL) est ajouté. Le composé **23** est obtenu sous la forme d'un solide marron (1.8 mg, 0.0045 mmol, rendement = 22 %).

¹H RMN (MeOD-d₄, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 5.41 (m, 1H, H1), 4.22 (s, 5H, 5 H^{''}), 4.81 (s, 2H, H1'', H3''), 4.48 (s, 2H, H2'', H4''), 3.68-3.77 (m, 1H, H4), 3.59 (q, 1H, $J = 7.3$ Hz, H2), 2.36 (dt, 1H, $J = 12.5$ Hz et 7.0 Hz, H3), 1.91-2.01 (m, 1H, H5), 1.27 (m, 1H, H3).

¹³C RMN (MeOD-d₄, 500 MHz, 300 K): δ (ppm) 173.26 (C6'), 76.27 (C1), 75.80 (C5'), 73.17 (C4'), 72.74 (C1'), 70.90 (C2'), 70.65 (C3'), 70.61 (5 C^{''}), 56.73 (C2), 48.57 (C4), 39.94 (C3), 36.26 (C5).

MS (ESI⁺): 328.8 [M+H]⁺

Solide amorphe marron

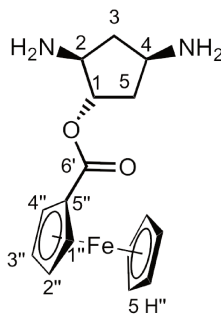


FIGURE V.14 – Composé **23**.

II - Préparation des échantillons d'ARN

Les séquences d'ARNr 16S23 et de l'aptamère à la néomycine ont été achetées chez Dharmacon (GE Healthcare) (figure V.15). Etant préalablement déprotégées en 2' (les groupements OH en 2' ne sont pas protégés par un groupement ACE (bis(acetoxyethoxy)-methyl)) et purifiées par HPLC, ces séquences ont été utilisées sans purification supplémentaire. Les conformations en tige-boucle ont été obtenues de la façon suivante. L'ARN est tout d'abord dilué à 1 mM soit:

- dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl (pour les expériences RMN).
- dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, EDTA 0.1 mM, NaCl 150 mM (pour les expériences en microcalorimétrie et pour les expériences en électrochimie).

L'ARN est ensuite chauffé à 95 °C puis refroidi sur de la glace pendant 5 min. Cette méthode permet à la séquence de se replier dans la conformation la plus favorable et donne ainsi lieu à l'obtention d'une tige-boucle pourvue d'un *bulge* ("hernie" en français) et évite la formation de dimères d'ARN. L'obtention de la forme monomérique est ensuite vérifiée par électrophorèse SDS-PAGE 18 %. La concentration est mesurée sur un spectrophomètre UV/Vis Biochrom Libra S22 ($\epsilon_{260\text{nm}}$ (ARNr 16S23) = 220100 L/mol.cm et $\epsilon_{260\text{nm}}$ (aptamère) = 256900 L/mol.cm).

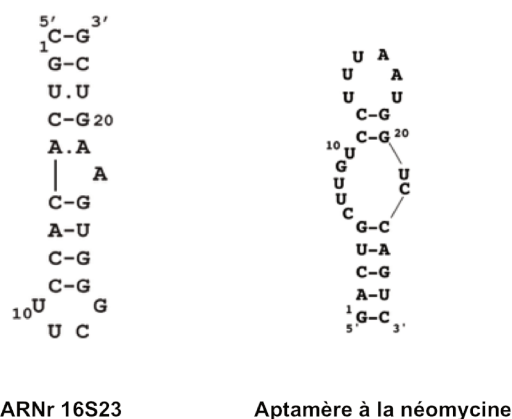


FIGURE V.15 – Séquences d'ARN étudiées pour les études de complexation avec la sonde FcPRM

III - Analyses RMN

Les expériences de RMN ont été enregistrées sur un spectromètre RMN Bruker Avance DRX 600 équipé d'une cryosonde TXI (600 MHz). La formation des complexes ARN/sonde FcPRM a été suivie par: RMN ^1H 1D et 2D TOCSY.

III - 1) Observation de la formation du complexe ARN/FcPRM en RMN ^1H 1D

Pour les expériences en RMN du proton, le spectre de l'ARNr 16S23 dissous dans un tampon phosphate (0.38 mM dans 10 mM KPO_4 , pH 6.5 et 50 mM KCl) a été enregistré à 288 K en utilisant une séquence Watergate pour la suppression du signal de l'eau.¹¹⁰ Les signaux des protons iminos des bases G et U de l'ARN sont suivis avant et après addition de la sonde FcPRM. Les déplacements chimiques des protons iminos

des nucléotides des bases U₁₆ et G₁₇ sont modifiés lors de l'addition de la sonde FcPRM (1 éq), comme indiqué sur la figure V.17.

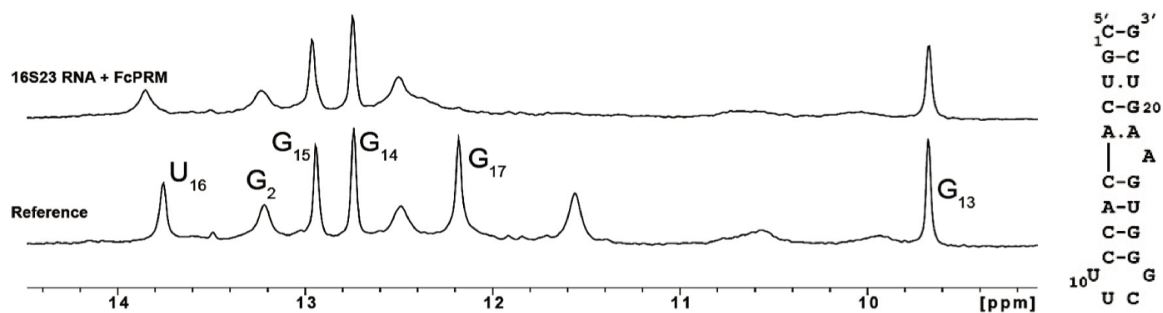


FIGURE V.16 – Observation de l'interaction entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 par RMN ¹H, à 288K dans un tampon 10 mM KPO₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl . Bas: spectre RMN ¹H de l'ARNr 16S23 (0.38 mM). Haut: spectre de l'ARNr 16S23 en présence de 1 eq. de la sonde FcPRM.

La même expérience RMN ¹H 1D a été répétée pour l'aptamère à la néomycine. Le spectre de cet aptamère (0.4 mM dans 10 mM KPO₄, pH 6.5 et 50 mM KCl) a été enregistré à 288 K en utilisant une séquence Watergate pour la suppression du signal de l'eau.¹¹⁰

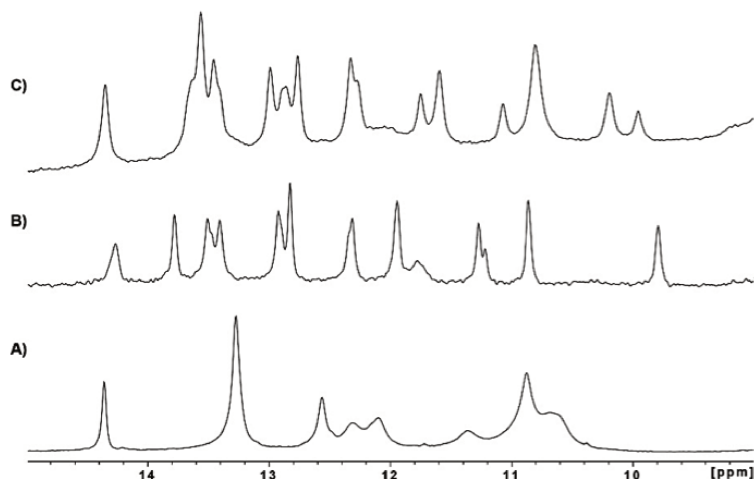


FIGURE V.17 – Aptamère à la néomycine (0.4 mM dans un tampon 10 mM KPO₄, pH 6.5 et 50 mM KCl), à 288 K. A) aptamère seul. B) aptamère en présence de néomycine. C) aptamère en présence de la sonde FcPRM.

III - 2) Observation de la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM en TOCSY

Pour cette expérience, l'ARNr 16S23 a été préparé dans un tampon entièrement deutéré D₂O (10 mM, pH 6.5 en présence de 50 mM KCl) à une concentration de 1.5 mM. Une série d'expériences TOCSY (temps de mélange 45 ms) ont été enregistrées à 288 K en absence puis en présence de 2 eq. de sonde FcPRM (rouge), préalablement solubilisée dans D₂O. La figure V.18, montre la superposition des expériences TOCSY en absence (spectre bleu) et en présence de 2 eq. de sonde FcPRM. Les nucléotides dont le déplacement chimique des protons H-H₆ est perturbé, sont indiqués en rouge sur la structure secondaire de l'ARN illustrée sur le spectre. Elles correspondent au site d'interaction spécifique de la sonde sur l'ARNr 16S23. L'attribution des signaux illustrés provient du travail réalisé par l'équipe de Puglisi.¹¹¹

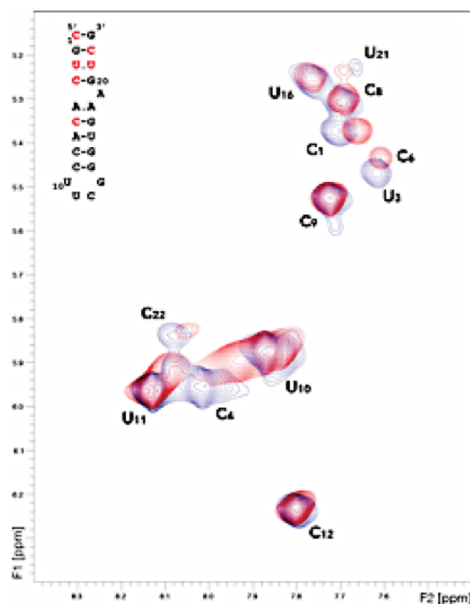


FIGURE V.18 – Superposition des spectres TOCSY de l'ARNr 16S23 (1.5 mM, tampon KPO_4 100 % D_2O pH 6.5 en présence de 50 mM KCl, temps de mélange 45 ms), 288 K. En bleu: seul. En rouge: en présence de 2 éq de FcPRM.

IV - Titration calorimétrique isotherme

Les expériences de microcalorimétrie (ITC) ont été réalisées sur un appareil MicroCal ITC₂₀₀ (GE Healthcare) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 0.1 mM EDTA, 150 mM NaCl.

Les expériences de dosage de l'ARNr 16S23 par la sonde FcPRM (figure ?? - a) ont été réalisées dans les conditions suivantes: 25 injections successives à 1.54 μL d'une solution de sonde FcPRM à 1.5 mM ($V(\text{seringue}) = 40 \mu\text{L}$) dans une cellule adiabatique ($V(\text{cellule}) = 200 \mu\text{L}$) remplie d'une solution d'ARNr 16S23 à 100 μM . Les expériences ont été réalisées à une température de 298 K. Une injection est réalisée toutes les 180 s et la solution est homogénéisée par rotation à 1000 rpm. Toutes les thermogrammes ITC ont été analysés grâce au logiciel Origin 7.0 (OriginLab) en utilisant un modèle d'interaction séquentielle à deux sites. Les échantillons ARN ont été préalablement dialysés pendant une nuit dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 0.1 mM EDTA, contenant 150 mM NaCl et leur concentration a ensuite été ajustée à 100 μM et vérifiée sur un spectrophotomètre UV/Vis Biochrom Libra S22. La solution de FcPRM a été préparée en utilisant le tampon de dialyse de l'ARN. Le protocole de dialyse des ARN a été réalisé comme suit:

- La membrane de dialyse de porosité 1000 Da et la cuve de dialyse (500 μL) sont nettoyés dans deux bains successifs de NaOH 1M avant d'être rincés dans un bain d'eau ultrapure.
- L'échantillon d'ARN est placé dans la cuve de dialyse qui est ensuite refermée par la membrane de dialyse en cellulose.
- La cuve de dialyse est placée dans 1L de solution du tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA et laissée sous agitation pendant une nuit.
- L'échantillon d'ARN est récupéré, sa concentration vérifiée par spectrométrie UV. La concentration est

ensuite ajustée pour les expériences ITC.

Les aires de chaque pic représentées sur les thermogrammes de l'expérience de dosage sont ensuite corrigées en leur retranchant la valeur des aires des pics du ligand injecté dans la solution tampon en l'absence de macromolécule cible (énergie liée à la dilution).

V - Electrochimie

Toutes les expériences de voltammétrie cyclique et de chronoampérométrie ont été réalisées à l'aide d'un potenstostat CHI 900, contrôlé par un ordinateur. Les données expérimentales ont été recueillies par le logiciel CHI 900. Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de mini cellules électrochimiques à trois électrodes obtenues par sérigraphie (figure V.19).

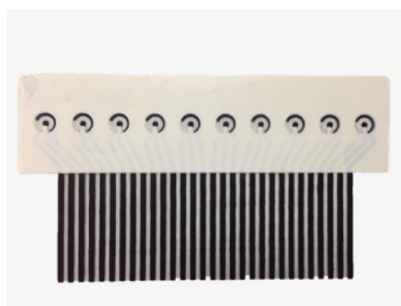


FIGURE V.19 – Electrodes sérigraphiées utilisées pour les mesures électrochimiques.

