



Utilisation des aptamères pour le dosage des petites molécules d'intérêt biologique

Benoit Chovelon

► To cite this version:

Benoit Chovelon. Utilisation des aptamères pour le dosage des petites molécules d'intérêt biologique. Biotechnologies. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV043 . tel-02057638

HAL Id: tel-02057638

<https://theses.hal.science/tel-02057638>

Submitted on 5 Mar 2019

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : Chimie Biologie

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Benoît CHOVELON

Thèse dirigée par **Dr. Corinne RAVELET**

Codirigée par **Pr. Eric PEYRIN** et

Co-encadrée par **Pr. Patrice FAURE**

préparée au sein du **Département de Pharmacochimie
Moléculaire**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Utilisation des aptamères pour le dosage de petites molécules d'intérêt biologique

Thèse soutenue publiquement le **21 décembre 2018**,
devant le jury composé de :

Dr. Carole CHAIX

Directrice de recherche, CNRS, Rapporteur

Pr. Patrice PROGNON

PU-PH, Université Paris-Saclay, Rapporteur

Dr. Arnaud BUHOT

Directeur de recherche, CEA, Président

Pr. Philippe GONZALO

PU-PH, Université Jean Monnet - Saint-Etienne, Examineur

Dr. Corinne RAVELET

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes, Directrice de thèse

Pr. Eric PEYRIN

Professeur, Université Grenoble Alpes, Co-directeur de thèse

Pr. Patrice FAURE

PU-PH, Université Grenoble Alpes, Co-encadrant



Remerciements

Je souhaiterais tout d'abord transmettre mes sincères remerciements aux membres du jury de cette thèse qui ont accepté de prendre du temps pour évaluer ce travail et qui sont parfois venus de loin pour la soutenance : **Madame le Docteur Carole Chaix** et **Monsieur le Professeur Patrice Prognon**, rapporteurs, **Monsieur le Professeur Philippe Gonzalo**, examinateur, ainsi que **Monsieur le Docteur Arnaud Buhot**, président du jury.

Cette thèse est le fruit d'une collaboration étroite entre le service de Biochimie Biologie moléculaire toxicologie de l'environnement (SB2TE) du CHU Grenoble Alpes et le Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM). A ce titre, je tiens à remercier chaleureusement **Monsieur le Professeur Patrice Faure**, responsable du SB2TE et co-encadrant de cette thèse et **Monsieur le Professeur Eric Peyrin**, responsable de l'équipe NOVA du DPM et co-directeur de cette thèse, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Au cours de ces trois années de doctorat j'ai été particulièrement bien encadré par ma directrice de thèse, **Madame le Docteur Corinne Ravelet**. Sa disponibilité, sa rigueur scientifique ainsi que ses très fortes qualités humaines ont été une aide précieuse pour moi. Je voudrais lui exprimer ma reconnaissance et lui transmettre mes très sincères remerciements.

Je tiens également à remercier **Emmanuelle Fiore**, technicienne au sein de l'équipe NOVA du DPM, pour son implication dans mes travaux de thèse. Son aide technique ainsi que sa profonde gentillesse ont vraiment facilité mon quotidien de doctorant.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux :

A tous les membres de l'équipe NOVA et plus largement tous les membres du DPM pour leur soutien et leur gentillesse.

Aux membres du service de Biochimie Biologie moléculaire toxicologie de l'environnement pour leur soutien et pour avoir accepté que je sois un peu moins disponible ces derniers mois.

Cette thèse, réalisée au cours de mon assistantat, marque véritablement la fin de ma « vie étudiante ». Je voudrais à ce titre remercier particulièrement **mes parents** pour leur profonde implication tout au long de ma scolarité et de mes études à la faculté de Pharmacie.

Je terminerai en remerciant mon épouse, **Armelle**, pour nos nombreux échanges sur mes travaux en cours et pour son soutien sans faille.

Abréviations

ACMIA	Antibody conjugated magnetic immunoassay
ADH	Hormone antidiurétique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AKCA	Aptamer kissing complex assay
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
CHU	Centre hospitalier universitaire
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
CPL	Chromatographie en phase liquide
CTx	Téloptide C terminal du collagène
Da	Dalton
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
ELAA	Enzyme-linked aptamer assay
ELAKCA	Enzyme-linked aptamer kissing complex assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMIT	Enzyme multiplied immunoassay technique
FPIA	Immunodosage par polarisation de fluorescence
GDH	Glucose déshydrogénase
GOD	Glucose oxydase
GTP	Guanosine triphosphate
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
HCG	Hormone chorionique gonadotrope
HK	Hexokinase
HRP	Peroxydase de raifort
ICP-AES	Spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif
ICP-MS	Spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif
Ig	Immunoglobuline
ISE	Electrodes sélectives d'ions
LBM	Laboratoire de biologie médicale
LMC	Leucémie myéloïde chronique

LOCI	Luminescent oxygen channeling immunoassay
NABM	Nomenclature des actes de biologie médicale
OCPC	Ortho-cresolphthaléine complexone
OTA	Ochratoxine A
PCR	Polymerase chain reaction
Protéine SSB	Single-strand binding protein
RET	Transfert d'énergie par résonance
SAA	Spectrométrie d'absorption atomique
SAE	Spectrométrie d'émission atomique
SCA	Syndrome coronarien aigu
SELEX	Systematic evolution of ligand by exponential enrichment
SPR	Résonance des plasmons de surface
TSH	Thyréostimuline
UPLC	Ultra performance liquid chromatography
UV	Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 : Electrode de verre permettant la mesure du pH.....	17
Figure 2 : Schématisation des méthodes spectrales optiques utilisées en LBM	21
Figure 3 : Représentation schématique d'une immunoglobuline	27
Figure 4 : Production d'un anticorps monoclonal par la technique des hybridomes. D'après Neobiolab ⁸⁴	28
Figure 5 : Relation signal - [Ag] d'une méthode à une seule reconnaissance	30
Figure 6 : Schéma d'une méthode à une seule reconnaissance, en phase hétérogène avec antigène marqué	31
Figure 7 : Schéma d'une méthode à une seule reconnaissance, en phase hétérogène avec anticorps marqué	31
Figure 8 : Principe du transfert d'énergie par résonance (RET)	32
Figure 9 : Principe d'une méthode EMIT® (Enzyme multiplied immunoassay technique) ...	32
Figure 10 : Principe d'une méthode de type FPIA (Fluorescence polarization immunoassay)	33
Figure 11 : Schéma d'une méthode à deux reconnaissances en phase hétérogène.....	34
Figure 12 : Principe de la méthode de chimiluminescence LOCI.....	35
Figure 13 : Représentation d'un nucléotide monophosphate	36
Figure 14 : Représentation d'une épingle à cheveux	37
Figure 15 : Représentation d'un pseudo-nœud.....	37
Figure 16 : Représentation d'un G-Quadruplex	37
Figure 17 : Schématisation de la méthode SELEX	39
Figure 18 : Stratégie du "split-aptamer". Formation du complexe ternaire en présence de la cible.	41
Figure 19 : A. Structures avec et sans la cible d'un aptamère pouvant être utilisé pour concevoir l'aptaswitch. B. Conception de l'aptaswitch.	42
Figure 20 : Stratégie de l'image dans le miroir.....	44
Figure 21 : A. Schéma de la méthode ELAA par compétition directe. B. Schéma de la méthode ELAA par compétition indirecte	47
Figure 22 : Aptamère scindé en deux fragments ("split-aptamer"). L'un est fixé sur la phase solide et l'autre est marqué. Formation du complexe ternaire en présence de la cible. ...	48
Figure 23 : Schématisation du principe de l'excitation photosélective	48
Figure 24 : Schéma de la méthode Enzyme-linked aptamer kissing complex assay (ELAKCA).....	53
Figure 25 : Séquences des vasoswitchs ADN et de l'aptakiss	68
Figure 26 : Réponse des vasoswitchs ARN en présence de différentes concentrations de cible	83
Figure 27 : Courbe de calibration pour la D-arginine-vasopressine avec le SYBR Green ...	103
Figure 28 : Schématisation de la compétition entre le SYBR Green et la cible.....	103
Figure 29 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction du ratio dye/base, en l'absence et en présence (10 μ M) de la cible	105

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de choix d'une technique de dosage plasmatique pour l'ion sodium (Na^+) et l'ion cuivrique (Cu^{2+})	15
Tableau 2 : Liste non exhaustive des méthodes spectrales optiques utilisées en LBM pour les petites molécules	22
Tableau 3 : Séquences des vasoswitchs ARN (en gras les nucléotides en série ADN impliqués dans le « complexe kissing » ; entre parenthèses les nucléotides en série ARN)	83

Table des matières

Remerciements	2
Abréviations	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	6
Table des matières	7
Introduction	9
Partie bibliographique	13
I. Stratégies utilisées en biologie médicale pour le dosage des cibles de petite taille	14
I.1. Méthodes électrochimiques	17
I.2. Utilisation d'un ligand : la complexométrie	18
I.3. Méthodes enzymatiques	19
I.4. L'immunoanalyse	20
I.5. Méthodes spectrales optiques	20
I.6. Spectrométrie de masse	23
I.7. Les méthodes chromatographiques	24
II. Les outils de reconnaissance moléculaire	26
II.1. Les anticorps : outils de reconnaissance moléculaire conventionnels	27
II.1.1. Structure	27
II.1.2. Synthèse	27
II.1.3. Utilisation des anticorps en diagnostic	28
II.1.4. Immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués	29
II.2. Nouveaux outils de reconnaissance moléculaire : les aptamères	36
II.2.1. Structure	36
II.2.2. Sélection par la méthode SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)	38
II.2.3. Applications analytiques	40
II.2.4. Analyse de matrices complexes	43
III. Précisions sur les techniques utilisées	46
III.1. Les méthodes ELAA (Enzyme-linked aptamer assay)	46
III.2. La polarisation de fluorescence	48
III.2.1. Utilisation avec les anticorps	49
III.2.2. Utilisation avec les aptamères	50

Résultats et discussion	51
I. Développement d'un système de dosage en phase hétérogène pour l'adénosine et la théophylline en utilisant la stratégie « complexe kissing »	52
II. Développement d'un système de dosage en phase homogène pour l'arginine-vasopressine en utilisant la stratégie « complexe kissing » combinée aux spiegelmers	67
III. Utilisation du SYBR Green dans les bioessais utilisant des oligonucléotides en série ADN	85
Conclusion et perspectives	106
Annexe.....	110
Bibliographie.....	124

Introduction

Les marqueurs biologiques sont des molécules synthétisées *in vivo*, dont la quantification au sein d'une matrice biologique (sérum, plasma, urines...) permettra d'évaluer un processus pathologique donné.¹ Ils sont utilisés par les cliniciens comme outil diagnostique et de pronostic, mais aussi pour le suivi de certaines pathologies. La recherche de nouveaux marqueurs constitue un axe de recherche principal des biologistes en analyse médicale, en constante évolution car étant étroitement liée aux avancées analytiques. Certains paramètres biologiques sont évalués depuis plusieurs siècles grâce aux sens humains (notamment la vue, l'odorat, et le goût). L'appréciation visuelle du teint d'un patient peut donner de précieuses indications au clinicien notamment en cas d'anémie (teint pâle lié à la baisse de l'hémoglobinémie) ou d'ictère (coloration jaune des téguments liée à l'accumulation de bilirubine).² L'haleine à l'odeur de pomme de reinette est un élément d'orientation en faveur d'une acidocétose³ (odeur caractéristique due à l'acétone qui est très volatile). Enfin Thomas Willis décrivait au 17^{ème} siècle que les urines des patients diabétiques avaient un goût sucré.⁴

Au cours du 20^{ème} siècle des avancées considérables concernant les méthodes spectrales, électrochimiques, séparatives ou encore l'immunoanalyse ont permis le dosage en routine de très nombreux marqueurs biologiques. Plus récemment les techniques de biologie moléculaire modernes et les techniques de spectrométrie de masse ont créé de nouvelles thématiques de recherche telles que la génomique (étude du génome, c'est-à-dire de l'ensemble des gènes), la transcriptomique (étude des ARN messagers), la protéomique (étude du protéome, c'est-à-dire de l'ensemble des protéines) ou encore la métabolomique (étude des métabolites).^{1,5} Ces nouvelles disciplines permettent d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques spécifiques d'une pathologie dans le but d'apporter une thérapie ciblée aux patients. Un exemple typique, est la leucémie myéloïde chronique (LMC), qui est une hémopathie due à la présence du chromosome Philadelphie (translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 aboutissant à la fusion des gènes BCR et ABL), responsable de la synthèse du transcrit BCR-ABL, aboutissant à l'expression d'une protéine ayant une activité tyrosine kinase très augmentée, à l'origine de la pathologie. Les techniques d'analyse du génome et du transcriptome sont généralement utilisées pour établir le diagnostic. L'identification de l'origine moléculaire de la pathologie a permis l'émergence d'une nouvelle classe thérapeutique, les inhibiteurs de tyrosine kinase, ayant amélioré considérablement le pronostic des patients.^{6,7}

Une fois le biomarqueur identifié, il sera de la compétence de l'analyste de développer ou de faire évoluer la méthode afin qu'elle soit compatible avec le dosage en routine de l'analyte dans un laboratoire de biologie médicale (LBM). Par exemple, afin de faciliter l'automatisation des techniques, de nombreux paramètres dosés il y a quelques années en radio-immunoanalyse,

sont aujourd'hui effectués en immunoanalyse « froide » (traceur non radioactif).⁸ Les techniques utilisées doivent être idéalement sensibles, spécifiques, faciles à mettre en œuvre, rapides, standardisables et peu coûteuses. Les techniques d'immunoanalyse, utilisant les anticorps comme outils de reconnaissance moléculaire, répondent à plusieurs de ces critères et sont logiquement très répandues en LBM aussi bien sous forme automatisées sur des automates multiparamétriques que sous forme de techniques manuelles. Un des points faibles de ces techniques est leur manque de sensibilité et de spécificité pour les marqueurs biologiques de petite taille. Par exemple, les anticorps utilisés pour le dosage du cortisol possèdent une réactivité croisée avec de nombreux stéroïdes endogènes tels que la cortisone ou le 11-désoxycortisol (composé S) et avec de nombreux stéroïdes de synthèse tels que la prednisolone ou la prednisone.⁹

La mise au point d'un dosage d'une petite molécule peut s'avérer particulièrement difficile : les techniques utilisant la reconnaissance moléculaire d'un anticorps sont peu sensibles et peu spécifiques, et à l'opposé les techniques utilisant la spectrométrie de masse sont coûteuses et lourdes à mettre en œuvre. L'enjeu est ainsi de développer des méthodes sensibles et spécifiques, présentant un haut débit d'analyse.

L'objectif de mon travail de thèse a été de développer des méthodes alternatives pour le dosage des petites molécules d'intérêt biologique utilisant les aptamères comme outils de reconnaissance moléculaire. Ces derniers sont des oligonucléotides sélectionnés *in vitro* par une approche combinatoire pour reconnaître une cible.¹⁰ Celles-ci peuvent être très variées : il peut s'agir d'un cation inorganique tel que l'ion cuivrique (Cu^{2+}),¹¹ d'une petite molécule organique telle que la 25-hydroxy-vitamine D,¹² d'une protéine telle que la thrombine¹³ ou encore d'une cellule.¹⁴ Les applications des aptamères sont très nombreuses notamment dans les domaines de l'analyse et de la thérapeutique. Ils représentent aujourd'hui une alternative intéressante aux anticorps en diagnostic^{15,16} et sont parfois appelés « anticorps chimiques ».¹⁴

La première partie de ce manuscrit sera consacrée à une étude bibliographique. Après avoir défini les petites molécules d'intérêt biologique ciblées, nous exposerons les différentes stratégies de dosage utilisées en LBM. Puis, une attention particulière sera portée aux techniques utilisant des outils de reconnaissance moléculaire tels que les anticorps et les aptamères. Enfin, une présentation rapide des méthodes de transduction du signal utilisées dans le cadre de mes travaux de thèse sera abordée.

La deuxième partie de ce manuscrit sera consacrée à la présentation sous forme d'articles parus dans des revues scientifiques de mes résultats expérimentaux. Le premier article concerne le développement en phase hétérogène d'un système de dosage à double

reconnaissance pour petites molécules (adénosine et théophylline) avec révélation enzymatique. Le second article est consacré au dosage d'un petit peptide d'intérêt biologique, l'arginine-vasopressine. Le développement a été effectué en phase homogène en utilisant la technique d'anisotropie de fluorescence. Cette dernière a également été utilisée dans le troisième travail, où nous décrivons un nouveau mode d'utilisation du SYBR Green (sonde fluorescente) pour la détection de petites molécules et de ligands de l'ADN.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit permettra de conclure et d'envisager des perspectives à ce travail, avec l'objectif de transposer une de ces techniques en laboratoire de biologie médicale.

Partie bibliographique

I. Stratégies utilisées en biologie médicale pour le dosage des cibles de petite taille

De nombreux articles sont consacrés à l'analyse des biomarqueurs de petite taille et en particulier aux difficultés de dosage de ces analytes.¹⁷ Les cibles de petite taille sont généralement opposées aux protéines et aux acides nucléiques (ADN et ARN).¹⁸ En biologie médicale, il s'agit alors des **ions** (H_3O^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , PO_4^{3-} , HCO_3^- , Fe^{3+} , Li^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} ...), des **gaz dissous** (dioxygène, dioxyde de carbone), des **métabolites** (glucose, acide urique, urée, créatinine, lactates, ammonium, cholestérol, triglycérides, bilirubines...), des **médicaments / toxiques** (antibiotiques, immunosuppresseurs, anti-épileptiques, théophylline, paracétamol, digoxine, éthanol, tétrahydrocannabinol...), de certaines **hormones** (catécholamines, hormones thyroïdiennes, hormones stéroïdiennes), des **vitamines** (groupe B, C, A, D, E et K) ou encore des **acides aminés**. L'intégralité des peptides serait évincée de cette définition relativement simple. L'immunoanalyse apporte une définition plus précise des petites molécules. Les cibles de petite taille sont ainsi définies par une masse moléculaire inférieure à 3000 Da,⁸ ce qui permet d'inclure les **peptides de petite taille** (généralement moins de 30 acides aminés : arginine-vasopressine, ocytocine...). En raison de la très grande popularité des immunodosages en LBM, nous retiendrons cette définition dans la suite de cette thèse.

Lors du choix d'une technique de dosage, le biologiste médical devra tenir compte de nombreux paramètres parmi lesquels, la forme de l'analyte à doser (forme libre *versus* forme totale), le volume d'analyse journalier, la faculté de la technique à être automatisée, les performances analytiques de la technique (limite de détection, sensibilité, spécificité...), la durée de la phase analytique ou encore le coût de fonctionnement. Le choix de la méthode de dosage doit être individualisé pour chaque analyte. Ainsi, deux analytes de structure proche, tels que l'ion sodium (Na^+) et l'ion cuivrique (Cu^{2+}), peuvent présenter des attentes très différentes (tableau 1) :

Tableau 1 : Critères de choix d'une technique de dosage plasmatique pour l'ion sodium (Na^+) et l'ion cuivrique (Cu^{2+})

	Ion sodium (Na^+)	Ion cuivrique (Cu^{2+})
Forme dosée	Le sodium libre est la forme généralement dosée (méthodes potentiométriques). Il s'agit du sodium physiologiquement actif (peut être assimilé au sodium total car les fractions liées aux protéines, aux carbonates et aux bicarbonates représentent moins de 2 % du sodium total). ¹⁹	Cuivre total (Cu^{2+} peut être notamment lié à la céruloplasmine, à l'albumine et à des molécules de faible masse moléculaire telles que les acides aminés).
Concentration physiologique	Principal cation du compartiment extracellulaire : environ 140 mmol/L de plasma	Il s'agit d'un élément trace essentiel ²⁰ : 10 – 30 $\mu\text{mol/L}$ de plasma
Indication	Evaluation de l'équilibre hydroélectrolytique, de l'état d'hydratation intracellulaire	Diagnostic de carence / surcharge en cuivre. Dépistage de la maladie de Wilson (cuivre échangeable). ²¹
Volume d'analyse au laboratoire de biologie médicale du Centre hospitalier universitaire (CHU) de Grenoble (extraction effectuée entre le 01/01/2018 et le 31/05/2018)	Environ 800 / jour	Environ 3 / jour
Cotation à la Nomenclature des actes de biologie médicale (NABM) 1 B = 0,27 euros	Fait partie avec l'ion potassium (K^+) et les chlorures (Cl^-) du groupement d'analyse appelé ionogramme coté 12 B ²² (au 30 mars 2016) soit 3,24 euros.	Coté 30 B ²² (au 11 octobre 2005) soit 8,1 euros
Peut-être demandé en urgences	Oui	Non

La méthode de référence pour le sodium est la photométrie de flamme²³ mais les biologistes utilisent par commodité les techniques potentiométriques. Lorsque le dosage est effectué sur l'échantillon non dilué, on parlera de potentiométrie directe. Par opposition, la mesure sur

l'échantillon dilué (généralement de l'ordre de 1/20) est appelée potentiométrie indirecte. Cette dernière présente l'avantage d'être facilement automatisable sur des analyseurs multiparamétriques de biochimie. Le rapport de janvier 2018 PROBIOQUAL (organisme d'évaluation externe de la qualité) indique que sur les 1309 laboratoires participant pour le dosage du sodium plasmatique, 1227 (94 %) utilisent la potentiométrie indirecte, les autres laboratoires utilisant la potentiométrie directe.

Pour le dosage du cuivre plasmatique, il est nécessaire de choisir une technique présentant des performances analytiques supérieures car les concentrations physiologiques sont environ dix mille fois plus petites que celles du sodium. Les méthodes d'analyse élémentaire permettent d'obtenir des limites de détection compatibles avec le dosage des éléments traces et en particulier compatibles avec le dosage du cuivre plasmatique.²⁴ Le rapport d'avril 2018 OELM (organisme d'évaluation externe de la qualité) indique que 55 % des participants pour le dosage du cuivre plasmatique, utilisent la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS), 40 % la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et 5 % la spectrométrie d'émission atomique (SEA). Les méthodes d'analyse élémentaire sont ainsi nécessaires pour doser cet élément même si elles sont plus lourdes à mettre en œuvre, plus coûteuses, et présentent des cadences plus faibles que les méthodes potentiométriques.

Une difficulté supplémentaire en biologie médicale est que l'on effectue des dosages sur des matrices complexes. Au laboratoire de biochimie, nous travaillons le plus fréquemment sur plasma obtenu après centrifugation de sang total prélevé dans des tubes contenant un anticoagulant (le plus souvent héparinate de lithium) ou sur les urines. Pour une même concentration d'un analyte dans deux milieux différents (plasma ou urine par exemple), le signal mesuré peut différer. En effet l'environnement chimique a une influence très importante sur le signal : c'est ce que l'on appelle l'effet matrice.⁸ Cela se traduit notamment par une variation de la pente de la droite d'étalonnage en fonction du milieu choisi. Pour minimiser ce phénomène il est nécessaire d'étalonner la méthode dans un milieu le plus proche possible de celui dans lequel on entreprend le dosage de l'analyte.

Après avoir analysé les paramètres à prendre en considération dans le choix d'une méthode de dosage, voici les principales approches pour l'étude des cibles de petite taille en LBM :

I.1. Méthodes électrochimiques

Il s'agit essentiellement des méthodes potentiométriques faisant appel aux électrodes sélectives d'ions (ISE) pourvues d'une membrane perméable à l'électrolyte à doser. Lorsqu'elle est en contact de l'échantillon, la diffusion de l'ion perméant à travers la membrane (du fait des lois de la diffusion) crée un potentiel de membrane modifiant la différence de potentiel attendue entre les électrodes de référence, ce qui permet d'accéder à la concentration de l'électrolyte.²⁵ L'électrode de verre permettant la mesure de l'activité de l'ion hydronium a été la première ISE utilisée en laboratoire de biologie médicale dans le but de mesurer le pH du sang.²⁶ L'électrode de mesure est constituée par une fine ampoule d'un verre perméable aux ions hydroniums et contenant une solution interne de pH connu (figure 1). Placée dans la solution de pH inconnu, il se développe au niveau de la membrane de verre un potentiel de membrane dépendant de la différence de concentration en H_3O^+ entre les deux solutions.

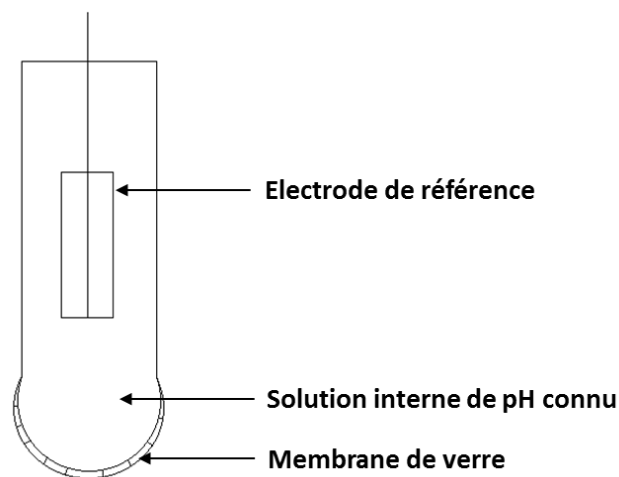


Figure 1 : Electrode de verre permettant la mesure du pH

Une ISE peut également être créée en piégeant un ionophore au sein d'une membrane. L'exemple le plus typique en biologie médicale est l'incorporation de la valinomycine (molécule cyclique de type peptidique) dans un polymère organique afin de créer une électrode sélective des ions potassium.²⁷ La valinomycine a une forte affinité vis-à-vis de K^+ , ce qui lui permet de jouer le rôle de transporteur lorsqu'elle est immobilisée dans une membrane.

Les ISE ont l'avantage d'être facilement miniaturisées, automatisables, rapides, peu coûteuses et permettent l'analyse de matrices complexes telles que le sang total non dilué.^{28,29} Elles sont utilisées dans la plupart des laboratoires de biochimie, en particulier pour le ionogramme (Na^+ , K^+ , Cl^-). Comme leur nom l'indique, l'utilisation des ISE est classiquement limitée au dosage des ions. Il est tout de même possible de modifier une ISE afin de la rendre sélective d'une

espèce neutre. C'est le cas, par exemple de l'électrode de Severinghaus³⁰ qui est une électrode à pH dotée d'une membrane perméable au dioxyde de carbone et permettant la mesure de la pression partielle en dioxyde de carbone du sang artériel (pCO₂).

Enfin, au sein des méthodes électrochimiques, les techniques ampérométriques permettent également le dosage d'espèces non chargées. L'exemple typique est le capteur de Clark³¹ permettant la mesure de la pression partielle en dioxygène du sang artériel (pO₂). Les électrodes à enzymes utilisant des oxydases sont d'autres exemples de méthodes ampérométriques permettant le dosage de substrats tels que le glucose ou encore la créatinine.

I.2. Utilisation d'un ligand : la complexométrie

Les cations inorganiques sont couramment dosés en LBM par des méthodes faisant intervenir des complexes organométalliques. C'est le cas notamment de l'ion calcium (Ca²⁺),³² de l'ion magnésium (Mg²⁺),³³ de l'ion lithium (Li⁺)³⁴ ou encore de l'ion ferrique (Fe³⁺ lié à la transferrine)³⁵. Une ou plusieurs molécules de ligand (base de Lewis) peuvent former des liaisons de coordination avec l'ion central (acide de Lewis) pour former un complexe (ou composé de coordination). L'affinité du ligand (L) vis-à-vis du cation inorganique (M) est caractérisée par la constante de dissociation (K_d) du complexe [M(L)_n] qui est la constante d'équilibre de la réaction suivante : $[M(L)_n]^{t-n.u} \rightleftharpoons M^{t+} + n L^{u-}$ où « n » est le nombre de ligand, « u » la charge négative portée par le ligand et « t » la charge positive portée par le cation inorganique.

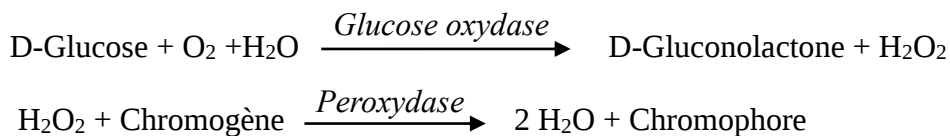
Le complexe formé est généralement coloré ce qui permet une mesure spectrométrique de l'absorbance de l'échantillon. Ces méthodes présentent l'avantage d'être simples à mettre en œuvre, facilement automatisables, rapides et sont peu coûteuses. Elles ont comme principal inconvénient leur manque de spécificité. Prenons l'exemple du dosage de l'ion calcium (Ca²⁺). Le calcium total (Ca²⁺ libre ainsi que Ca²⁺ lié aux protéines et Ca²⁺ complexé) est majoritairement mesuré en LBM par spectrophotométrie. Le ligand le plus couramment utilisé est l'ortho-cresolphthaléine complexone (OCPC), capable de se lier aux ions calcium pour former un complexe pourpre. L'absorbance du milieu réactionnel à 575 nm est directement proportionnelle à la concentration de calcium dans l'échantillon. Il existe une interférence des ions magnésium (Mg²⁺) capables de former également un complexe avec l'OCPC. Cette interférence est éliminée d'une part en tamponnant le milieu réactionnel à pH élevé (pH ≈ 10), ce qui limite la formation du complexe magnésium-OCPC et d'autre part en utilisant un second ligand, la 8-quinolinol capable de former un complexe avec les ions magnésium.³²

I.3. Méthodes enzymatiques

Il est possible d'envisager un dosage enzymatique dès lors que l'analyte est le substrat d'une enzyme. C'est le cas de nombreuses petites molécules d'intérêt biologique telles que les métabolites (glucose,³⁶ acide urique,^{36,37} urée,³⁶ créatinine,³⁸ lactates,³⁹ ammonium,⁴⁰ cholestérol,⁴¹ triglycérides⁴²...), l'éthanol⁴³ ou encore les bicarbonates.⁴⁴ La spécificité de ces techniques sera en partie liée à la sélectivité des enzymes utilisées, certaines pouvant en effet accepter d'autres substrats que l'analyte. Il sera nécessaire de se placer dans des conditions où la vitesse de la réaction enzymatique (évaluée généralement par une mesure d'absorbance) sera proportionnelle à la concentration du substrat. Dans le modèle simplifié de Michaelis-Menten il s'agit notamment de veiller à ce que la concentration en substrat soit négligeable devant la constante de Michaelis ($[S] \ll K_M$).

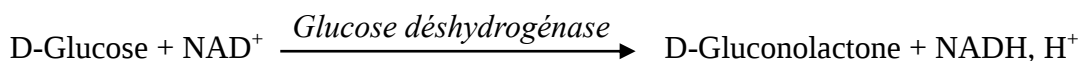
Pour un couple substrat-analyte donné, il peut exister plusieurs méthodes enzymatiques pouvant elles-mêmes être une succession de réactions enzymatiques. Prenons l'exemple du glucose, dont il existe trois méthodes enzymatiques principales de dosage :

❖ Méthode à la glucose oxydase (GOD)⁴⁵ :



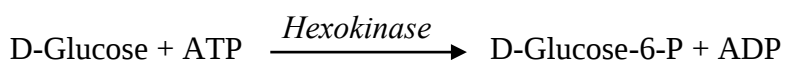
La seconde réaction enzymatique, de réduction du peroxyde d'hydrogène et d'oxydation du chromogène par la peroxydase, est une réaction de Trinder. Cette dernière n'est pas spécifique du dosage du glucose et peut constituer la réaction indicatrice du dosage de nombreux substrats en biochimie, après une première réaction spécifique d'oxydation du substrat avec génération de peroxyde d'hydrogène. Le chromophore généré vient colorer l'échantillon, ce qui permet une mesure spectrophotométrique de l'absorbance qui sera alors proportionnelle à la concentration du substrat.

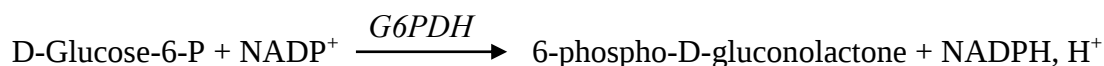
❖ Méthode à la glucose déshydrogénase (GDH)⁴⁶ :



Il s'agit d'une méthode en une seule étape avec lecture de l'absorbance à 340 nm.

❖ Méthode à l'héxokinase (HK)³⁶ :





Cette technique utilise une première réaction enzymatique catalysée par l'hexokinase non spécifique du glucose suivie d'une réaction indicatrice catalysée par la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) qui est très spécifique de son substrat, générant NADPH, H⁺ absorbant à 340 nm. Il s'agit de la technique de référence de dosage du glucose, sujette à des interférences dans des limites acceptables alors que la spécificité est excellente.⁴⁷

I.4. L'immunoanalyse

Ces techniques utilisent les anticorps comme outils de reconnaissance moléculaire et permettent le dosage de nombreuses petites molécules en LBM : médicaments, toxiques, hormones, vitamines, peptides...

Une description de certaines de ces techniques sera effectuée dans la partie consacrée aux outils de reconnaissance moléculaire.

I.5. Méthodes spectrales optiques

Il s'agit de méthodes basées sur les interactions de la matière avec la lumière en tant qu'onde électromagnétique. L'analyse peut se faire à l'échelle de la **molécule** ou de l'**atome**.

En LBM, trois principales techniques sont utilisées à l'**échelle moléculaire** pour l'analyse des petites molécules : la spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible étudiant l'absorption d'énergie lumineuse, la spectrofluorimétrie étudiant l'émission de radiation lumineuse, ainsi que la turbidimétrie / néphélémétrie s'intéressant à la diffusion de la lumière par l'échantillon. La mesure de l'intensité lumineuse se fait dans l'axe du faisceau de lumière incident en spectrophotométrie et en turbidimétrie, il s'agit alors de mesurer un signal négatif c'est-à-dire une diminution de l'intensité transmise (I_t) par rapport à l'intensité du rayon incident (I_0) permettant de calculer la transmittance $T = I_t / I_0$. En revanche, en spectrofluorimétrie ainsi qu'en néphélémétrie, on mesure un signal positif proportionnel à la concentration de l'analyte, correspondant habituellement à l'intensité lumineuse détectée à angle droit de la direction du faisceau de lumière incident (figure 2).

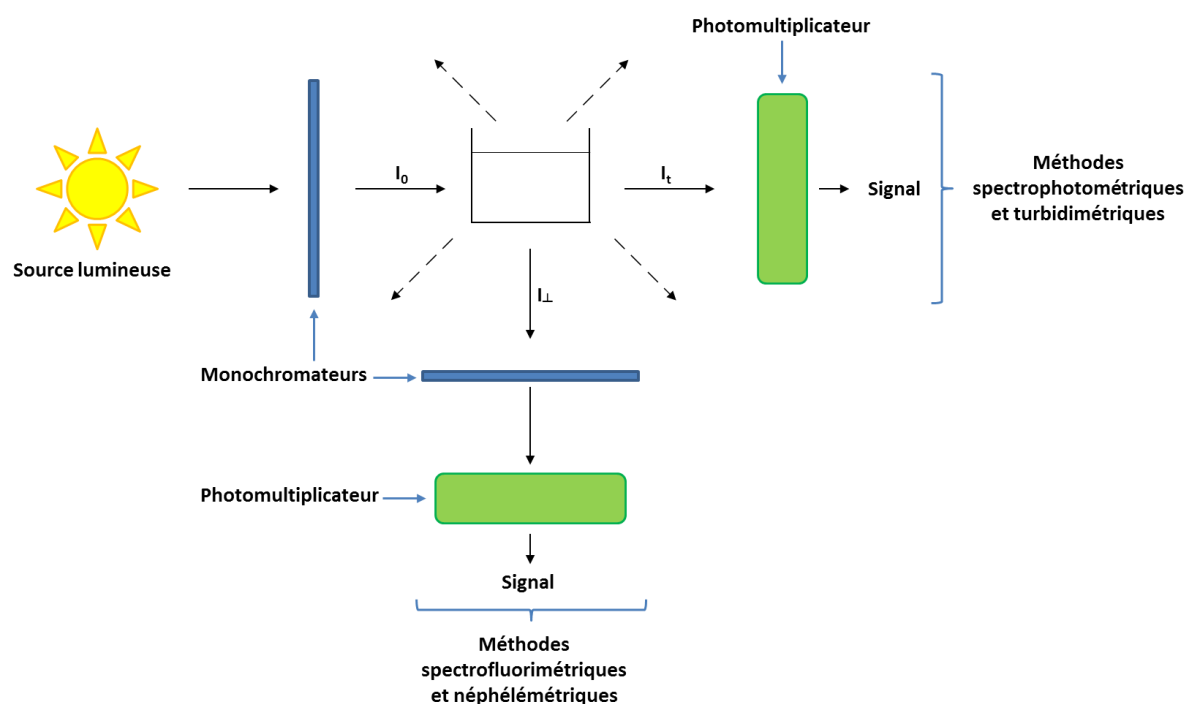


Figure 2 : Schématisation des méthodes spectrales optiques utilisées en LBM

Les techniques utilisées à l'échelle moléculaire sont facilement automatisables et permettent l'analyse d'un panel extrêmement large de petites molécules. Elles constituent la méthode de révélation de nombreuses techniques sur les automates multiparamétriques de biochimie. Elles peuvent également, être utilisées comme détecteur en chromatographie (tableau 2).

Tableau 2 : Liste non exhaustive des méthodes spectrales optiques utilisées en LBM pour les petites molécules

	Exemples de combinaisons avec d'autres méthodes analytiques
Spectrophotométrie d'absorption moléculaire UV-visible	- Révélation des méthodes complexométriques : Ca^{2+},³² Mg^{2+},³³ Li^+... - Révélation de nombreuses méthodes enzymatiques : glucose,³⁶ acide urique,^{36,37} urée,³⁶ créatinine,³⁸ lactates,³⁹ ammonium,⁴⁰ cholestérol,⁴¹ triglycérides⁴²... - Révélation de certaines méthodes immuno-enzymatiques : méthodes EMIT® (<i>Enzyme multiplied immunoassay technique</i>) pour les dosages de médicaments et de toxiques, méthodes ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)⁸... - Détection en chromatographie : vitamine A,⁴⁸ vitamine E⁴⁹...
Spectrofluorimétrie	- Révélation des méthodes immuno-fluorescentes : marquage d'un anticorps par un fluorophore (fluorescence directe)⁸ - Révélation de certaines méthodes immuno-enzymatiques : marquage de l'anticorps par une enzyme capable de donner un produit fluorescent à partir d'un substrat fluorigène (fluorescence indirecte)⁸ - Elargissement aux méthodes immuno-luminescentes : marquage d'un anticorps par un luminophore (molécule capable d'émettre de la lumière après excitation lumineuse, chimique, électrique...)⁸ - Immunodosage par polarisation de fluorescence (FPIA) : dosages de médicaments et toxiques⁸ - Détection en chromatographie (l'analyte pouvant subir, s'il ne possède pas de fluorophore, une étape de dérivation) : dosage de la vitamine C,⁵⁰ vitamine B1,⁵¹ vitamine B6⁵²...
Turbidimétrie / Néphélémétrie	Techniques d'immunoprécipitation en milieu liquide, basées sur les propriétés de diffusion de la lumière des complexes immuns (complexes antigène-anticorps) : dosages de médicaments ⁵³ et toxiques

Contrairement aux techniques d'analyses moléculaires, qui comme nous venons de le voir sont très souvent combinées à d'autres méthodes analytiques, les techniques **d'analyse élémentaire** sont principalement utilisées seules en LBM. Il s'agit essentiellement de la spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et de la spectrométrie d'émission atomique (SEA) basées comme leur nom l'indique sur l'absorption ou l'émission de radiations lumineuses par les atomes. Ces techniques permettent l'analyse des éléments traces essentiels tels que le cuivre, le zinc, le sélénium, l'iode et aussi des toxiques tels que l'aluminium, le manganèse ou encore les métaux lourds.

Les techniques modernes d'émission atomique, utilisant le plasma à couplage inductif (ICP-optique ou ICP-AES pour *ICP atomic emission spectrometry* ou ICP-OES pour *ICP optical emission spectrometry*) comme source d'atomisation et d'excitation de l'échantillon, peuvent être couplées à la chromatographie, ce qui permet d'accéder par exemple à la spéciation des métaux lourds, particulièrement importante en toxicologie.⁵⁴

I.6. Spectrométrie de masse

Les méthodes de spectrométrie de masse sont les principales méthodes spectrales non optiques permettant l'analyse des petites cibles en LBM. Elles permettent la séparation des molécules d'intérêt, préalablement ionisées, en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). La classification des spectromètres de masse se fait selon leurs deux composants principaux, c'est-à-dire la source d'ionisation (exemple : plasma à couplage inductif, ionisation électronique, bombardement d'atomes rapides...) ainsi que l'analyseur de masse (exemple : quadripôle, temps de vol, secteur magnétique...).

La technique de spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) avec analyseur quadripolaire, prédomine largement dans le domaine de **l'analyse élémentaire**.⁵⁵ Elle est principalement utilisée en routine pour le dosage des éléments traces essentiels. Comme pour l'ICP-optique, le couplage à la chromatographie liquide haute performance permet d'accéder à la spéciation chimique des éléments.⁵⁴

En ce qui concerne **l'analyse moléculaire**, les spectromètres de masse utilisés sont le plus souvent couplés à la chromatographie liquide haute performance, ce qui permet l'analyse de molécules très variées telles que les hormones (exemple : aldostérone⁵⁶), les vitamines (exemple : vitamine D,^{57,58} vitamine K⁵⁹...), les médicaments (exemple : entécavir⁶⁰), les peptides (exemple : arginine-vasopressine⁶¹⁻⁶²) ainsi que les acides-aminés.⁶³

Les techniques de spectrométrie de masse sont lourdes à mettre en œuvre : elles nécessitent un équipement onéreux, du personnel qualifié, et permettent difficilement d'obtenir un haut débit

d'analyse. Les spectromètres de masse sont en revanche des détecteurs universels offrant un panel très étendu de cibles analysables et dont les domaines d'application sont très variés.⁶⁴

I.7. Les méthodes chromatographiques

Il s'agit de méthodes séparatives permettant le dosage de très nombreuses petites molécules d'intérêt biologique. Dans ces techniques, l'échantillon introduit dans la phase mobile est poussé par l'intermédiaire d'une pompe dans la colonne chromatographique contenant la phase stationnaire. Le temps de parcours de la colonne chromatographique appelé temps de rétention (temps entre l'injection et la détection) est caractéristique de l'analyte et dépend de l'affinité de celui-ci vis-à-vis de la phase stationnaire et de la phase mobile.

La chromatographie liquide à haute performance (CLHP) est la principale méthode chromatographique en phase liquide (CPL) utilisée en LBM. Ses bonnes performances sont obtenues grâce à la réduction de la taille des particules de phase stationnaire (3-5 μm) associée à une diminution du temps d'analyse par augmentation du débit de la phase mobile au sein d'un système à haute pression (200-400 bars).

L'UPLC (pour ultra performance liquid chromatography) est utilisée à un degré moindre que la CLHP en LBM. Il s'agit d'une évolution de la CLHP liée à la réduction de la taille des particules de phase stationnaire (<2 μm), ce qui permet d'augmenter le débit de la phase mobile sans altérer la résolution de la méthode. Cette évolution a l'inconvénient d'augmenter la pression du système (500-1000 bars). Le principal avantage de l'UPLC est la réduction du temps d'analyse ce qui peut être un atout considérable pour les analyses urgentes.⁶⁵

Le principal mode chromatographique utilisé pour le dosage des molécules organiques est la chromatographie de partage sur phases stationnaires apolaires (= chromatographie à polarité de phases inversée) consistant à greffer les silanols de la phase stationnaire par des motifs apolaires (exemple : colonne C18). De très nombreux détecteurs peuvent être utilisés en sortie de colonne chromatographique. Voici les principaux pour l'étude des petites molécules d'intérêt biologique :

- Les détecteurs spectrophotométriques, basés sur la loi de Beer-Lambert, sont très utilisés car de nombreux analytes absorbent dans l'UV-visible.^{48,49} Les plus simples permettent d'obtenir l'absorbance à une longueur d'onde (λ) fixée en fonction du temps. D'autres, les détecteurs à barrette de diodes, donnent accès aux spectres tridimensionnels temps - longueur d'onde (λ) - absorbance, ce qui fournit une information qualitative importante sur l'analyte.

- Les détecteurs spectrofluorimétriques, basés sur la mesure de l'intensité émise (I_f) à 90° du rayon incident permettant l'excitation (en règle générale). Leur utilisation est limitée aux molécules fluorescentes bien qu'une étape de dérivation (réaction chimique permettant le greffage d'un fluorophore sur l'analyte) soit possible.⁵⁰⁻⁵²
- Les détecteurs électrochimiques de type ampérométriques ou coulométriques, basés sur la mesure d'un courant d'oxydation ou de réduction de l'analyte à potentiel fixé. Ce sont des détecteurs sensibles et spécifiques mais limités aux analytes électroactifs. En LBM, ce couplage est limité aux dosages des catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline)⁶⁶ et de leurs métabolites (dérivés méthoxylés,⁶⁷ acide homovanillique,⁶⁸ acide vanylmandélique⁶⁸) ainsi que de la sérotonine⁶⁹ et de son métabolite principal (5-hydroxy-indolacétique⁶⁸).
- Les détecteurs utilisant la spectrométrie de masse^{56,59,60,62,63} donnant accès au spectre tridimensionnel temps – masse – intensité du signal. Le couplage CLHP – SM est lourd à mettre en œuvre mais permet théoriquement la détection de tous les analytes.

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) plus lourde à mettre en œuvre, est moins utilisée que la chromatographie en phase liquide. La séparation à température élevée, combinée à l'emploi de colonnes capillaires, augmente l'efficacité tout en diminuant la perte de charge. Cela permet d'augmenter la vitesse de la phase mobile, autorisant l'augmentation de la longueur des colonnes utilisées. La CPG permet l'analyse des composés gazeux ou susceptibles d'être volatilisés par chauffage sans décomposition.⁷⁰

Après avoir énuméré les critères de choix d'une technique ainsi que les différentes approches utilisées en LBM pour l'étude des cibles de petite taille, une attention toute particulière sera portée aux techniques utilisant les outils de reconnaissance moléculaire.

II. Les outils de reconnaissance moléculaire

De très nombreux processus biologiques font appel à la reconnaissance moléculaire avec fixation d'un ligand sur une cible. On peut citer l'activation des récepteurs membranaires par des molécules endogènes (exemple : catécholamines sur les récepteurs adrénergiques⁷¹) ou exogènes (exemple : bêta-2 mimétiques sur les récepteurs bêta-2 adrénergiques⁷²), la catalyse enzymatique via la fixation du substrat au site actif de l'enzyme,⁷³ l'immunité humorale grâce à la reconnaissance antigène-anticorps,⁷⁴ l'activation de la transcription d'un gène par fixation d'un facteur de transcription sur l'ADN⁷⁵ ou encore l'activité catalytique des ribozymes⁷⁶ (ARN capables de catalyser une réaction chimique).

L'interaction entre le ligand et la cible est habituellement réversible et met en jeu des liaisons de faible énergie⁷⁷ : liaisons hydrogène, liaisons électrostatiques, effet hydrophobe, interactions de Van der Waals. L'interaction est généralement sensible à de nombreux paramètres et en particulier au pH, à la température ainsi qu'à la présence de certains ions.⁷⁸ Deux grandeurs permettent d'évaluer la qualité de la reconnaissance moléculaire :

- L'affinité du ligand vis-à-vis de sa cible représente sa faculté à interagir fortement avec elle. La constante de dissociation (K_d) permet de l'évaluer.⁷⁹ Elle est reliée à l'équilibre de la réaction suivante : Ligand – Cible $\rightleftharpoons$ Ligand + Cible

$$\text{D'après la loi d'action de masse, nous avons : } K_d = \frac{[\text{Ligand}] \times [\text{Cible}]}{[\text{Ligand-Cible}]}$$

Ainsi plus l'affinité d'un ligand pour sa cible est importante, plus la constante de dissociation sera petite.

- L'autre grandeur caractéristique de la liaison ligand – cible est la spécificité de la reconnaissance, c'est-à-dire la faculté du ligand à distinguer la cible d'une molécule interférente. Elle peut être évaluée par le calcul du pourcentage de réactivité croisée.⁸

L'utilisation de ligands capables de se fixer avec une forte affinité et une forte spécificité à une cible est à l'origine de nombreuses applications analytiques. Une condition nécessaire est que le complexe ligand – cible génère un signal quantifiable différent du signal en présence du ligand et de la cible seuls.

II.1. Les anticorps : outils de reconnaissance moléculaire conventionnels

II.1.1. Structure

A la fin du 19^{ème} siècle, Behring et Kitasato mettent en évidence le rôle des anticorps dans la réaction immunitaire contre les toxines tétaniques et diphtériques.⁸⁰ Ces molécules produites par les organismes vivant après inoculation d'un antigène, sont des protéines ayant des propriétés immunologiques d'où leur nom d'immunoglobulines. Leur synthèse au cours de la réaction immunitaire est assurée *in vivo* par les lymphocytes B.

Schématiquement, les immunoglobulines (Ig) sont formées de quatre chaînes polypeptidiques reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures⁸ : deux chaînes lourdes (environ 50 kDa pour les immunoglobulines G) responsables de la classe des Ig (A, D, E, G, M) et deux chaînes légères (environ 25 kDa) de type kappa ou lambda quelle que soit la classe de l'immunoglobuline (figure 3).

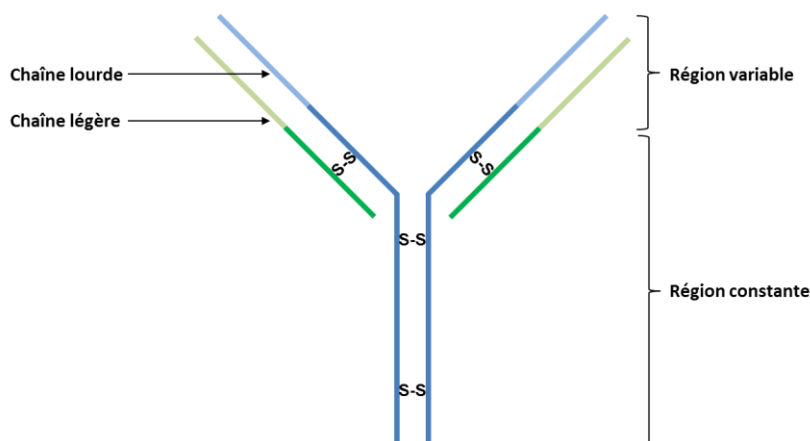


Figure 3 : Représentation schématique d'une immunoglobuline

II.1.2. Synthèse

Initialement les chercheurs produisaient eux-mêmes les anticorps d'intérêt alors qu'aujourd'hui de nombreuses entreprises sont spécialisées dans la production de ces molécules pouvant être utilisées en thérapeutique ainsi que dans le domaine très large du diagnostic. Cette approche fait appel à des processus biologiques pouvant aboutir à des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.

La première étape, souvent longue et fastidieuse, consiste en l'immunisation d'un animal (les plus fréquents : souris, rats, cobayes, lapins, chèvres, moutons ou chevaux) contre un antigène donné.⁸¹ Les protocoles contiennent généralement plusieurs injections sur une période de quatre à douze semaines.⁸² La réaction immunitaire, par nature polyclonale, génèrent des anticorps

hétérogènes dits polyclonaux, c'est-à-dire dirigés contre des épitopes différents de l'antigène. Ils pourront être obtenus après prélèvement du sérum de l'animal.

Les anticorps monoclonaux sont des anticorps reconnaissant un épitope donné d'un antigène. Ils sont tous identiques et sont produits par un seul clone de plasmocyte. Köhler et Milstein ont décrit en 1975 la technique des hybridomes, permettant leur synthèse en quantité importante.⁸³ Elle est basée sur la fusion d'un lymphocyte B sécréteur prélevé sur l'animal immunisé, avec une cellule cancéreuse le plasmocytome. La cellule hybride obtenue possède alors les caractéristiques du lymphocyte B (production d'un anticorps monoclonal) et du plasmocytome (cellule tumorale ayant la propriété de se multiplier indéfiniment) (figure 4).

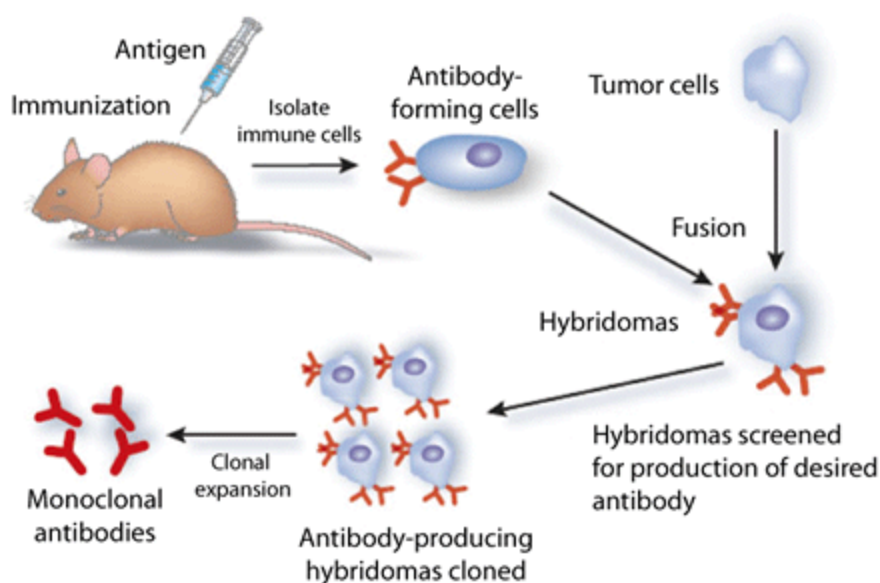


Figure 4 : Production d'un anticorps monoclonal par la technique des hybridomes. D'après Neobiolab⁸⁴

II.1.3 Utilisation des anticorps en diagnostic

De très nombreuses techniques d'analyse utilisent la réaction antigène – anticorps. Historiquement, les premières descriptions d'utilisation d'anticorps à visée analytique datent des années 1940 avec les techniques d'**immunoprécipitation en milieu gélifié** (mise en évidence de la toxine diphtérique en 1948 par Ouchterlony notamment^{85,86}). Ces méthodes ne sont pratiquement plus utilisées aujourd'hui et ont été supplantées par les méthodes d'**immunoprécipitation en milieu liquide** (néphélométrie et turbidimétrie).¹ Ces dernières sont très utilisées en LBM, notamment pour le dosage des protéines en concentration importante telles que l'albumine⁸⁷ (valeurs de référence : 38 - 48 g/L de sérum¹) qui est la protéine sérique

majoritaire, la transferrine⁸⁸ (valeurs de référence : 2 – 3 g/L de sérum¹) qui est la principale protéine de transport du fer sous forme ferrique (Fe^{3+}), la protéine C réactive^{87,88} (valeurs de référence : < 10 mg/L de sérum¹) qui est le marqueur biologique de référence du syndrome inflammatoire, mais aussi pour le suivi thérapeutique de certains médicaments en concentration importante (de l'ordre du mg/L de plasma) tels que la gentamicine⁵³, la carbamazépine⁸⁹... Pour atteindre des limites de détection plus basses les méthodes d'**immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués** sont nécessaires, ce qui permet par exemple le dosage de la thyrostimuline⁹⁰ (valeurs de référence : 1,8 – 36 pmol/L de sérum¹) permettant le suivi des dysthyroïdies ou encore de la troponine⁹¹ (les valeurs de référence dépendent du kit utilisé, mais sont de l'ordre de la dizaine de ng/L de plasma¹) pour le diagnostic des syndromes coronariens aigus (SCA).

Les techniques **d'immunoprécipitation en milieu liquide et d'immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués** sont actuellement très largement utilisées en LBM notamment sur les automates multiparamétriques de biochimie. D'autres techniques utilisant la réaction antigène – anticorps telles que l'immunochromatographie et la cytométrie en flux sont également bien implantées (et à un degré moindre la chromatographie d'affinité). Les techniques de surface telles que les microbalances à quartz,⁹² les méthodes électrochimiques,⁹³ la résonance des plasmons de surface (SPR),⁹⁴ ou encore la technique d'interférométrie en couche biologique, utilisant des anticorps comme outils de reconnaissance moléculaire, sont largement décrites dans la littérature mais leurs applications en biologie médicale sont limitées. Les chercheurs utilisant de nouveaux éléments de reconnaissance moléculaire tels que les aptamères, pour le développement de nouvelles techniques de dosage transposables en LBM, s'inspirent des techniques **d'immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués**. Il est donc important de dresser un inventaire succinct de ces différentes techniques.

II.1.4. Immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués

On entend par marqueur une entité liée soit à l'antigène, soit à l'anticorps, qui délivrera un signal quantifiable. Habituellement il s'agit d'un radioélément, d'une enzyme ou encore d'un luminophore (molécule capable d'émettre de la lumière après excitation lumineuse, chimique, électrique...). La molécule portant le marqueur est alors appelée traceur.⁸ Bien que les dosages d'anticorps soient possibles, la classification de ces techniques sera limitée aux dosages d'antigènes.

Les techniques en phase hétérogène nécessitent la fixation sur un support solide (puits, billes, particules aimantées...) d'un anticorps ou d'un antigène ainsi qu'au minimum, une étape de

séparation de la forme libre et de la forme liée (fraction engagée dans un complexe antigène-anticorps) du traceur. En phase homogène, le dosage a lieu en solution sans étape de séparation, ce qui permet un gain de temps considérable. C'est la réaction antigène – anticorps qui entrainera la modulation du signal.

Les méthodes présentées et notamment celles qui sont réalisées en phase homogène présentent donc l'avantage d'être rapides et facilement automatisables, ce qui permet un haut débit d'analyse.

II.1.4.1. Méthodes à une seule reconnaissance

Ces techniques sont utilisées lorsque l'antigène ne dispose que d'un seul épitope ou lorsque seul un anticorps peut se lier à l'antigène sans perturber la fixation d'un deuxième anticorps. Dans la pratique, il s'agit de techniques de dosage de petites molécules (< 3000 Da).⁸

Afin d'obtenir une compétition entre l'antigène analyte (à doser) et l'antigène réactif, la concentration d'anticorps ne doit pas être en excès. Le signal mesuré est généralement inversement proportionnel à la concentration d'antigène analyte (figure 5).

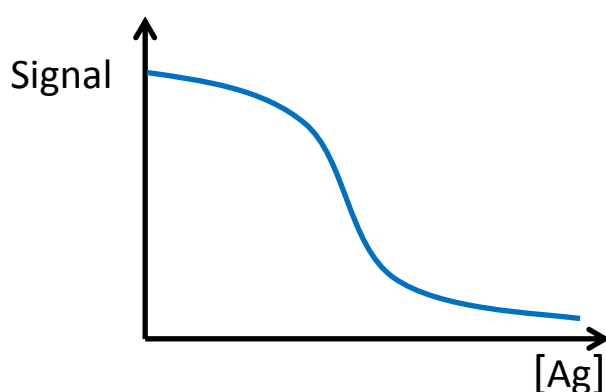


Figure 5 : Relation signal - [Ag] d'une méthode à une seule reconnaissance

❖ Techniques en phase hétérogène

Exemple 1 : Méthode avec antigène marqué (figure 6)

La plupart des techniques à une seule reconnaissance en phase hétérogène utilisent un antigène marqué et un anticorps fixé sur la phase solide. C'est le cas de la technique de radio-immunoanalyse Cisbio® pour le dosage de la testostérone, de la technique de radio-immunoanalyse Beckman Coulter® pour le dosage du cortisol ou encore de la technique de

chimiluminescence présente sur les automates Siemens ADVIA Centaur® pour le dosage du cortisol.

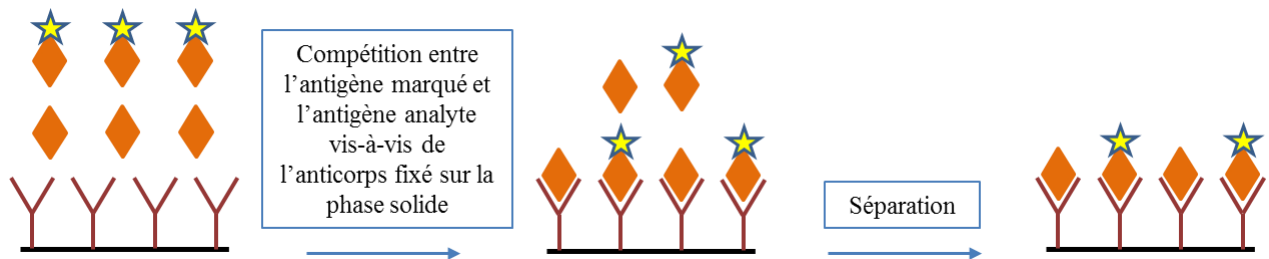


Figure 6 : Schéma d'une méthode à une seule reconnaissance, en phase hétérogène avec antigène marqué

Exemple 2 : Méthode avec anticorps marqué (figure 7)

Peu de techniques utilisent cette stratégie. Nous pouvons toutefois citer la technique ACMIA (Antibody conjugated magnetic immunoassay) présente sur les automates RXL HM Dimension® permettant le dosage de nombreux médicaments.

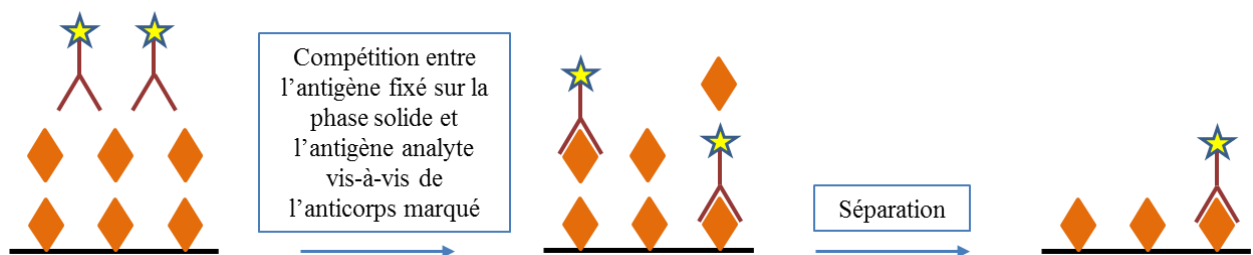


Figure 7 : Schéma d'une méthode à une seule reconnaissance, en phase hétérogène avec anticorps marqué

❖ Techniques en phase homogène

La liaison antigène – anticorps va moduler l'activité du (ou des) marqueur(s).

Exemple 1 : Méthode avec anticorps et antigène marqués par des fluorophores (figure 8)

Cette méthode est basée sur le transfert d'énergie par résonance (RET). Le premier fluorophore est excité à la longueur d'onde λ_1 et transmet son énergie au deuxième fluorophore qui va émettre à une longueur d'onde λ_2 (avec $\lambda_1 < \lambda_2$). Le transfert d'énergie est inversement proportionnel à la puissance 6 de la distance entre les deux fluorophores,⁸ ce qui permet un transfert important lorsque les deux fluorophores sont proches.

La technique TRACE® utilisant un cryptate d'Europium et une phycobiliprotéine utilise cette stratégie.

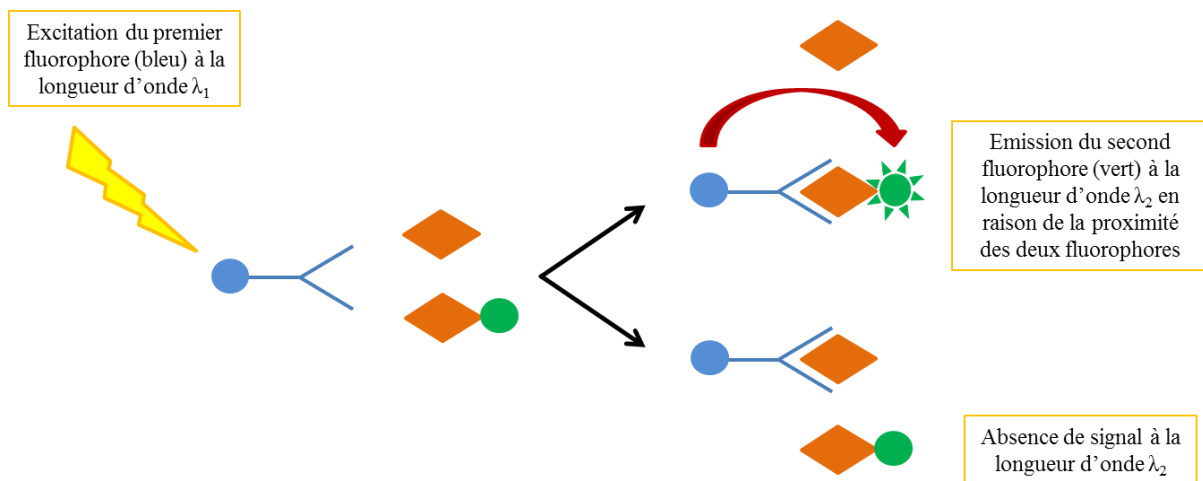


Figure 8 : Principe du transfert d'énergie par résonance (RET)

Exemple 2 : Méthode avec antigène marqué par une enzyme (figure 9)

L'activité de l'enzyme (présente sur l'antigène) est modulée par la liaison à l'anticorps. L'activité peut être diminuée par liaison à l'anticorps en raison d'encombrement stérique mais l'inverse (augmentation de l'activité) est également possible suivant l'enzyme utilisée pour le marquage. Les méthodes EMIT® (Enzyme multiplied immunoassay technique), très utilisées pour les dosages des médicaments et des toxiques, utilisent ces systèmes.