Une sérigraphieuse semi-automatique DEK modèle 65 (Presco, USA) a été utilisée pour déposer successivement de fines couches d'encre sur des films plans de téréphtalate de polyéthylène à travers de masques de sérigraphie constitués d'une toile tendue en acier inoxydable (230 fils d'acier inoxydable par pouce carré). Ce dispositif permet de sérigraphier le motif de 20 électrodes en même temps. L'électrode de travail et la contre électrode sont préparées à partir d'une encre Electrodag PF-407A (Acheson Colloids Co), tandis que la pseudo électrode de référence est préparée à partir d'encre Electrodag 418S (Acheson Colloids Co). Une première couche d'argent est déposée pour assurer une meilleure conductivité sous les dépôts d'encre de carbone et au niveau des contacts électriques, puis séchée dans un four pendant 15 minutes à 120 °C. La couche de carbone permettant de former l'électrode de travail et la contre électrode est ensuite appliquée et séchée 15 minutes à 120 °C. Enfin, une couche diélectrique hydrophobe (Vinilfast 36, Kiian, Italie) est appliquée et séchée dans les mêmes conditions afin d'isoler chaque cellule électrochimique par une cavité circulaire de 5 mm de diamètre et quelques micromètres d'épaisseur. Ceci permet à un volume de 50 μL de solution d'être maintenu à la surface des électrodes sans s'étaler.

Avant chaque expérience, les électrodes ont été systématiquement préparées de la façon suivante:

- Nettoyage des électrodes à l'éthanol absolu.
- Les électrodes sont traitées par une solution de BSA 1 mg/mL pendant 15 min (dépôt d'une gouttelette à la surface de l'électrode), puis rinçées deux fois avec de l'eau ultra-pure.

Sauf indication contraire, toutes les expériences ont été réalisées à température ambiante dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 0.1 mM EDTA, 150 mM NaCl. Ces électrodes ont été utilisées dans des expériences de voltammétrie cyclique balayant à une vitesse de $0.1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ entre 0.1 et 0.7 V (vs. Ag/AgCl). Tous les voltammogrammes ont été traités en utilisant OriginPro 9.0 (OriginLab).

V - 1) Expériences de titrage - Détermination des constantes de dissociation K_D

Les variations du courant de pic de la sonde électroactive ont été suivies par voltamétrie cyclique, à la suite d'ajouts croissants de quantités d'ARN à température ambiante. Un exemple de protocole de titrage est décrit ci-dessous (ce protocole a été adapté selon les concentrations en sonde FcPRM utilisées):

Pour l'exemple d'expérience de titration illustré en figure V.21, nous avons suivi l'évolution des courants de pics à la suite d'additions successives d'ARNr 16S23 (de 0.07 à 8.3 éq) Une gouttelette de $38.5 \mu\text{L}$ (V_0) de tampon MES contenant $15 \mu\text{M}$ de sonde FcPRM est déposée sur une cellule sérigraphiée puis des injections successives de solutions mères d'ARNr 16S23 ont été réalisées comme suit:

- une première injection de $0.2 \mu\text{L}$ d'une solution mère d'ARNr 16S23 à $202 \mu\text{M}$, afin d'ajouter $1 \mu\text{M}$ d'ARN dans la gouttelette.
- suivie d'injections à $0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8 \mu\text{L}$ à partir d'une solution mère d'ARNr 16S23 à $840 \mu\text{M}$, afin d'ajouter $4.3, 6.3, 8.4, 10, 12$ and $15 \mu\text{M}$ d'ARN respectivement.

Ces ajouts aboutissent respectivement à des concentrations finales en ARNr 16S23 de 1, 5.4, 10, 14, 18, 25, 33, 43, 55, 67, 79, 95 et $109 \mu\text{M}$ dans la gouttelette. Ce qui correspond à 0.07, 0.4, 0.7, 1.0, 1.2, 1.7, 2.3, 3.0, 4.0, 4.9, 5.8, 7.1 et 8.3 éq., comme illustré sur les voltammogrammes de la figure V.21 - a.

Chaque injection est réalisée à l'aide d'une pipette et de cônes de pipette RNase-free. La solution injectée est homogénéisée par des pipetages allers-retours dans la gouttelette. Après chaque injection, une série de voltammogrammes est enregistrée jusqu'à stabilisation complète des courants de pic anodique et cathodique. L'injection suivante ne s'effectue qu'après nous être assurés de la stabilité du voltammogramme.

La valeur du courant de pic anodique du voltammogramme stabilisé, est ensuite extraite et corrigée de manière à prendre en compte une diminution du courant liée à la dilution. Pour cela, les valeurs de courant sont multipliées par le facteur correctif D_{factor} suivant:

$$D_{\text{factor}} = V_0/V_{(\text{après injection})}$$

Les valeurs de courant de pics sont ensuite normalisées par rapport au courant de pic initialement mesuré en absence d'ARN, puis reportés en fonction de la concentration corrigée d'ARN. A l'aide du logiciel Mathematica (Wolfram), une régression non linéaire des points expérimentaux selon un modèle à un site de fixation est réalisée, aboutissant ainsi à une valeur de K_D .

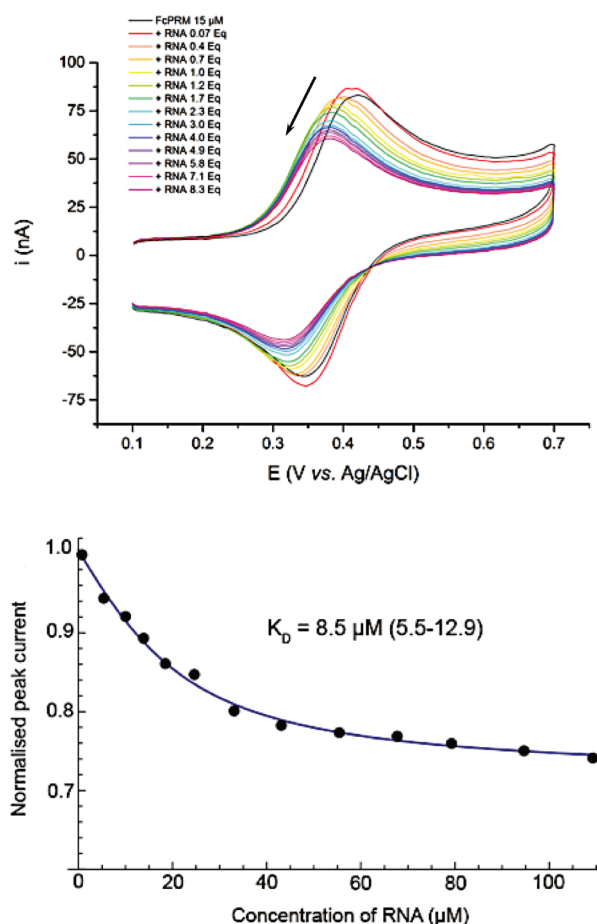


FIGURE V.20 – Exemple d'expérience de titration réalisée par CV. a) Voltamogrammes. b) Régression non linéaire des points expérimentaux et valeur de K_D associée.

V - 2) Expériences de compétition - Détermination de K_D d'aminoglycosides non marqués

Les variations du courant de pic résultant de l'addition de quantités d'aminoglycoside compétiteur à un complexe FcPRM/ARN pré-formé, ont été suivies par voltammétrie cyclique à température ambiante. Un exemple de protocole de compétition, réalisé à une concentration précise est décrit ci-dessous. Ce protocole a été adapté selon les concentrations de travail.

Les exemples d'expérience de compétition illustré en figure V.22, ont été réalisés en utilisant la néomycine et la paromomycine. Nous avons suivi l'évolution des courants de pics résultant d'additions successives d'aminoglycoside (de 0.1 à 5.2 eq) dans une gouttelette de 39.2 µL (V_0) de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, contenant un complexe FcPRM/ARN (ratio 1:0.7). Les injections d'aminoglycoside compétiteur ont été réalisées comme suit:

- injections de 0.2, 0.3 et 0.4 µL d'une solution mère d'aminoglycoside à 0.5 mM afin de respectivement additionner 2.5, 3.7 et 5 µM dans la gouttelette.
- suivies injections à 0.5, 0.6 et 0.8 µL d'une solution mère d'aminoglycoside à 1 mM afin d'augmenter la concentration en aminoglycoside de 12, 14 et 18 µM respectivement.

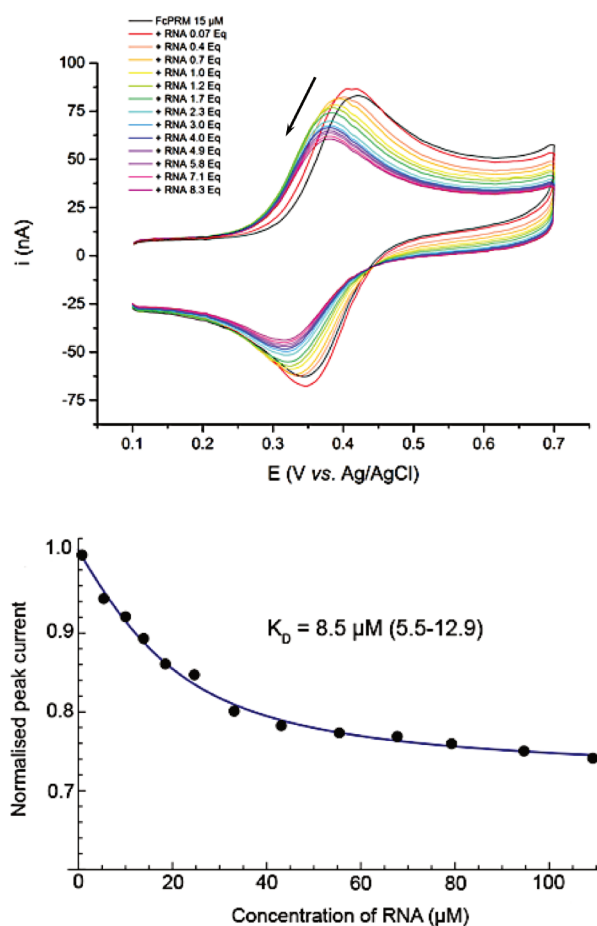


FIGURE V.21 – Exemple d’expérience de titration réalisée par CV. a) Voltammogrammes. b) Régression non linéaire des points expérimentaux et valeur de K_D associée.

Comme illustré sur la figure V.22 - a et b, ces injections ont abouti à des concentrations en aminoglycoside dans la goutte de: 2.5, 5, 8, 10, 14, 19, 31, 45, 59, 73, 92, 110 et 127 μM respectivement. Ceci correspond aux voltammogrammes enregistrés pour 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1.1, 1.7, 2.3, 2.8, 3.6, 4.4 et 5.2 eq.

Chaque injection est réalisée à l’aide d’une pipette automatique et de cônes de pipette RNase-free. La solution injectée est homogénéisée par des pipetages allers-retours dans la gouttelette. Après chaque injection, les voltammogrammes sont enregistrés jusqu’à stabilisation complète des courants de pics anodique et cathodique. L’injection suivante ne s’effectue qu’après nous être assurés de la stabilité du voltammogramme.

Comme précédemment, la valeur du courant de pic anodique du voltammogramme stabilisé est ensuite extraite et corrigée de manière à prendre en compte une diminution de courant liée à la dilution. Pour cela, les valeurs de courant sont multipliées par le facteur correctif D_{factor} suivant:

$$D_{\text{factor}} = V_0 / V_{(\text{après injection})}$$

Les valeurs de courant de pics sont ensuite normalisées par rapport au courant de pic initialement enregistré en absence d’ARN, puis reportés en fonction de la concentration corrigée d’ARN. A l’aide du logiciel Mathematica (Wolfram), une régression non linéaire des points expérimentaux selon un modèle à un site de

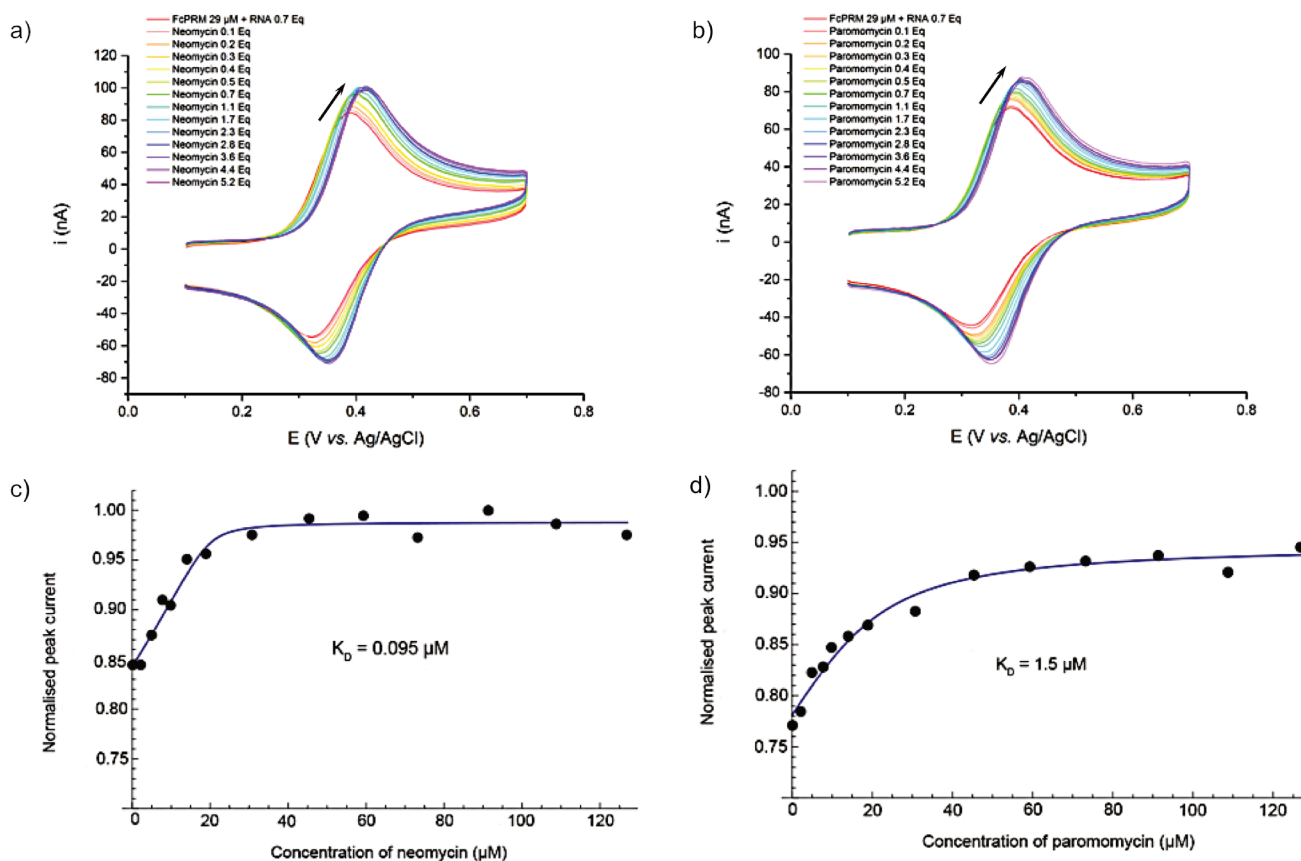


FIGURE V.22 – Exemple d’expérience de compétition réalisées en CV dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) et b) Voltammogrammes. c) et d) Courbe de dosage et régression non-linéaire des points expérimentaux.

fixation est réalisée, aboutissant ainsi à une valeur de K_D .

V - 3) Utilisation du dispositif de gouttelette tournante

Pour ces expériences, nous avons utilisé une électrode tournante de *Princeton Applied Research, Model 636 RDE* avec comme embout une électrode disque/anneau carbone/Pt. Celle-ci n’est utilisée que comme embout rotatif apposé à la surface d’une gouttelette de façon à la prendre en sandwich, afin de la mettre en rotation à une vitesse constante. Pour contrôler de façon précise la position de l’électrode sérigraphiée située sous cet embout rotatif, une platine de positionnement micrométrique (*Sutter Instrument*) a été utilisée. En fixant l’électrode sérigraphiée à ce dispositif, on peut contrôler son positionnement vis-à-vis de l’électrode tournante selon les trois axes x , y et z .

a) Détermination de K_D à l’aide de la gouttelette tournante

De façon similaire au protocole décrit précédemment dans le paragraphe V - 1), nous avons réalisé une expérience de dosage. Un exemple de protocole de détermination de constante de dissociation, cette fois réalisé en conditions hydrodynamiques grâce à l’utilisation de la gouttelette tournante, est détaillé ci-dessous. Pour réaliser une expérience de dosage dans ces conditions, l’électrode de travail est immobilisée sur

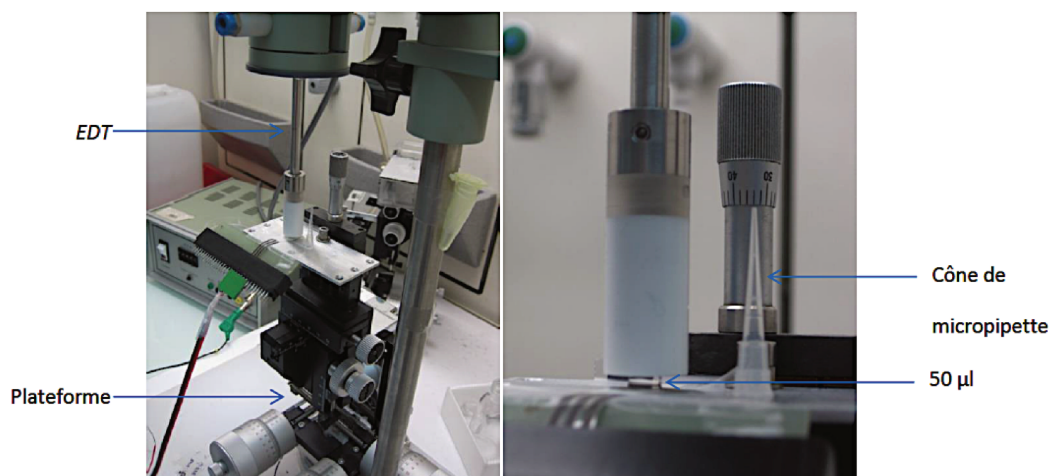


FIGURE V.23 – A gauche le dispositif d'électrode tournante, à droite le dispositif de micromanipulation. Figure tirée de la thèse de Lylian Challier.¹⁸⁵ EDT:électrode à disque tournant.

le dispositif de micromanipulation puis, positionnée en face de l'électrode tournante. Une fois l'électrode bien positionnée, une gouttelette de 40 μL (V_0) de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA de sonde FcPRM est déposée à sa surface. La gouttelette est ensuite surélevée selon l'axe z grâce au dispositif de micromanipulation, jusqu'à ce qu'elle entre en contact avec l'embout rotatif. L'écart entre cet embout et l'électrode sérigraphiée fixe, est d'environ 2.5 mm. Enfin, l'électrode tournante est mise en rotation à 2500 rpm.

Ce protocole de dosage a été réalisé à une concentration précise en sonde FcPRM. Il a été adapté selon les concentrations de travail. Nous avons suivi l'évolution des courants de plateau à la suite d'additions successives d'ARNr 16S23 dans une gouttelette de 40 μL (V_0) de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA contenant 50 μM de sonde FcPRM. Les injections ont été réalisées comme suit:

- trois injections successives de 0.5 μL d'une solution stock d'ARNr 16S23 à 810 μM , afin d'ajouter 10, 9.9 et 9.8 μM d'ARN dans la gouttelette.
- suivies de deux injections à 1.1 μL d'une solution stock d'ARNr 16S23 à 810 μM , afin d'ajouter 21 puis 20.4 μM d'ARN dans la gouttelette.
- une injection à 1.6 μL d'une solution stock d'ARNr 16S23 à 810 μM , afin d'ajouter 28.6 μM d'ARN dans la gouttelette.
- une injection à 3 μL d'une solution stock d'ARNr 16S23 à 810 μM , afin d'ajouter 50.3 μM d'ARN dans la gouttelette.
- une injection à 3.2 μL d'une solution stock d'ARNr 16S23 à 810 μM , afin d'ajouter 50 μM d'ARN dans la gouttelette.

Ces ajouts aboutissent à des concentrations finales en ARNr 16S23 dans la goutte de 10, 20, 30, 50, 70, 100, 150 et 200 μM respectivement, comme illustré sur les voltammogrammes de la figure V.24 - A.

Chaque injection est réalisée à l'aide d'une pipette automatique et de cônes de pipette RNase-free. La solution est injectée lors de l'arrêt de la rotation (sans soulever l'embout rotatif) et l'homogénéisation est assurée par la mise en rotation de la gouttelette. Après chaque injection, les voltammogrammes sont enregistrés

jusqu'à stabilisation complète des courants de plateau. Pour procéder à l'injection suivante, on s'assure de la stabilité du voltammogramme après plusieurs cycles.

Chaque valeur de courant de plateau, est ensuite extraite et ensuite corrigée afin de prendre en compte une diminution de courant liée à la dilution. Pour cela, les valeurs de courant sont multipliées par le facteur correctif D_{factor} suivant:

$$D_{\text{factor}} = V_0/V_{\text{(après injection)}}$$

Les valeurs de courant de plateau sont ensuite normalisées par rapport au courant de plateau initialement enregistré en absence d'ARN, puis reportés en fonction de la concentration corrigée d'ARN. A l'aide du logiciel Mathematica (Wolfram), une régression non linéaire des points expérimentaux selon un modèle à un site de fixation est réalisée, aboutissant ainsi à une valeur de K_D .

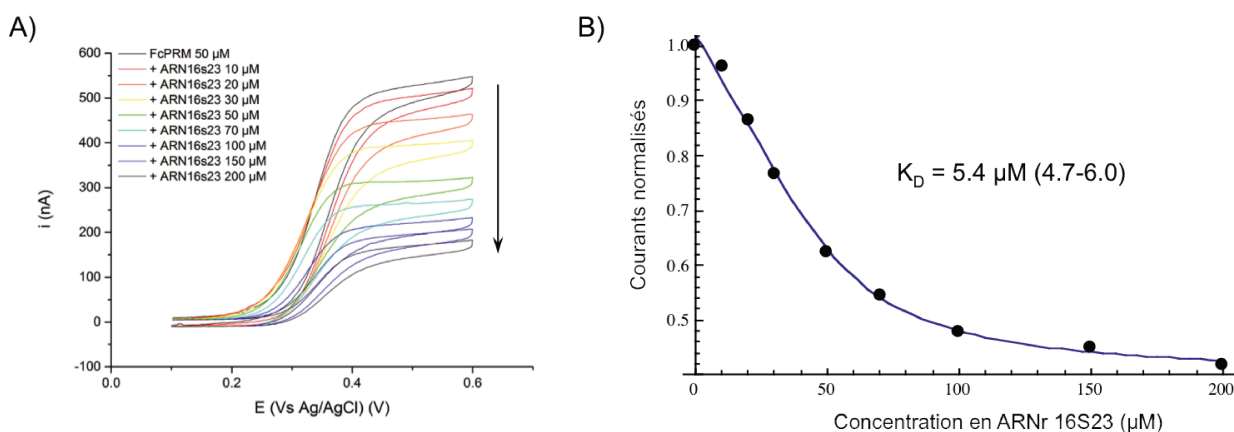


FIGURE V.24 – A) Dosage de la sonde FcPRM (50 µM) par l'ARNr 16S23 suivi en CV en conditions hydrodynamiques. B) Valeur de KD^{FcPRM} obtenue pour cette expérience, indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.

Annexes

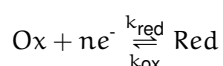
Table des molécules synthétisées

Numéro	Molécule	Numéro	Molécule	Numéro	Molécule
1		11		21	
2		12		22	
3		13		23	
4		14			
5		15			
6		16			
7		17			
8		18			
9		19			
10		20			

FIGURE V.25 – Table des molécules synthétisées.

Electrochimie

L'électrochimie est une discipline permettant d'étudier les réactions chimiques se déroulant aux interfaces entre un conducteur électronique et un conducteur ionique. Le conducteur électronique (un métal conducteur, un semi-conducteur ou encore un polymère conducteur) assure le transport de charge (déplacement d'électrons) sous l'application d'un courant électrique. Le conducteur ionique quant à lui, peut être constitué de sels fondus ou d'une solution d'électrolytes supports, et permet le transport du courant en solution par le mouvement des ions. En réponse à ces transferts de charges, les espèces électroactives présentes en solution subissent un changement d'état d'oxydation. Ces phénomènes d'oxydation ou de réduction, définis par l'équation suivante, peuvent entraîner une modification de leur nature physico-chimique.



avec Ox et Red les formes oxydée et réduite de l'espèce électroactive, e⁻ un électron, n le nombre d'électrons échangés lors de la réaction et enfin k_{red} et k_{ox} les constantes cinétiques de transfert électronique pour la réduction et l'oxydation du couple oxydant/réducteur.

La relation de Nernst permet de définir le potentiel d'une électrode E_{eq} en équilibre thermodynamique avec une solution électrolytique:

$$E_{\text{eq}} = E^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Ox}]_{\text{sol}}}{[\text{Red}]_{\text{sol}}}$$

avec E° le potentiel standard du couple Ox/Red, R la constante des gaz parfaits (8.314 J.mol⁻¹.K⁻¹), T la température (en K), F la constante de Faraday (96485 C.mol⁻¹) et $[\text{Ox}]_{\text{sol}}$ et $[\text{Red}]_{\text{sol}}$ les concentrations en solution de l'oxydant et du réducteur. Le potentiel d'un couple redox correspond à la mesure de la différence de potentiel entre deux électrodes plongées dans le même électrolyte (ou dans deux électrolytes reliés par un pont salin). Ainsi, le potentiel de l'électrode où a lieu la réaction (électrode de travail: WE) se détermine par rapport à une seconde électrode (électrode de référence: Ref) dont le potentiel est stable. Sa valeur a été mesurée au préalable par rapport à l'électrode normale à hydrogène (ENH) dont le potentiel est fixé à zéro par convention.

Une réaction d'oxydo-réduction peut se décomposer en une série d'étapes élémentaires consécutives dont la plus lente déterminera la vitesse globale de la réaction. Pour une espèce en solution, un modèle de réaction simple implique seulement trois étapes: le transport de matière de l'espèce électroactive de la solution vers l'électrode, suivi du transfert d'électrons (sans adsorption des espèces à la surface de l'électrode) et enfin le transport de matière du produit de la réaction vers la solution (figure V.26).