L'amikacine sur les automates Siemens Vista®, la phénytoïne sur les automates Abbott® Architect « c » series, et la tobramycine sur les automates Roche® Cobas « c » series sont dosés par cette technique.

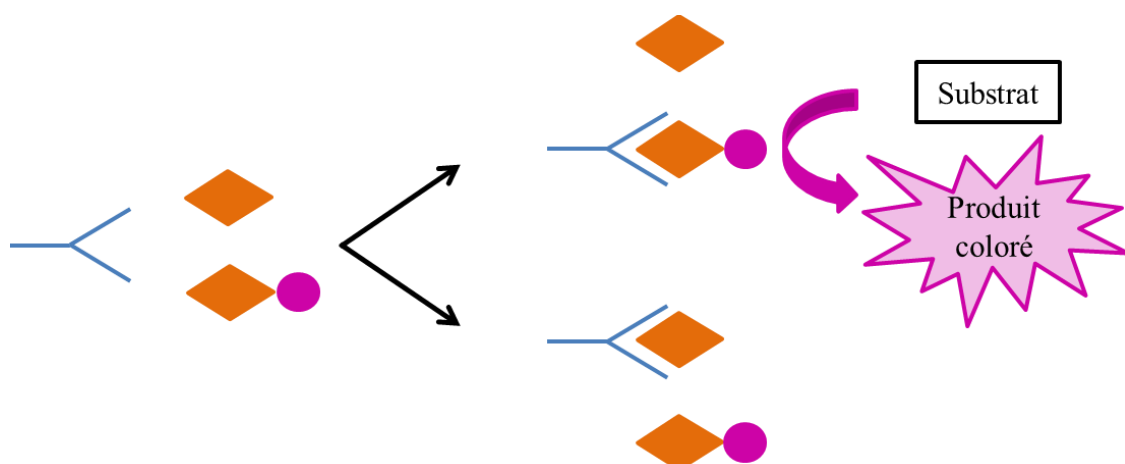


Figure 9 : Principe d'une méthode EMIT® (Enzyme multiplied immunoassay technique)

Exemple 3 : Immunodosages par polarisation de fluorescence (FPIA, *Fluorescence polarization immunoassay*) (figure 10)

L'antigène analyte et l'antigène marqué par un fluorophore, entrent en compétition vis-à-vis de l'anticorps anti-analyte. La fixation de l'anticorps sur l'antigène marqué diminue considérablement le degré de liberté du fluorophore, ce qui ralentit le processus de dépolarisation de la lumière émise (voir III.2). Plus l'analyte est de petite taille (et la différence de masse de l'analyte *versus* masse de l'anticorps est grande), plus la différence de signal généré entre la forme libre du traceur et la forme liée sera importante. Il s'agit donc de techniques dédiées exclusivement aux dosages des petites molécules et en particulier des médicaments et des toxiques.

Les automates Roche® Integra series utilisent cette technique pour les dosages des psychotropes (acide valproïque, carbamazépine, phénobarbital, phénytoïne) et des antibiotiques (amikacine, gentamicine, tobramycine, vancomycine). Le méthotrèxate est également dosé par FPIA sur les automates Abbott® TDx.

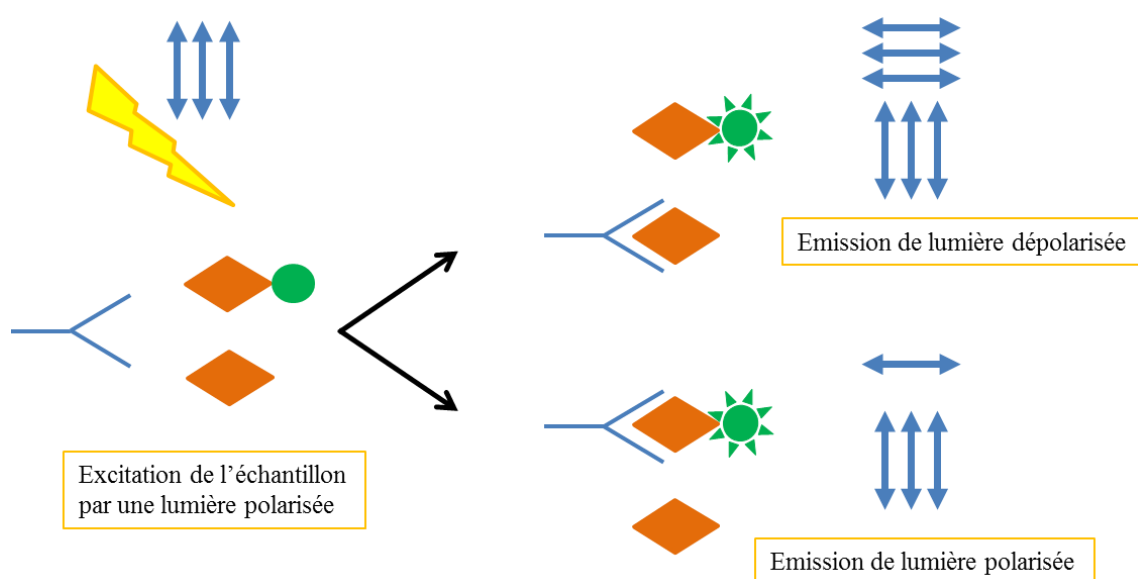


Figure 10 : Principe d'une méthode de type FPIA (*Fluorescence polarization immunoassay*)

II.1.4.2. Méthodes à double reconnaissance

Ces techniques impliquent la fixation de deux anticorps sur l'antigène à doser et sont ainsi parfois appelées méthodes de type « sandwich ». Elles sont réservées aux analytes de grande taille (> 3000 Da) possédant deux sites épitopes. Les anticorps « réactifs » sont utilisés en excès par rapport à l'analyte.

Ces techniques permettent d'accroître la spécificité (pour interférer, une molécule doit posséder les deux épitopes) et de diminuer la limite de détection.⁸

❖ Techniques en phase hétérogène (figure 11)

Un premier anticorps est fixé sur une phase solide. Après une étape d'incubation avec l'échantillon et l'anticorps de révélation, on procèdera à l'étape de séparation. La révélation du système dépendra de la nature du marqueur. Si le marqueur est une enzyme il s'agira d'une méthode ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) sandwich.

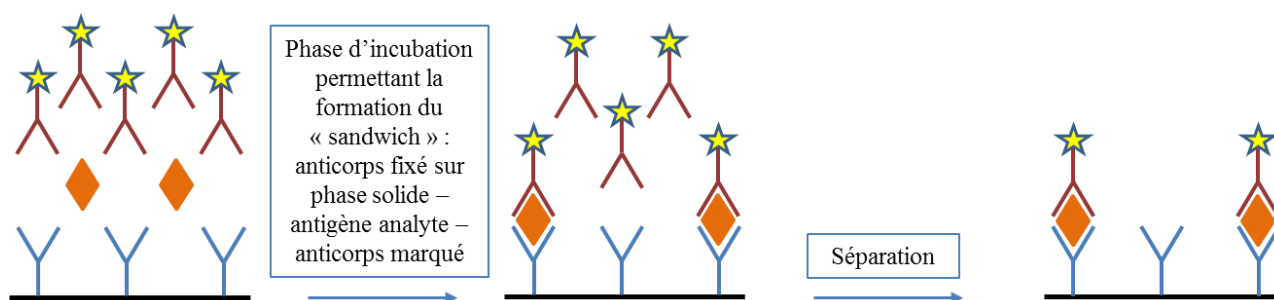


Figure 11 : Schéma d'une méthode à deux reconnaissances en phase hétérogène

Le dosage de la parathormone sur les automates Siemens ADVIA Centaur® utilise cette technique. L'anticorps de capture est fixé sur des billes paramagnétiques et l'anticorps de révélation est marqué à l'ester d'acridinium permettant une mesure de fluorescence.

La technique de radio-immunoanalyse DIAsource® pour le dosage de la prolactine utilise également cette technique. L'anticorps de capture est fixé sur la paroi des tubes quand l'anticorps de révélation est marqué à l'iode 125.

❖ Techniques en phase homogène

La formation du sandwich anticorps – antigène analyte – anticorps va moduler l'activité du (ou des) marqueur(s).

Exemple : Méthode de chimiluminescence LOCI (Luminescent oxygen channeling immunoassay) (figure 12)

Après irradiation de l'échantillon à une longueur d'onde λ_1 , les molécules photosensibles de phtalocyanine fixées sur le premier anticorps génèrent de l'oxygène singulet. En cas de proximité avec les molécules d'oléfine immobilisées sur le second anticorps, cela déclenchera une réaction de chimiluminescence générant un signal à une longueur d'onde λ_2 .⁹⁵

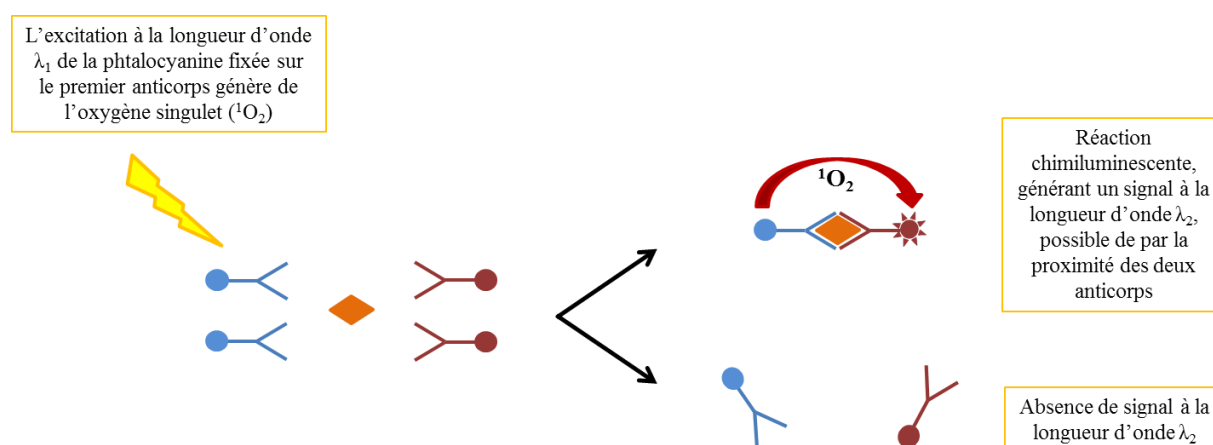


Figure 12 : Principe de la méthode de chimiluminescence LOCI

Les automates Siemens Vista® utilisent la technique LOCI pour le dosage de très nombreux analytes tels que la troponine, la thyroïdostimuline (TSH), l'hormone chorionique gonadotrope (HCG) ou encore la ferritine.

II.2. Nouveaux outils de reconnaissance moléculaire : les aptamères

II.2.1. Structure

Les aptamères sont des acides nucléiques de petite taille (oligonucléotides) simple brin en série ARN (acide ribonucléique) ou ADN (acide désoxyribonucléique) ayant été sélectionnés par méthode SELEX (Systematic evolution of ligand by exponential enrichment) pour reconnaître avec une forte affinité et de manière spécifique une cible.^{10,96} Il s'agit donc de courts polymères dont l'unité de base est le nucléotide. Un nucléotide étant constitué d'un pentose lié en 1' à une base azotée et en 5' à un, deux ou trois groupements phosphate (figure 13).

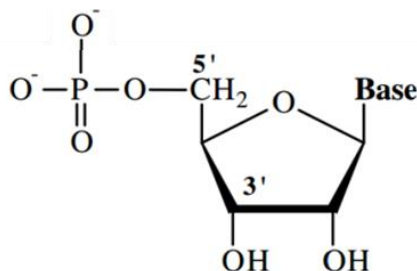


Figure 13 : Représentation d'un nucléotide monophosphate

Les aptamères sont ainsi définis par leur structure primaire, c'est-à-dire par leur séquence nucléotidique (généralement moins de cent nucléotides). Connaissant cette dernière, ils sont facilement synthétisés par voie chimique à la différence des anticorps dont le processus de synthèse biologique est plus lourd et plus difficilement standardisable.

Les oligonucléotides ont la faculté de former des appariements intra-caténaires en raison principalement, des interactions entre bases complémentaires de type « Watson-Crick » (appariements G ≡ C impliquant la formation de trois liaisons hydrogène ; appariements A = T (ADN) et A = U (ARN) n'impliquant que deux) (structure secondaire). Les aptamères vont s'organiser en motifs structuraux caractéristiques, responsables de leur structure tridimensionnelle et ayant une importance cruciale dans la reconnaissance de la cible. Il est à noter le rôle prépondérant des cations monovalents et divalents dans la stabilisation de ces structures. Les trois principaux motifs structuraux rencontrés dans les aptamères sont :

- La tige-boucle ou épingle à cheveux ou hairpin⁹⁷ (figure 14)

Deux domaines complémentaires d'un même brin s'apparient. Les nucléotides entre les deux régions forment une boucle.

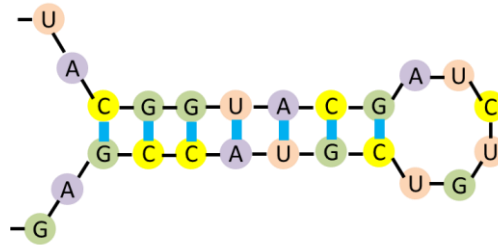


Figure 14 : Représentation d'une épingle à cheveux

- Pseudo-nœud^{98,99}

Il s'agit d'une structure en tige-boucle dont certains nucléotides de la boucle vont s'apparier avec une autre région de l'oligonucléotide, distincte de la tige (figure 15).

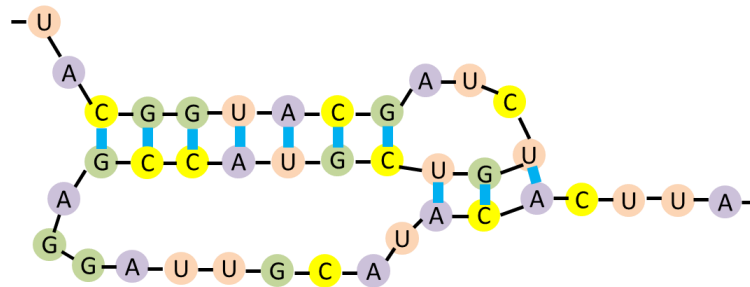


Figure 15 : Représentation d'un pseudo-nœud

- Tétrade de G ou G-Quadruplex¹⁰⁰

Cette structure repose sur des appariements de type Hoogsteen avec rapprochement de quatre guanines dans un plan cyclique pour former une structure en plateau. La présence d'un cation monovalent (potassium très souvent¹⁰¹) au centre des quatre guanines, stabilise la structure.¹⁰² Les G-Quadruplex sont formés par l'empilement de plusieurs structures planes (figure 16).

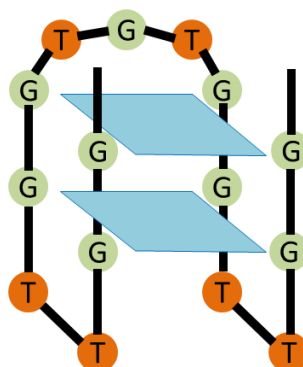


Figure 16 : Représentation d'un G-Quadruplex

II.2.2. Sélection par la méthode SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment)

Les aptamères sont sélectionnés *in vitro* grâce à une méthode de sélection appelée SELEX.¹⁰ Cette méthode a été décrite pour la première fois au début des années 1990.⁹⁶ L'atout principal de cette méthode est sa faculté à être mise en œuvre pour des cibles très hétérogènes quant à leur nature, leur structure ou leur taille. Il est ainsi possible de sélectionner un aptamère dirigé contre un cation inorganique tel que l'ion cuivrique Cu^{2+} ,¹¹ une petite molécule organique telle que la 25-hydroxy-vitamine D,¹² une protéine telle que la thrombine¹³ ou encore une cellule.¹⁴ Le protocole de sélection d'aptamères en série ADN comporte plusieurs étapes. S'agissant d'une approche combinatoire, la première étape consistera à synthétiser la banque d'oligonucléotides en série ADN. Ces derniers sont constitués d'une partie aléatoire de vingt à cinquante bases, encadrée par deux régions constantes qui seront nécessaires à l'étape d'amplification. La diversité atteinte est estimée à 10^{15} séquences oligonucléotidiques différentes.

La cible d'intérêt sera ensuite placée au contact de la banque. La diversité structurale de la banque étant considérable, quelques séquences reconnaîtront naturellement la cible et tout l'enjeu sera alors de séparer l'immense majorité des séquences libres de la minorité ayant reconnue la cible. Les techniques de séparation utilisées sont nombreuses, certaines comme la chromatographie d'affinité¹⁰³ ou les techniques utilisant des billes magnétiques,¹⁰⁴ nécessitent l'immobilisation de la cible d'intérêt sur un support solide. D'autres, telles que les techniques de centrifugation,¹⁰⁵ de filtration sur membrane de nitrocellulose^{106,107} ou d'électrophorèse capillaire¹⁰⁸ permettent de s'affranchir de cette étape d'immobilisation. Celle-ci présente en effet certains inconvénients : la présence d'un lien entre la phase solide et la cible peut altérer la reconnaissance de cette dernière par les oligonucléotides. De plus il sera nécessaire d'éliminer les oligonucléotides reconnaissant de manière non spécifique le support solide en faisant une étape de contre-sélection.

A l'issue de la séparation, les séquences affines seront amplifiées par PCR (Polymerase chain reaction). Au terme de cette étape, un cycle de sélection complet aura été effectué (figure 17), l'opérateur aura alors à sa disposition une banque restreinte d'oligonucléotides ayant une certaine affinité vis-à-vis de la cible. Il conviendra de répéter les cycles de sélection avec les candidats aptamères obtenus au cycle précédent, en changeant les conditions physico-chimique (pH, force ionique, tampon...) afin d'accroître l'affinité des oligonucléotides vis-à-vis de la cible. Après plusieurs cycles de sélection, les aptamères sélectionnés seront clonés et séquencés

ou seulement séquencés par séquençage haut débit. La dernière étape, qui n'est pas la moindre, consiste à choisir la ou les séquences aptamères parmi tous les candidats sélectionnés. Ce choix peut être guidé par l'utilisation de logiciels d'alignement de séquences (MEME,¹⁰⁹ PATTERNITY-seq,¹¹⁰ Kalign2¹¹¹), qui peuvent permettre d'identifier dans certains cas, des motifs consensus qui aideront au choix des séquences.

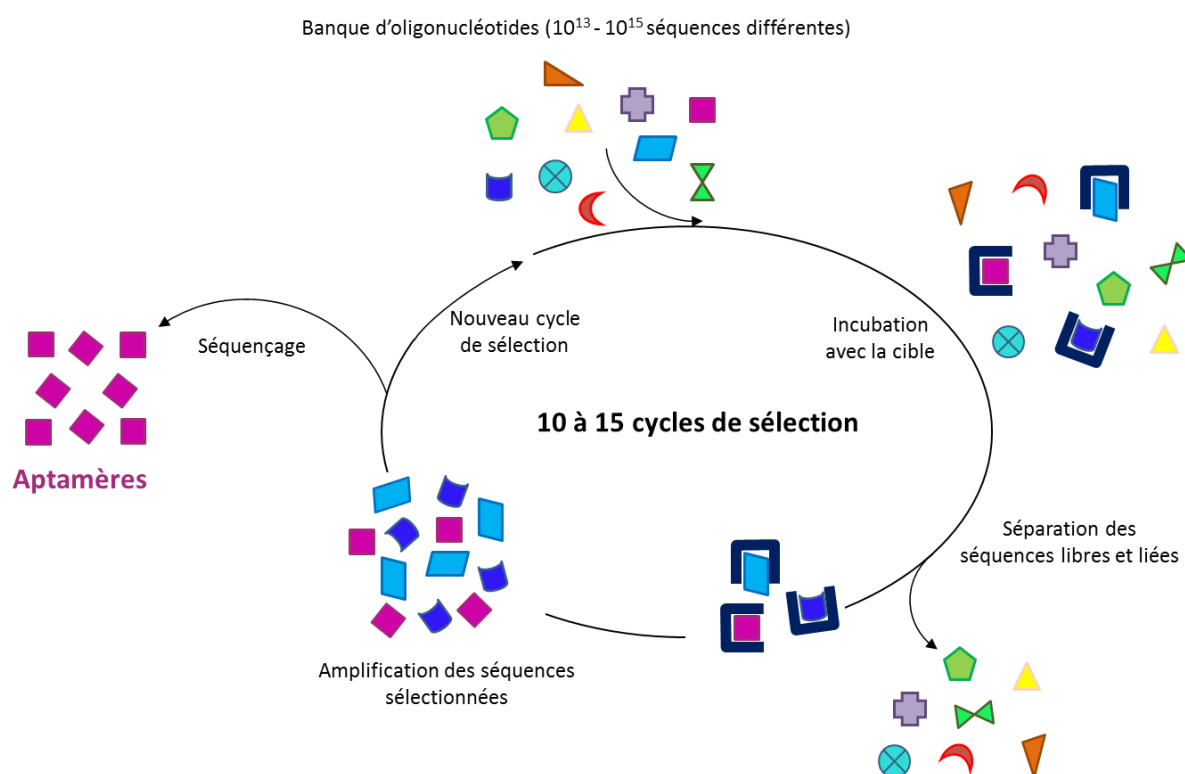


Figure 17 : Schématisation de la méthode SELEX

Le protocole de sélection d'un aptamère en série ARN est relativement semblable mais nécessite toutefois deux étapes supplémentaires : transcription de la banque d'oligonucléotide en série ADN afin d'obtenir une banque d'oligonucléotide en série ARN ; transcription inverse des oligonucléotides en série ARN avant les étapes d'amplification par PCR.

Sélectionner un aptamère reconnaissant une cible avec une forte affinité et de manière spécifique est une procédure longue pouvant durer plusieurs semaines avec les méthodes SELEX traditionnelles. Certains ont ainsi envisagé de nouveaux protocoles SELEX pour réduire le temps de sélection. Il s'agit notamment de la méthode one-step SELEX¹¹² consistant à n'effectuer qu'un seul cycle de sélection et de la technique du non-SELEX¹¹³⁻¹¹⁴ consistant à supprimer les étapes d'amplification des séquences affines entre les cycles de sélection.

La sélection par SELEX, d'aptamères dirigés contre des petites molécules peut également s'avérer difficile. Il a ainsi été décrit la technique de Capture-SELEX utilisant des billes magnétiques sur lesquelles les oligonucléotides sont immobilisés, la molécule d'intérêt étant libre en solution.¹¹⁵

II.2.3. Applications analytiques

Les aptamères sont des outils récents ayant des applications très nombreuses en analyse et en thérapeutique. Ils présentent des similitudes importantes avec les anticorps ce qui permet d'envisager la substitution des anticorps par les aptamères dans un but analytique.¹⁵ Les très nombreux articles scientifiques sur le sujet témoignent de la très forte valeur ajoutée des aptamères : synthèse chimique à faible coût, reproductible d'un lot à un autre, stabilité thermique, cibles potentielles très variées.

Les aptamères peuvent être utilisés en amont de la méthode analytique pour le prétraitement de l'échantillon. Il existe des cartouches d'extraction en phase solide au sein desquelles des aptamères ont été immobilisés. Ces cartouches commercialisées, permettent la purification d'échantillons contenant des mycotoxines (ochratoxine A et aflatoxines).^{116,117}

Les aptamères peuvent également être utilisés de manière combinée aux méthodes séparatives et en particulier aux méthodes chromatographiques. Ils seront alors immobilisés au sein de la colonne chromatographique afin de séparer des molécules d'un échantillon.¹¹⁸⁻¹¹⁹ La méthode SELEX permet la sélection d'aptamère présentant une forte énantiosélectivité, ce qui permet également de réaliser des séparations chirales.¹²⁰ Il est à noter le développement de tests rapides de type immunochromatographique utilisant des aptamères à la place des anticorps.¹⁶ Le développement de biocapteurs à base d'aptamères en diagnostic est actuellement en plein essor. Ceux basés sur des techniques de surface, ne nécessitent généralement pas de marquage particulier (« label-free »), mais l'immobilisation de l'aptamère ou de la cible sur une phase solide. Il s'agit notamment des biocapteurs utilisant des microbalances à quartz,¹²¹ des techniques électrochimiques,¹²² la technique de résonance des plasmons de surface (SPR),¹²³ la technique d'interférométrie en couche biologique¹²⁴ ou encore la technique de Spectroscopie Raman Exaltée de Surface.¹²⁵ Ils ont l'inconvénient d'être souvent lourds à mettre en œuvre car ils nécessitent un appareillage dédié.

La grande popularité des biocapteurs de type optique, utilisant des techniques de fluorescence ou d'absorbance moléculaire, vient justement de leur simplicité de mise en œuvre. Ils nécessitent généralement un marquage par un fluorophore,⁹⁷ un marquage indirect par une

enzyme par l'intermédiaire de la biotine¹²⁶ (utilisation de la très forte interaction biotine – streptavidine) ou plus rarement un marquage direct par une enzyme.¹²⁷

En raison de leur petite taille comparativement aux anticorps (≈ 10 kDa *versus* ≈ 150 kDa), les aptamères permettent d'envisager le dosage des petites molécules (< 3000 Da) avec double reconnaissance de la cible, ce qui permet d'accroître la spécificité de l'essai par rapport aux méthodes d'immunoanalyse. Cela est particulièrement intéressant en biologie médicale où l'immunoanalyse de type compétitive manque parfois cruellement de spécificité. Deux stratégies sont actuellement utilisées pour une double reconnaissance des cibles de petite taille :

- La première consiste à scinder un aptamère en deux fragments afin de réaliser une méthode de type « sandwich ». Les deux « néo-aptamères » ne pourront s'associer qu'en présence de la cible pour former un complexe ternaire (figure 18). Stojanovic *et al.* ont décrit cette technique à partir de l'aptamère anti-cocaïne.¹²⁸

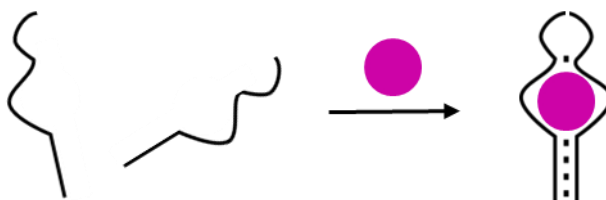


Figure 18 : Stratégie du "split-aptamer". Formation du complexe ternaire en présence de la cible.

- La seconde, développée par notre laboratoire (en collaboration avec l'équipe du Docteur Jean-Jacques Toulmé, Laboratoire ARNA - Université de Bordeaux), consiste à utiliser l'interaction boucle-boucle entre deux oligonucléotides, également appelée « complexe kissing », afin de réaliser un « pseudo-sandwich ». Cette stratégie nécessite au préalable une étape de conception d'un aptaswitch qui peut s'avérer délicate et qui n'est pas généralisable à tous les aptamères : l'aptamère initial doit se présenter sous forme déstructurée en l'absence de la cible, et former une tige boucle en présence de celle-ci, avec une boucle apicale n'intervenant pas dans la reconnaissance de la cible (figure 19A). Ces conditions étant posées, l'aptaswitch sera créé en substituant la séquence de la boucle apicale par une séquence permettant d'engendrer une interaction boucle-boucle avec un second oligonucléotide appelé aptakiss (figure 19B). Théoriquement, l'aptaswitch déstructuré en l'absence de la cible, ne permet pas la formation du « complexe kissing ».¹²³

Afin de décrire cette nouvelle stratégie, Durand *et al.* ont utilisé la technique de résonance des plasmons de surface (SPR) (nécessitant l'immobilisation de l'aptakiss) et

la technique d'anisotropie de fluorescence (nécessitant le marquage de l'aptakiss) contre deux cibles différentes, l'adénosine et la guanosine triphosphate (GTP). Les aptamères utilisés sont de nature différente : un en série ADN et un autre en série ARN.¹²³

Durand *et al.* ont ensuite sélectionné plusieurs couples de boucles par une approche de type SELEX dans le but de réaliser une plateforme de détection en multiplex qui consiste en la détection simultanée de plusieurs cibles dans un même échantillon.¹²⁹

Dans le but d'améliorer ces systèmes, Goux *et al.* ont notamment utilisé un troisième oligonucléotide, appelé agent bloquant, afin de réduire le signal non spécifique lié à l'interaction aptaswitch – aptakiss en l'absence de la cible.⁹⁷ Ils ont ensuite envisagé une technique d'amplification du signal utilisant des nanoparticules d'or avec révélation colorimétrique du système.¹³⁰

L'équipe du Docteur Jean-Jacques Toulmé, en collaboration avec une équipe de recherche Japonaise, a ensuite travaillé sur le développement de nanostructures à base d'acides nucléiques utilisant l'interaction aptaswitch – aptakiss. Ainsi, Takeuchi *et al.* ont mis en évidence par la technique de microscopie à force atomique la formation d'une nanostructure induite par la présence de GTP.¹³¹ Plus récemment, Azéma *et al.* ont décrit la formation d'un polymère induit par la présence d'adénosine à partir de monomères dérivés de l'aptaswitch anti-adénosine et de son aptakiss.¹³²

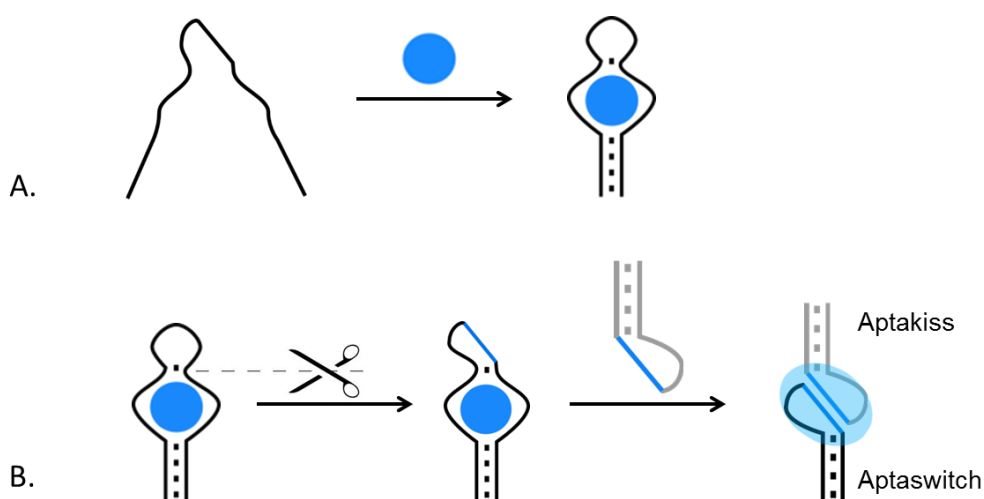


Figure 19 : A. Structures avec et sans la cible d'un aptamère pouvant être utilisé pour concevoir l'aptaswitch. B. Conception de l'aptaswitch.

II.2.4. Analyse de matrices complexes

Le premier obstacle à l'analyse de matrices complexes telles que les milieux biologiques (sérum, plasma, urine...) est la dégradation potentielle des aptamères par les nucléases omniprésentes dans les fluides biologiques¹³³ : les ribonucléases (RNases) catalysent la dégradation de l'ARN et les désoxyribonucléases (DNases) catalysent la dégradation de l'ADN. Une première solution est de modifier chimiquement les oligonucléotides, soit avant la méthode SELEX (exemple : utilisation de 2'-NH₂-2'-désoxypyrimidines¹³⁴) soit après (exemple : utilisation d'acides nucléiques verrouillés ou Locked Nucleic Acids (LNAs)¹³⁵ possédant un pont méthylène entre l'oxygène en 2' et le carbone en 4'), les nucléases ne pouvant dégrader que ceux en série naturelle. Les modifications post-SELEX ont l'inconvénient de pouvoir altérer l'affinité des aptamères sélectionnés vis-à-vis de la cible, mais ont l'avantage de ne pas gêner l'action des polymérases lors des phases d'amplification de la méthode SELEX. Inversement, les modifications pré-SELEX n'entraînent pas de perte d'affinité puisque la sélection est faite à partir de la banque modifiée, mais l'activité des polymérases peut être diminuée.