Le signal enregistré au cours d'une expérience électrochimique correspond généralement à une mesure de courant en fonction d'une variation de potentiel. Ceci est notamment le cas pour la voltammétrie cyclique, dont les détails sont abordés dans le paragraphe I - 2) du chapitre III. D'après la loi de Faraday, la quantité de molécules oxydées ou réduites à une électrode est proportionnelle au courant électrique mesuré à chaque instant et au temps de la mesure (et donc à la charge):

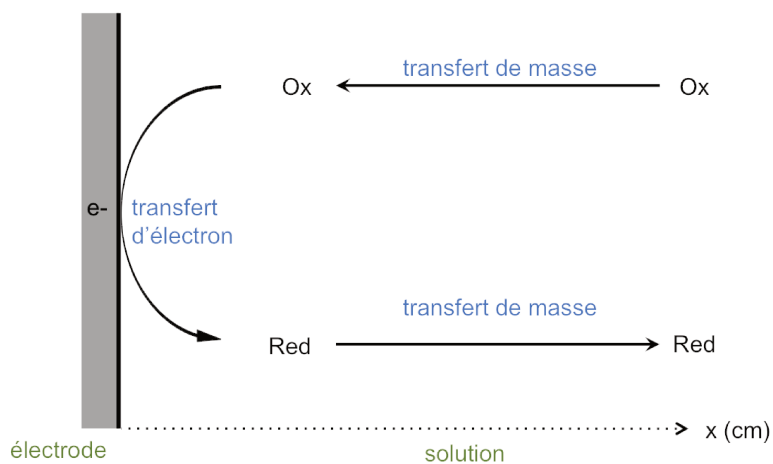


FIGURE V.26 – Processus clé d'une réaction chimique: le transfert de masse et le transfert de charge.

$$N = \frac{Q}{n \times F}$$

où N est la quantité de matière (en mol), Q la quantité d'électricité, F la constante de Faraday et n le nombre d'électrons impliqués dans la réaction.

Etant donné qu'une réaction électrochimique se déroule au niveau d'une interface électrode-électrolyte, la vitesse de réaction est exprimée en fonction de la surface de l'électrode de travail. Ainsi, la vitesse globale de la réaction v_{globale} peut être définie par:

$$v_{\text{globale}} = \frac{dN}{dt} = \frac{I}{nFA} = \frac{J}{nF}$$

où I correspond à la quantité d'électricité par unité de temps t , A correspond à l'aire de l'électrode de travail et J à la densité de courant.

Différents facteurs peuvent toutefois influencer la vitesse de réaction électrochimique et ainsi modifier l'intensité de courant enregistrée, tels que:

- le transfert de charge, qui correspond à l'efficacité avec laquelle les électrons s'échangent entre l'électrode et l'espèce électroactive. Cette réaction est décrite par la loi de Butler-Volmer et implique que le courant évolue de façon exponentielle en fonction de la surtension appliquée à l'électrode de travail. Il dépend de la nature de l'électrode de travail.
- le transfert de masse: c'est à dire le transport des espèces électroactives vers l'interface électrode-électrolyte selon le type de transport impliqué. Le transfert de masse est décrit par les lois de Fick qui stipulent que le courant est proportionnel à la concentration en solution de l'espèce électroactive si la couche de diffusion δ est d'épaisseur constante (régime de diffusion stationnaire). Cependant, le courant décroît en $t^{-1/2}$ dans le cas d'un régime de diffusion naturelle car l'épaisseur de la couche de diffusion est variable.
- les réactions chimiques pouvant intervenir avant et/ou après la réaction électrochimique (complexation, échange de proton, ...).

— d'autres phénomènes tels que l'adsorption du réactif sur l'électrode ou la désorption du produit de réaction.

Le transport de la matière est un phénomène de première importance lorsque que l'on considère une expérience d'électrochimie. Comme précédemment mentionné, les espèces électroactives en solution doivent d'abord être transportées en direction de la surface de l'électrode avant de pouvoir subir une réaction de transfert d'électron. Le transfert de masse est régi par trois types de transport:

1. la diffusion: c'est le déplacement des espèces en solution sous l'effet d'un gradient de concentration.
2. la migration: qui englobe les mouvements des espèces sous l'effet d'un gradient de potentiel électrique (entre l'électrode de travail et la contre-électrode).
3. la convection: qui correspond au déplacement des espèces en réponse un gradient de vitesse de fluide. Celui-ci peut être causé par une convection forcée (forces mécaniques) ou par convection naturelle (mouvement Brownien).

Généralement, les expériences électrochimiques sont conduites en présence d'une solution contenant d'un large excès d'électrolyte support. Cette grande proportion en sel spectateur permet de minimiser la contribution des effets de migration. De plus, en raison des forces de frottement, la convection est considérée comme étant quasi-nulle à proximité de l'électrode. Ces précautions expérimentales permettent de négliger les phénomènes de transport liées à la convection et la migration. Ainsi, la concentration C_i de l'espèce électroactive dépend uniquement des phénomènes de diffusion selon un axe x normal à la surface d'une électrode plane. Dans le cas où la solution d'électrolyte est sous agitation (diffusion stationnaire), le flux de matière J_i de l'espèce i est défini par la première loi de Fick:

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

J_i (en $\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) correspond au flux de matière de l'espèce i et D_i (en $\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) est son coefficient de diffusion.

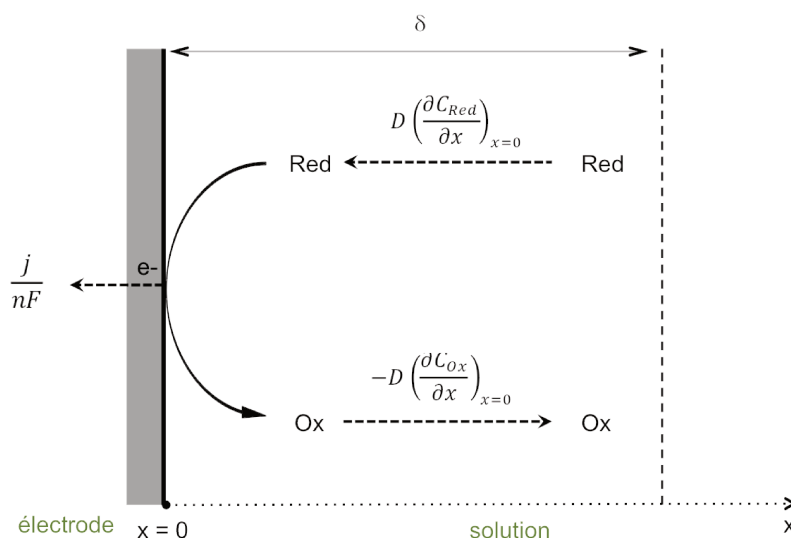


FIGURE V.27 – Schéma de l'égalité des flux à la surface de l'électrode.

En absence de convection forcée, l'application d'une surtension suffisante à l'électrode permettant de déclencher le processus redox aboutit à une modification de la proportion $[\text{Ox}]/[\text{Red}]$ au voisinage de l'électrode.

Un gradient de concentration s'établit alors, provoquant un phénomène de diffusion naturelle de la matière. Ce gradient est amené à diminuer au cours du temps au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de l'électrode. La distance à la surface de l'électrode où s'établit J est appelée couche de diffusion δ (figure V.27). Les densités de courant mesurées dépendent donc du temps nécessaire à une espèce électroactive pour traverser cette couche de diffusion. Dans ce cas, le flux de matière dépend du paramètre de temps et c'est la seconde loi de Fick qui permet de déterminer la variation de la concentration de l'espèce mesurée dans l'espace et dans le temps:

$$\frac{\partial C_i(x, t)}{\partial t} = \frac{\partial^2 C_i(x, t)}{\partial x^2}$$

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

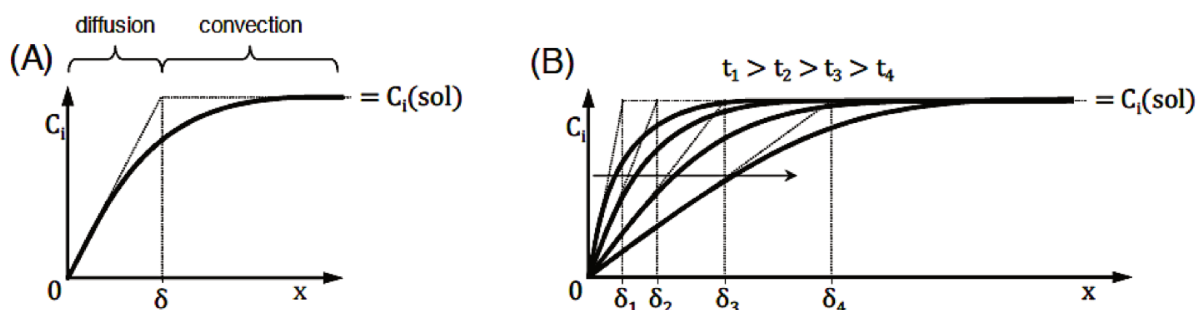


FIGURE V.28 – Profils de concentration en fonction de x . A) En régime de diffusion stationnaire. B) En régime de diffusion naturelle.

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

$$i_a(t) = \frac{nFD_{\text{Red}}C^{\circ}_{\text{Red}}}{\delta}$$

Pour un régime de diffusion naturelle, $\delta = \text{constante}$. Ainsi, il est possible d'établir l'expression analytique du courant qui dépendra de la forme du créneau de potentiel imposé. Pour un potentiel constante, l'équation précédente devient:

$$i_a(t) = \frac{nFD_{\text{Red}}C^{\circ}_{\text{Red}}}{\sqrt{\pi D_{\text{Red}} t}}$$

Dans le cas de diffusion convective (électrode tournante), le régime hydrodynamique permet de renouveler les espèces à l'électrode beaucoup plus efficacement que la diffusion naturelle. De ce fait, le gradient de concentration J est constant car δ ne s'étend pas. La couche de diffusion est contrainte par le régime convectif. Il s'établit alors un état stationnaire caractérisé par une concentration stable à l'intérieur de la couche de diffusion d'épaisseur δ . De ce fait, le courant n'évolue plus au cours du temps.

Bibliographie

- [1] Esteller, M. *Nature Reviews Genetics* **2011**, *12*, 861–874.
- [2] Shortridge, M. D.; Varani, G. *Current Opinion in Structural Biology* **2015**, *30*, 79–88.
- [3] Guan, L.; Disney, M. D. *ACS Chemical Biology* **2012**, *7*, 73–86.
- [4] Martin Egli, W. S. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer-Verlag New York, 2013.
- [5] Saenger, W. *Principles of Nucleic Acid Structure*; Springer New York, 1984.
- [6] Mandal, M.; Breaker, R. R. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2004**, *5*, 451–463.
- [7] Carell, T.; Brandmayr, C.; Hienzsch, A.; Müller, M.; Pearson, D.; Reiter, V.; Thoma, I.; Thumbs, P.; Wagner, M. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 7110–7131.
- [8] Davis, F. F.; Allen, F. W. *The Journal of Biological Chemistry* **1957**, *227*, 907–915.
- [9] Leontis, N. B.; Stombaugh, J.; Westhof, E. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30*, 3497–3531.
- [10] Bernat, V.; Disney, M. D. *Neuron* **2015**, *87*, 28–46.
- [11] Tinoco, I.; Bustamante, C. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *293*, 271–281.
- [12] Marquet, R.; Isel, C.; Ehresmann, C.; Ehresmann, B. *Biochimie* **1995**, *77*, 113–124.
- [13] Moser, J.; Lorenz, S.; Hubschwerlen, C.; Rompf, A.; Jahn, D. *The Journal of Biological Chemistry* **1999**, *274*, 30679–30685.
- [14] Schön, A.; Krupp, G.; Gough, S.; Berry-Lowe, S.; Kannangara, C. G.; Söll, D. *Nature* **1986**, *322*, 281–284.
- [15] Alexander, R. P.; Fang, G.; Rozowsky, J.; Snyder, M.; Gerstein, M. B. *Nature Reviews. Genetics* **2010**, *11*, 559–571.
- [16] Gallego, J.; Varani, G. *Accounts of Chemical Research* **2001**, *34*, 836–843.
- [17] Thomas, J. R.; Hergenrother, P. J. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 1171–1224.
- [18] Winkler, W. C.; Breaker, R. R. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1024–1032.
- [19] Winkler, W. C.; Breaker, R. R. *Annual Review of Microbiology* **2005**, *59*, 487–517.

- [20] Serganov, A.; Nudler, E. *Cell* **2013**, *152*, 17–24.
- [21] Ramesh, A.; Winkler, W. C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2014**, *1839*, 989–994.
- [22] Chabanon, H.; Mickleburgh, I.; Hesketh, J. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics* **2004**, *3*, 240–256.
- [23] Soukup, J. K.; Soukup, G. A. *Current Opinion in Structural Biology* **2004**, *14*, 344–349.
- [24] Ramakrishnan, V. *Cell* **2002**, *108*, 557–572.
- [25] Jarvest, R. L. et al. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 1959–1962.
- [26] Roberts, W. S. L.; Petit, J.-F.; Strominger, J. L. *Journal of Biological Chemistry* **1968**, *243*, 768–772.
- [27] Tisné, C. *Current HIV Research* **2005**, *3*, 147–156.
- [28] Wimberly, B. T.; Brodersen, D. E.; Clemons, J., W M; Morgan-Warren, R. J.; Carter, A. P.; Vornrhein, C.; Hartsch, T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 327–339.
- [29] Ban, N.; Nissen, P.; Hansen, J.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. *Science* **2000**, *289*, 905–920.
- [30] Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. *Cell* **1983**, *35*, 849–857.
- [31] Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. *Cell* **1982**, *31*, 147–157.
- [32] Mendell, J. T. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 1179–1184.
- [33] Croce, C. M. *Nature Reviews. Genetics* **2009**, *10*, 704–714.
- [34] Castel, S. E.; Martienssen, R. A. *Nature Reviews. Genetics* **2013**, *14*, 100–112.
- [35] Quinn, J. J.; Chang, H. Y. *Nature Reviews. Genetics* **2015**, *17*, 47–62.
- [36] Sharp, P. A. *Cell* **2009**, *136*, 577–580.
- [37] Cooper, T. A.; Wan, L.; Dreyfuss, G. *Cell* **2009**, *136*, 777–793.
- [38] Poehlsgaard, J.; Douthwaite, S. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, *3*, 870–881.
- [39] Wilson, D. N. *Nature Reviews Microbiology* **2014**, *12*, 35–48.
- [40] Zaman, G. J.; Michiels, P. J.; van Boeckel, C. A. *Drug Discovery Today* **2003**, *8*, 297–306.
- [41] Hermann, T. *Biochimie* **2002**, *84*, 869–875.
- [42] Kulik, M.; Goral, A. M.; Jasiński, M.; Dominiak, P. M.; Trylska, J. *Biophysical Journal* **2015**, *108*, 655–665.
- [43] Magnet, S.; Blanchard, J. S. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 477–498.
- [44] Leggett, J. E. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, eighth edition ed.; Saunders, Ed.; Elsevier LTD, Oxford, 2015; pp 310–321.

- [45] Avent, M. L.; Rogers, B. A.; Cheng, A. C.; Paterson, D. L. *Internal Medicine Journal* **2011**, *41*, 441–449.
- [46] Kaul, M.; Pilch, D. S. *Biochemistry* **2002**, *41*, 7695–7706.
- [47] Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S. *Journal of Molecular Biology* **2005**, *346*, 119–134.
- [48] Hendrix, M.; Priestley, E. S.; Joyce, G. F.; Wong, C. H. *Journal of The American Chemical Society* **1997**, *119*, 3641–3648.
- [49] Kondo, J.; Hainrichson, M.; Nudelman, I.; Shallom-Shezifi, D.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S.; Westhof, E.; Baasov, T. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1700–1709.
- [50] Vicens, Q.; Westhof, E. *Structure* **2001**, *9*, 647–658.
- [51] Vicens, Q.; Westhof, E. *Biopolymers* **2003**, *70*, 42–57.
- [52] Recht, M. I.; Fourmy, D.; Blanchard, S. C.; Dahlquist, K. D.; Puglisi, J. D. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *262*, 421–436.
- [53] Panecka, J.; Šponer, J.; Trylska, J. *Biochimie* **2015**, *112*, 96–110.
- [54] Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Puglisi, J. D. *Science* **1999**, *285*, 1722–1725.
- [55] Ogle, J. M. *Science* **2001**, *292*, 897–902.
- [56] Ogle, J. M.; Murphy, F. V., IV; Tarry, M. J.; Ramakrishnan, V. *Cell* **2002**, *111*, 721–732.
- [57] Vicens, Q.; Westhof, E. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1018–1023.
- [58] Fourmy, D.; Recht, M. I.; Blanchard, S. C.; Puglisi, J. D. *Science* **1996**, *274*, 1367–1371.
- [59] Fourmy, D.; Yoshizawa, S.; Puglisi, J. D. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *277*, 333–345.
- [60] Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Pilch, D. S. *Journal of The American Chemical Society* **2004**, *126*, 3447–3453.
- [61] François, B.; Russell, R. J. M.; Murray, J. B.; Aboul-ela, F.; Masquida, B.; Vicens, Q.; Westhof, E. *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, 5677–5690.
- [62] Lynch, S. R.; Puglisi, J. D. *Journal of Molecular Biology* **2001**, *306*, 1037–1058.
- [63] Yoshizawa, S.; Fourmy, D.; Eason, R. G.; Puglisi, J. D. *Biochemistry* **2002**, *41*, 6263–6270.
- [64] Carter, A. P.; Clemons, W. M.; Brodersen, D. E.; Morgan-Warren, R. J.; Wimberly, B. T.; Ramakrishnan, V. *Nature* **2000**, *407*, 340–348.
- [65] Zhang, J.; Tamilarasu, N.; Hwang, S.; Garber, M. E.; Huq, I.; Jones, K. A.; Rana, T. M. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, 34314–34319.
- [66] Dinesh, C. U.; Rana, T. M. *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complex*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; pp 58–87.
- [67] Blount, K. F.; Tor, Y. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1612–1621.

- [68] Luedtke, N. W.; Tor, Y. *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004; pp 18–40.
- [69] Parsons, J.; Castaldi, M. P.; Dutta, S.; Dibrov, S. M.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *Nature Chemical Biology* **2009**, *5*, 823–825.
- [70] Carnevali, M.; Parsons, J.; Wyles, D. L.; Hermann, T. *ChemBiochem: A European Journal of Chemical Biology* **2010**, *11*, 1364–1367.
- [71] Edmond De Hoffmann, V. S. *Mass Spectrometry Principles and Applications*; John Wiley and Sons Ltd, 2007.
- [72] Schalley, C., Ed. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*; Wiley-Blackwell, 2006.
- [73] Ganem, B.; Li, Y. T.; Henion, J. D. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 6294–6296.
- [74] Cole, R. B. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, *35*, 763–772.
- [75] Cech, N. B.; Enke, C. G. *Mass Spectrometry Reviews* **2001**, *20*, 362–387.
- [76] Sannes-Lowery, K. A.; Griffey, R. H.; Hofstadler, S. A. *Analytical Biochemistry* **2000**, *280*, 264–271.
- [77] Griffey, R. H.; Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A.; Ecker, D. J.; Crooke, S. T. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **1999**, *96*, 10129–10133.
- [78] Hofstadler, S. A.; Sannes-Lowery, K. A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 585–595.
- [79] Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Darnell, J.; Masson, P.; Sanlaville, C. *Biologie moléculaire de la cellule*; Biologie cellulaire et moléculaire; De Boeck Supérieur, 2005.
- [80] Sannes-Lowery, K. A.; Mei, H.-Y.; Loo, J. A. *International Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *193*, 115–122.
- [81] Hofstadler, S. A.; Griffey, R. H. *Chemical Reviews* **2001**, *101*, 377–390.
- [82] Rosu, F.; Pauw, E. D.; Gabelica, V. *Biochimie* **2008**, *90*, 1074–1087.
- [83] Bhunia, A. K. *Advances in Food and Nutrition Research* **2008**, *54*, 1–44.
- [84] Homola, J. *Chemical Reviews* **2008**, *108*, 462–493.
- [85] Davis, T. M.; Wilson, W. D. *Drug-Nucleic Acid Interactions*; Methods in Enzymology; Academic Press, 2001; Vol. 340; pp 22–51.
- [86] Wong, C.-H.; Liang, F.-S. *Recognition of Carbohydrates in Biological Systems, Part A: General Procedures*; Methods in Enzymology; Academic Press, 2003; Vol. 362; pp 340–353.
- [87] Wong, C. H.; Hendrix, M.; Priestley, E. S.; Greenberg, W. A. *Chemistry & Biology* **1998**, *5*, 397–406.
- [88] Sucheck, S. J.; Wong, A. L.; Koeller, K. M.; Boehr, D. D.; ann Draker, K.; Sears, P.; Wright, G. D.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 5230–5231.
- [89] Davis, T. M.; Wilson, W. *Analytical Biochemistry* **2000**, *284*, 348–353.

- [90] Nguyen, B.; Tanious, F. A.; Wilson, W. D. *Methods* **2007**, *42*, 150–161.
- [91] Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*; De Boeck Supérieur, 2004.
- [92] Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy - Third Edition*; Springer-Verlag New York Inc., 2006.
- [93] Zhu, Z.; Ravelet, C.; Perrier, S.; Guieu, V.; Fiore, E.; Peyrin, E. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 7203–7211.
- [94] Goux, E.; Lespinasse, Q.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fiore, E.; Peyrin, E. *Methods* **2016**, *97*, 69–74.
- [95] Shandrick, S.; Zhao, Q.; Han, Q.; Ayida, B. K.; Takahashi, M.; Winters, G. C.; Simonsen, K. B.; Vourloumis, D.; Hermann, T. *Angewandte Chemie International Edition* **2004**, *43*, 3177–3182.
- [96] Hamasaki, K.; Rando, R. R. *Analytical Biochemistry* **1998**, *261*, 183–190.
- [97] Ryu, D. H.; Rando, R. R. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9*, 2601–2608.
- [98] Wang, Y.; Hamasaki, K.; Rando, R. R. *Biochemistry* **1997**, *36*, 768–779.
- [99] Zhou, J.; Wang, G.; Zhang, L.-H.; Ye, X.-S. *Medicinal Research Reviews* **2007**, *27*, 279–316.
- [100] Pope, A. J.; Haupts, U. M.; Moore, K. J. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 350–362.
- [101] Foussard, J.-N.; Julien, E.; Mathé, S.; Debellefontaine, H. *Les bases de la thermodynamique-3éd.: Cours et exercices corrigés*; Dunod, 2015.
- [102] Ghai, R.; Falconer, R. J.; Collins, B. M. *Journal of Molecular Recognition* **2012**, *25*, 32–52.
- [103] Burnouf, D.; Ennifar, E.; Guedich, S.; Puffer, B.; Hoffmann, G.; Bec, G.; Disdier, F.; Baltzinger, M.; Dumas, P. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 559–565.
- [104] Day, Y. S.; Baird, C. L.; Rich, R. L.; Myszka, D. G. *Protein Science* **2002**, *11*, 1017–1025.
- [105] Kaul, M.; Barbieri, C. M.; Kerrigan, J. E.; Pilch, D. S. *Journal of Molecular Biology* **2003**, *326*, 1373–1387.
- [106] Pellecchia, M.; Bertini, I.; Cowburn, D.; Dalvit, C.; Giralt, E.; Jahnke, W.; James, T. L.; Homans, S. W.; Kessler, H.; Luchinat, C.; Meyer, B.; Oschkinat, H.; Peng, J.; Schwalbe, H.; Siegal, G. *Nature Reviews. Drug Discovery* **2008**, *7*, 738–745.
- [107] Latham, M. P.; Brown, D. J.; McCallum, S. A.; Pardi, A. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1492–1505.
- [108] Flinders, J.; Dieckmann, T. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2006**, *48*, 137–159.
- [109] Moumné, R.; Catala, M.; Larue, V.; Micouin, L.; Tisné, C. *Biochimie* **2012**, *94*, 1607–1619.
- [110] Piotto, M.; Saudek, V.; Sklenár, V. *Journal of Biomolecular NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- [111] Fourmy, D.; Recht, M. I.; Puglisi, J. D. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *277*, 347–362.
- [112] Yoshizawa, S. *The EMBO Journal* **1998**, *17*, 6437–6448.

- [113] Lombès, T.; Mourné, R.; Larue, V.; Prost, E.; Catala, M.; Lecourt, T.; Dardel, F.; Micouin, L.; Tisné, C. *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 9530–9534.
- [114] Allain, F. H.; Varani, G. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267*, 338–351.
- [115] Bain, A. D. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **2003**, *43*, 63–103.
- [116] Micura, R.; Höbartner, C. *ChemBioChem* **2003**, *4*, 984–990.
- [117] Palmer, A. G.; Kroenke, C. D.; Loria, J. P. *Methods in Enzymology*; Elsevier BV, 2001; pp 204–238.
- [118] Pai, J.; Yoon, T.; Kim, N. D.; Lee, I.-S.; Yu, J.; Shin, I. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 19287–19296.
- [119] Abulwerdi, F. A.; Schneekloth, J. S. *Methods* **2016**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.04.022>.
- [120] Disney, M. D.; Seeberger, P. H. *Chemistry - A European Journal* **2004**, *10*, 3308–3314.
- [121] Bryan, M. C.; Wong, C.-H. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 3639–3642.
- [122] Rao, A. N.; Grainger, D. W. *Biomaterials Science* **2014**, *2*, 436–471.
- [123] Ferapontova, E. E.; Olsen, E. M.; Gothelf, K. V. *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 4256–4258.
- [124] Schoukroun-Barnes, L. R.; Wagan, S.; White, R. J. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 1131–1137.
- [125] Ferguson, B. S.; Hoggarth, D. A.; Maliniak, D.; Ploense, K.; White, R. J.; Woodward, N.; Hsieh, K.; Bonham, A. J.; Eisenstein, M.; Kippin, T. E.; Plaxco, K. W.; Soh, H. T. *Science Translational Medicine* **2013**, *5*, 213ra165–213ra165.
- [126] los Santos-Alvarez, N. D.; Lobo-Castanon, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tunon-Blanco, P. *Journal of the American Chemical Society* **2007**, *129*, 3808–3809.
- [127] Cao, Y.; Chen, D.; Chen, W.; Yu, J.; Chen, Z.; Li, G. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *812*, 45–49.
- [128] Jarczewska, M.; Gorski, L.; Malinowska, E. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 3861–3877.
- [129] Wang, H.; Tor, Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 1951–1956.
- [130] Kumar, S.; Kellish, P.; Robinson, W. E.; Wang, D.; Appella, D. H.; Arya, D. P. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2331–2347.
- [131] Usui, T.; Umezawa, S. *The Journal of Antibiotibiotics* **1987**, *40*, 1464–1467.
- [132] Greenberg, W. A.; Priestley, E. S.; Sears, P. S.; Alper, P. B.; Rosenbohm, C.; Hendrix, M.; Hung, S.-C.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 6527–6541.
- [133] Tok, J. B.-H.; Dunn, L. J.; Jean, R. C. D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11*, 1127–1131.
- [134] Kirk, S. R.; Luedtke, N. W.; Tor, Y. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 980–981.
- [135] Luedtke, N. W.; Liu, Q.; Tor, Y. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11391–11403.