Une seconde solution particulièrement élégante est d'utiliser des nucléotides en série L pour la synthèse des aptamères, les enzymes de dégradation des acides nucléiques, stéréosélectives, ne reconnaissant que ceux en série D. Il conviendra de réaliser la sélection de l'aptamère (par la méthode SELEX) contre l'énantiomère de la cible d'intérêt, avec une banque d'oligonucléotide « standard » en série D. Après séquençage des aptamères obtenus, il sera possible de synthétiser l'énantiomère d'un des aptamères à l'aide de nucléotides en série L (riboses en série L, seuls constituants des acides nucléiques naturels, ayant un pouvoir rotatoire). L'aptamère en série L obtenu est appelé « spiegelmer » (« spiegel » signifiant « miroir » en Allemand). Il sera capable de reconnaître spécifiquement la cible d'intérêt (figure 20). De nombreux spiegelmers sont décrits dans la littérature. L'équipe de Fürste a notamment réussi à cibler la L-arginine¹³⁶ ainsi que la D-adénosine¹³⁷ grâce à cette stratégie.

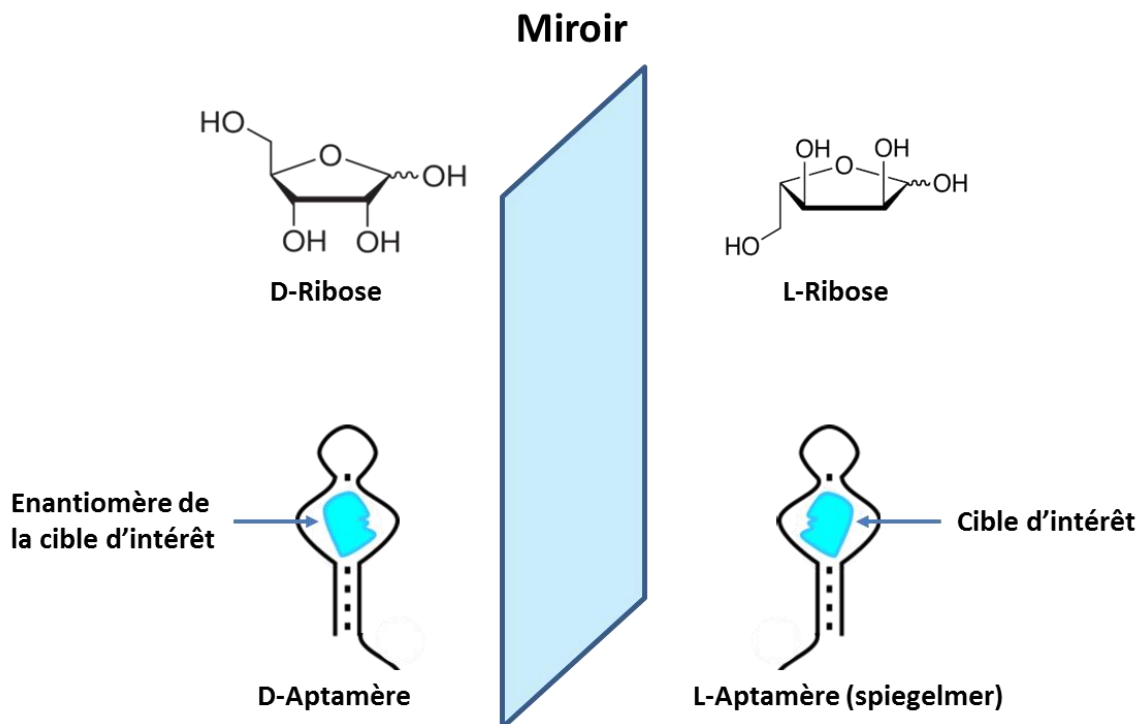


Figure 20 : Stratégie de l'image dans le miroir

Le second obstacle à l'utilisation des aptamères en milieu biologique est leur fixation non spécifique sur les protéines ainsi que leur hybridation partielle avec des brins complémentaires d'acides nucléiques.^{138,139} Lorsqu'ils sont fixés sur les protéines ou sur des acides nucléiques, les aptamères seront généralement inaptes à reconnaître la cible d'intérêt. Pour surmonter cette difficulté, plusieurs solutions peuvent être envisagées :

- 1) Augmenter la concentration relative d'aptamère : soit en augmentant la concentration absolue de l'aptamère soit en diluant l'échantillon dans le but de diminuer la concentration des protéines et des acides nucléiques (avec l'inconvénient que la limite de détection sera augmentée d'autant dans ce dernier cas).
- 2) Ajouter dans le milieu réactionnel un leurre en concentration importante. Il peut s'agir d'oligonucléotides ou de polymères anioniques permettant de saturer les protéines ou les acides nucléiques présents dans l'échantillon biologique.¹⁴⁰
- 3) Utilisation de spiegelmers : Seuls les acides nucléiques naturels en série D peuvent s'hybrider avec les acides nucléiques présents dans l'échantillon (en série D). De même, il est décrit une importante stéréosélectivité de la fixation des aptamères aux protéines, les acides nucléiques naturels en série D se fixant davantage que ceux en série L.^{138,139}

- 4) Prétraitement de l'échantillon (présente l'avantage d'éliminer également les nucléases) :
- a. Précipitation des protéines par mélange de l'échantillon avec un solvant organique (éthanol, méthanol...).^{141,142} Il s'agit d'une méthode courante en LBM pouvant être suivie d'une phase d'évaporation du solvant organique, ayant comme principal intérêt la simplification de la matrice.
 - b. Ultrafiltration de l'échantillon biologique.¹⁴² Cette technique est limitée à l'analyse des petites molécules, capables de traverser le filtre (exemple : filtres 3K ne laissant passer que les molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 3000 Da). L'ultrafiltration permet de simplifier la matrice en éliminant les protéines et la plupart des acides nucléiques (de taille supérieure à 10 nucléotides). Elle permet également d'accéder à la fraction libre de la cible d'intérêt.

La digestion des aptamères par les nucléases et leur fixation sur les protéines ou sur les acides nucléiques constituent des obstacles majeurs dont l'analyste devra impérativement tenir compte lors du passage en milieux complexes.

III. Précisions sur les techniques utilisées

Durant mon travail de thèse, nous avons fait le choix d'utiliser des méthodes de transduction du signal de type optique, utilisant des techniques de fluorescence ou d'absorbance moléculaire, pour le développement de techniques de dosage pour petites molécules. Ces méthodes sont faciles à mettre en œuvre et ne nécessitent pas d'investissement dans du matériel spécifique. Elles sont de plus omniprésentes en LBM, notamment sur les automates multiparamétriques de biochimie (immunoanalyse, techniques enzymatiques, techniques complexométriques).

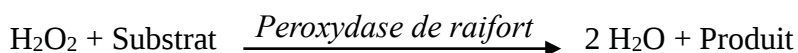
Au cours de la première partie de mon travail de thèse, la technique de spectrophotométrie UV-visible mesurant l'absorbance d'une solution, m'a permis d'évaluer l'amplification enzymatique du signal dans un système en phase hétérogène nommé ELAA (Enzyme-linked aptamer assay).

La technique d'anisotropie de fluorescence a été utilisée dans les deux parties suivantes, pour le développement de méthodes en phase homogène en utilisant des fluorophores liés de façon covalente aux oligonucléotides ou libres en solution (« label free »).

Un exposé de ces méthodes, décrites dans la littérature pour le dosage des petites molécules, facilitera la compréhension de mes travaux.

III.1. Les méthodes ELAA (Enzyme-linked aptamer assay)

Il s'agit de techniques en phase hétérogène avec amplification enzymatique ayant comme modèle les techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).¹⁴³ Ces dernières se sont développées à partir des années 1970^{8,143} à une époque où l'immunoanalyse avec antigène ou anticorps marqués n'était représentée que par la radio-immunoanalyse. Le marquage par une enzyme (*versus* radioélément) a donné beaucoup de souplesse, ce qui a contribué au succès de ces techniques. Les enzymes utilisées (généralement la peroxydase de raifort ou la phosphatase alcaline) permettent de catalyser la réaction de dégradation d'un substrat en un produit générant le signal mesuré. Exemple de la peroxydase de raifort (HRP pour *horseradish peroxidase*) :



Le substrat choisi est généralement un chromogène ce qui permet le suivi de la réaction enzymatique à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (mesure d'absorbance).

De la même façon que les techniques d'immunoanalyse sont classées en deux groupes (voir II.1.4), les méthodes ELAA sont classées en techniques à une seule reconnaissance dites compétitives et techniques à deux reconnaissances dites « sandwich ». Ces dernières sont

largement décrites dans la littérature pour le dosage des molécules de grande taille.^{13,144} Les méthodes par compétition pour petites molécules sont également bien documentées. Elles sont subdivisées (figure 21) en méthodes par compétition directe,^{126,145} lorsque la cible analyte entre en compétition avec la cible marquée (réactif) et en méthodes par compétition indirecte,^{145,146} lorsque la cible analyte entre en compétition avec la cible fixée sur la phase solide (l'aptamère est alors marqué).

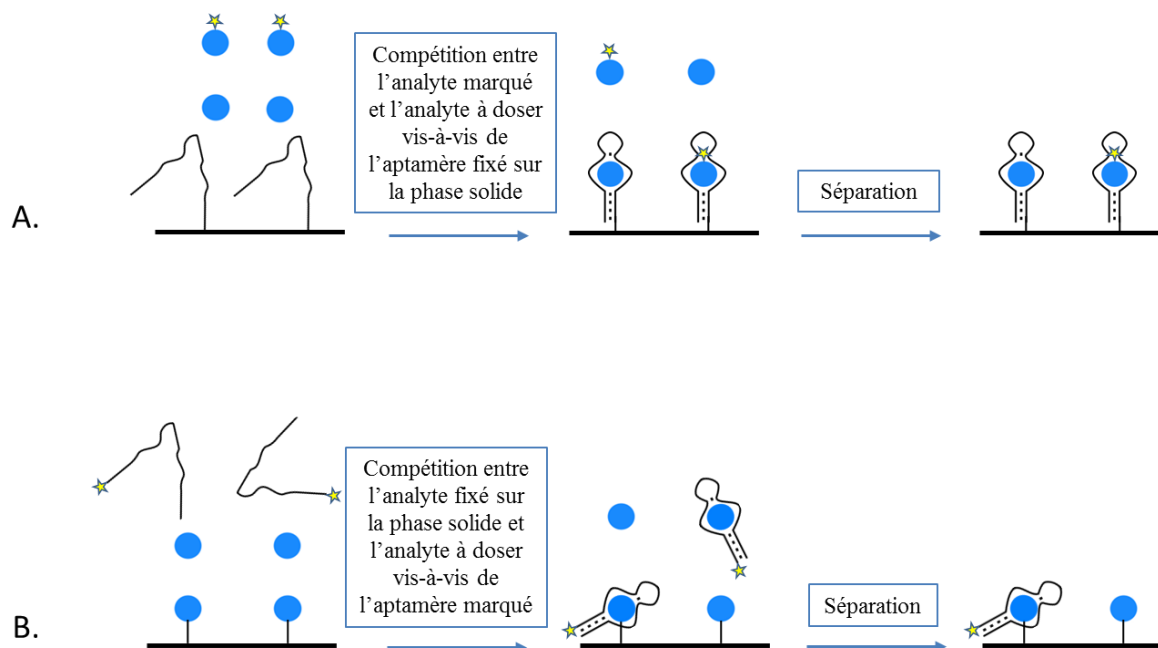


Figure 21 : A. Schéma de la méthode ELAA par compétition directe. B. Schéma de la méthode ELAA par compétition indirecte

En revanche, en ce qui concerne les méthodes à deux reconnaissances pour petites molécules, une seule stratégie avec détection enzymatique a été décrite. Il s'agit du clivage (figure 22) de l'aptamère reconnaissant la cible en deux fragments capables de former un complexe ternaire en présence de la cible.^{147,148} Cette méthode présente l'avantage d'accroître la spécificité de la reconnaissance de la cible et de permettre la mesure d'un signal « positif » contrairement aux méthodes compétitives. Elle a cependant l'inconvénient de diminuer l'affinité des deux « néo-aptamères » ce qui peut entraîner la détérioration de la limite de détection. Zhu *et al.* décrivent ainsi l'augmentation d'un facteur dix de la limite de détection de leur technique de dosage de l'adénosine lors du passage en « split-aptamer ».¹⁴⁹ En revanche, le biocapteur électrochimique basé sur cette stratégie décrit par Zhang *et al.* pour le dosage de la cocaïne, présente quant à lui une limite de détection améliorée par rapport aux autres systèmes utilisant cet aptamère.¹⁴⁷ Cela met en évidence que la limite de détection d'un système dépend en grande partie de l'affinité de l'aptamère mais aussi de la méthode de transduction du signal utilisée.

L'équipe d'Heemstra a proposé une amélioration de la stratégie du « split-aptamer » basée sur la ligation chimique des deux « néo-aptamères » afin de prévenir la dissociation du complexe ternaire et ainsi préserver la sensibilité du système.¹⁵⁰

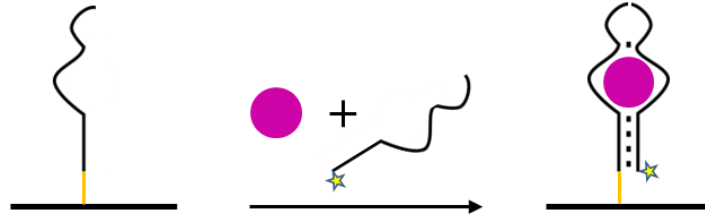


Figure 22 : Aptamère scindé en deux fragments ("split-apatmer"). L'un est fixé sur la phase solide et l'autre est marqué. Formation du complexe ternaire en présence de la cible.

III.2. La polarisation de fluorescence

Cette technique d'analyse déclinée de la fluorescence conventionnelle, est basée sur le principe de l'excitation photosélective par la lumière préalablement polarisée : les fluorophores dont l'orientation du moment de transition est parallèle à celle du vecteur champ électrique de la lumière polarisée, seront excités préférentiellement (figure 23).

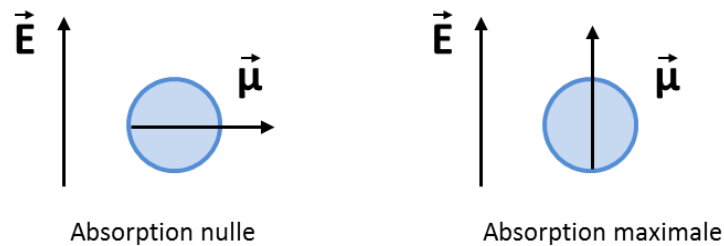


Figure 23 : Schématisation du principe de l'excitation photosélective

Durant le temps de vie de l'état excité, tout changement d'orientation du fluorophore entrainera une dépolarisation de la lumière émise. Ainsi un fluorophore avec un degré de liberté élevé émettra une lumière peu polarisée à l'inverse d'un fluorophore plus contraint.

Le degré de polarisation de la lumière émise peut être évalué par l'anisotropie de fluorescence r ou par le degré de polarisation p , calculés après mesure de l'intensité de la lumière émise, polarisée soit dans la même direction que l'excitation ($I_{//}$) soit dans une direction perpendiculaire ($I_{\perp}$) :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2 I_{\perp}} \text{ et } p = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}$$

Le dénominateur dans la formule de l'anisotropie de fluorescence (r) représente l'intensité totale de fluorescence alors que dans la formule du taux de polarisation (p) il s'agit de l'intensité de fluorescence dans la direction d'observation. En sciences analytiques, l'utilisation de r est privilégiée car les relations qui en découlent sont plus simples d'utilisation.¹⁵¹

L'équation de Perrin permet également de calculer l'anisotropie r dans un modèle où le fluorophore est assimilé à une sphère : $r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}}$

Avec r_0 l'anisotropie de fluorescence fondamentale (anisotropie en l'absence de tout processus de dépolarisation), τ le temps de vie de l'état excité et θ le temps de corrélation rotationnelle. Plus r est élevé, plus la lumière émise est polarisée.

Prenons le cas d'un fluorophore couplé à un ligand. La fixation du ligand sur sa cible modifiera l'environnement du fluorophore, ce qui peut entraîner un changement du temps de vie de l'état excité (τ) et / ou du temps de corrélation rotationnelle (θ) à l'origine d'une variation de l'anisotropie de fluorescence. Chacune des formes du ligand marqué aura sa propre anisotropie de fluorescence, r_f pour la forme libre et r_b pour la forme liée à la cible. D'après la loi d'additivité, on a alors l'anisotropie du mélange r qui est égale à la somme des anisotropies individuelles pondérées par la fraction de contribution à la fluorescence (f_f pour la forme libre et f_b pour la forme liée) : $r = f_f \cdot r_f + f_b \cdot r_b$

$$\text{Avec } f_f = \frac{m_f}{m_f + m_b \times \frac{q_b}{q_f}} \text{ et } f_b = \frac{m_b \times \frac{q_b}{q_f}}{m_f + m_b \times \frac{q_b}{q_f}}$$

Où m_f et m_b représente la fraction molaire de la forme libre et liée du ligand, et q_b et q_f le rendement quantique de la forme libre et liée du ligand.

Ces principes ainsi décrits vont nous permettre de comprendre leur utilisation avec les outils de reconnaissance moléculaire.

III.2.1. Utilisation avec les anticorps

La technique FPIA (Fluorescence polarization immunoassay) est une technique d'immunoanalyse (voir II.1.4.1) utilisant la polarisation de fluorescence, destinée au dosage des petites molécules.^{8,152} Elle met en compétition l'analyte à doser avec l'analyte marqué (réactif) vis-à-vis d'un anticorps anti-analyte. Lorsque l'analyte marqué est fixé sur l'anticorps, l'anisotropie de fluorescence mesurée est importante en raison de la masse élevée de l'anticorps (temps de corrélation rotationnelle θ important). La présence dans l'échantillon d'analyte à

doser entraînera le déplacement de l'analyte marqué qui aura alors un degré de liberté élevé à l'origine de la diminution de l'anisotropie de fluorescence mesurée.

En LBM, cette technique permet, depuis de nombreuses années, le dosage des petites molécules et en particulier des médicaments et toxiques. La concurrence des méthodes turbidimétriques, immunoenzymatiques et chimiluminescentes est importante mais la part de marché de cette technique pour ces analytes est tout de même comprise entre 5 et 15 %. Le rapport PROBIOQUAL d'octobre 2017 indique par exemple que sur les 227 laboratoires participant pour le dosage du phénobarbital plasmatique, 21 ($\approx 10\%$) utilisent la FPIA.

III.2.2. Utilisation avec les aptamères

De nombreuses techniques sont décrites dans la littérature mais aucune n'est à ce jour utilisée en routine en LBM. Tel que décrit par notre équipe dans la revue de la littérature intitulée « Panoply of Fluorescence Polarization/Anisotropy Signaling Mechanisms for Functional Nucleic Acid-Based Sensing Platforms »¹⁵³ (annexe) trois stratégies peuvent être utilisées pour le dosage des petites molécules (elles seront détaillées dans la revue) :

- Une stratégie basée sur la modification du temps de corrélation rotationnelle θ en raison de l'augmentation de la masse apparente du fluorophore. Cette stratégie est largement majoritaire, les techniques en format compétitif étant les plus représentées.¹⁵⁴ Les techniques en format non compétitif font appel soit à un aptamère scindé en deux,^{128,150} soit à l'interaction boucle-boucle entre deux oligonucléotides,¹²³ soit à la digestion nucléotidique enzymatique.¹⁵⁵
- Une stratégie basée sur la modification du temps de corrélation rotationnelle (θ) en raison d'une modification de la mobilité locale du fluorophore.¹⁵⁶
- Une stratégie basée sur la modification du temps de vie de l'état excité (τ). A ce jour, la méthode décrite dans le cadre de ma thèse utilisant le SYBR Green pour le dosage « label-free » de petites molécules, est la seule technique décrite.¹⁵⁷

Résultats et discussion

I. Développement d'un système de dosage en phase hétérogène pour l'adénosine et la théophylline en utilisant la stratégie « complexe kissing »

Stratégie

Les techniques en phase hétérogène sont utilisées en LBM, soit sous forme automatisée sur un automate multiparamétrique de biochimie, soit sous forme de techniques manuelles. Le cas échéant, l'automatisation est rendue un peu plus complexe qu'en phase homogène en raison de l'étape cruciale de séparation de la forme libre et liée du traceur. Les techniques manuelles présentent l'avantage d'être faciles à mettre en œuvre ne nécessitant généralement qu'un appareillage simple tel qu'un spectrophotomètre UV-visible ou qu'un compteur de radioactivité. Elles seront privilégiées pour les analyses peu fréquentes permettant de travailler en série de façon hebdomadaire voire mensuelle, l'automatisation n'étant alors pas rentable. C'est le cas par exemple, au laboratoire du CHU de Grenoble, du Téloptide C terminal du collagène (CTx) dosé par technique ELISA « sandwich » ou encore de la testostérone dosée par radio-immunoanalyse.

L'adénosine (267,2 g/mol) et la théophylline (180,2 g/mol) sont des cibles de petite taille qui ont été utilisées comme modèles dans ce travail (bien que la théophylline puisse être dosée en LBM, ces dosages ne présentent que peu d'intérêt en analyse biologique). Leur dosage en phase homogène par polarisation de fluorescence utilisant la stratégie « complexe kissing » précédemment expliquée a été développée par notre laboratoire.⁹⁷ Notre but sera de mettre en œuvre cette stratégie pour la première fois en phase hétérogène en utilisant une méthode ELAA (Enzyme-linked aptamer assay). L'amplification enzymatique du signal avait également pour but d'améliorer la limite de détection du système.

Nous avons utilisé comme phase solide des puits de la marque Corning® porteurs de fonctions N-Oxysuccinimides à leur surface, permettant l'immobilisation d'oligonucléotides porteurs d'une fonction amine.¹⁴⁸ Les couples aptaswitch – aptakiss utilisés ont été décrits dans la littérature.^{97,129} Les aptaswitch ont été modifiés par ajout en 5' d'une fonction amine espacée de l'oligonucléotide par un linker C₁₂ (permettant à l'aptaswitch de ne pas être trop contraint). Une fois greffé par lien covalent (fonction amide), l'aptaswitch peut se structurer en tige boucle en présence de la cible ce qui permet l'interaction boucle-boucle avec l'aptakiss biotinylé. L'enzyme (peroxydase de raifort) couplée à la streptavidine peut alors se fixer sur l'aptakiss (interaction biotine-streptavidine). Finalement, le système est révélé par ajout du substrat de l'enzyme (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine). Après arrêt de la réaction enzymatique par addition

d'acide sulfurique, l'absorbance est lue à 450 nm sur un spectrophotomètre UV-visible (figure 24).

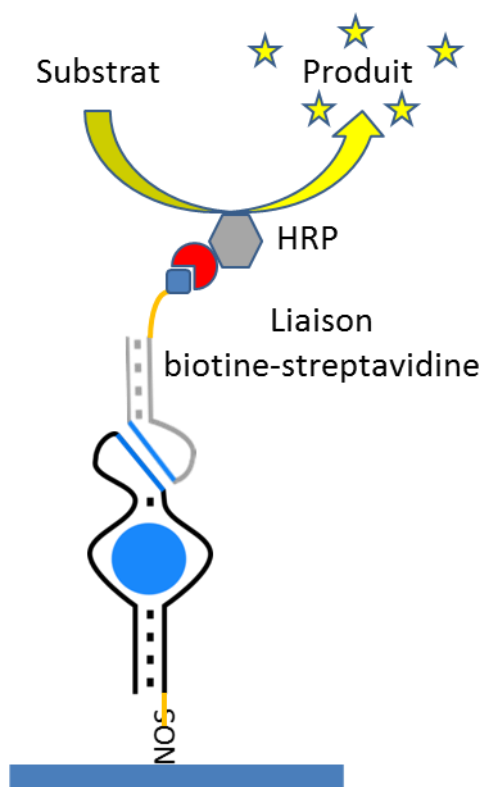


Figure 24 : Schéma de la méthode *Enzyme-linked aptamer kissing complex assay (ELAKCA)*

En théorie, l'aptaswitch déstructuré en l'absence de la cible, ne devrait pas pouvoir interagir avec l'aptakiss. Expérimentalement, il a été observé un bruit de fond relativement important lié à l'interaction non spécifique aptaswitch-aptakiss. Pour remédier à ce problème, un troisième oligonucléotide ayant le rôle d'agent bloquant a donc été utilisé pour éviter la fixation de l'aptakiss sur l'aptaswitch.⁹⁷ Celui-ci est complémentaire de la séquence de l'aptaswitch impliquée dans l'interaction boucle-boucle ce qui défavorise l'interaction aptaswitch-aptakiss en l'absence de la cible. L'ajout de la cible permet le déplacement de l'agent bloquant et la structuration de l'aptaswitch.

Cette stratégie a donc été testée sur deux modèles différents et également en milieu complexe pour évaluer son utilisation potentielle en LBM.

ELAKCA: Enzyme-Linked Aptamer Kissing Complex Assay as a Small Molecule Sensing Platform

Benoît Chovelon,^{†,‡} Guillaume Durand,[§] Eric Dausse,[§] Jean-Jacques Toulmé,[§] Patrice Faure,^{‡,||} Eric Peyrin,^{*,†} and Corinne Ravelet^{*,†}

[†]University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

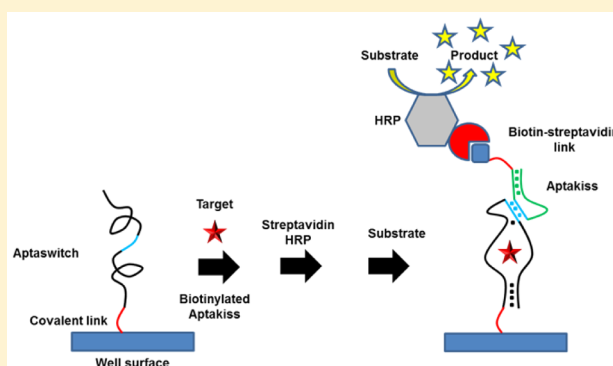
[‡]Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble Site Nord - Institut de Biologie et de Pathologie, F-38041 Grenoble, France

[§]Laboratoire ARNA, Université Bordeaux, Inserm U869, F-33076 Bordeaux, France

^{||}University Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxia Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France

Supporting Information

ABSTRACT: We report herein a novel sandwich-type enzyme-linked assay for the “signal-on” colorimetric detection of small molecules. The approach (referred to as enzyme-linked aptamer kissing complex assay (ELAKCA)) relied on the kissing complex-based recognition of the target-bound hairpin aptamer conformational state by a specific RNA hairpin probe. The aptamer was covalently immobilized on a microplate well surface to act as target capture element. Upon small analyte addition, the folded aptamer was able to bind to the biotinylated RNA hairpin module through loop–loop interaction. The formed ternary complex was then revealed by the introduction of the streptavidin-horseradish peroxidase conjugate that catalytically converted the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate into a colorimetric product. ELAKCA was successfully designed for two different systems allowing detecting the adenosine and theophylline molecules. The potential practical applicability in terms of biological sample analysis (human plasma), temporal stability, and reusability was also reported. Owing to the variety of both hairpin functional nucleic acids, kissing motifs, and enzyme-based signaling systems, ELAKCA opens up new prospects for developing small molecule sensing platforms of wide applications.



Enzyme-linked sorbent assays are very popular analytical methods in numerous areas including clinical chemistry, environmental monitoring, or food safety. The enzyme-based signal amplification, the ability for the high-throughput analysis and the potentiality to use colorimetric products (requiring no specialized and costly equipment) are the major attractive features of the technique. Immunological assays such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) currently represent the most prevalent platforms which are commercially available for many applications. However, the use of antibodies as recognition elements presents some important limitations, notably in terms of batch-to-batch variability, temporal stability, and cost for analysis.¹

As an attractive alternative, nucleic acid aptamers have emerged as replacement or complementary probes for enzyme-linked sorbent assays. The so-called enzyme-linked aptamer assay (ELAA) has been first described for the detection of proteins.² In this case, sandwich ELAA using either two aptamers or one aptamer in combination with one antibody is commonly privileged for improving the assay sensitivity and specificity.^{3–7} Many examples of ELAA have been later

reported for the quantification of small molecules such as food contaminants and biomarkers.^{8–12} However, because of the small size of targeted species, they are mostly based on competitive formats that led to “signal-off” assays of limited sensitivity and precision. To date, only one strategy has been reported to circumvent the problem. This involves the split aptamer concept in which an aptamer is cut into two fragments that self-assemble in the presence of target.¹³ By immobilizing one split aptamer fragment onto a microplate surface and by tagging the other one for enzymatic amplified detection, sandwich-type ELAA have been successfully achieved,^{14,15} along lines resembling to the open-sandwich ELISA approach.¹⁶ The major drawback of the split aptamer-based ELAA is related to the reduced binding affinity of the cleaved aptamer. Therefore, in order to prevent the dissociation of the ternary complex during the washing steps of ELAA, Heemstra and co-workers have introduced an elegant ligation strategy

Received: December 2, 2015

Accepted: February 2, 2016

Published: February 2, 2016



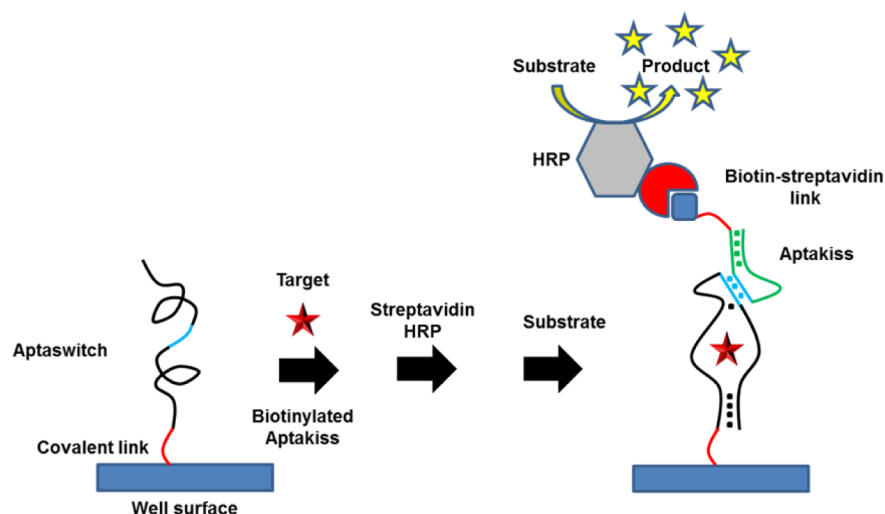


Figure 1. Schematic illustration of the ELAKCA strategy using the horseradish peroxidase-based colorimetric detection system.

between the two fragments of the split aptamer.^{17,18} Despite the improved assay performances, this method suffers from additional functionalization steps of the two DNA strands, careful optimization of the reactive groups, and extended assay time for the ligation process.

In the present work, we describe a novel small molecule sandwich-type ELAA strategy relying on the formation of a nucleic acid assembly based on a kissing complex (referred to as enzyme-linked aptamer kissing complex assay (ELAKCA)). The detection principle is depicted in Figure 1. The aptamer is engineered in such a way that the binding of the small target shifts its conformation from an unfolded to a folded hairpin shape (aptaswitch). The apical loop of the parent aptamer is substituted by a short RNA sequence (in blue in Figure 1) liable to interact with the loop of a second RNA hairpin (aptakiss) so that the folded structure of the aptaswitch is recognized through the formation of a kissing complex.^{19–21} The aptaswitch is then immobilized onto the well surface to serve as the target capture element whereas the aptakiss is labeled to allow the enzyme-linked target detection by establishing the specific loop–loop interaction with the target-bound aptaswitch.

ELAKCA was performed for two different systems involving the adenosine and theophylline small targets and their corresponding aptaswitch capture elements and aptakiss probes. Assays were subsequently used in the context of human plasma sample analysis, and both the temporal stability and the reusability ability of the aptaswitch-functionalized well surfaces were investigated.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents. Adenosine, guanosine, caffeine, bovine serum albumin (BSA), tween 20, and Protect RNA were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France). NaCl was obtained from Chimie-Plus Laboratoires (Bruyères de Pouilly, France). Hypoxanthine was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France), 3-methyluric acid and 1-methyl xanthine were obtained from Siccip-emmop (Marseille, France). Theophylline was purchased from TCI Europe. Water was obtained from a Direct-Q 3UV water purification system (Millipore, Saint-Quentin en Yveline, France) fitted with reverse osmosis and exchange-ion cartridges. MgCl₂ and EDTA were supplied by Carloth (Lauterbourg, France).

Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, streptavidin–HRP conjugate, and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (UltraTMB) substrate were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). All oligonucleotides (listed in Table S1) were synthesized and HPLC-purified by Eurogentec (Angers, France). DNA-BIND 1 × 8 Stripwell 96-well plates (amine binding, *N*-oxysuccinimide surface) were purchased from Corning Incorporated.

Colorimetric Detection of Adenosine and Theophylline. The oligonucleotide stock solutions were prepared in pure water at 10^{−4} or 10^{−5} M and stored at −20 °C. The working solutions of aptaswitches, BA, aptakisses were prepared from the stock solutions by diluting with the concentrated appropriate buffer.

Amino-functionalized aptaswitch was dissolved in grafting buffer (500 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 8.5). The 100 μL/well aptaswitch solutions were added into a DNA-BIND stripwell plate at a concentration of 50 pmol/well. The wells were coated with reactive NHS, which could covalently couple with amino-modified oligonucleotides. After 75 min incubation at room temperature and small mechanical agitation, the plate was washed three times by filling each well with 200 μL of washing buffer (20 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄, pH = 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.05% Tween 20) to remove the unbound aptaswitch. The wells were blocked by 1 h incubation with 200 μL grafting buffer containing 5% BSA at 37 °C and washed three times as described above.

A volume of 100 μL of kissing buffer (20 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄, pH = 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) containing the aptakiss (0.4 pmol/well for adenosine or 0.3 pmol/well for theophylline), the blocking DNA strand (BA1 for adenosine or BA4 for theophylline, 5 pmol/well) and the corresponding target were then added into each well and incubated for 25 min at 4 °C. After emptying, 100 μL/well of 5 ng streptavidin–HRP (in kissing buffer) was added. Following 5 min reaction at 25 °C, 100 μL/well of UltraTMB was added after washing three times with 400 μL of kissing buffer. The mixture was kept for 5 min at 25 °C and 25 μL of 2 M H₂SO₄ were finally added. Following the stop reaction, the solutions were transferred into a microcell and the absorbance signal was measured at 450 nm using a Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer. Calibrations curves were performed in triplicate. The concentration range was 0 to 1000 μM for adenosine and 0 to 62.5 μM for theophylline.

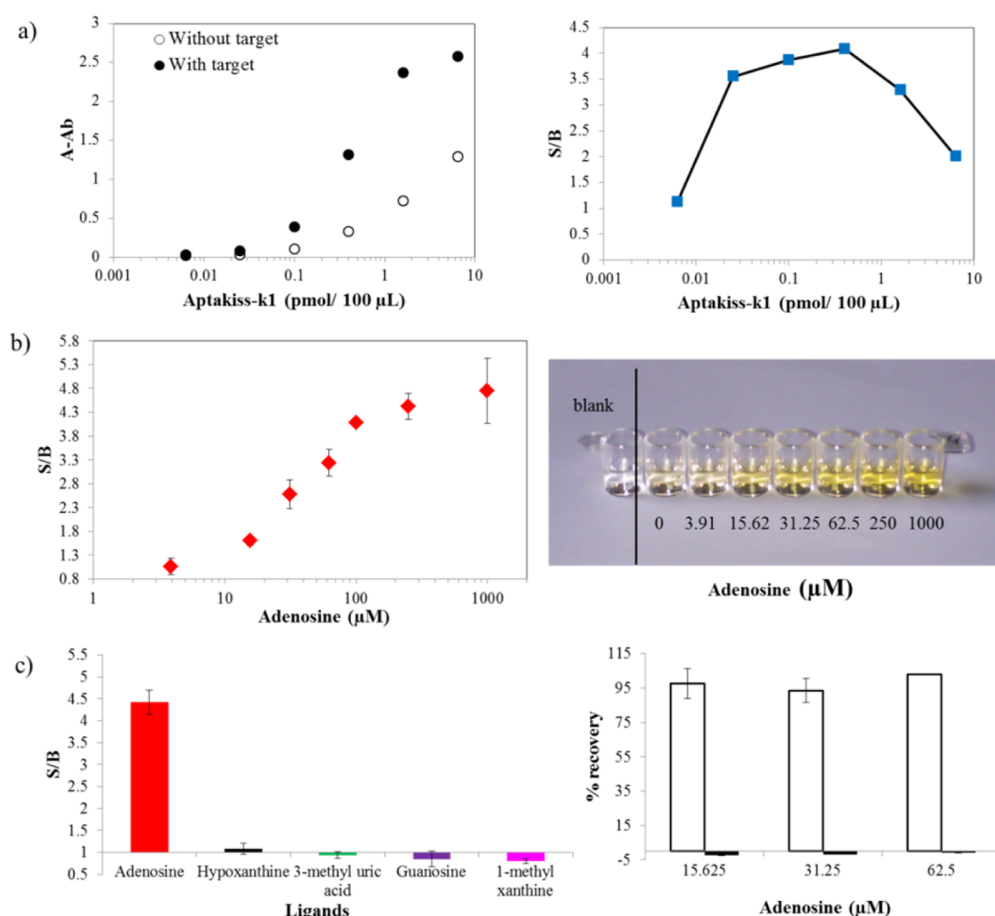


Figure 2. (a) Left: colorimetric response change of ELAKCA upon addition of various amounts of aptakiss-k1, in the absence and in the presence of adenosine (100 μ M). A is the absorbance signal and A_b the blank absorbance signal (without aptakiss-k1 and target). Right: the resulting S/B change where $S = A - A_b$ and $B = A_0 - A_b$ (A_0 is the absorbance signal in absence of target). (b) Left: Dose-response (S/B) curve for adenosine using ELAKCA. Right: Picture of the corresponding colorimetric response for different adenosine concentrations (blank is also shown). (c) Left: Specificity study of ELAKCA using adenosine and different noncognate ligands (at 250 μ M). Right: Recovery of adenosine from spiked samples with (white) and without (black) ultrafiltration-based plasma pretreatment.

Recovery of Analytes from Spiked Human Plasma.

The blood was collected in a lithium heparin tube (BD Vacutainer) of 4 mL by venipuncture in the elbow fold of a laboratory volunteer. After centrifugation (10 min, 2 000g at 20 $^{\circ}$ C), a volume of 350 μ L of plasma was initially spiked with a stock solution of 10 mM adenosine. Dilutions were realized in plasma in order to obtain three different concentrations of adenosine (15.6, 31.3, and 62.5 μ M). Each sample was added to a Nanosep 3K centrifugal device (Pall) spin column and then spun at 12 000g for 1 h in a MIKRO 220 R centrifuge. After spinning, the ultrafiltrate was added to a new Nanosep 3K for a second centrifugation at 11 000g during 25 min, the operation was renewed one time at 9 000g during 15 min. A volume of 100 μ L of the resulting ultrafiltrate was mixed with 100 μ L of BA1 and 100 μ L of aptakiss-k1 and put down on the plate. For theophylline, the procedure used was similar. The plasma concentrations of theophylline before ultrafiltration on Nanosep 3K were 2.0 μ M and 7.8 μ M.

Storage Study. After the aptaswitch immobilization step, wells were washed three times by 200 μ L of washing buffer. A volume of 300 μ L of storage buffer (washing buffer containing 0.2% of protect RNA) were added in every well. After the storage step at 4 $^{\circ}$ C during 2 days or 14 days, wells were washed three times by 200 μ L of washing buffer, and then the normal protocol was taken back by the BSA blocking step.

Reusability Study. After realization of a calibration curve, wells were washed five times with complex kissing elimination buffer containing EDTA (20 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , pH = 5.1, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 0.05% Tween 20, EDTA 20 mM). During each of five cycles of washing, the buffer was maintained 6 min at room temperature in the wells. Wells were washed three times by 200 μ L of washing buffer and the normal protocol was taken back by the BSA blocking step.

RESULTS AND DISCUSSION

In the first stage of the work, we aimed to demonstrate the proof-of-principle of ELAKCA by using the aptaswitch-aptakiss couple specific to adenosine (ADOsw-28/aptakiss-k1, see Table S1 for sequences). These functional oligonucleotides have been previously constructed to develop other kinds of kissing complex-based aptamer sensing platforms.^{19,20} Their design involved different key steps. The kissing motifs were initially identified from an artificial repertoire of RNA hairpins.¹⁹ The aptamer sequence was subsequently engineered to convert the recognition element into a target-responsive hairpin aptaswitch. The aptamer structure was first partly destabilized by shortening the stem by some base pairs at the bottom of the hairpin.^{19,20} This truncation provided a large single-stranded internal loop in the central region of the

unbound oligonucleotide, allowing promotion of the target-induced structural variation from an inactive unfolded to an active folded state. A RNA sequence (extracted from identified kissing motifs and thus prone to interaction with its corresponding hairpin aptakiss) was next inserted into the aptaswitch loop. No significant alteration in the target affinity was expected as the apical loop of adenosine hairpin aptamer is not involved in the binding to the ligand. Moreover, the ability of the designed aptaswitch to maintain the functional folding and target binding features of the aptamer was demonstrated.^{19,20}

The ELAKCA protocol that used a horseradish peroxidase (HRP)-based colorimetric detection was detailed in the [Experimental Section](#). Briefly, 5'-amine-C12-modified ADOsw-28 was initially coupled to the DNA-BIND plate surfaces covalently linked to *N*-oxysuccinimide ester (NHS) groups through an amide bond. After blocking remaining NHS groups on the solid surface with bovine serum albumin and cleaning the well with the washing buffer, the target and the biotinylated aptakiss-k1 were added to the 96-well microplate. Following a further washing step, the streptavidin-HRP was subsequently added into the wells to react with the biotinylated aptakiss bound to the immobilized ADOsw-28-adenosine complex. Finally, the unbound streptavidin-HRP was removed and the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate (UltraTMB) of HRP was added to produce the target-related absorbance signal.

We initially carried out experiments with a 5'-amine-C12-modified test DNA oligonucleotide (30 nt) and a biotinylated DNA complementary strand (CS, used as target). We intended to evaluate (i) the procedure efficiency of the amino-oligonucleotide immobilization onto the well surface and (ii) the ability of the streptavidin-HRP to signal the presence of the hybridized CS target. The 450 nm absorbance linearly increased when the amount of the CS target added to the wells was increased, showing the effectiveness of the overall enzyme-linked sorbent assay protocol (see [Figure S1](#) for CS calibration curves).

Once this step completed, we translated the methodology to the adenosine ELAKCA. The optimal experimental conditions for the formation of the kissing complex were previously established, i.e., 20 mM phosphate buffer, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂.^{19,20} In a sandwich enzyme-linked assay, one of the most important parameters to optimize is the amount of detection element. The effect of the aptakiss-k1 concentration on the generated signal-to-background change (*S/B*, where *S* and *B* represent the colorimetric response in the presence and absence of target, respectively) was then investigated (ADOsw-28 = 50 pmol/well, [Figure 2a](#)). To improve the response, a DNA strand (BA) blocking the aptakiss binding to the free aptaswitch was added to the wells (see the sequence in [Table S1](#)).^{20,21} At low amounts of aptakiss-k1, almost no significant absorbance was observed in the absence of adenosine. In accordance with the target-induced formation of the kissing complex, an enhancement of the colorimetric signal was reported upon cognate ligand addition ([Figure 2a](#), left). The optimal *S/B* value was reached for an aptakiss-k1 amount of 0.4 pmol/well (see [Figure 2a](#), right). [Figure 2b](#) (left) displays the dose-response curve constructed under these conditions. The detection limit (based on $3\sigma/S$, where σ is the standard deviation of the response in absence of target and *S* the slope of calibration curve linear part, see [Figure S2](#)) was estimated to 5 μ M with a dynamic range up

to 250 μ M. As also presented in [Figure 2b](#) (right), the adenosine detection by naked eyes was feasible. A variety of noncognate ligands did not produce any consequent response, demonstrating the specificity of the assay ([Figure 2c](#), left).

We next assessed the general applicability of ELAKCA by using another hairpin aptamer directed against a clinically relevant target (theophylline).²² Theophylline is a drug used in the treatment of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. Because of the wide variation in metabolism between patients and the narrow therapeutic index (20–100 μ M) of this drug, monitoring of theophylline concentrations in blood is essential.²³ A kissing prone motif was recently identified and inserted into the parent aptamer to design an all-RNA theophylline aptaswitch (THEOsw-4').²⁴ Folded THEOsw-4' recognizes the aptakiss-k4 hairpin through specific loop-loop interaction. Both the general ELAKCA procedure and the operating conditions were similar to those described for the adenosine detection (see [Table S1](#) for sequences). As shown in [Figure S3](#), we reached a maximal *S/B* value for 0.2–0.4 pmol/well of biotinylated aptakiss-k4 (THEOsw-4' = 50 pmol/well). The theophylline titration curve is presented in [Figure S4](#). The estimated detection limit was 0.5 μ M with a dynamic range up to 30 μ M. ELAKCA was found to be specific to theophylline as caffeine did not generate signal ([Figure S4](#)).

Several optical sandwich-type aptasensors have been described for the adenosine (and analogues) and theophylline sensing. They are based either on the split-aptamer strategy or on the kissing-complex aptamer approach, involving fluorescence, excimer-based fluorescence, quantum dot assembly mediated fluorescence quenching, and fluorescence anisotropy as transduction techniques.^{13,19,20,25–29} [Table S2](#) displays the reported detections limits. Colorimetric ELAKCA appears to be competitive with some of these methods.^{13,19,20,25–27} However, it appears much less sensitive than excimer and quantum dot-based fluorescent sensing platforms.^{28,29} Improved performances of ELAKCA are expected by decreasing the background absorbance ([Figure 2a](#), left). This could be achieved through further optimization of the kissing motifs to better discriminate between the free and the target-bound states of the aptaswitch.²⁰ Works along this line are currently ongoing in our laboratories.

We further aimed to use the two described ELAKCAs in the context of biological sample analysis. Human plasma samples were spiked with known amounts of analyte and then treated to remove nucleases³⁰ as well as proteins that could interact nonspecifically with functional oligonucleotides.³¹ The plasma treatment procedure implied ultrafiltration through a 3000 Da molecular weight cutoff spin column.³² ELAKCAs were next carried out with the collected ultrafiltrates. For adenosine, an excellent overall recovery of $98 \pm 5\%$ was obtained whereas no target was recovered in the absence of plasma pretreatment ([Figure 2c](#), right). On the other hand, an underestimated recovery of $38 \pm 8\%$ was reported for the theophylline assay (data not shown). As the ultrafiltration technique allows isolating the free drug from its blood protein-bound fraction,³³ the recovered theophylline corresponds indeed to its unbound form. The theophylline protein binding is known to be in the 40–60% range for fresh blood samples.³⁴ The free theophylline level measured here is thus in agreement with the expected one. This data suggests that the reported approach could provide an estimate of the therapeutically relevant fraction.³⁵

We finally evaluated the temporal stability of the aptaswitch-grafted surfaces as well as their possibility to be regenerated for

a repeated use. The ADOsw-28-functionalized microplate wells preliminary impregnated with a RNase inhibitor (ProtectRNA) were investigated for their capability to remain active after different storage times. As shown in Figure S5a, almost no change in the assay response was observed after 2 weeks of storage. The reusability of the binding surfaces was analyzed by using different regeneration protocols. These involved washing by EDTA at various temperatures. As Mg^{2+} is essential to both the kissing complex formation and the target binding to aptaswitch, the divalent cation complexation by EDTA should be able to dissociate the ternary assembly. As expected, the background colorimetric signal from the initial assay was almost completely eliminated under conditions of 20 mM EDTA washing steps at room temperature. Furthermore, despite a few loss of the absolute signal, ELAKCA could be at least triply performed using the same functionalized surface without significant change in S/B (Figure S5b).

CONCLUSION

In summary, we have reported the proof-of-principle and the potential practical applicability of a novel sandwich-like ELAA dedicated to the “signal-on” determination of small analytes. The strategy relies on the recognition of the target-bound aptamer conformational state by a specific aptakiss probe. On the basis of a similar principle, “antimetatype” ELISA has been previously developed to detect low-molecular-weight antigens.^{36,37} Unfortunately, as the result of the strong difficulty to reliably produce “antimetatype” antibodies, very few examples have been reported to date. Owing to the vast diversity of both small target hairpin functional nucleic acids^{38–41} and kissing motifs,²⁴ we may anticipate a wider range of sensing applications for ELAKCA. One could envision also other types of enzyme-based signaling systems involving fluorescent, chemiluminescent or electrochemical approaches.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04575.

Sequences of oligonucleotides and additional data as noted in text (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr.

*E-mail: corinne.ravelet@ujf-grenoble.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Labex ARCANE (Grant ANR-11-LABX-0003-01).

REFERENCES

- (1) Toh, S. Y.; Citartan, M.; Gopinath, S. C. B.; Tang, T. H. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 392–403.
- (2) Drolet, D. W.; Moon-McDermott, L.; Romig, T. S. *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 1021–1025.
- (3) Ikebukuro, K.; Kiyohara, C.; Sode, K. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2168–2172.

- (4) Ferreira, C. S. M.; Papamichael, K.; Guilbault, G.; Schwarzacher, T.; Garipey, J.; Missailidis, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1039–1050.
- (5) Tang, L.; Liu, Y.; Ali, M. M.; Kang, D. K.; Zhao, W.; Li, J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4711–4717.
- (6) Takahara, M.; Hayashi, K.; Goto, M.; Kamiya, N. *J. Biosci. Bioeng.* **2013**, *116*, 660–665.
- (7) Salimi, A.; Khezrian, S.; Hallaj, R.; Vaziry, A. *Anal. Biochem.* **2014**, *466*, 89–97.
- (8) Barthelmebs, L.; Jonca, J.; Hayat, A.; Prieto-Simon, B.; Marty, J. L. *Food Control* **2011**, *22*, 737–743.
- (9) Park, H.; Paeng, I. R. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *685*, 65–73.
- (10) Shim, W. B.; Mun, H.; Joung, H. A.; Ofori, J. A.; Chung, D. H.; Kim, M. G. *Food Control* **2014**, *36*, 30–35.
- (11) Zhao, Q.; Zhang, Z.; Xu, L.; Xia, T.; Li, N.; Liu, J.; Fang, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 2949–2955.
- (12) Wang, Y. K.; Zou, Q.; Sun, J. H.; Wang, H. A.; Sun, X.; Chen, Z. F.; Yan, Y. X. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 136–141.
- (13) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11547–11548.
- (14) Zhang, D. W.; Sun, C. J.; Zhang, F. T.; Xu, L.; Zhou, Y. L.; Zhang, X. X. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *31*, 363–368.
- (15) Nie, J.; Deng, Y.; Deng, Q. P.; Zhang, D. W.; Zhou, Y. L.; Zhang, X. X. *Talanta* **2013**, *106*, 309–314.
- (16) Islam, K. N.; Ihara, M.; Dong, J.; Kasagi, N.; Mori, T.; Ueda, H. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 1008–1014.
- (17) Sharma, A. K.; Kent, A. D.; Heemstra, J. M. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 6104–6109.
- (18) Kent, A. D.; Spiropoulos, N. G.; Heemstra, J. M. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 9916–9923.
- (19) Durand, G.; Lisi, S.; Ravelet, C.; Dausse, E.; Peyrin, E.; Toulmé, J. J. *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 7062–7065.
- (20) Goux, E.; Lisi, S.; Ravelet, C.; Durand, G.; Fiore, E.; Dausse, E.; Toulmé, J. J.; Peyrin, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 6515–6524.
- (21) Takeuchi, Y.; Endo, M.; Suzuki, Y.; Hidaka, K.; Durand, G.; Dausse, E.; Toulmé, J. J.; Sugiyama, H. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 130–135.
- (22) Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. *Science* **1994**, *263*, 1425–1429.
- (23) Pesce, A. J.; Rashkin, M.; Kotagal, U. *Clin. Chem.* **1998**, *44*, 1124–1128.
- (24) Durand, G.; Dausse, E.; Goux, E.; Fiore, E.; Peyrin, E.; Ravelet, C.; Toulmé, J. J. *Nucleic Acids Res.*, submitted.
- (25) Zhu, Z.; Ravelet, C.; Perrier, S.; Guieu, V.; Fiore, E.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7203–7211.
- (26) Sato, Y.; Zhang, Y.; Nishizawa, S.; Seino, T.; Nakamura, K.; Li, M.; Teramae, N. *Chem. - Eur. J.* **2012**, *18*, 12719–12724.
- (27) Yang, C.; Spinelli, N.; Perrier, S.; Defrancq, E.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3139–3143.
- (28) Wu, C.; Yan, L.; Wang, C.; Lin, H.; Wang, C.; Chen, X.; Yang, C. J. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 2232–2237.
- (29) Liu, J.; Liu, Y.; Yang, X.; Wang, K.; Wang, Q.; Shi, H.; Li, L. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 11121–11128.
- (30) Brumbt, A.; Ravelet, C.; Grosset, C.; Ravel, A.; Villet, A.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1993–1998.
- (31) Perrier, S.; Zhu, Z.; Fiore, E.; Ravelet, C.; Guieu, V.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4233–4240.
- (32) Rowe, A. A.; Miller, E. A.; Plaxco, K. W. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7090–7095.
- (33) Brors, O.; Sager, G.; Sandnes, D.; Jacobsen, S. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1983**, *15*, 393–397.
- (34) Shaw, L. M.; Fields, L.; Mayock, R. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1982**, *32*, 490–496.
- (35) Dasgupta, A. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2002**, *40*, 986–993.
- (36) Self, C. H.; Dessi, J. L.; Winger, L. A. *Clin. Chem.* **1994**, *40*, 2035–2041.
- (37) Nagata, S.; Tsutsumi, T.; Yoshida, F.; Ueno, Y. *Nat. Toxins* **1999**, *7*, 49–55.

- (38) Burgstaller, P.; Kochoyan, M.; Famulok, M. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 4769–4776.
- (39) Xue, X.; Wang, F.; Liu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3244–3245.
- (40) Ma, K.; Wang, H.; Li, X.; Xu, B.; Tian, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 2625–2630.
- (41) Alsager, O. A.; Kumar, S.; Zhu, B.; Travas-Sejdic, J.; McNatty, K. P.; Hodgkiss, J. M. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4201–4209.

Supporting Information

ELAKCA: Enzyme-linked Aptamer Kissing Complex Assay as a Small Molecule Sensing Platform

B. Chovelon,^{a,b} G. Durand,^c E. Dausse,^c J-J. Toulmé,^c P. Faure,^{b,d} E. Peyrin^{a*} and C. Ravelet^{a*}

^aUniversity Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble; CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^bDépartement de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble site Nord - Institut de biologie et de pathologie, F-38041 Grenoble, France

^cLaboratoire ARNA, Université Bordeaux, Inserm U869, F-33076 Bordeaux, France

^dUniversity Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxy Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France

Table of content

1. Sequences of oligonucleotides.....	2
2. Additional data	2
2.1 Optimization of experimental conditions for the control system.....	2
2.2 Linear part of the dose-response curve for adenosine	3
2.3 Optimization of experimental conditions for theophylline ELAKCA	4
2.4 Dose-response curve for theophylline	5
2.5 Comparison of detection limits	5
2.6 Temporal stability and reusability of functionalized surfaces.....	6

1. Sequences of oligonucleotides

Table S1: Sequences of oligonucleotides used in this study. RNA bases are in bold. The loop-loop helix interaction is underlined. Complementary bases are in italic.

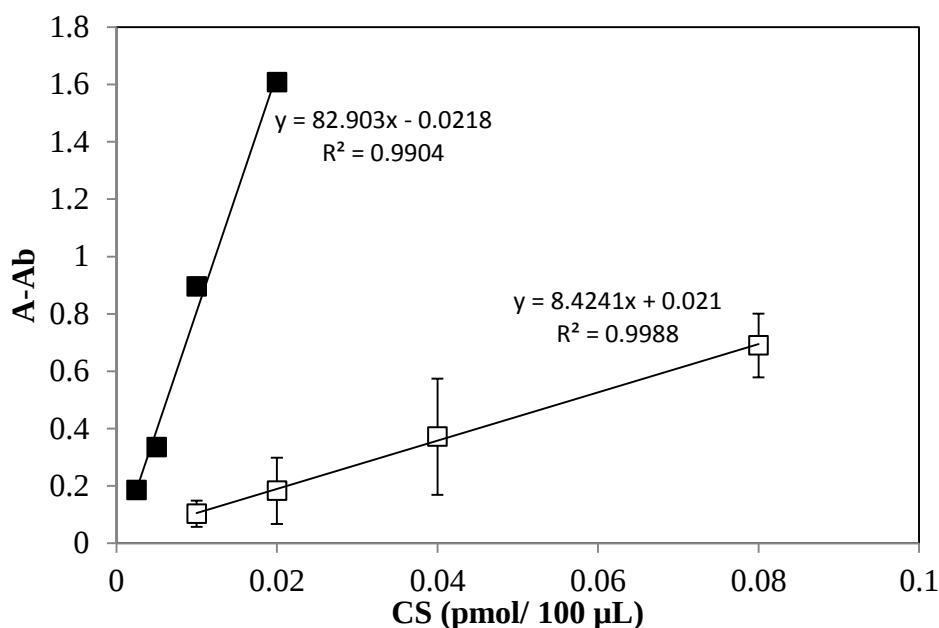
Control System	
Test DNA	5'-NH ₂ -C ₁₂ -GATATGCAGAGCATATAAAATGAGGTAGGA-3'
CS target	3'-CGTCTCGTATATTTTACTCCATCCTCTATA-biotin-5'
Adenosine System	
ADOsw-28	5'-NH ₂ -C ₁₂ -GTTGGGGGAAC <u>UGGGGGCG</u> TGGAGGAAAC-3'
Aptakiss-k1	5'-UGCUCGG <u>CCCCG</u> CGAGCA-biotin-3'
BA1	3'-GACCCCTCA-5'
Theophylline System	
THEO-sw4'	5'-NH ₂ -C ₁₂ -GGCGAUACCAG <u>ACAUCAC</u> CCCUUGGCAGCGUC-3'
Aptakiss-k4	5'-GGGCAGUGAUGUUGCCC-biotin-3'
BA4	3'-CGCUAUCUGUAGUGGAACUCGCAG-5'

2. Additional data

2.1 Optimization of experimental conditions for the control system

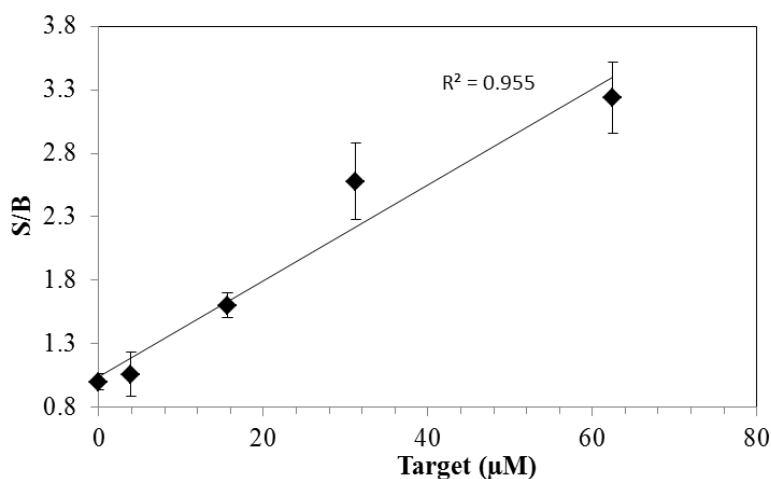
The efficiency of the overall enzyme-linked sorbent assay protocol was evaluated using the formation of the test DNA:CS duplex as control system. Two different grafting buffers were employed: buffer 1 and buffer 2 composed of 50 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 8.5 and 500 mM NaH₂PO₄–Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 8.5, respectively. Dose-response curves were constructed for the two grafting buffers. As shown in Figure S1, the assay response increased linearly as the CS target concentration increased from 0.01 to 0.08 pmol/100 μ L (50 mM phosphate buffer) or from 0.0025 to 0.02 pmol/100 μ L (500 mM phosphate buffer). In the 500 mM phosphate buffer, the slope was multiplied by a factor of about 10 and the intraday repeatability was greatly improved as compared to the 50 mM phosphate buffer. The 500 mM grafting buffer was thus selected for the ELAKCA experiments.

Figure S1. Comparison of the titration curves of the CS target obtained using two different grafting buffers: 50 mM (white square) or 500 mM (black square) $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{--Na}_2\text{HPO}_4$, 1 mM EDTA, pH 8.5. Test DNA was fixed at 50 pmol/well. A is the absorbance signal and A_b the blank absorbance signal (without CS target).



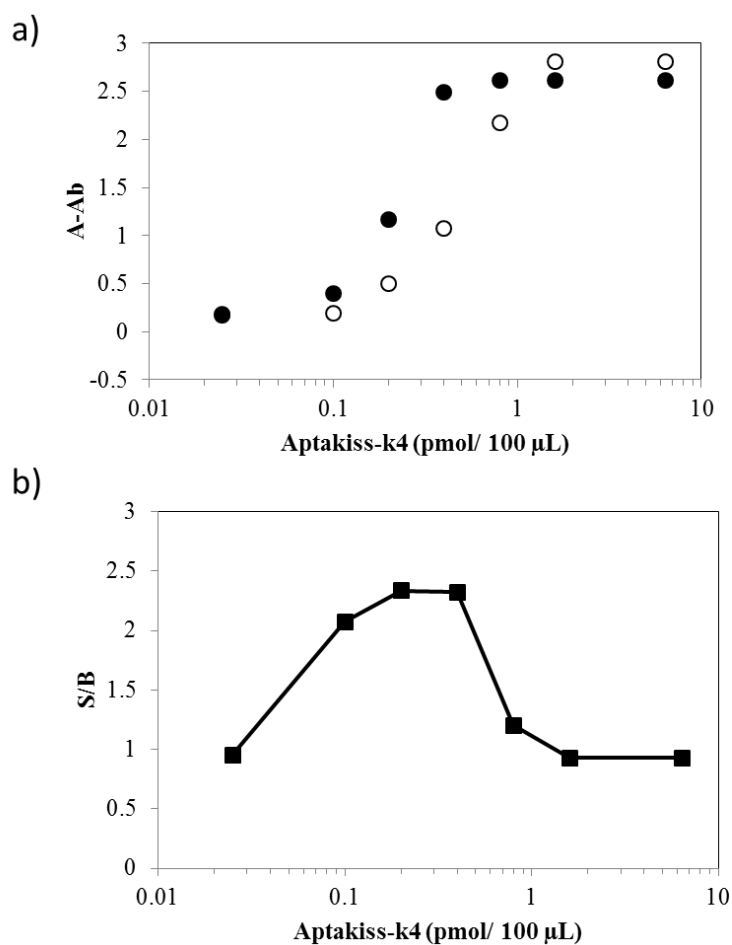
2.2 Linear part of the dose-response curve for adenosine

Figure S2. Linear part of the dose-response (S/B) curve for adenosine using ELAKCA.