- [136] Hamasaki, K.; Woo, M.-C.; Ueno, A. *Tetrahedron Letters* **2000**, *41*, 8327–8332.
- [137] Busscher, G. F.; Rutjes, F. P. J. T.; van Delft, F. L. *Chemical Reviews* **2005**, *105*, 775–792.
- [138] Liu, X.; Thomas, J. R.; Hergenrother, P. J. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 9196–9197.
- [139] Thomas, J. R.; Liu, X.; Hergenrother, P. J. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12434–12435.
- [140] Pasco, M.; Mouméné, R.; Lecourt, T.; Micouin, L. *The Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76*, 5137–5142.
- [141] Mouméné, R.; Pasco, M.; Prost, E.; Lecourt, T.; Micouin, L.; Tisné, C. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 13111–13113.
- [142] Zhou, Y.; Gregor, V. E.; Ayida, B. K.; Winters, G. C.; Sun, Z.; Murphy, D.; Haley, G.; Bailey, D.; Froelich, J. M.; Fish, S.; Webber, S. E.; Hermann, T.; Wall, D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 1206–1210.
- [143] Stepnicka, P. *Ferrocenes - Ligands, Materials and Biomolecules*; John Wiley & Sons, 2008.
- [144] Crabtree, R. H. *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals*; Wiley-Blackwell, 2005.
- [145] Seiwert, B.; Karst, U. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* **2007**, *390*, 181–200.
- [146] Tranchant, I.; Hervé, A.-C.; Carlisle, S.; Lowe, P.; Slevin, C. J.; Forssten, C.; Dilleen, J.; Williams, D. E.; Tabor, A. B.; Hailes, H. C. *Bioconjugate Chemistry* **2006**, *17*, 1256–1264.
- [147] Batsanov, A. S.; Héroult, D.; Howard, J. A. K.; Patrick, L. G. F.; Probert, M. R.; Whiting, A. *Organometallics* **2007**, *26*, 2414–2419.
- [148] Nogueira, I. R.; Carneiro, G.; Yoshida, M. I.; de Oliveira, R. B.; Ferreira, L. A. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **2011**, *37*, 1083–1089.
- [149] Yan, X.; Gao, F.; Yotphan, S.; Bakirtzian, P.; Auclair, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 2944–2951.
- [150] Sainlos, M.; Belmont, P.; Vigneron, J.-P.; Lehn, P.; Lehn, J.-M. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, *2003*, 2764–2774.
- [151] Mével, M.; Sainlos, M.; Chatin, B.; Oudrhiri, N.; Hauchecorne, M.; Lambert, O.; Vigneron, J.-P.; Lehn, P.; Pitard, B.; Lehn, J.-M. *Journal of Controlled Release* **2012**, *158*, 461–469.
- [152] Park, W. K. C.; Auer, M.; Jaksche, H.; Wong, C.-H. *Journal of the American Chemical Society* **1996**, *118*, 10150–10155.
- [153] Roestamadji, J.; Grapsas, I.; Mobashery, S. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11060–11069.
- [154] Luna, A. P.; Ceschi, M.-A.; Bonin, M.; Micouin, L.; Husson, H.-P.; Gougeon, S.; Estenne-Bouhtou, G.; Marabout, B.; Sevrin, M.; George, P. *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3522–3524.

- [155] Chung, F.; Tisné, C.; Lecourt, T.; Dardel, F.; Micouin, L. *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 4489–4491.
- [156] Chung, F.; Tisné, C.; Lecourt, T.; Seijo, B.; Dardel, F.; Micouin, L. *Chemistry (Weinheim An Der Bergstrasse, Germany)* **2009**, *15*, 7109–7116.
- [157] Lombès, T.; Bégis, G.; Maurice, F.; Turcaud, S.; Lecourt, T.; Dardel, F.; Micouin, L. *ChemBioChem: a European Journal of Chemical Biology* **2008**, *9*, 1368–1371.
- [158] Stout, D. M.; Takaya, T.; Meyers, A. I. *The Journal of Organic Chemistry* **1975**, *40*, 563–569.
- [159] Bian, S.; Scott, A. M.; Cao, Y.; Liang, Y.; Osuna, S.; Houk, K. N.; Braunschweig, A. B. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 9240–9243.
- [160] Wu, Y. X.; Kwon, Y. J. *Methods* **2016**, *106*, 21–28.
- [161] Toulmé, J.-J.; Rocha, S. D.; Dausse, E.; Azéma, L.; Lebars, I.; Moreau, S. *Médecine Nucléaire* **2007**, *31*, 478–484.
- [162] Duchardt-Ferner, E.; Weigand, J. E.; Ohlenschläger, O.; Schmidtke, S. R.; Suess, B.; Wöhnert, J. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 6216–6219.
- [163] Liu, J.; Morris, M. D.; Macazo, F. C.; Schoukroun-Barnes, L. R.; White, R. J. *Journal of the Electrochemical Society* **2014**, *161*, H301–H313.
- [164] Bernacchi, S.; Freisz, S.; Maechling, C.; Spiess, B.; Marquet, R.; Dumas, P.; Ennifar, E. *Nucleic Acids Research* **2007**, *35*, 7128–7139.
- [165] Lombès, T. Synthèse d'analogues d'aminoglycosides par voie chimique et ingénierie métabolique : Application à l'étude des ARN par RMN du fluor. Ph.D. thesis, 2012; Thèse de doctorat dirigée par Micouin, Laurent et Dardel, Frédéric Chimie Paris 5 2012.
- [166] Ennifar, E.; Aslam, M. W.; Strasser, P.; Hoffmann, G.; Dumas, P.; van Delft, F. L. *ACS Chemical Biology* **2013**, *8*, 2509–2517.
- [167] Ilgu, M.; Fulton, D. B.; Yennamalli, R. M.; Lamm, M. H.; Sen, T. Z.; Nilsen-Hamilton, M. *RNA* **2014**, *20*, 815–824.
- [168] Allen J. Bard, L. R. F. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*; John Wiley & Sons, Inc, 2000.
- [169] Savéant, J.-M. *Elements of molecular and biomolecular electrochemistry: an electrochemical approach to electron transfer chemistry*; John Wiley & Sons, 2006.
- [170] Limoges, B.; Degrand, C.; Brossier, P.; Blankespoor, R. L. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 1054–1060.
- [171] Tan, E. S. Q.; Wivanius, R.; Toh, C.-S. *Electroanalysis* **2009**, *21*, 749–754.
- [172] Challier, L.; Mavré, F.; Moreau, J.; Fave, C.; Schöllhorn, B.; Marchal, D.; Peyrin, E.; Noël, V.; Limoges, B. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 5415–5420.

- [173] Challier, L.; Miranda-Castro, R.; Marchal, D.; Noël, V.; Mavré, F.; Limoges, B. *Journal of the American Chemical Society* **2013**, *135*, 14215–14228.
- [174] De Rache, A.; Buess-Herman, C.; Doneux, T. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2015**, *745*, 44–55.
- [175] Dardel, F. *Bioinformatics* **1994**, *10*, 273–275.
- [176] Weigand, J. E.; Sanchez, M.; Gunnesch, E.-B.; Zeiher, S.; Schroeder, R.; Suess, B. *RNA* **2007**, *14*, 89–97.
- [177] Weigand, J. E.; Schmidtke, S. R.; Will, T. J.; Duchardt-Ferner, E.; Hammann, C.; Wohnert, J.; Suess, B. *Nucleic Acids Research* **2010**, *39*, 3363–3372.
- [178] Congreve, M.; Chessari, G.; Tisi, D.; Woodhead, A. J. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 3661–3680.
- [179] Wang, Z.-X. *FEBS Letters* **1995**, *360*, 111–114.
- [180] Tran, T.; Disney, M. D. *Biochemistry* **2010**, *49*, 1833–1842.
- [181] Kivlehan, F.; Mavre, F.; Talini, L.; Limoges, B.; Marchal, D. *The Analyst* **2011**, *136*, 3635–3642.
- [182] Gaillard, C.; Strauss, F. *Technical Tips Online* **1998**, *3*, 63–65.
- [183] Gao, F.; Yan, X.; Baettig, O. M.; Berghuis, A. M.; Auclair, K. *Angewandte Chemie International Edition* **2005**, *44*, 6859–6862.
- [184] Pasco, M. Synthèse asymétrique de diamines cyclopentaniques polyfonctionnelles : des outils pour l'étude d'interactions avec l'ARN. Ph.D. thesis, 2010; Thèse de doctorat dirigée par Micouin, Laurent Chimie Paris Descartes 2010.
- [185] Challier, L. Méthodologies électrochimiques pour la caractérisation thermodynamique et cinétique de reconnaissance biomoléculaire : application au système aptamère/molécule chirale. Ph.D. thesis, 2013; Thèse de doctorat dirigée par Noel, Vincent Electrochimie Paris 7 2013.

Table des figures

I.1	Structure primaire de l'ARN	12
I.2	Hydrolyse de l'ARN en conditions alcalines	13
I.3	Exemples de structures secondaires de l'ARN représentés A) schématiquement B) en trois dimensions. Figure tirée de. ¹⁰	13
I.4	Schéma des étapes de transcription et de traduction. Source: National Human Genome Research Institute, "Talking Glossary of Genetic Terms". www.genome.gov/glossary/	15
I.5	Les trois régions de l'ARNm. Tiré de ¹⁷	16
I.6	Un exemple de riboswitch. Tiré de ¹⁷	16
I.7	L'ARNt dans l'étape de traduction. Source: National Human Genome Research Institute, "Talking Glossary of Genetic Terms". www.genome.gov/glossary/	17
I.8	Structure du ribosome procaryote. ²⁴	18
I.9	Classification générale des aminoglycosides.	22
I.10	Exemples d'aminoglycosides.	22
I.11	Structure de la néomycine et valeurs de pK _a de ses groupements amines ⁴⁶	23
I.12	Contribution des molécules d'eau dans la formation de liaisons hydrogène entre le site A de l'ARNr et la paromomycine. ⁵⁰	24
I.13	a) Structure cristalline de la petite sous-unité 30S du ribosome de <i>E.coli</i> . L'ARN 16S et les protéines ribosomales sont représentées en rouge et en gris respectivement. ⁵¹ b) ARNr 16S de <i>E.coli</i> . ⁵²	25
I.14	Mode d'action des aminoglycosides. Figure extraite de. ³	25
I.15	A) Modèle de l'ARNr 16S27 de <i>E.coli</i> utilisé par Fourmy <i>et al.</i> ⁵⁹ Les nucléotides impliqués dans la formation du complexe avec les aminoglycosides sont entourés en bleu. B) Représentation schématique de l'ARNr 16S27 seul. C) ARNr 16S27 en présence de la paromomycine (PRM). Ces deux schémas illustrent bien le mouvement de bascule des deux adénines A1492 et A1493. ⁶⁰ D) Structure aux rayons X de l'ARNr 16S27 seul. E) Structure aux rayons X du complexe ARNr 16S27-PRM. La PRM est représentée en couleur bronze. ⁵⁹	26
I.16	Interaction de la PRM avec les résidus spécifiques de la sous-unité 30S du ribosome. ⁶⁴ Les interactions impliquant les molécules d'eau environnantes n'ont pas été illustrées pour plus de clarté.	27
I.17	Les ARNm du VIH comme cibles des aminoglycosides. ⁴⁰	28

I.18	Interaction Tat-TAR. Tiré de. ¹⁷	29
I.19	Schéma du fonctionnement d'un spectromètre de masse. Tiré de <i>Analytical Methods in Supra-molecular Chemistry</i> . ⁷²	30
I.20	Schéma du principe d'ionisation par nébulisation. Figure extraite de Cech <i>et al.</i> ⁷⁵	31
I.21	A) Spectre ESI-MS obtenu lors du dosage de l'ARNr 16S par la PRM. B) Détermination du K_D par régression linéaire des données obtenues lors de la titration de l'ARN 16S par la PRM. Figure extraite de. ⁷⁶	32
I.22	A) Spectre ESI-MS obtenu lors du dosage des ARN 16S et 18S en présence de six aminoglycosides. AP: apramycine, RM: ribostamycine, TB: tobramycine, BK: kanamycine B, PM: paromomycine, LV: lividomycine. La région du spectre correspondant à m/z entre 1820 et 1950 a été agrandie. B) K_D (en μM) obtenus pour chacun des aminoglycosides. Figure extraite de. ⁷⁷	33
I.23	Principe de la SPR. ⁸³	35
I.24	Exemple de sensorgramme obtenu pour une reconnaissance antigène/anticorps. Source: www.bio-rad.com/fr-fr/applications-technologies/proteon-surface-plasmon-resonance-detection-system#1	36
I.25	Diagramme de Jablonski illustrant la désexcitation moléculaire sous forme de fluorescence ou de phosphorescence. Tiré de ⁹²	38
I.26	Schéma illustrant le principe de la polarisation de fluorescence. Adapté de <i>Technical Resource Guide Fluorescence Polarization Fourth Edition</i> , disponible sur https://tools.thermofisher.com/downloads/FP1.pdf	39
I.27	La CRP, sonde fluorescente utilisée dans l'étude de Rando ⁹⁷ par polarisation de fluorescence.	39
I.28	Paromomycine fonctionnalisée avec différents dérivés du pyrène, utilisés par Hamasaki et Rando. ⁹⁶	40
I.29	ARN 16S27 modifié par une 2-AP en position 1492.	41
I.30	Structures de la séquence RRE, du peptide Rev et de son analogue fluorescent utilisés dans l'étude de Rando. ⁹⁸	42
I.31	a) Schéma d'un microcalorimètre. b) Exemple de profil ITC. c) Données thermodynamiques obtenues à partir d'un profil ITC. Adapté de ¹⁰⁴	43
I.32	Déplacements chimiques en ^1H RMN des bases de l'ARN et des protons du ribose. ¹⁰⁸	45
I.33	a) Séquence de l'ARN 16S23. b) Principe des expériences de compétition réalisées par ^{19}F RMN. L'étoile verte symbolise la sonde fluorée tandis que l'hexagone rouge illustre la molécule compétitrice non marquée. ¹¹³	46
I.34	Influence des cinétiques d'échange dans l'interprétation de signaux par RMN. Adapté de. ¹¹⁷	47
I.35	Principe d'utilisation de microarray. Tiré de ¹¹⁸	48
I.36	Stratégies d'immobilisation utilisées pour le criblage d'ARN. Tiré de ¹¹⁹	48
I.37	ARN fluorescents utilisés dans l'étude de Disney par microarray. Adapté de ¹²⁰	49
I.38	Immobilisation d'aminoglycosides sous forme de microarray en présence d'ARN et analyse de leur réponse par fluorescence. a) Microarray d'aminoglycosides en présence d'ARN 16S. b) Intensité de fluorescence observée pour chaque aminoglycoside en présence d'ARN 16S ou 18S. Tiré de ¹²⁰	50
I.39	a) tobramycine. b) Analogue de la tobramycine utilisé pour cette étude, R = $\text{C}_{15}\text{H}_{18}$. c) ARN 16S27 marqué en 5' par une Fluorescéine. d) Dosage de la tobramycine par l'ARN 16S27-Fluorescéine. Adapté de ¹²¹	51