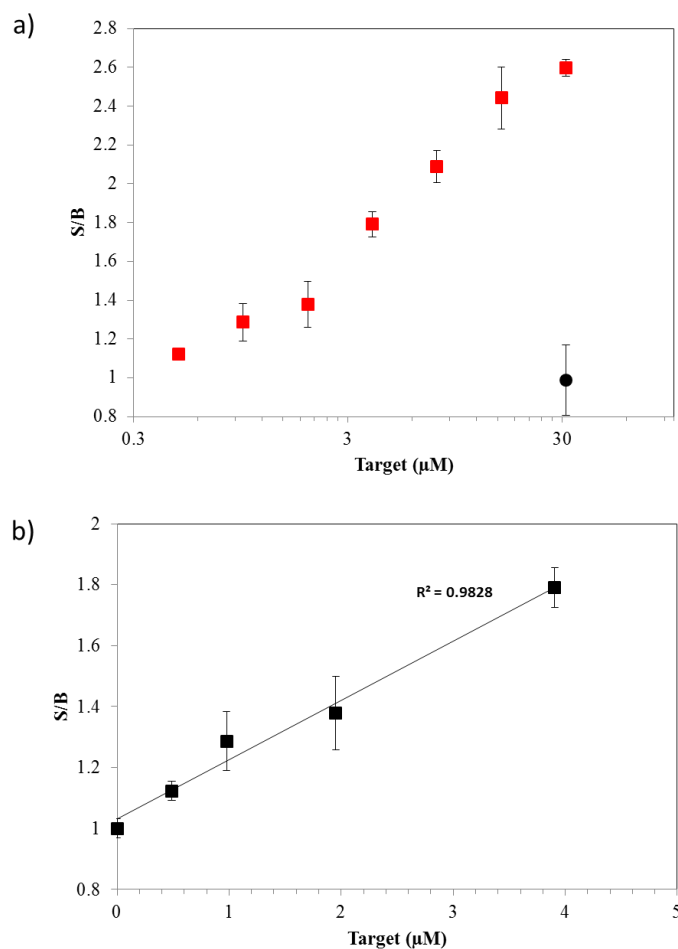
2.3 Optimization of experimental conditions for theophylline ELAKCA

Figure S3. (a) Response of ELAKCA for different concentrations of **aptakiss-k4**: 0.025, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 6.4 pmol/well with 50 pmol/well **THEOsw-4'** without (empty circle) and with target (100 μ M) (full circle). A is the absorbance signal and A_b the blank absorbance signal (without **aptakiss-k4** and target). **(b)** S/B ratio plotted against **aptakiss-k4** concentrations. Experimental conditions: buffer: 20 mM NaH_2PO_4 – Na_2HPO_4 , pH = 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 ; reaction temperature: 4°C; BA4: 5 pmol/well.



2.4 Dose-response curve for theophylline

Figure S4. (a) Dose-response curve for theophylline using **THEOsw-4'/aptakiss-k4**-based ELACKA. The generated signal for the non-cognate caffeine ligand at 31 μM is also shown in black. **(b)** Linear part of the dose-response curve for theophylline.



2.5 Comparison of detection limits

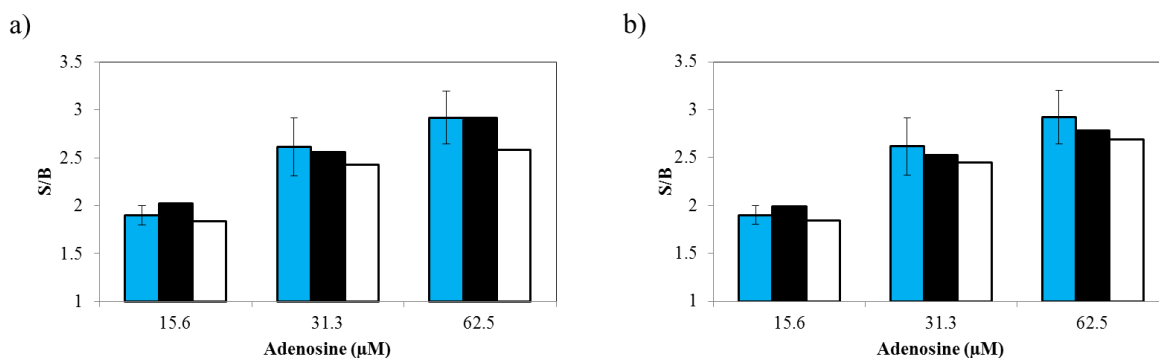
Table S2: Limit of detection (LOD) for adenosine (and analogues) and theophylline using optical sandwich-type aptamer assays.

Assay-analyte	LOD	Ref
Colorimetric ELAKCA-adenosine/theophylline	5 μM /0.5 μM	This work
Fluorescent split aptamer assay-ATP	~20 μM	13
Fluorescence anisotropy split aptamer assay-adenosine	15 μM	25
Fluorescence anisotropy-mass amplifier split aptamer assay-adenosine	10 μM	25
Fluorescence anisotropy aptamer kissing complex assay-adenosine	10 μM /4 μM	19/20

Competitive fluorescent split aptamer assay-theophylline	1 μ M	26
Host-dye reporter fluorescent split aptamer assay-adenosine	1 μ M	27
Excimer-based fluorescent split aptamer assay-ATP	0.08 μ M	28
Quantum dot assembly fluorescent split aptamer assay-adenosine	0.01 μ M	29

2.6 Temporal stability and reusability of functionalized surfaces

Figure S5. (a) Storage study of the ADOsw-28-functionalized surfaces at 0 (blue), 2 (black), and 14 (white) days. **(b)** Evaluation of the reusability ability of these binding surfaces. Reference (blue), reuse 1 (black) and reuse 2 (white). Assay response for 3 different target concentrations.



Conclusion

La stratégie de l'aptamère scindé était jusqu'à présent la seule possibilité d'envisager un dosage non compétitif à deux reconnaissances pour petite molécule en phase hétérogène.¹²⁸ Nos résultats sont particulièrement intéressants et encourageants car ils permettent d'envisager de tels dosages sans les inconvénients de cette stratégie (notamment une diminution d'affinité entraînant une détérioration de la limite de détection).

Nous espérons, grâce à l'amplification enzymatique du signal, améliorer les limites de détection pour l'adénosine et la théophylline. Finalement, elles sont du même ordre de grandeur que celles obtenues par polarisation de fluorescence. Cela peut s'expliquer par la détection photométrique qui est par nature moins sensible que la détection fluorimétrique. Mais la raison principale est vraisemblablement la présence d'un bruit de fond important lié à l'interaction aptaswitch-aptakiss en l'absence de la cible : toute amplification du signal entraîne une augmentation du signal non spécifique du même ordre,⁸ le rapport signal sur bruit (S/B) restant inchangé. Pour envisager l'amélioration de la limite de détection par ELAKCA, il faudrait utiliser un couple de boucles, à l'origine du « complexe kissing », générant moins de bruit de fond. Récemment un couple de boucle ADN – ARN générant un signal non spécifique très faible a justement été décrit et utilisé par notre laboratoire dans le cadre d'une détection colorimétrique utilisant des nanoparticules d'or.¹³⁰

Les essais de stockage des puits après greffage et leur réutilisation témoignent de la bonne stabilité de l'aptaswitch immobilisé par liaison covalente. Cela permet d'envisager le stockage dans le temps de puits greffés afin de faciliter leur utilisation en LBM (l'étape d'immobilisation de l'aptaswitch étant particulièrement chronophage dans cette expérimentation). En comparaison, les entreprises commercialisant des kits ELISA pour réaliser des analyses de biologie médicale proposent généralement des puits avec des anticorps préalablement immobilisés.

Enfin, en raison de l'utilisation d'oligonucléotides naturels non modifiés (principalement en série ARN) et pour permettre l'utilisation de cette technique en milieu complexe, une étape préalable d'ultrafiltration du plasma sur des filtres 3K était nécessaire. L'utilisation d'échantillons de plasma humain surchargés en adénosine ou en théophylline ont permis de démontrer que cette méthode est tout à fait applicable en LBM.

Après avoir travaillé sur des molécules modèles permettant le développement d'une nouvelle méthode ELAA, nous nous sommes intéressés à un peptide synthétisé *in vivo*, l'arginine-vasopressine, pour lequel le dosage en laboratoire de biologie médicale est difficile.

II. Développement d'un système de dosage en phase homogène pour l'arginine-vasopressine en utilisant la stratégie « complexe kissing » combinée aux spiegelmers

Stratégie

L'arginine-vasopressine également appelée hormone antidiurétique (ADH) est une hormone peptidique cyclique (présence d'un pont disulfure entre les cystéines 1 et 6) de neuf acides aminés (1084 Da), synthétisée par l'hypothalamus et libérée par la post-hypophyse. Son action sur le rein est principalement anti-diurétique *via* la synthèse d'aquaporine permettant la réabsorption d'eau au niveau distal.¹⁵⁸ Son dosage est utile en cas de diabète insipide,¹⁵⁹ de syndrome de sécrétion inappropriée d'hormone antidiurétique,¹⁵⁹ de syndrome d'apnée du sommeil¹⁶⁰ ou encore dans le cadre des activités sportives en altitude.¹⁶¹ Le dosage de l'ADH peut être effectué dans les urines (valeurs de référence : 35 - 79 pmol/24h¹⁶²) ou dans le plasma (valeurs de référence : 0,5 - 13 pmol/L¹⁶²). Il s'agit d'un dosage difficile, réalisé généralement par radio-immunoanalyse après extraction de l'analyte¹⁶³ bien que récemment, des méthodes plus lourdes utilisant la CLHP couplée à la spectrométrie de masse aient été décrites.^{61,62,164}

Le développement d'une méthode de dosage impliquant un complexe boucle-boucle pour l'ADH permettra d'élargir le panel d'analyse des méthodes AKCA (aptamer kissing complex assay), jusqu'à présent limité aux cibles de très petite taille telles que les bases puriques.^{97,123,129,130,165} Le travail a été initié avec un aptamère décrit dans la littérature, reconnaissant l'énantiomère non naturel de l'arginine-vasopressine en série D (le peptide sécrété *in vivo* est en série L) ayant une constante de dissociation (K_d) de l'ordre du micromolaire.¹⁶⁶ A partir de cet aptamère nous avons imaginé et synthétisé trois aptaswitches (vasosw3' A, vasosw3' B, vasosw3' C) en substituant une partie de la séquence, n'ayant à priori que peu d'intérêt dans la reconnaissance de la cible, par une séquence capable de réaliser un « complexe kissing » (figure 25) :

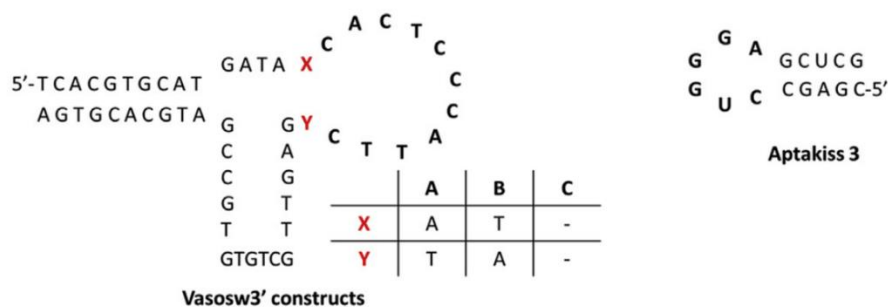


Figure 25 : Séquences des vasoswitchs ADN et de l'aptakiss

Les boucles de l'aptaswitch et de l'aptakiss utilisées étaient originales car il s'agissait d'un « complexe kissing » ARN – ADN ne générant que très peu de bruit de fond (contrairement aux boucles du travail précédent).¹³⁰ L'aptakiss 3 a été marqué en 5' par une molécule fluorescente, le Texas Red, permettant une mesure de l'anisotropie de fluorescence : augmentation de r lors de la formation du complexe ternaire vasosw – cible – aptakiss.

Le vasosw3' A a été retenu pour la suite du travail car il présentait la meilleure réponse en présence d'une concentration fixe de D-arginine-vasopressine. Par la suite, nous avons optimisé la composition du tampon à l'aide de solvants organiques dans le but d'améliorer la sensibilité de notre méthode.

Enfin, l'image dans le miroir de ce test a été mise en place : synthèse du spiegelmer de l'aptaswitch en série L (L-vasosw3' A) reconnaissant la L-arginine-vasopressine (énantiomère naturel) et de l'aptakiss en série L (L-aptakiss 3). Les oligonucléotides non naturels en série L présentent une bonne stabilité *in vivo*, facilitant la transposition du système en milieu complexe.¹³⁸



Mirror-image aptamer kissing complex for arginine-vasopressin sensing

Benoit Chovelon^{a, b, c}, Emmanuelle Fiore^{a, b, c}, Patrice Faure^{c, d}, Eric Peyrin^{a, b, *},
Corinne Ravelet^{a, b, **}

^a University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^b CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

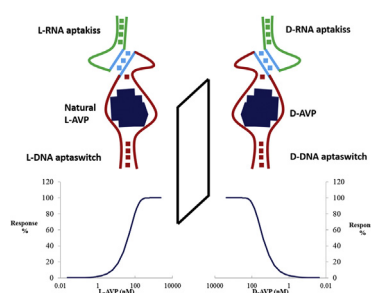
^c Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble Site Nord - Institut de Biologie et de Pathologie, F-38041 Grenoble, France

^d University Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxia Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France

HIGHLIGHTS

- The mirror-image aptamer kissing complex (AKC) approach was demonstrated.
- The scope of the AKC strategy was extended to peptide targets.
- The all-L AKC improved the fluorescence anisotropy assay robustness for complex matrix analysis.
- The use of methanol as cosolvent enhanced the assay sensitivity.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 July 2017

Received in revised form

3 November 2017

Accepted 13 November 2017

Available online 23 November 2017

Keywords:

Aptamer

Kissing complex

Mirror-image assay

Peptide target

Complex matrix

ABSTRACT

The recently reported aptamer kissing complex (AKC) strategy has allowed for the development of a new kind of sandwich-like sensing tools. Currently AKC assays have been only applied to low molecular weight molecules and their functionality in complex matrices remains challenging. The objective of the present study broken down into two sub-aims; exploring the propensity to broaden the scope of detectable analytes and designing a more robust system for potential applications to realistic samples. An all L-configuration aptaswitch module derived from a hairpin spiegelmer specific to a larger target, *i.e.* the arginine-vasopressin (AVP) hormone, was elaborated. The target-induced AKC formation in presence of a specific mirror-image RNA hairpin (L-aptakiss) probe were analyzed by using fluorescence anisotropy. The mirror-image kissing complex was successfully formed when the L-AVP target bound to the engineered L-aptaswitch element. It was also established that the use of methanol as cosolvent significantly improved the assay sensitivity through the stabilization of the ternary complex. Finally, the capability of the mirror-image method to operate in 10-fold diluted, untreated human serum was illustrated. The current work revealed that the AKC concept can be expanded to a wider range of targets and converted to a L-configuration sensing platform especially suitable for bioanalysis purposes.

© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France.

** Corresponding author. University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France.

E-mail addresses: eric.peyrin@univ-grenoble-alpes.fr (E. Peyrin), corinne.ravelet@univ-grenoble-alpes.fr (C. Ravelet).

1. Introduction

During the last two decades, the development of aptamer-based analytical devices has become a research field in constant expansion. Numerous aptamer assays/sensors rely on strategies that commonly depend on the target-induced allosteric switch of the functional nucleic acid [1–5]. Among them, the aptamer kissing complex (AKC) concept constitutes a promising approach to detect small molecules [5]. The principle is based on the ability of an engineered aptamer (aptaswitch) to undergo a ligand-mediated transition from an unstructured to a structured hairpin. A short sequence, able to interact with the loop of a second hairpin (aptakiss), is incorporated into the aptaswitch apical loop. In absence of ligand, the central and apical domains of the switching aptamer are largely unfolded in such a way that no loop-loop (kissing) interactions can occur between the aptakiss and the aptaswitch. Target binding to the central bulge of the aptaswitch stabilizes its overall structure and shapes the stem-loop motif. The apical loop of the folded aptaswitch can then interact with the loop of the aptakiss, signaling the presence of the analyte. The AKC strategy is devoted to hairpin aptamers for which the apical loop is not involved in the target recognition [5]. For analytical applications, one particularly interesting feature of the approach is related to its ability to detect small molecules under a sandwich-like format, potentially providing signal amplification [6].

To date, several aptaswitch-aptakiss couples have been identified. Natural RNA-RNA kissing complexes have been initially mimicked by designing RNA aptaswitches that detect the GTP and theophylline targets in combination with an RNA aptakiss [5–7]. We have also engineered a chimera by inserting an RNA kissing motif into a DNA aptamer specific to adenosine [5]. More recently, an all-DNA adenosine aptaswitch able to bind to a novel RNA aptakiss has been reported [8]. These diverse hairpin couples have been successfully used in a variety of AKC assays (AKCA) based on SPR, fluorescence, fluorescence anisotropy, or colorimetry signaling techniques [5–10]. Although the analytical capabilities of the AKC approach have been established, there remains some major challenges notably in terms of analyte range and assay robustness.

The range of target-aptamer couples potentially amenable to AKCA represents a key questioning. At the present time, AKCA have been only demonstrated for aptamers specific to purine bases and derivatives [5–10]. These targets are planar aromatic compounds of low molecular weight (M_w in the 180–500 Da range) that all shape the hairpin through intercalation between purine base platforms of the internal bulge [11–13]. The spatial confinement of these small-size ligands within the closely delimited binding central core can preserve both the topology and accessibility of the apical loop-junction motif of the bound aptaswitches. These structural features enable the efficient formation of the kissing complex in presence of the aptakiss. However, the aptness of the switch-kiss system to accommodate larger targets with different structures and binding modes needs to be established.

Another issue of the AKCA is related to the use of the RNA aptakiss as signaling element (*i.e.* the probe), constituting a limitation in biological contexts due to its inherent (bio)chemical instability [14]. Furthermore, the non-specific binding of matrix proteins to nucleic acids and the off-target effects complicate its analytical applications in real conditions [15]. Moreover, laborious sample ultrafiltration pre-treatment steps (eventually associated to a very high dilution factor of matrices) are required to achieve reliable AKC-based sensing in complex media [6,8]. One elegant and powerful way to circumvent these difficulties relies on the use of mirror-image analogs (referred to as L-nucleic acids or sometimes *spiegelmers*) that are both highly resistant to the nuclease digestion and much less sensitive to the binding interferences due

to the biopolymer enantiopecificity [15–17]. Although the mirror-image approach has been previously exploited for designing more practical L-nucleic acid-based assays/sensors [15,18–21], the demonstration of functional mirror-image kissing complex has not yet been reported.

The aim of the present study was to (i) determine if the AKC strategy can be extended to a wider range of ligand structures and (ii) elaborate a new robust sensing system by using opposite chirality concept. Our work focused on a previously isolated imperfect hairpin aptamer specific to the arginine-vasopressin (AVP) [22], a mammalian hormone that plays a crucial role in the regulation of renal water excretion. This choice was initially motivated by the fact that AVP is a cyclic ~1000 Da nonapeptide. When compared with a flat small ligand, the binding of peptides to functional nucleic acids obviously implies a larger interfacial surface and causes on a stronger structural distortion of aptamers [11]. Moreover, previous thermodynamic data have suggested that a significant adaptative transition occurs upon the AVP-aptamer complex formation [23]. Thus, this model system appeared well suited to explore the potential of the AKC scope. In addition, the AVP aptamer provided the platform to use the *spiegelmer* strategy [22]. By exploiting the mirror-image approach, we expected that the aptakiss in the L-series coupled to the L-aptaswitch specific to the natural hormone could provide an all-L configuration AKC assay with improved robustness (see the schematic representation of the approach in Fig. 1). Finally, AVP is a clinically relevant biomarker for diagnosis of several pathological conditions [24].

The present work was carried out by using the recently described DNA-RNA kissing sequence pair [8]. The fluorescence anisotropy technique was employed as signaling method (the fluorescently labeled aptakiss was used as probe) for allowing facile monitoring of both kissing complex formation and resistance potential toward biological interferences. The AVP aptaswitch was first engineered and the experimental binding conditions for the AKC were optimized to improve the assay response. The ability of the mirror-image AKCA to function under optimal conditions was established and its enhanced capabilities to operate in a biofluid context (10-fold diluted serum) were demonstrated.

2. Experimental section

2.1. Reagents

Both D-Arginine Vasopressin trifluoroacetate salt and L-Arginine

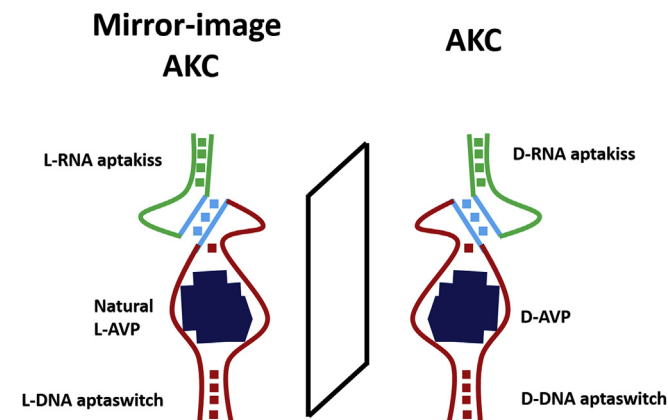


Fig. 1. Schematic illustration of the mirror-image AKC approach for creating an all-L configuration sensing system specific to the natural L-AVP target. The loop-loop interaction is depicted in light blue. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Vasopressin trifluoroacetate salt were supplied by Bachem (Weil am Rhein, Germany). Polyethylene glycol (PEG) 4000 Da was obtained from Prolabo (Paris, France). The following reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France): tris(hydroxymethyl) aminomethane (Tris), PEG (35000 Da), acetonitrile, dimethyl sulfoxide (DMSO), human serum (male, AB), L-oxytocin and a mixture of RNases, DNase-free, from bovine pancreas (Ref: 11119915001 Roche). Water was obtained from a Direct-Q 3UV water purification system (Millipore, Saint-Quentin en Yveline, France) fitted with reverse osmosis and exchange-ion cartridges. Sodium chloride (NaCl) and magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were purchased from Chimie-Plus laboratories (Bruyères de Pouilly, France) and Panreac Quimica (Barcelona, Spain), respectively. Ethylene glycol, methanol and ethanol were from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Acetone was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). All oligonucleotides (Table 1) were synthesized and HPLC-purified by Eurogentec (Angers, France).

2.2. Sample preparation for AKCA and mirror-image AKCA

Oligonucleotide stock solutions were prepared with pure water at 10^{-4} or 10^{-5} M and stored at -20°C . Working solutions of aptaswitch and aptakiss were prepared from the stock solutions by diluting with the concentrated appropriate buffer. Sample solutions were heated at 80°C for 5 min and then kept at 4°C for 30 min for attaining stability prior to use. A stock solution of D- or L-AVP was prepared at $1845\ \mu\text{M}$ in water. After preparation, this parent stock solution was diluted using the 2X concentrated buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM MgCl_2), in presence or absence of cosolutes depending on experiments. To create the dose-response curves, individual wells were prepared by mixing the solution of aptaswitch (final concentration = 300 nM), aptakiss (final concentration = 10 nM) and different amounts of target solutions (final volume = 100 μL). Blank wells were prepared by adding 100 μL of the binding buffer in the microplate. The microplate was disposed into the microplate device for the anisotropy reading after 90 min of incubation (unless otherwise stated) at 4°C in the dark.

For the study of nuclease susceptibility of the D- and L-kiss probes, the stock solution of RNases was mixed with the 2X buffer and further mixed with the aptakiss to obtain a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration of nucleases. Samples were prepared in vials (final volume = 120 μL) and 100 μL of the mixture were transferred in the wells after mixture with aptakiss (10 nM). For experiments in diluted serum, a stock solution of human serum was filtered using 0.22 μm PVDF membranes prior to use. The serum was then directly added to the well containing the aptakiss (10 nM), at the end to avoid bubble formation. In such matrices, AKCA and M-AKCA were carried out as described previously for binding buffer conditions.

2.3. Apparatus and anisotropy parameter determination

Fluorescence anisotropy was measured in black, 96 wells

Greiner Bio-One microplates (Courtaboeuf, France) using a Tecan Infinite F500 microplate reader (Männedorf, Switzerland). Excitation for Texas Red (TR) was set at $585 \pm 20\ \text{nm}$ and emission was collected with a $635 \pm 30\ \text{nm}$ bandpass filter. The anisotropy (r) was calculated by the instrument software as previously reported [5]. The r_f value represented the anisotropy of the free Texas red-labeled aptakiss, the r_0 value was the anisotropy of the probe in the presence of aptaswitch only and the r value was the tracer anisotropy measured in the presence of both aptaswitch and target. The Δr and $\Delta r(\%)$ parameters were calculated as follows:

$$\Delta r = r - r_0 \quad (1)$$

$$\Delta r(\%) = \frac{(r - r_0) \times 100}{(r_{\max} - r_0)} \quad (2)$$

where $r_{\max}$ corresponded to the anisotropy signal at saturating target concentration. The mean and standard deviation (error bar) values are calculated using triplicate data collected from one experiment.

The following modified one phase exponential association equation was employed to estimate the apparent dissociation constant K_d :

$$\Delta r = (r_{\max} - r_0)(1 - e^{-kc}) \quad (3)$$

where c is the concentration of target molecule and k a fit parameter. The nonlinear regression of the Δr versus c plots was achieved using the Table curve 2D software (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) and the apparent K_d value was determined from the midpoint of the equation, i.e. $-\ln(0.5)/k$.

For the target sensing in complex matrix such as diluted serum, the relative FA variation was determined through the following equation:

$$\Delta r_{\text{serum}}(\%) = \frac{(r_{\text{serum}} - r_{0\text{serum}}) \times 100}{(r_{\text{maxbuffer}} - r_{0\text{buffer}})} \quad (4)$$

where serum and buffer subscripts corresponded to the FA signal measured in the respective media.

3. Results and discussion

3.1. Design of AKCA specific to AVP

Firstly, we focused on the elaboration of the AVP-binding aptaswitch. The original aptamer specific to AVP was isolated by Williams et al. [22] using an *in vitro* selection based on the spiegelmer technology. The authors clearly identified an imperfect hairpin secondary structure where the large, asymmetric internal bulge (20 nucleotides) is essential for the target binding while the apical loop does not participate in the ligand recognition (Fig. 2).

Table 1

Sequences of oligonucleotides used in this study. The apical loop sequences of both aptaswitch and aptakiss are blue-colored.

Name	Sequence (5' → 3')
Vasosw3'A	TCACGTGCATGATA ACACTCCCATTCT GAGTTGCTGTGTGCCGATGCACGTGA
Vasosw3'B	TCACGTGCATGATA TA CACTCCCATTTCAGAGTTGCTGTGTGCCGATGCACGTGA
Vasosw3'C	TCACGTGCATGATA CA CTCCCATTTCGAGTTGCTGTGTGCCGATGCACGTGA
Kiss3	Texas red-CGAGCC CU GGGAGCUCG

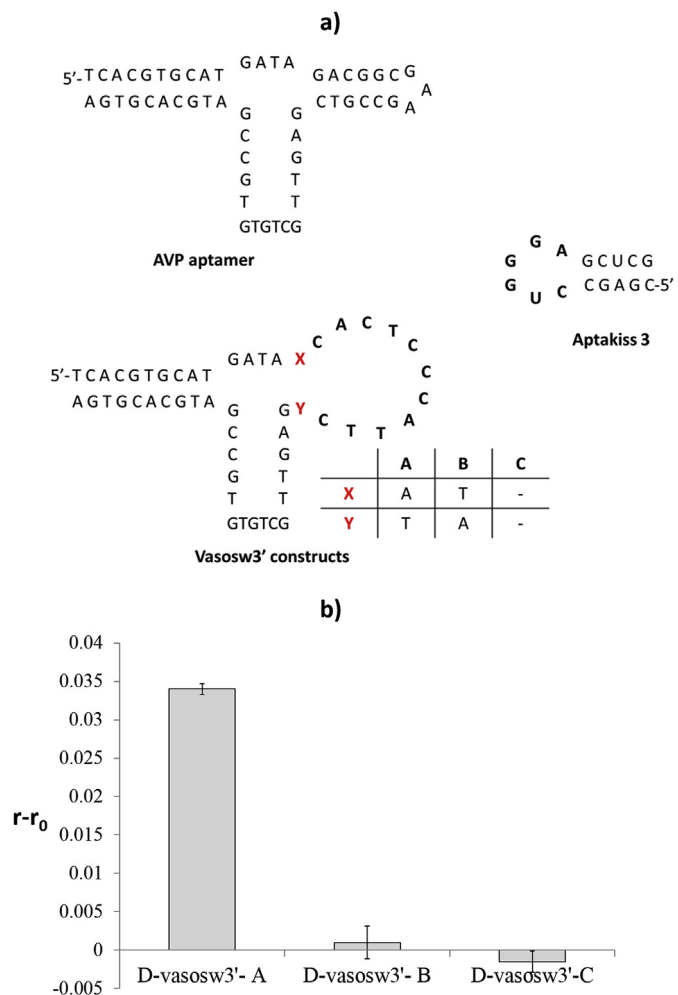


Fig. 2. a) Expected secondary structure for the arginine vasopressin aptamer (from Ref. [22]), the aptaswitch (Vasosw3') constructs and the aptakiss3. Kissing sequences are in bold face. b) AKCA response for the three aptaswitch constructs. Buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂; D-kiss3 and D-Vasosw3'A, B, C concentration was 10 nM and 300 nM, respectively. D-AVP concentration was 1.2 μ M. Reaction temperature: 4 $^{\circ}$ C. Read at 90 min. r value represents the anisotropy in presence of target and r_0 value is the anisotropy in absence of target.

For simplicity and cost effectiveness, the AVP aptaswitch was engineered using the natural D-DNA aptamer instead of the L-DNA aptamer. Following the mirror-image principle, the target peptide corresponded to the unnatural AVP D-enantiomer (D-AVP), which was chemically synthesized. The recently described D-DNA kissing sequence [8] was used to construct the D-AVP-aptaswitch (D-Vasosw3'). The D-aptakiss hairpin (D-kiss3) containing the complementary apical loop RNA sequence was employed for forming the typical D-Vasosw-D-kiss interaction between the two kissing elements. As previously reported [5,7], the monitoring of the AKC formation can be easily achieved in homogeneous solution through fluorescence anisotropy measurements, by using the 5'-end Texas Red-labeled D-kiss3 as fluorescent tracer.

The long terminal stem of the original AVP aptamer was retained for the aptaswitch design (Fig. 2a) since it has previously shown that a highly stable end-helix improves the assay sensitivity [5]. We subsequently chose to entirely delete the apical helical region of the parent hairpin in such way that the unfolded-folded shape transition was favored upon target binding (Fig. 2a). Three constructs of D-Vasosw3' were then designed. These binding units contained the two following bases (5'-3') at the central bulge-apical

loop interface: A-T (the original putative base-pair at the junction), T-A (reversed base-pair) and C-C (A-T base-pair deletion) for the D-Vasosw3'A, B and C, respectively (Fig. 2a). Among the variants, only D-Vasosw3'A displayed a significant increase in the FA signal in presence of 10 nM D-kiss3 and 1.2 μ M D-AVP target ($r - r_0 \approx 0.035$), as shown in Fig. 2b. The assay response means that the interaction of the D-peptide ligand with the D-Vasosw3'A element triggers the formation of the ternary assembly. This confirms that the nature of the aptaswitch junction between the internal binding site and the apical loop plays a preponderant role in the kissing complex formation [8,10]. The D-AVP target binding to D-Vasosw3'A did not impair the loop-loop interaction between the two hairpins, demonstrating that the range of ligands amenable to the AKC strategy is broader than previous reports.

Using the D-Vasosw3'A unit, the calibration curve was then constructed by increasing the D-AVP concentration in the binding buffer solution (Fig. 3a). Under these conditions, the apparent K_d (determined from Eq. (3)) was found in the submicromolar range, i. e. $0.64 \mu\text{M} \pm 0.10$, close to the previously measured dissociation constant for the parent aptamer (0.9 μ M) [22]. The binding data indicates that D-Vasosw3'A is able to retain the molecular recognition properties of the original functional nucleic acid, as previously reported with the engineered aptaswitches specific to purine compounds [5–8]. The limit of detection (LOD) for D-AVP in the binding buffer was estimated (using the $3\sigma/S$ method, where σ is the standard deviation of the response in absence of target and S the slope of the linear part of the calibration curve) to be 336 nM. The linear dynamic range was from 150 nM to 2400 nM ($R^2 = 0.978$).

3.2. Optimization of the binding conditions for improving the AKCA sensitivity

Several works have demonstrated that the presence of cosolutes in the solution can profoundly affect non-canonical nucleic acid architectures [25]. Polymers such as PEG and polysaccharides can mainly act through excluded volume effects while smaller hydrophilic molecules including organic solvents, sugars or amino acids modify the water activity and the dielectric constant of the solution. In many cases, the increase in steric effects and osmotic stress, or the reduction of the dielectric constant enable the stabilization of high-order nucleic acid structures [25–27]. In this context, we investigated the effects of a variety of cosolutes on the target-induced kissing complex formation. The addition of high M_w (35000 Da) and low M_w (4000 Da) PEG cosolutes to the reaction solution (20%) caused a moderate improvement in the FA variation upon 75 nM D-AVP binding (Fig. 3b). Typical osmolytes such as ethylene glycol and sucrose determined either a mild increase or a decrease in the assay response (Fig. 3b). The addition of alcohol cosolvents to the binding buffer led to favorable effects on the signal change in the presence of D-AVP, especially for methanol that produced the best assay response enhancement (Fig. 3b).