I.40 Biocapteur utilisant l'ARN pour détecter la théophylline en phase hétérogène, tiré de. ¹²³ <i>eT</i> : transfert d'électron.	52
I.41 Méthodologie de détection de la tobramycine en phase hétérogène, adapté de. ¹²⁴	53
I.42 Biocapteur à ARN permettant de détecter la néomycine, tiré de. ¹²⁶ Le cercle bleu représenté sur le schéma représente la néomycine.	54
II.1 Dégradation contrôlée d'aminoglycosides en milieu acide.	58
II.2 Représentation schématique de l'utilisation de dimères d'aminoglycosides, adaptée de. ¹³³	58
II.3 Dimères de la néamine avec divers bras espaceurs de type amide ou amine. ⁸⁸	59
II.4 Néamine protégée, utilisée pour la formation de dimères par l'équipe de Wong. ⁸⁸	60
II.5 Synthèse de la néo-acridine 1	61
II.6 Exemples de néomycines modifiées par un groupement acridine, synthétisées par l'équipe de Tor. ¹³⁴	62
II.7 Approche utilisée par Hamasaki <i>et al.</i> pour la synthèse de dérivés intercalants de la néamine	62
II.8 Analogues de la néamine, fonctionnalisés avec des groupements aromatiques, synthétisés par Hamasaki <i>et al.</i> ¹³⁶	63
II.9 Approche par chimie "click" pour la synthèse de dimères de DOS.	64
II.10 Deux dimères de DOS, spécifiques d'ARN tétra et octa-boucle. ¹³⁹	64
II.11 Analogues de la néamine synthétisés par l'équipe de Wong. ¹³²	65
II.12 Voie de synthèse empruntée par l'équipe de Wong pour la synthèse de divers analogues de la néamine fonctionnalisés en position 5. ¹³²	65
II.13 L'analogue fluoré de la DOS précédemment synthétisé au laboratoire, le DACPF (composé 6).	66
II.14 Stratégie de synthèse d'un analogue électroactif de la paromomycine.	67
II.15 Essai d'amination réductrice entre le sulfate de paromomycine et le carboxaldehyde de ferrocène (Fc-CHO).	68
II.16 Tentative de couplage peptidique entre le composé 7 et le sulfate de paromomycine	69
II.17 Synthèse de la sonde électroactive à partir de l'ester activé Fc-NHS (composé 8).	69
II.18 Essai en milieu tamponné au phosphate à pH 8 en présence de DMF	70
II.19 Utilisation d'une résine échangeuse de cation Amberlite IRA-400.	71
II.20 Stratégie employée par Yan <i>et al.</i> ¹⁴⁹ afin de fonctionnaliser les aminoglycosides.	72
II.21 Synthèse du ferrocène 11	72
II.22 Synthèse de la sonde électroactive FcPRM (composé 12)	73
II.23 Profils d'élution HPLC observés à 210 nm pour a) Le dérivé ferrocène 11 seul, après élution sur 20 minutes b) brut réactionnel de la réaction conduisant à la sonde électroactive, après élution sur 20 min.	74
II.24 Spectre de masse du brut réactionnel contenant la sonde FcPRM, obtenu par ESI-MS (ESI ⁺)	75
II.25 Synthèse de la néamine free-base.	76
II.26 Essai de synthèse de la néamine dans le dioxane	76
II.27 Synthèse de la sonde Fc-néamine 16	77
II.28 Voie de synthèse du dicarbamate 21	78
II.29 Synthèse de la sonde Fc-DACP 23	78

II.30 Structures d'ARN étudiées.	79
II.31 Principe de la méthode SELEX, adapté de. ¹⁶⁰	80
II.32 Observation de l'interaction entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 (0.38 mM dans un tampon 10 mM KPO ₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl) par RMN ¹ H à 288K . Sur cette figure sont superposés les spectres RMN ¹ H de l'ARNr 16S23 seul (reference 16S23), et de l'ARNr 16S23 en présence de quantités croissantes (en éq.) de sonde FcPRM.	81
II.33 a) Superposition du spectre TOCSY de l'ARNr 16S23 seul (1.5 mM) (en bleu) et en présence de la sonde FcPRM (en rouge). Ces spectres ont été enregistrés à 288 K dans un tampon KPO ₄ 100 % D ₂ O (pH 6.5) contenant 50 mM KCl, avec un temps de mélange de 45 ms. b) Structure de l'ARNr 16S23 mettant en évidence les nucléotides impliqués dans l'interaction avec la sonde FcPRM. En rouge: nucléotides identifiés par l'expérience TOCSY représentée en a). Flèches vertes: nucléotides identifiés par l'expérience RMN ¹ H précédemment réalisée. Entourés en bleu: nucléotides identifiés par l'équipe de Puglisi.	82
II.34 Spectres RMN ¹ H de l'aptamère à la néomycine (0.4 mM) dans un tampon 10 mM KPO ₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl à 288K. De bas en haut: aptamère à la néomycine seul, aptamère en présence de 1 eq. de néomycine, aptamère en présence de 1 eq. de la sonde FcPRM.	83
II.35 Expériences de titrage réalisées dans le tampon phosphate.	84
II.36 Expérience de titration de l'ARNr 16s23 par la sonde FcPRM dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM de NaCl et 0.1 mM EDTA.	85
II.37 Profils ITC ¹⁶⁶ enregistrés lors du dosage de l'ARNr 16S27 par la paromomycine dans un tampon 25 mM cacodylate de sodium pH 7.0, en présence de 2 mM MgCl ₂ et de a) 100 mM KCl b) 200 mM KCl c) Paramètres de liaison obtenus.	86
II.38 Profils de titration de l'ARNr 16S23 par la PRM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. a) à 20 °C, avec [PRM]=500 μM et [ARN]=20 μM. b) à 20 °C, avec [PRM]=1 mM et [ARN]=45 μM.	87
III.1 Cellule électrochimique à trois électrodes. Figure tirée de. ¹⁶⁸	90
III.2 Figure tirée de, ¹⁶⁸ illustrant le principe de la chronoampérométrie. a) Application d'un saut de potentiel à l'électrode. b) Courant suivi en fonction du temps.	91
III.3 Principe de la voltamétrie cyclique. a) Application d'une rampe de potentiel symétrique en fonction du temps. b) Exemple de voltamogramme obtenu pour la réduction d'une espèce redox Nernstienne monoélectronique.	92
III.4 Voltamogramme obtenu en régime de convection contrôlée pour la réduction d'une espèce Ox réversible.	93
III.5 a) Séquence de balayage de potentiel utilisée en SWV. b) Exemple de courbe courant-potentiel obtenu.	94
III.6 Principe de la méthode de détection en phase homogène selon l'approche développée par Cao <i>et al.</i> Le losange rose représente la protéine cible, l'ostéopontine. L'étoile bleue représente le bleu de méthylène. Tiré de. ¹²⁷	95
III.7 Principe général d'un dosage compétitif en phase homogène par électrochimie. Tiré de. ¹⁷²	96

III.8 Principe général de détection de la reconnaissance ARN/sonde FcPRM par voie électrochimie en phase homogène et détail de la structure de la sonde FcPRM.	97
III.9 (a) Electrodes sérigraphiées utilisées au laboratoire. (b) et (c) Représentations schématiques d'une cellule électrochimique. WE: Electrode de travail ($S = 0.0177 \text{ cm}^2$), CE: Contre-électrode, Ref: Electrode de référence Ag/AgCl.	98
III.10 Voltamogrammes de la sonde FcPRM mesurés à deux concentrations, dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl. a) $[\text{FcPRM}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$. b) $[\text{FcPRM}] = 5.6 \text{ } \mu\text{M}$	99
III.11 Courants représentés en fonction de la concentration en FcPRM, obtenus par CV sur électrodes sérigraphiées "nues" dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl.	100
III.12 Allure des voltamogrammes de la sonde FcPRM ($54 \text{ } \mu\text{M}$) dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl. a) sur électrode nue. b) avec BSA. c) avec PVP.	100
III.13 Courants représentés en fonction de la concentration en FcPRM, obtenus par CV sur électrodes sérigraphiées et pré-conditionnées à la BSA (réalisé en triplicata). Mesures réalisées dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, en présence de 50 mM KCl.	101
III.14 Exemple de chronoampérogramme utilisé pour déterminer la concentration d'une solution de FcPRM. Chronoampérogramme enregistré à un potentiel $E = + 0.5 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl contenant la sonde FcPRM à $50 \text{ } \mu\text{M}$	104
III.15 Suivi de la concentration d'une solution de FcPRM (tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl) au cours du temps.	104
III.16 Observation de la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM par CV dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. Le voltamogramme noir représente la sonde seule en solution ($[\text{FcPRM}] = 15 \text{ } \mu\text{M}$). Le voltamogramme rouge correspond à l'addition de 8.3 eq d'ARNr 16S23 à la solution de FcPRM.	106
III.17 Expérience de titration de la sonde FcPRM par l'ARNr 16S23, suivie par voltamétrie cyclique. a) Voltamogrammes d'une solution de sonde FcPRM ($15 \text{ } \mu\text{M}$ dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) en présence de concentrations croissantes en ARNr 16S23. b) Courbe de titrage obtenue à partir du report des valeurs de courants de pics anodiques en fonction de la concentration en ARNr 16S23. en rouge: courants bruts. en vert: courants corrigés de la dilution. c) Courbe de titrage obtenue à partir des valeurs de courants de pics anodiques corrigés et normalisés, représentés en fonction de la concentration en ARNr 16S23	108
III.18 Equilibres réactionnels se produisant en solution.	109
III.19 Courbes de dosage obtenues (pour une solution en FcPRM égale à $15 \text{ } \mu\text{M}$ dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) par régression non-linéaire des valeurs de pics de courants anodiques normalisés puis représentés en fonction de la concentration en ARN. a) Equilibre statique (équation 7). b) Equilibre dynamique (équation 9).	112

III.20 Expériences de dosage réalisées à différentes concentrations en sonde FcPRM. A) et B) Voltamogrammes résultant d'une expérience de titration à partir d'une concentration en FcPRM de 33 μM (tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) et courbe de titrage associée. Les points représentent les valeurs de courants de pics anodiques. La courbe en trait plein correspond à un ajustement non-linéaire de ces données. Le K_D^* associé est indiqué avec un intervalle de confiance de 95 % indiqué entre parenthèses. C) et D) Voltamogrammes résultant d'une expérience de titration à partir d'une concentration en FcPRM de 54 μM (tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) et courbe de titrage associée. Le K_D^* associé est indiqué avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.	113
III.21 Titration de FcPRM par l'ARNr 16S23 suivi par CV en utilisant une référence SCE.	114
III.22 Représentation schématique du dispositif permettant de travailler en régime hydrodynamique. ¹⁷³ EDT: Electrode à disque tournant.	115
III.23 Exemple de chronoampérogramme permettant de suivre l'évolution du courant en fonction du temps suite à l'addition successive de solution en sonde FcPRM (2 μM dans la goutte) puis d'ARNr (10 μM dans la goutte).	117
III.24 Variation du courant obtenue après injection de 2 μL d'une solution stock FcPRM à 40 μM , dans 38 μL de tampon KPO_4 . Le courant enregistré est représenté en pointillés et l'ajustement en trait plein.	118
III.25 Chronoampérogrammes illustrant la formation du complexe FcPRM/ARNr 16S23 dans un tampon 10 mM KPO_4 pH 6.5, 50 mM KCl. Les pointillés représentent les données expérimentales et le trait plein représente l'ajustement. a) En présence de FcPRM, 2 μM . b) En présence de FcPRM, 0.4 μM	118
III.26 A) Titration de la sonde FcPRM (50 μM dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA) par l'ARNr 16S23 suivi en CV en conditions hydrodynamiques. B) Valeur de K_D^* obtenue pour cette expérience, indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.	119
III.27 a) Gauche: voltamogrammes obtenus au cours de la réaction de titrage de la sonde FcPRM à 34 μM par l'ARNr 16S23 à 5°C dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA. Droite: courbe de titrage résultante et son ajustement non-linéaire permettant de déterminer le K_D . b) Gauche: voltamogrammes obtenus au cours de la réaction de titrage de la sonde FcPRM à 32 μM par l'ARNr 16S23 à 15°C dans le même tampon MES. Droite: courbe de titrage résultante et son ajustement non-linéaire permettant de déterminer le K_D	121
III.28 a) Courbes de titrages de la sonde FcPRM (environ 30 μM) par l'ARNr 16S23 dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, EDTA 0.1 mM suivis en CV à 5°C, 15°C et 25°C. b) Graphe représentant $\text{Ln}(K) = f(\frac{1}{T})$ à trois températures différentes.	122
III.29 a) Voltamogrammes obtenus au cours de la titration de la sonde FcPRM (9.5 μM) par l'aptamère à la néomycine dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, en conditions stationnaires. b) Courbe de titrage obtenue par régression non-linéaire des courants de pics anodiques. La valeur de K_D^* obtenue, est indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.	123