In the present and previous AKCAs, we used a binding buffer solution containing a significantly high Mg(II) concentration (in the 5–10 mM range) [5–8,10]. Target recognition by aptamers often depends on the presence of divalent cations that induces the active conformational state of functional nucleic acids through their binding to specific sites [28]. In addition, as the formation of kissing complexes involves the twisting of the loops on each hairpin, a sufficient Mg(II) amount is generally required to overwhelm the electrostatic repulsion arising from the close positioning of phosphate groups [29]. Thus, we can reasonably hypothesize that the methanol-aided decrease in the dielectric constant favored the Mg(II) electrostatic interaction with both the aptaswitch and kissing motifs, leading to the assembly stabilization and then

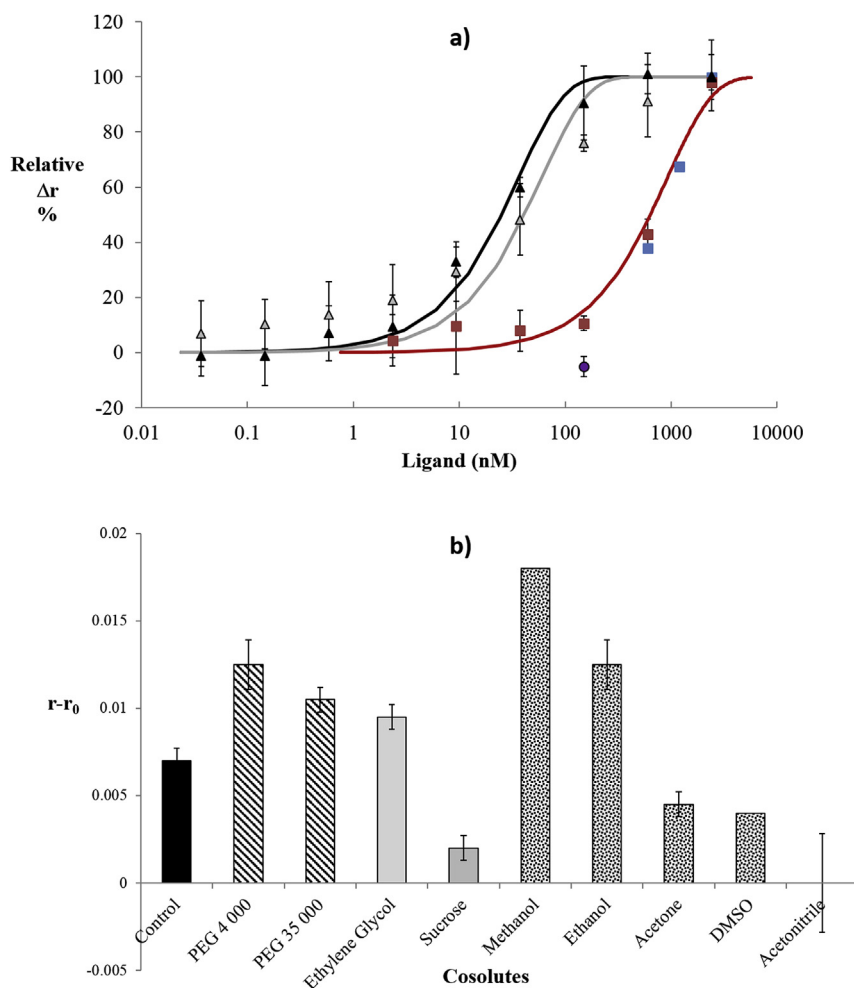


Fig. 3. **a)** Calibration curves for the D-AVP target using AKCA in buffer (red square) or in 18.75% methanol-containing buffer (black triangle). Calibration curve for the L-AVP using M-AKCA in 18.75% methanol-containing buffer (grey triangle). M-AKCA response in pure buffer conditions for L-AVP (three target concentrations: 0.6, 1.2, 2.4 μ M, blue square). M-AKCA response in methanol-containing buffer for L-oxytocin (0.15 μ M, purple circle). Theoretical curves are created using the adjustable k parameter (Eq. (3)). **b)** Assay FA response upon addition of a variety of cosolutes to the binding buffer solution in presence of D-AVP (75 nM). Cosolutes were fixed at 20% in the wells. Control corresponded to experimental data in buffer without any addition of cosolutes. r value represents the anisotropy in presence of target and r_0 value is the anisotropy in absence of target. Error bars are present for each condition but in some cases standard deviations were very low so that they are almost not visible. Buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM $MgCl_2$; D-kiss3 and D-Vasow3'A concentration was 10 nM and 300 nM, respectively. Reaction temperature: 4 °C. Read at 90 min. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

improving the AKCA response. Similar explanation has been proposed by Smirnov and Shafer concerning the stabilizing effects of aliphatic alcohols on the G-quadruplex structure [30]. Besides, both D-Vasow3'B and C constructs that did not respond in aqueous solution (Fig. 2b) were able to engender an anisotropy increase in a hydro-organic mixture (Fig. S1). Detrimental effects were observed with other small organic cosolvents such as acetonitrile, DMSO and acetone (Fig. 3b). The phenomenon could be explained, at least in part, by their preferential binding to exposed hydrophobic groups

of the ternary complex so that the whole assembly would be destabilized [25,30]. Moreover, by varying the amount of methanol from 6.25 to 37.5%, we found that the AKCA response increased until about 20% of the cosolvent and then diminished at higher percent (Fig. S2). The behavior is consistent with solvation forces that would counteract the $Mg(II)$ -binding electrostatic effects at large alcohol content. To evaluate if the AKC stabilizing effect of methanol would be a general feature, we subsequently performed similar experiments with a previously described aptaswitch-

Table 2

Limit of detection (LOD) for AVP using previously reported aptasensing methods.

Strategy, reporting method	LOD	Ref
Full aptamer, gold nanoparticle-based colorimetry	50 nM	[31]
Full aptamer, fluorescence anisotropy	200 nM	[32]
Split aptamer, graphene-based electrochemistry	5 nM	[33]
Full aptamer, graphene multilayer-based electrochemistry	1 nM	[34]
Full aptamer, microfluidic device coupled to mass spectrometry	1 pM	[35]
Full aptamer, microfluidic device coupled to carbon nanotube-based electrochemistry	43 pM	[36]
AKC assembly, fluorescence anisotropy	8 nM	This work

aptakiss system, i.e. specific to the theophylline target and implying an all RNA-RNA kissing pair as well as different binding conditions (Fig. S3). We observed a significant increase in the FA response over the methanol proportion range, suggesting that this alcohol-mediated effect could be a common mechanism for the AKC structural stabilization.

The calibration curve for D-AVP was constructed using the optimal methanol-containing buffer (Fig. 3a). The apparent K_d ($0.025 \mu\text{M} \pm 0.002$) was almost 25-fold lower than that observed in pure aqueous solution ($\sim 0.65 \mu\text{M}$). This determined a significant reduction in the LOD for the D-AVP target, estimated to 7.9 nM (vs ~ 340 nM in aqueous medium). In this case, the linear dynamic range was from 2.3 nM to 150 nM ($R^2 = 0.997$). As summarized in Table 2, the observed LOD was lower than those obtained with other homogeneous-phase aptamer assays [31,32] and comparable to those retrieved with heterogeneous-phase electrochemical aptasensors [33,34]. Both Lin et al. [35] and Ericksson and co-workers [36] have reached much lower detection limits (1 and 43 pM, respectively), but at the expense of sophisticated analytical technologies implying a microfluidic device, the analyte capture by immobilized aptamers and the subsequent mass spectrometry or electrochemical signaling methods.

3.3. Mirror-image AKCA

Once the Vasosw was designed and the binding conditions optimized, we next aimed at translating the mirror-image strategy to the elaboration of an all-L kissing complex (herein referred to as mirror-image aptamer kissing complex, M-AKC). To assess its recognition properties toward the natural L-AVP hormone, both L-Vasosw3'A and fluorescently labeled L-kiss3 were synthesized and mixed with increasing amounts of L-target. Under the optimal methanol-containing binding solution conditions, the FA signal was enhanced when the L-AVP concentration increased, similarly to that retrieved for the all-D AKC configuration (Fig. 3a). Moreover, the apparent dissociation constant ($0.041 \mu\text{M} \pm 0.007$), the detection limit (25 nM) and the linear dynamic range (from 2.3 nM to 600 nM; $R^2 = 0.980$) for the L-enantiomer assay were close to those reported with the D-enantiomer approach. In the pure buffered solution, the FA response of the L-system also matched that of the D-system (Fig. 3a). The results reveal that the mirror-image kissing complex can be effectively formed upon L-target addition, in accordance with the principle of chiral inversion (Fig. 1). Some authors have previously used duplex or triplex assemblies of L-oligonucleotides for designing structure-switching biosensors of opposite chirality [15,19,21,37,38]. Both Lin et al. [39] and Kim et al. [40] have also reported double-stranded structures of L-DNA building units for creating diverse mirror-image supramolecular architectures. However, to the best of our knowledge, the current data represents the first demonstration of L-nucleic acid functional assemblies relying on the loop-loop topology. The M-AKCA selectivity was demonstrated by using the natural nonapeptide L-oxytocin as non-cognate ligand [22]. No significant change in the anisotropy signal was reported in presence of $0.15 \mu\text{M}$ L-oxytocin in the L-switch/L-kiss mixture under hydro-organic conditions (Fig. 3a).

We subsequently assessed both the nuclease susceptibility of the aptakiss probes and the potential binding interferences originating from complex matrices. As methanol could induce protein precipitation and then obscure some interfering phenomena, we used organic solvent-free solutions as analysis media. After addition of a mixture of RNases to the binding buffer, the extent of enzymatic attack of L- or D-aptakisses was simply monitored by FA as the signal should decrease upon the appearance of cleaved nucleic acid fragments in the mixture [41]. As expected, the FA

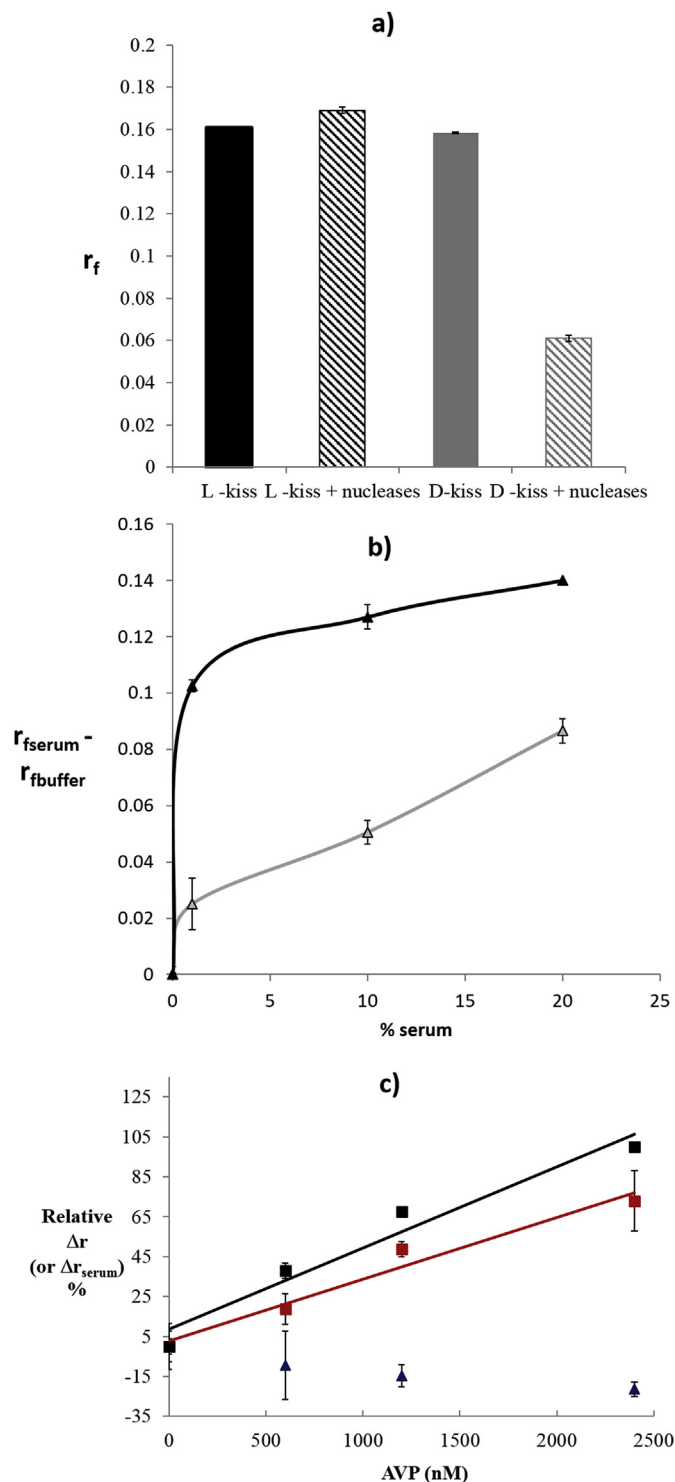


Fig. 4. a) FA signal (r_f) for free L-kiss3 or D-kiss3 in absence or in presence of nucleases. Final concentration of nucleases was $2 \mu\text{g/mL}$. Aptakiss concentration: 10 nM. b) FA variation for free L-kiss3 (grey triangle) or D-kiss3 (black triangle) in presence of different proportions of serum in the reaction solution. Aptakiss concentration: 10 nM. $r_{f\text{serum}}$ and $r_{f\text{buffer}}$ are the anisotropy values of aptakiss in serum-containing buffer and pure buffer, respectively. c) Relative FA response ($\Delta r_{\text{serum}}(\%)$) in 10% serum for the L- (red square) or D- (blue triangle) systems. For comparison with the standard data, the relative response for the L-system in the pure buffered solution ($\Delta r(\%)$) is also presented (black square). Aptakiss and aptaswitch concentration was 10 nM and 300 nM, respectively. Error bars are present for each condition but in some cases standard deviations were very low so that they are almost not visible. Buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂. Reaction temperature: 4 °C. Read at 90 min. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

signal exhibited a strong reduction by employing the D-probe (Fig. 4a). On the other hand, the use of the L-kiss3 resulted in no significant anisotropy change, confirming the lack of vulnerability of the L-RNA to the enzymatic digestion (Fig. 4a). We next carried out similar FA experiments in untreated blood-containing media. Samples with different proportions of native serum were initially incubated with the D-RNA tracer. The FA signal of D-kiss3 was sharply enhanced, *i. e.* an anisotropy increase of ~ 0.100 , when the amount of serum in the binding medium was as low as 1% (Fig. 4b). As the anisotropy increment reflected the association of the probe with high M_w binding elements [42], the FA variation suggested the probe binding to blood proteins as well as possible partially complementary nucleic acids [15]. Obviously, fluorescent RNA fragments resulting from the potential RNase degradation of the tracer could associate with serum binders and also contribute to the anisotropy increase. The FA signal further increased modestly in 10–20% serum, indicating that the matrix effects were predominantly attained starting from 1% biological fluid. On the other hand, the FA response of the L-kiss3 tracer in complex matrices was much less pronounced. A small FA increase was observed in 1% serum, by only almost one quarter (~ 0.025) as compared with the D-probe anisotropy change. Even in 10% serum, the FA increase was largely lower (~ 0.050 vs ~ 0.125). All these results indicate that the L-configuration aptakiss is more resistant to serum interferences.

In order to assess the practical advantages of the mirror-image approach over the conventional one, we finally performed assays in a realistic context by using serum samples spiked with increasing concentrations of the AVP target. We found that the M-AKCA system was able to signal the presence of L-AVP in reaction solution containing up to 10% of untreated serum (Fig. 4c). The assay sensitivity in such complex environment was slightly diminished as compared with the standard solution (by a 1.3 factor) with recoveries varying from about 50 to 75% over the L-AVP concentration range. In contrast, for the D-configuration AKCA, the anisotropy increase was completely alleviated in 10% serum under the same target concentration range (Fig. 4c). Of note, in presence of 20% serum in the binding solution, matrix effects became too prominent (Fig. 4b) for providing any assay response even with the L-configuration method (data not shown). The sensitivity of the current M-AKCA is not sufficient for a real clinical application. Indeed, AVP is found at a trace level in biological samples, its concentration ranging from 1 to 100 pM in relation to the type of fluids and pathologies [35,43]. Therefore, the immunoassays routinely used in biomedical practice require either a radioactivity detection or an optical signal amplification step in heterogeneous phase [43]. As the sandwich-like AKC strategy can be readily adapted to the ELISA-type format [6], it would be expected that further assay sensitivity improvement could be reached through the use of such enzyme-based amplified method.

4. Conclusion

In summary, the present work demonstrates the feasibility of exploiting the AKC strategy to a peptidic target, broadening the scope of detectable analytes. The assay sensitivity is found to be significantly improved upon addition of about 20% methanol cosolvent to the binding buffer solution. It is also established that the AKC can be effectively converted to a target-responsive mirror-image assembly of enhanced robustness for sensing in biological samples. It is of interest to highlight that the current strategy is not limited to chiral compounds such as reported herein. As previously shown, L-nucleic acid recognition modules can be elaborated from original aptamers specific to small achiral targets, displaying the same molecular recognition characteristics than those of the D-binding units [21,38]. We then anticipate that the mirror-image

AKC could be also converted to hairpin aptamers that target achiral ligands, including the previously reported theophylline-binding aptaswitch or other potential ones [38].

Acknowledgments

This work was supported by AGIR POLE 2016 (project ADH-KISSPLEX) and Labex ARCANE (ANR-11-LABX-0003–01) programs.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.043>.

References

- [1] M.N. Stojanovic, P. de Prada, D.W. Landry, Fluorescent sensors based on aptamer self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.* 122 (2000) 11547–11548.
- [2] R. Nutiu, Y. Li, Structure-switching signaling aptamers, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 4771–4778.
- [3] M.N. Stojanovic, D.M. Kolpashchikov, Modular aptameric sensors, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 9266–9270.
- [4] E.J. Merino, K.M. Weeks, Fluorogenic resolution of ligand binding by a nucleic acid aptamer, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 12370–12371.
- [5] G. Durand, S. Lisi, C. Ravelet, E. Dausse, E. Peyrin, J.J. Toulmé, Riboswitches based on kissing complexes for the detection of small ligands, *Angew. Chem. Int. Ed.* 126 (2014) 7062–7065.
- [6] B. Chovelon, G. Durand, E. Dausse, J.J. Toulmé, P. Faure, E. Peyrin, C. Ravelet, ELAKCA: enzyme-linked aptamer kissing complex assay as a small molecule sensing platform, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2570–2575.
- [7] G. Durand, E. Dausse, E. Goux, E. Fiore, E. Peyrin, C. Ravelet, J.J. Toulmé, A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs: towards multiplex detection by switching hairpin aptamers, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 4450–4459.
- [8] E. Goux, E. Dausse, V. Guieu, L. Azéma, G. Durand, M. Henry, L. Choinsard, J.J. Toulmé, C. Ravelet, E. Peyrin, A colorimetric nanosensor based on a selective target-responsive aptamer kissing complex, *Nanoscale* 9 (2017) 4048–4052.
- [9] K. Zhang, K. Wang, X. Zhu, M. Xie, A label-free kissing complexes-induced fluorescence aptasensor using DNA-templated silver nanoclusters as a signal transducer, *Biosens. Bioelectron.* 78 (2016) 154–159.
- [10] E. Goux, S. Lisi, C. Ravelet, G. Durand, E. Fiore, E. Dausse, J.J. Toulmé, E. Peyrin, An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 6515–6524.
- [11] T. Hermann, D.J. Patel, Adaptive recognition by nucleic acid aptamers, *Science* 287 (2000) 820–825.
- [12] C.H. Lin, D.J. Patel, Structural basis of DNA folding and recognition in an AMP-DNA aptamer complex: distinct architectures but common recognition motifs for DNA and RNA aptamers complexed to AMP, *Chem. Biol.* 4 (1997) 817–832.
- [13] J.M. Carothers, J.H. Davis, J.J. Chou, J.W. Szostak, Solution structure of an informationally complex high-affinity RNA aptamer to GTP, *RNA* 12 (2006) 567–579.
- [14] B.N. Trawick, A.T. Daniher, J.K. Bashkin, Inorganic mimics of ribonucleases and ribozymes: from random cleavage to sequence-specific chemistry to catalytic antisense drugs, *Chem. Rev.* 98 (1998) 939–960.
- [15] L. Cui, R. Peng, T. Fu, X. Zhang, C. Wu, H. Chen, H. Liang, C.J. Yang, W.H. Tan, Biostable L-DNAzyme for sensing of metal ions in biological systems, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1850–1855.
- [16] S. Klussmann, A. Nolte, R. Bald, V.A. Erdmann, J.P. Furste, Mirror-image RNA that binds D-adenosine, *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 1112–1115.
- [17] R. Boisgard, B. Kuhnast, S. Vonhoff, C. Younes, F. Hinnen, J.M. Verbavatz, B. Rousseau, J.P. Fürste, B. Wlotzka, F. Dollé, S. Klussmann, B. Tavitian, In vivo biodistribution and pharmacokinetics of 18F-labelled spiegelmers: a new class of oligonucleotidic radiopharmaceuticals, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 32 (2005) 470–477.
- [18] A. Brumbt, C. Ravelet, C. Grosset, A. Ravel, A. Villet, E. Peyrin, Chiral stationary phase based on a biostable L-RNA aptamer, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1993–1998.
- [19] H. Liang, S. Xi, L. Cui, C. Wu, X. Zhang, Designing a biostable L-DNAzyme for lead(II) ion detection in practical samples, *Anal. Methods* 8 (2016) 7260–7264.
- [20] G.M. Han, Z.Z. Jia, Y.I. Zhu, J.J. Jiao, D.M. Kong, X.Z. Feng, Biostable L-DNA-templated aptamer-silver nanoclusters for cell-type-specific imaging at physiological temperature, *Anal. Chem.* 88 (2016) 10800–10804.
- [21] C. Olea, D.P. Horning, G.F. Joyce, Ligand-dependent exponential amplification of a self-replicating L-RNA enzyme, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8050–8053.
- [22] K.P. Williams, X.H. Liu, T.N. Schumacher, H.Y. Lin, D.A. Ausiello, P.S. Kim, D.P. Bartel, Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 11285–11290.
- [23] M. Michaud, E. Jourdan, A. Villet, A. Ravel, C. Grosset, E. Peyrin, A DNA aptamer

- as a new target-specific chiral selector for HPLC, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 8672–8679.
- [24] N.G. Morgenthaler, J. Struck, S. Jochberger, M.W. Dünser, Copeptin: clinical use of a new biomarker, *Trends Endocrinol. Metab.* 19 (2008) 43–49.
- [25] S.I. Nakano, D. Miyoshi, N. Sugimoto, Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids, *Chem. Rev.* 114 (2014) 2733–2758.
- [26] C.D. Downey, R.L. Crisman, T.W. Randolph, A. Pardi, Influence of hydrostatic pressure and cosolutes on RNA tertiary structure, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 9290–9291.
- [27] J. Tyrell, K.M. Weeks, G.J. Pielak, Challenge of mimicking the influences of the cellular environment on RNA structure by PEG-induced macromolecular crowding, *Biochemistry* 54 (2015) 6447–6453.
- [28] J. Buck, J. Noeske, J. Wöhnert, H. Schwalbe, Dissecting the influence of Mg^{2+} on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 4143–4153.
- [29] P. Sehdev, G. Crews, A.M. Soto, Effect of helix stability on the formation of loop-loop complexes, *Biochemistry* 51 (2012) 9612–9623.
- [30] I.V. Smirnov, R.H. Schafer, Electrostatics dominate quadruplex stability, *Biopolymers* 1 (2007) 91–101.
- [31] J. Ren, J. Wang, J. Wang, E. Wang, Colorimetric enantio-recognition of oligopeptide and logic gate construction based on DNA aptamer-ligand-gold nanoparticle interactions, *Chem-Eur. J.* 19 (2013) 479–483.
- [32] X. Liu, Q. Zhao, Fluorescence anisotropy assay for D-vasopressin with a tetramethylrhodamine-labeled aptamer, *Anal. Methods* 8 (2016) 2383–2390.
- [33] Y. Du, S. Guo, H. Qin, S. Dong, E. Wang, Target-induced conjunction of split aptamer as new chiral selector for oligopeptide on graphene-mesoporous silica-gold nanoparticle hybrids modified sensing platform, *Chem. Commun.* 48 (2012) 799–801.
- [34] H. Qin, J. Liu, C. Chen, J. Wang, E. Wang, An electrochemical aptasensor for chiral peptide detection using layer-by-layer assembly of polyelectrolyte-methylene blue/polyelectrolyte-graphene multilayer, *Anal. Chim. Acta* 712 (2012) 127–131.
- [35] T.H. Nguyen, R. Pei, D.W. Landry, M.N. Stojanovic, Q. Lin, Microfluidic aptameric affinity sensing of vasopressin for clinical diagnostic and therapeutic applications, *Sens. Actuators B-Chem.* 154 (2011) 59–66.
- [36] P. He, V. Oncescu, S. Lee, I. Choi, D. Ericksson, Label-free electrochemical monitoring of vasopressin in aptamer-based microfluidic biosensors, *Anal. Chim. Acta* 759 (2013) 74–80.
- [37] T.A. Feagin, D.P.V. Olsen, Z.C. Headman, J.M. Heemstra, High-throughput enantiopurity analysis using enantiomeric DNA-based sensors, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 4198–4206.
- [38] H. Chen, S. Xie, H. Liang, C. Wu, L. Cui, S.Y. Huan, X. Zhang, Generation of biostable L-aptamers against achiral targets by chiral inversion of existing D-aptamers, *Talanta* 164 (2017) 662–667.
- [39] C. Lin, Y. Ke, Z. Li, J.H. Wang, Y. Liu, H. Yan, Mirror image DNA nanostructures for chiral supramolecular assemblies, *Nano. Lett.* 9 (2009) 433–436.
- [40] K.R. Kim, H.Y. Kim, Y.D. Lee, J.S. Ha, J.H. Kang, H. Jeong, D. Bang, Y.T. Ko, S. Kim, H. Lee, D.R. Ahn, Self-assembled mirror DNA nanostructures for tumor-specific delivery of anticancer drugs, *J. Control. Release* 243 (2016) 121–131.
- [41] A. Kidd, V. Guieu, S. Perrier, C. Ravelet, E. Peyrin, Fluorescence polarization biosensor based on an aptamer enzymatic cleavage protection strategy, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 3229–3234.
- [42] Z. Zhu, C. Ravelet, S. Perrier, V. Guieu, E. Fiore, E. Peyrin, Single-stranded DNA binding protein-assisted fluorescence polarization aptamer assay for detection of small molecules, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7203–7211.
- [43] G. Leng, N. Sabatier, Measuring oxytocin and vasopressin: bioassays, immunoassays and random numbers, *J. Neuroendocrinol.* 28 (2016), <https://doi.org/10.1111/jne.12413>.

Supplementary Data

Mirror-Image Aptamer Kissing Complex for Arginine-Vasopressin Sensing

Benoit Chovelon,^{a,b} Emmanuelle Fiore,^{a,b} Patrice Faure,^{b,c} Eric Peyrin^{a*} and Corinne Ravelet^{a*}

^a*University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble; CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France*

^b*Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble site Nord - Institut de biologie et de pathologie, F-38041 Grenoble, France*

^c*University Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxy Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France*

Figure S1	p S2
Figure S2	p S3
Figure S3	p S4
References	p S5

Fig. S1. Assay FA response for the three D-Vasosw3' constructs in hydro-organic mixture. Buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂ with 25% MeOH. D-kiss3 and D-Vasosw3'A, B, C concentration was 10 nM and 300 nM, respectively. D-AVP concentration: 50 nM. Reaction temperature 4°C. Read at 60 min. r value represents the anisotropy in presence of target and r_0 value is the anisotropy in absence of target.

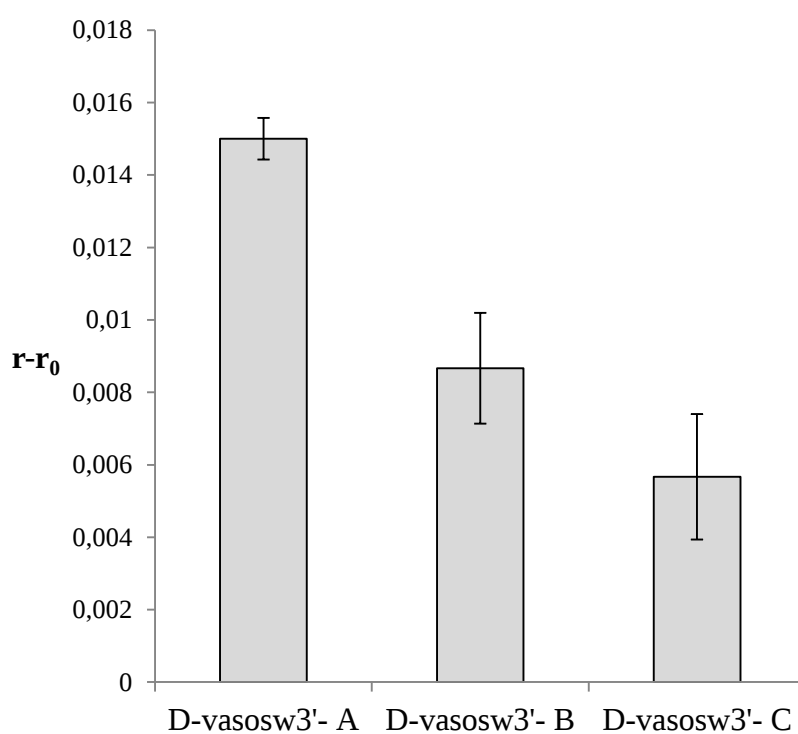


Fig. S2. Effect of the amount of the methanol (ME) cosolvent on the AKCA response for D-AVP (75 nM). Buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM MgCl₂. D-kiss3 and D-Vasow3'A concentration was 10 nM and 300 nM, respectively. Reaction temperature 4°C. Read at 90 min. r value represents the anisotropy in presence of target and r_0 value is the anisotropy in absence of target.