III.30a) Voltamogrammes obtenus au cours de la titration de la sonde FcPRM (11 μM) par l'aptamère à la néomycine dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, en conditions hydrodynamiques. b) Courbe de titrage obtenue par régression non-linéaire des courants de pics anodiques. La valeur de K_D^* obtenue, est indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.	123
III.31 Suivi de la formation du complexe entre la sonde FcPRM et l'aptamère à la néomycine par chronoampérométrie.	124
IV.1 Principe d'un dosage par compétition en électrochimie	126
IV.2 Evolutions attendues des voltamogrammes au cours d'expériences de compétition. a) Voltamogramme de la sonde FcPRM seule. b) Chute du courant en réponse à la formation du complexe ARNr 16S23/FcPRM. c) Augmentation du courant résultant de la libération de la sonde FcPRM en solution. Sur les graphes b et c , la courbe en pointillés correspond à celle du graphe a , ce qui permet de mieux visualiser la diminution ou l'augmentation du courant par rapport à la valeur initiale.	127
IV.3 Expérience de compétition entre la sonde FcPRM (29 μM) et la PRM pour l'ARNr 16S23 (20 μM) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltamogrammes obtenus suivant des additions de paromomycine sur le complexe FcPRM/ARNr 16S23. b) Courants anodiques normalisés et représentés en fonction de la concentration en PRM permettant de déterminer le K_D	128
IV.4 Expériences de compétition impliquant deux aminoglycosides non marqués: la néomycine et la néamine. Ces mesures ont été réalisées dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltamogrammes obtenus suite à l'addition de néomycine à une solution de tampon MES contenant 29 μM de FcPRM et 20 μM d'ARNr 16S23. b) Courbe de dosage compétitif associée à la figure a, obtenue après ajustement non-linéaire des courants de pics anodiques. c) Voltamogrammes obtenus suite à l'addition de néamine à une solution de tampon MES contenant 27 μM de FcPRM et 35 μM d'ARNr 16S23. d) Courbe de dosage compétitif obtenue après ajustement non-linéaire des courants de pics anodiques de la figure b.	130
IV.5 Classement par ordre d'affinité pour l'ARNr 16S23 pour les trois aminoglycosides testés. La plus affine étant à gauche.	131
IV.6 Expérience de compétition entre la sonde FcPRM (10 μM) et la néomycine pour l'aptamère à la néomycine (8 μM) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) Voltamogrammes enregistrés au cours du dosage compétitif. b) Courbe de dosage compétitif obtenue par régression non-linéaires des courants anodiques.	132

IV.7	Détection par chronoampérométrie de faibles concentrations en néomycine dans une gouttelette de 41.3 μL contenant 10 μM d'aptamère à la néomycine et 10 μM de sonde FcPRM dans un tampon 10 mM MES, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. La zone agrandie illustre la remontée de courant suite à l'injection de a) 0,45 μL de néomycine à partir d'une solution mère à 100 μM (soit 1.1 μM dans la goutte). b) 0.2 μL de néomycine à partir d'une solution mère à 100 μM (soit 0.5 μM dans la goutte). Les pics apparaissant aux alentours de 80 secondes sur les chronoampérogrammes proviennent de la perturbation de la gouttelette en rotation au moment où le cône de pipette est introduit pour additionner l'aptamère.	133
IV.8	Aminoglycosides utilisées lors d'expériences de compétition.	134
IV.9	Exemple de réaction de compétition entre la néomycine et la FcPRM (22 μM) vis-à-vis de l'ARNr 16S23 (22 μM) dans un tampon 10 MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. La remontée du courant résulte de trois injections successives en néomycine dans la gouttelette de mesure: 0.3 eq., 1.1 eq. et 1.8 eq.	135
IV.10	Gains de courant mesurés après l'addition de trois concentrations en ligands compétiteurs (0.3 eq, 1.1 eq. et 1.8 eq) à une gouttelette de tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA contenant 22 μM de FcPRM et 22 μM d'ARNr 16S23.	136
IV.11	Classement de six aminoglycosides par ordre d'affinité pour l'ARNr 16S. Obtenu par l'équipe Wong <i>via</i> SPR. ⁸⁷	137
IV.12	Dispositif utilisé pour les expériences de criblage. Tiré de. ¹⁸¹ a) Plaque de 48 micropuits au fond desquels se trouvent les électrodes sérigraphiées. b) Multipotentiostat utilisé pour les mesures. c) Le consommable se place à plat sur la plaque chauffante du prototype afin de réaliser simultanément 48 mesures.	138
IV.13	Tiré de. ¹⁸¹ a) Signal initial théorique de la sonde redox seule en solution, suivi par SWV. b) Diminution progressive du courant suite à la complexation de la sonde redox avec un ADN, suivi en SWV.	139
IV.14	Expérience de compétition pour six aminoglycosides en parallèle, suivie par SWV. a) Interface de contrôle permettant de suivre en temps réel l'évolution du courant dans chaque puits. b) Exemple d'expérience de compétition réalisée sur microplaque entre la paromomycine (24 μM) et la sonde FcPRM (17 μM) vis-à-vis de l'ARNr 16S23 (17 μM) dans un tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. L'ordre de lecture des voltamogrammes est légendée. I_0 , $I_{lié}$ représentent respectivement les intensités de courant de pic pour la sonde seule et pour le complexe FcPRM/ARNr 16S23. I représente l'intensité de courant suivant l'addition de 24 μM de paromomycine.	140
V.1	Synthèse du composé 7	146
V.2	Synthèse du composé 8	147
V.3	Synthèse du composé 9	148
V.4	Synthèse du composé 11	149
V.5	Synthèse du composé 12	150
V.6	Synthèse du composé 13	151
V.7	Synthèse du composé 14	152

V.8 Synthèse du composé 16	153
V.9 Composé 19	154
V.10 Composé 20	155
V.11 Synthèse du composé 5	156
V.12 Composé 21	157
V.13 Composé 22	158
V.14 Composé 23	159
V.15 Séquences d'ARN étudiées pour les études de complexation avec la sonde FcPRM	160
V.16 Observation de l'interaction entre la sonde FcPRM et l'ARNr 16S23 par RMN ¹ H, à 288K dans un tampon 10 mM KPO ₄ pH 6.5 en présence de 50 mM KCl . Bas: spectre RMN ¹ H de l'ARNr 16S23 (0.38 mM). Haut: spectre de l'ARNr 16S23 en présence de 1 eq. de la sonde FcPRM.	161
V.17 Aptamère à la néomycine (0.4 mM dans un tampon 10 mM KPO ₄ , pH 6.5 et 50 mM KCl), à 288 K. A) aptamère seul. B) aptamère en présence de néomycine. C) aptamère en présence de la sonde FcPRM.	161
V.18 Superposition des spectres TOCSY de l'ARNr 16S23 (1.5 mM, tampon KPO ₄ 100 % D ₂ O pH 6.5 en présence de 50 mM KCl, temps de mélange 45 ms), 288 K. En bleu: seul. En rouge: en présence de 2 éq de FcPRM.	162
V.19 Electrodes sérigraphiées utilisées pour les mesures électrochimiques.	163
V.20 Exemple d'expérience de titration réalisée par CV. a) Voltammogrammes. b) Régression non linéaire des points expérimentaux et valeur de K _D associée.	165
V.21 Exemple d'expérience de titration réalisée par CV. a) Voltammogrammes. b) Régression non linéaire des points expérimentaux et valeur de K _D associée.	166
V.22 Exemple d'expérience de compétition réalisées en CV dans le tampon 10 mM MES pH 5.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA. a) et b) Voltammogrammes. c) et d) Courbe de dosage et régression non-linéaire des points expérimentaux.	167
V.23 A gauche le dispositif d'électrode tournante, à droite le dispositif de micromanipulation. Figure tirée de la thèse de Lylian Challier. ¹⁸⁵ EDT:électrode à disque tournant.	168
V.24 A) Dosage de la sonde FcPRM (50 μM) par l'ARNr 16S23 suivi en CV en conditions hydrodynamiques. B) Valeur de K ^D _{FcPRM} obtenue pour cette expérience, indiquée avec un intervalle de confiance de 95 % entre parenthèses.	169
V.25 Table des molécules synthétisées.	171
V.26 Processus clé d'une réaction chimique: le transfert de masse et le transfert de charge.	173
V.27 Schéma de l'égalité des flux à la surface de l'électrode.	174
V.28 Profils de concentration en fonction de x. A) En régime de diffusion stationnaire. B) En régime de diffusion naturelle.	175

Liste des tableaux

I.1	Les différents ARN et leurs fonctions.	14
I.2	Effets de la concentration en Na ⁺ sur la T _m (température de fusion) et l'affinité des aminoglycosides pour l'ARN 16S. Tiré de ⁴⁶	44
I.3	Comparatif des techniques utilisées pour l'étude des interactions entre l'ARN 16S et les aminoglycosides.	56
II.1	Récapitulatifs des conditions utilisées dans la réaction entre le composé 11 et PRM.H ₂ SO ₄	71
II.2	Résultats obtenus pour les expériences de titrage de la figure II.35.	85
II.3	Données thermodynamiques de la formation du complexe FcPRM/ARNr 16S23, obtenues pour l'expérience illustrée en figure II.36.	86
III.1	Comparaison des courants selon l'utilisation de BSA ou de PVP pour une solution en sonde FcPRM à 33 μM dans un tampon 10 mM KPO ₄ pH 6.5, 50 mM KCl.	102
IV.1	Remontée du courant suivant l'addition de 24 μM de ligand compétiteur à un complexe 1:1 de sonde FcPRM/ARNr 16S23.	141

Résumé de la thèse

Etant donné leur implication dans de nombreux processus biochimiques, les ARN sont maintenant considérés comme des cibles thérapeutiques très prometteuses. Cependant, nos connaissances limitées concernant les phénomènes d'interaction entre les ARN et de petites molécules, compliquent l'élaboration de nouveaux ligands (ou médicaments), capables de reconnaître sélectivement une structure complexe d'ARN. En absence de toute approche rationnelle, une stratégie de criblage pourrait permettre de mieux comprendre ces phénomènes de reconnaissance. Cette thèse porte sur la mise au point d'une méthode électrochimique, simple, adaptée pour du criblage haut-débit et permettant de détecter et de quantifier les interactions ARN/ligands. Le principe de la méthode repose sur la différence de coefficient de diffusion qui existe entre la forme libre d'un ligand possédant des propriétés redox et sa forme complexée à l'ARN. Cette stratégie de détection par voie électrochimique présente comme avantages d'être peu coûteuse, rapide, simple d'utilisation, adaptée pour du criblage haut-débit de molécules et utilisable dans de faibles volumes. Cette méthodologie a été utilisée pour caractériser la formation d'un complexe entre un analogue d'aminoglycoside porteur d'un groupe ferrocène et une séquence d'ARNr 16S23. De plus, des expériences de compétition entre le complexe ARN/ligand redox et des aminoglycosides non modifiées permettent d'étendre la méthode à la détermination de constantes de dissociation (K_D) pour des molécules non marquées en phase homogène. Ces expériences de compétition pourront être généralisées pour mesurer le K_D de bibliothèques de molécules, permettant ainsi de trouver de meilleurs ligands d'ARN.

RNA molecules play a major role in various biochemical processes and they are now considered as an important drug target. However, our limited understanding of the interactions occurring between small molecules and RNA complicate the search for new ligands (or drugs) with improved specific interaction and binding to elaborated RNA structures. In the absence of any rational approach, a screening strategy could shed light on the ligand/RNA interactions. In this thesis, we describe a simple electrochemical approach allowing for high-throughput detection and quantification of small molecule/RNA interactions. The principle of the method relies on the difference of diffusion rates between a redox molecular probe free or bound to its RNA target and thus to the ability to more easily electrochemically detect the former over the latter in a homogenous solution. This electrochemical detection strategy has the advantages of being affordable, fast, easy to use, sensitive and well-adapted to a high-throughput screening strategy in small volume samples. This methodology was used to characterize the binding of an aminoglycoside analog bearing a ferrocenyl group to the ribosomal RNA fragment (rRNA 16S23). Furthermore, competitive binding of unlabelled aminoglycosides on the RNA/electrochemical probe complex allowed us to evaluate their dissociation constants (K_D). These competitive experiments could further be generalized to measure K_D values for libraries of molecules, which could help to find better RNA ligands.