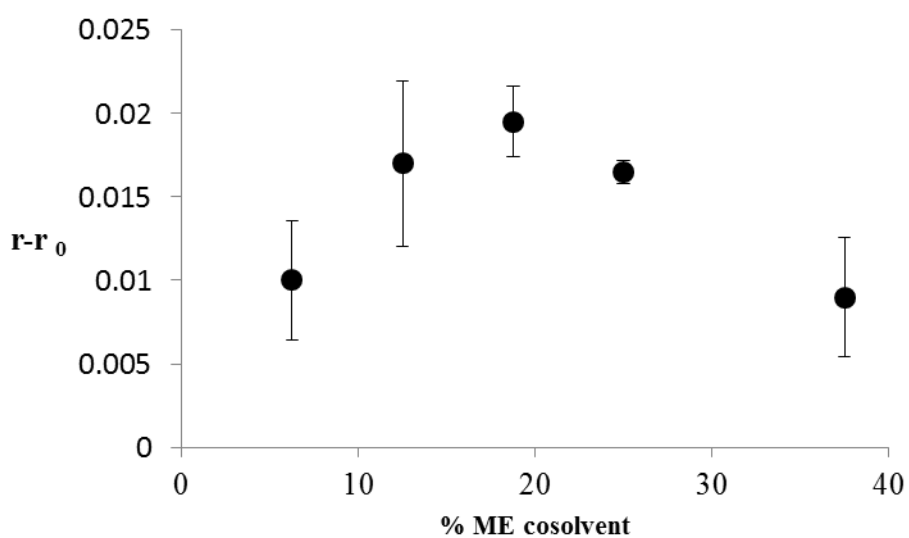
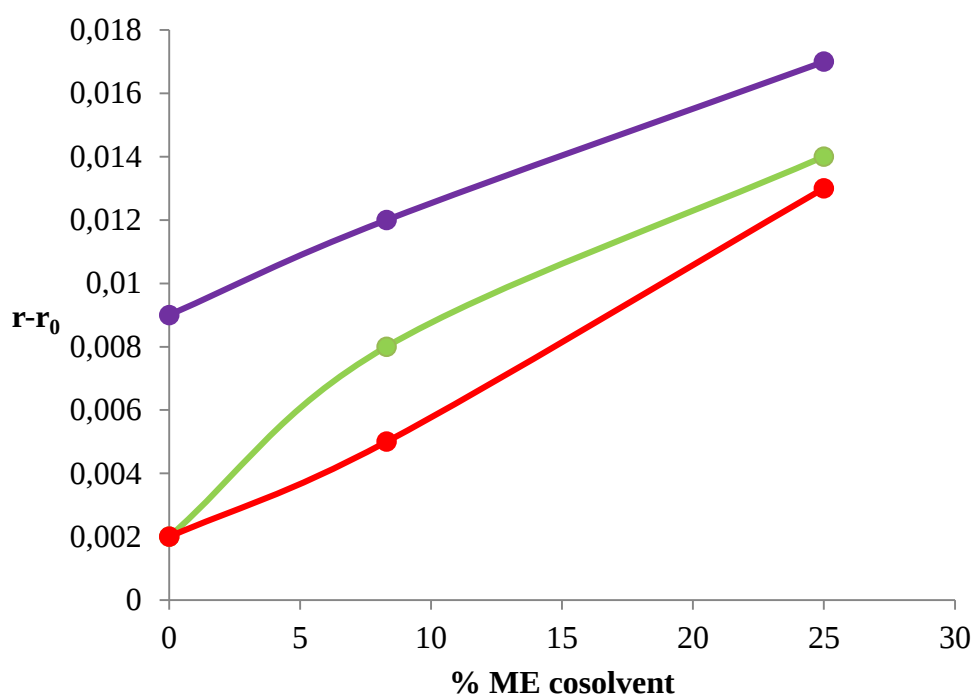


Fig. S3. Effect of the amount of the methanol (ME) cosolvent on the AKCA response for a different target-aptaswitch-aptakiss system. Both 3'-end TR-labelled aptakiss (aptakiss-k4, 5'-GGGCAGUGAUGUUGCCC) and aptaswitch (THEsw4', 5'-GGCGAUACCAGACAUCACCCCUUGGCAGCGUC) RNA oligonucleotides were used as AKC recognition modules for the theophylline FA assay. These kissing elements have been previously engineered as reported in reference [S1]. A RNA strand (5'-GACGCUCAAGGUGAUGUCUAUCGC), blocking the aptakiss binding to the free aptaswitch, was also employed to improve the AKCA response [S2]. Binding conditions were as follows: 10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ buffer; 20 min of incubation at 4°C. Oligonucleotide concentration: 10 nM. Theophylline concentration: 1 (red), 3.9 (green) and 62.5 (purple) μ M. r value represents the anisotropy in presence of target and r_0 value is the anisotropy in absence of target.



References

- [S1] G. Durand, E. Dausse, E. Goux, E. Fiore, E. Peyrin, C. Ravelet, J. J. Toulmé, A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs; towards multiplex detection by switching hairpin aptamers, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 4450-4459.
- [S2] B. Chovelon, G. Durand, E. Dausse, J. J. Toulmé, P. Faure, E. Peyrin, C. Ravelet, ELAKCA: enzyme-linked aptamer kissing complex assay as a small molecule sensing platform, *Anal. Chem.* 88 (2016) 2570-2575.

Conclusion

L'optimisation de la composition du tampon a permis une nette amélioration de la sensibilité de notre méthode : l'ajout de méthanol faisant passer la limite de détection de 340 nmol/L à 8 nmol/L. La présence de méthanol permet de renforcer l'interaction Mg^{2+} - oligonucléotides (particulièrement importante dans la reconnaissance de la cible et dans la formation du « complexe kissing ») en raison probablement de la diminution de la constante diélectrique du tampon. La limite de détection obtenue est intéressante comparativement à celles obtenues dans d'autres systèmes utilisant cet aptamère. Néanmoins un dosage d'ADH dans un échantillon humain plasmatique ou urinaire semble difficile sans une étape préalable d'extraction de l'analyte.

L'application en milieu complexe a été réalisée dans un échantillon de sérum humain surchargé avec de la L-arginine-vasopressine. Conformément à notre attente, les oligonucléotides en série L se sont montrés résistants à la dégradation par les nucléases. En revanche, leur fixation aux protéines plasmatiques s'est révélée importante, bien que de moindre ampleur comparativement aux oligonucléotides en série D. Tout du moins l'impact sur la mesure de l'anisotropie de fluorescence s'est révélé significatif, ce qui peut s'expliquer par le fait que cette technique est particulièrement sensible aux variations de taille de la molécule porteuse du fluorophore. Cette fixation aux protéines plasmatiques impose de n'utiliser qu'un faible pourcentage de plasma dans le milieu réactionnel. Ainsi, une courbe de calibration de la L-arginine-vasopressine a été obtenue en présence de 10 % de sérum, ce qui n'a pas été possible avec le système image dans le miroir (D-oligonucléotides) pour doser la D-arginine-vasopressine. Cet inconvénient est toutefois à relativiser car les techniques d'immunoanalyse utilisées en LBM imposent systématiquement une dilution importante de l'échantillon dans le milieu réactionnel.

A titre d'exemple, le dosage du cortisol par chimiluminescence sur les automates Siemens ADVIA Centaur® et celui de la gentamicine par la technique PETINIA (immunodosage par inhibition turbidimétrique améliorée par des particules) sur les automates Siemens Vista® sont représentatifs des dilutions généralement utilisées. Pour le cortisol, 20 µl d'échantillon sont dilués dans 300 µL de réactifs (ce qui représente 6,25 % de plasma dans le milieu réactionnel) ; pour la gentamicine, 1,31 µL d'échantillon sont dilués dans 106 µL de réactifs (soit une teneur finale en plasma de 1,2 %).

Dans l'objectif de diminuer les limites de détection et de pouvoir effectuer un dosage de l'arginine-vasopressine en LBM, nous nous sommes intéressés à un deuxième aptamère dirigé contre la D-arginine-vasopressine.¹⁶⁷ Il s'agit d'un oligonucléotide en série D-ARN ayant une meilleure affinité que l'aptamère utilisé jusqu'à présent ($K_d \approx 560$ pmol/L). Nous avons ainsi

imaginé la conception de trois nouveaux aptaswitchs (non présentés dans l'article précédent) dirigés contre la D-arginine-vasopressine. Pour cela la boucle d'ADN (également utilisée pour la conception des trois vasoswitchs tout ADN) a été insérée de trois façons différentes au sein de l'aptamère en série ARN. Voici les séquences obtenues et testées par anisotropie de fluorescence (tableau 3) :

Tableau 3 : Séquences des vasoswitchs ARN (en gras les nucléotides en série ADN impliqués dans le « complexe kissing » ; entre parenthèses les nucléotides en série ARN)

vasoswitch ARN 1	5'-(AGUGUGCGUGGU) ACACTCCCATTCT (GGGGUAGGGCUUGGAUGGGUAGUACACU)-3'
vasoswitch ARN 2	5'-(AGUGUGCGUGGUUAAUAAUUGG) ACACTCCCATTCT (UUGGAUGGGUAGUACACU)-3'
vasoswitch ARN 3	5'-(GGGGUAGGGCUUGGAUGGGUAGUACACU) ACACTCCCATTCT (AGUGUGCGUGGU)-3'

En l'absence de méthanol, les trois vasoswitchs semblent présenter une certaine réponse mais l'anisotropie de fluorescence est relativement variable et l'amplitude du signal faible (figure 26).

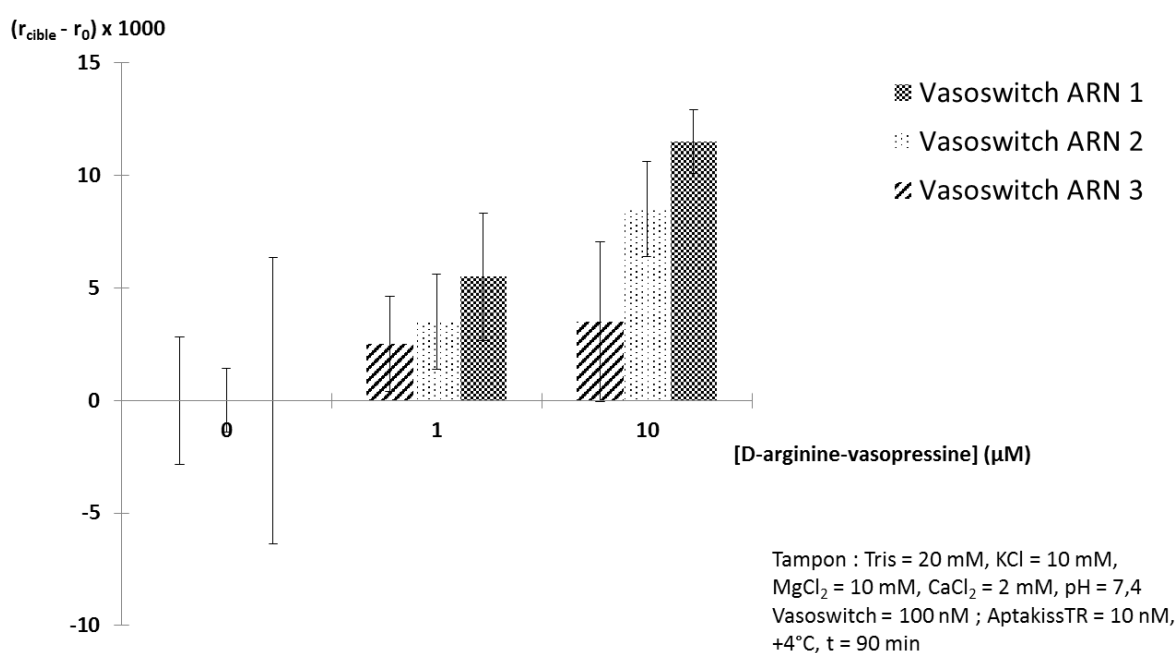


Figure 26 : Réponse des vasoswitchs ARN en présence de différentes concentrations de cible

La présence de méthanol n'a pas permis d'améliorer le système comme c'était le cas avec le vasoswitch en série ADN. Après des essais d'optimisation en jouant sur la stœchiométrie (rapport aptaswitch / aptakiss), sur la durée d'incubation avant mesure de l'anisotropie de fluorescence, ou sur la composition du tampon, cette stratégie a été abandonnée et cela d'autant

plus facilement que la synthèse en série L d'un oligonucléotide constitué d'ARN et d'ADN serait particulièrement coûteuse pour un test diagnostique haut débit de routine.

Finalement, ces deux premiers travaux ont concerné le développement de systèmes présentant des similitudes importantes avec l'immunoanalyse. L'objectif de la suite de ma thèse a été de développer une méthodologie de dosage innovante sans marquage (« label-free ») utilisant les propriétés propres des acides nucléiques. Ce nouveau moyen de détection pourrait permettre d'améliorer le dosage de l'arginine-vasopressine.

III. Utilisation du SYBR Green dans les bioessais utilisant des oligonucléotides en série ADN

Stratégie

Une grande majorité des bioessais de type optique à base d'aptamère utilisent les mêmes techniques de marquage qu'en immunoanalyse : marquage par un fluorophore,⁹⁷ marquage direct par une enzyme,¹²⁷ marquage indirect par une enzyme par l'intermédiaire de la biotine.¹²⁶ Pourtant, la modification d'un oligonucléotide par ajout d'un marqueur représente une étape délicate pouvant s'avérer coûteuse et pouvant gêner la reconnaissance de la cible par l'aptamère. Il est donc très intéressant de s'intéresser à des systèmes de type « label free ».

Comme nous l'avons déjà évoqué, les biocapteurs basés sur des techniques de surface sont souvent présentés comme des méthodes « label-free ».¹²¹⁻¹²⁵ Ces techniques nécessitent néanmoins l'immobilisation de l'aptamère ou de la cible, ce qui représente une étape délicate. L'immobilisation de l'aptamère par création d'un lien covalent impose habituellement la fonctionnalisation par un groupe chimique ainsi que l'ajout d'un bras espaceur.¹⁴⁸ A noter également la fréquente utilisation de la très forte affinité biotine – streptavidine ou biotine – avidine pour immobiliser un aptamère préalablement biotinylé.¹²¹ Il y a toutefois des exceptions parmi lesquelles nous pouvons citer le biocapteur électrochimique développé par Farjami *et al.* pour le dosage de la dopamine.¹²² L'aptamère anti-dopamine est en effet immobilisé par l'intermédiaire de liaisons électrostatiques entre les fonctions amines (charges positives), des cystéamines immobilisées à la surface de l'électrode d'or, et les groupements phosphates de l'aptamère (charges négatives). Les liaisons faibles telles que les liaisons électrostatiques ont cependant l'inconvénient d'être rompues facilement.

En ce qui concerne les biocapteurs de type optique basés sur des systèmes « label-free », le phénomène d'inhibition de la fluorescence (« quenching ») est très souvent utilisé. C'est le cas notamment du biocapteur de Roncancio *et al.* permettant le dosage de la cocaïne, basé sur le déplacement d'un fluorophore, l'ATMND, par la cocaïne entraînant l'exaltation de la fluorescence.¹⁶⁸ Le biocapteur de Wu *et al.* permettant le dosage de l'ochratoxine A (OTA) est lui basé sur le déplacement de la thioflavine T (fluorophore) par l'OTA entraînant une importante inhibition de la fluorescence.¹⁶⁹

En plus de la délicate étape de marquage de l'oligonucléotide, les bioessais à base d'aptamère pour petite molécule utilisant la technique de polarisation de fluorescence, génèrent un signal bien souvent faible.¹⁵³ Le développement de biocapteurs « label-free » sensibles est ainsi particulièrement attendu. Actuellement, une seule stratégie est d'ailleurs décrite. Il s'agit du

biocapteur de Zhen *et al.* permettant le dosage des ions potassiums.¹⁷⁰ En l'absence de potassium, les fixations de l'acridine orange et des deux oligonucléotides simple brin (sonde de reconnaissance de K⁺) sur l'oxyde de graphène, sont responsables de l'importante anisotropie de fluorescence mesurée. La présence de potassium permet l'association des deux oligonucléotides simple brin et leur structuration en un G-quadruplexe ayant une forte affinité pour l'acridine orange. La petite taille du complexe formé (acridine orange – G-quadruplexe), déplacé de l'oxyde de graphène, entraîne ainsi une importante diminution de l'anisotropie de fluorescence.

Dans cette troisième partie du travail, nous avons ainsi envisagé une méthode de révélation « label-free », particulièrement innovante, utilisant le SYBR Green libre en solution. Il s'agit d'une petite molécule de la famille des cyanines, ayant la faculté de se lier à l'ensemble des acides nucléiques avec une préférence pour l'ADN double brin (intercalation et interaction avec le petit sillon de l'ADN). Il est utilisé à ce jour en LBM pour détecter l'ADN et l'ARN sur gel de polyacrylamide ou d'agarose¹⁷¹ et pour quantifier l'ADN lors des PCR en temps réel.¹⁷² Peu fluorescent à l'état libre, il devient un très bon fluorophore lors de sa fixation sur les acides nucléiques. Les chercheurs s'intéressent habituellement à la fluorescence du SYBR Green. L'originalité de notre travail provient de l'étude de l'anisotropie de fluorescence de cette cyanine.

Après avoir étudié le comportement du SYBR Green en présence d'oligonucléotides double brin, le SYBR Green a été utilisé comme système de révélation pour des petites molécules et a montré son intérêt dans l'étude des ligands de l'ADN à travers des essais de déplacement.

Concernant les bioessais pour petites molécules, nous avons utilisé trois oligonucléotides fonctionnels : un aptamère anti-adénosine, un aptamère anti-tyrosinamide et un oligonucléotide riche en thymines reconnaissant le mercure. Après incubation avec la cible pendant cinq minutes, le SYBR Green a été ajouté puis une lecture de l'anisotropie de fluorescence a été réalisée.

Pour les essais de déplacement du SYBR Green nous avons utilisé quatre couples ligands – oligonucléotides : l'actinomycine D qui est un intercalant ayant la possibilité de se fixer sur un oligonucléotide double brin ADN de 12 paires de bases ; le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) qui est un ligand du petit sillon de l'ADN ayant également la possibilité de se fixer sur l'oligonucléotide double brin ADN de 12 paires de bases ; la protéine SSB (Single-strand binding protein) ayant la possibilité de se fixer à un oligonucléotide polyT simple brin de 30 bases ; la rutine ayant la possibilité de se fixer à un oligonucléotide s'organisant en G-

Quadruplex. Après incubation de l'oligonucléotide avec le SYBR Green, le ligand de l'ADN est ajouté puis l'anisotropie de fluorescence est mesurée.



A lifetime-sensitive fluorescence anisotropy probe for DNA-based bioassays: The case of SYBR Green

Benoit Chovelon^{a,b,c}, Emmanuelle Fiore^{a,b}, Patrice Faure^{c,d}, Eric Peyrin^{a,b,*}, Corinne Ravelet^{a,b,*}

^a University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^b CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^c Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble site Nord - Institut de biologie et de pathologie, F-38041 Grenoble, France

^d University Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxia Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Fluorescence anisotropy
SYBR Green
Lifetime
DNA oligonucleotide
Wide applicability

ABSTRACT

In standard steady-state fluorescence anisotropy (FA) DNA-based assays, the ligand binding to a given receptor is typically signalled by the rotational correlation time changes of the tracer. Herein, we report a radically different strategy that relies on the peculiar excited state lifetime features of the SYBR Green (SG) dye. This DNA-binding probe exhibits a drastically short lifetime in solution, leading to a high FA signal. Its complexation to oligonucleotides determines a singular and very large depolarization depending on the concerted effects of extreme lifetime enhancement and resonance energy homotransfer. On the basis of ligand-induced changes in the molar fractions of bound and free forms of SG, the approach provides an unprecedented means for the FA monitoring of the ligand binding to short DNA molecules, allowing the elaboration of a variety of intercalator displacement assays and label-free biosensors that involve diverse DNA structures (duplex, hairpin, G-quadruplex and single-stranded), ligand types (ion, small organic molecule and protein) and binding modes (intercalation, minor groove, allosteric switch). These findings open up promising avenues in the design of a new generation of FA assays.

1. Introduction

The fluorescence anisotropy/polarization (FA/FP) spectroscopy is very popular in the biochemical/biophysical field for the determination of volume and flexibility of macromolecules, the analysis of ligand-receptor binding, the study of the membrane fluidity or the tissue imaging as well as in the analytical chemistry area for clinical, environmental and food control applications (Jameson and Ross, 2010). Due to the self-referencing detection nature of the technology, FA-based assays are quite insensitive to fluorescence fluctuation, fluorophore concentration, photobleaching and environmental interferences (Jia et al., 2015). The steady-state FA response of a fluorescent probe is classically expressed by the following Perrin relation form:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (1)$$

where r is the measured fluorescence anisotropy, r_0 is the fundamental fluorescence anisotropy, τ the excited state lifetime of the fluorophore and θ the rotational correlation time of the probe.

In the particular field of the nucleic acid analysis, label-free FA methods based on intercalation dyes such as acridine orange (AO),

ethidium bromide or other planar cationic species have been widely employed for exploring the structures, dynamics and binding modes of DNA/RNA molecules (Sayed and Pal, 2015; Shaw and Pal, 2007; Duhamel et al., 1996; Genest et al., 1985; Richardson and Schulman, 1981; Lober, 1981). As the r value inversely depends on the τ/θ ratio (Eq. (1)), the anisotropy change of the probe upon DNA binding results from two major contributions: (i) the θ variation mainly dependent on the enlargement of the overall molecular size of the rotating species and (ii) the τ modification based on the photochemical changes. Standard steady-state FA responses are governed by the change in the rotational correlation time component of the probe. For instance, the average τ and θ values of the typical AO dye in both free and DNA duplex-bound states are presented in Fig. 1A. The θ increase is greater than the τ one leading to the decrease in the τ/θ ratio, which in turn determines the classical increase in the polarization upon dye binding (Fig. 1A). Obviously, the shorter the length of targeted DNA molecules, the lower will be the assay response for these probes. As the consequence, the application spectrum of the label-free steady-state FA approach is inherently restricted to highly polymeric DNA molecules (Genest et al., 1985; Richardson and Schulman, 1981).

Herein, we describe a radically different strategy that relies on the

* Corresponding authors at: University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France.

E-mail addresses: eric.peyrin@ujf-grenoble.fr (E. Peyrin), corinne.ravelet@ujf-grenoble.fr (C. Ravelet).

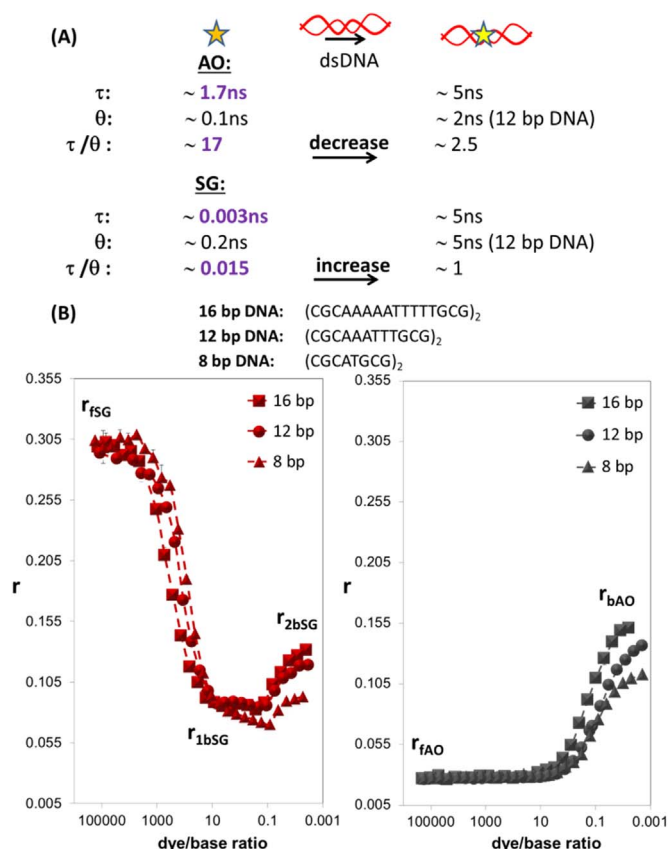


Fig. 1. (A) Photochemical and rotational features of AO and SG probes. The θ values for the SG dye in DNA-bound and free forms were estimated from the computed rotational diffusion coefficients (Duhamel et al., 1996) and prediction software (<http://nmr.chemistry.manchester.ac.uk/?q=node/290>), respectively. All the other parameters were taken from literature data (ambient temperature, solution viscosity of around 1 cP and low dye/base ratio) (Shaw and Pal, 2007; Lober, 1981; Dragan et al., 2012). (B) Steady-state fluorescence anisotropy of SG (left) and AO (right) probes upon binding to 16, 12 and 8 bp duplexes. Binding buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl with 2.5% ethanol.

peculiar lifetime changes of the DNA-binding probe. Although not yet accomplished in steady-state FA assays, one can predict from Eq. (1) that a reversed variation of the r value could be achieved by using a tracer that would display strong increase in the τ value when complexed to DNA. Asymmetrical monomethine cyanine dyes such as SYBR Green (SG) are extensively used by many laboratories around the world in DNA staining (Schneenberger et al., 1995), quantitative real-time PCR and DNA melting curve analysis (Gentilini and Turba, 2014). Their unique intra-molecular flexibility leads to a drastically short lifetime in aqueous solution (in the ps range) whereas an extreme increase occurs in the constrictive environment of DNA (τ in the ns range) (Fig. 1A) (Dragan et al., 2010, 2012). Therefore, the θ increase of SG upon the free to short DNA-bound switch should be of weak magnitude as compared to the enhancement in the dye lifetime such that a decrease in the anisotropy signal is expected. In contrast to traditional rotation-based intercalating probes, the absolute FA change of SG should be improved with the DNA size decreasing, suggesting that this dye could be especially pertinent for probing oligonucleotides. In order to evaluate the potentialities of the proposed FA strategy, we initially studied the change in the steady-state anisotropy of SG when bound to small dsDNA model templates (from 8 to 16 bp) and compared the FA response to that produced by the conventional AO probe. We subsequently exploited the reporting features of the cyanine dye in both intercalator displacement assays and label-free biosensors by monitoring the FA variation related to the ligand-induced changes of the free and DNA-bound fractions of SG. The wide applicability of

the approach was demonstrated by using a diversity of ligand:DNA systems.

2. Experimental section

2.1. Chemicals

SYBR Green I (SG), tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), adenosine, guanosine, tyrosinamide, tyrosine, phenylalanine, inosine, actinomycin D, 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and rutin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin, France). Acridine orange (AO) and sodium chloride (NaCl) were purchased from Chimie-Plus laboratories (Bruyères de Pouilly, France) and Panreac Quimica (Barcelona, Spain), respectively. HgCl₂ and CuCl₂ were purchased from Prolabo (Coueron, France). ZnCl₂ and MgCl₂ were supplied by Acros (thermoFisher Scientific, New jersey, US) and Carloth (Lauterbourg, France), respectively. HCl, NaOH and DMSO were provided by Carlo Erba (Val de Reuil, France). 3-methyluric acid was obtained from Siccip-emmop (Marseille, France). E. coli single-stranded DNA binding protein (SSB) was purchased from Tebubio (Le Perray en Yvelines, France). Water was obtained from a Direct-Q® 3UV water purification system (Millipore, Saint-Quentin en Yvelines, France) fitted with reverse osmosis and exchange-ion cartridges. All chemicals were at least of analytical grade. All the DNA oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Belgium).

2.2. Apparatus

Fluorescence anisotropy was measured in black 96-well (or 384-well for SSB-based ID assay) Greiner Bio-One microplates (Courtaboeuf, France) using a Tecan Infinite F500 microplate reader (Männedorf, Switzerland). Excitation for both AO and SG was set at 485 ± 20 nm and emission was collected with 535 ± 25 nm bandpass filters. The fluorescence anisotropy (r) was calculated as classically described (Ruta et al., 2009). The fluorescence intensity was determined as previously reported (Perrier et al., 2016). Absorption measurements for the SG concentration determination were realized on a Shimadzu UV mini-1240 spectrophotometer (Sarreguemines, France).

2.3. SG or AO interaction with DNA templates

The oligonucleotide solutions were prepared in water and stored at -20 °C. The working DNA template solutions were obtained by adequate dilution of the stock solution in 2X concentrated binding buffer. Prior to the first utilization, the working solutions were heated at 80 °C for 5 min and left to stand at room temperature for 30 min. The stock solution 10,000X of SG was in DMSO. The concentration of SG was determined by measuring the absorbance using the extinction coefficients $\epsilon_{495}=75,000$ M⁻¹cm⁻¹ and the TE buffer (10 mM Tris pH 7.5 and 1 mM EDTA), as previously described (Dragan et al., 2012). The stock solution was estimated to be 6.5 mM. A stock solution of AO was prepared in water at 1 mM. An appropriate dilution of SG or AO in water was used to prepare the working solutions. These were mixed with 2X concentrated binding buffer and 5% ethanol (the addition of this very small amount of organic solvent was found to improve the FA measurement repeatability) before to be mixed into the individual wells (final volume=100 μ L) with the oligonucleotides working dilutions. The titration curves of DNA were realized at ambient temperature and the microplate was immediately placed into the microplate reader for the measurement. The final concentration of SG and AO was 4.2 μ M and 6 μ M, respectively. Blank wells of the microplate received 100 μ L of the binding buffer containing 2.5% of ethanol as for the other wells. All experiments were done in triplicate.

2.4. Intercalator displacement assays

We worked with DNA template concentrations for which the ligand-bound DNA-to-free DNA anisotropy ratio was the highest. These optimal conditions were attained for the d/b ratio range that led to free DNA anisotropy equal to r_{1bSG} (data not shown). The final concentrations of 12 bp DNA, poly-T and c-MYC G4 were respectively 782 nM, 390 nM and 390 nM. SG and DNA solutions were pre-incubated for 5 min in wells and the selected ligands were added at increasing concentrations. The final concentration of SG was 4.2 μ M. The binding buffer conditions for the 12 bp DNA duplex assays were 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl. Poly-T and c-MYC G4 ID assays were realized using a buffer constituted of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM KCl. For 12 bp DNA template assays, actinomycin D (intercalating binder) and DAPI (minor groove binder) were chosen as competitors. Actinomycin D was dissolved in DMSO-water mixture at 6 mM concentration and DAPI in water at 28.6 mM concentration. The ligand concentration varied respectively from 0 to 500 μ M for actinomycin D (1.5% of DMSO in wells) and from 0 to 5720 μ M for DAPI. Concerning the poly-T assay, SSB was diluted in water at a final concentration of 26 μ M. The protein concentration varied from 0 to 2500 nM. Rutin was dissolved in DMSO and was used as displacer ligand for c-MYC G4 assay. The rutin concentration varied from 0 to 8000 μ M (4% DMSO in wells). All the ligand solutions were diluted with 2X buffer solutions. All experiments were done in triplicate.

2.5. Biosensors

The binding buffer for the SG-based adenosine and tyrosinamide biosensors consisted of 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$. For the Hg(II) biosensor, the binding buffer was 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl. Although $NaNO_3$ can provide better response than other salts with Hg(II)-specific T-rich oligonucleotides (Yin et al., 2012; Wang et al., 2016), we choose to perform experiments under the same binding solution conditions (except $MgCl_2$ for Hg(II)) for the three functional DNAs, i.e., by using NaCl (which is commonly employed for the adenosine and tyrosinamide aptamers) in all the buffers. The working oligonucleotide solutions were selected and prepared as reported above for the ID assays. The final concentration for adenosine aptamer, tyrosinamide aptamer and Hg(II) T-rich DNA were respectively 32 nM, 32 nM and 8.33 nM. The target solutions were first prepared in water and then diluted in buffer 2X. For titration curves, the ligand concentration ranged from 0 to 1000 μ M for adenosine, from 0 to 20 mM for tyrosinamide and from 0 to 312.5 nM for Hg(II). The reagents were mixed in the wells in the following order: functional DNA and targets were first pre-incubated for 5 min followed by the addition of SG. The final concentration of SG in wells was lowered to 1.05 μ M to improve the assay response. Experiments were performed at both ambient and low reaction temperatures. In the latter case, oligonucleotide samples were incubated in ice water bath for a 30 min period. Analyte solutions were also stocked in ice water bath before use. These samples were then transferred into the individual wells, and the fluorescence anisotropy measurement was immediately performed.

3. Results and discussion

3.1. Study of the steady-state FA of SG upon binding to short dsDNA molecules

In the first stage of the present work, we investigated the steady-state FA features of SG upon interaction with a 12 bp model DNA template (Fig. 1B). The r value of SG in bulk solution was high for a free dye ($r_{fSG} \sim 0.305$), as the result of the very rapid decay of the excited state relative to the timescale of rotation. For comparison, the free AO probe exhibited a most common low r_{fAO} of ~ 0.025 due to a rotational

diffusion rate faster than the rate of emission. Titration curves were then constructed by plotting the anisotropy of dyes against the added DNA concentration, depicted under the dye/base (d/b) ratio scale (Fig. 1B). Consistent with our prediction, the r value of SG was greatly diminished with the d/b ratio decreasing. However, the anisotropy trend showed a clear transition at d/b = 0.1. The titration curve displayed a plateau in the 10–0.1 d/b range with a minimal value r_{1bSG} as low as ~ 0.085 followed by an increase in the anisotropy until a limiting value $r_{2bSG} \sim 0.120$ at d/b approaching 0.001 (Fig. 1B). Such distinct behavior signed the occurrence of mixed depolarization mechanisms. At nearly saturating DNA concentration, the FA change between free and DNA-bound states ($\Delta r_{2SG} (r_{2bSG} - r_{fSG}) = -0.185$) can be reasonably ascribed to the increase in the τ/θ ratio upon the SG lifetime enhancement (Fig. 1A). The further depolarization that appeared at large density of dye along DNA was assigned to the well-known resonance energy homotransfer (homo-RET) between closely located molecules (Genest et al., 1985; Lober, 1981; Barcellona and Gratton, 1996; Kubota and Steiner, 1977), leading to enhanced FA variation ($\Delta r_{1SG} (r_{1bSG} - r_{fSG}) = -0.220$).

On the other hand, we observed a typical increase in the FA signal for AO with the d/b ratio decreasing (Fig. 1B), due to the enlargement of the rotational diffusion of the dye when DNA bound (Fig. 1A). A maximal r value of about 0.135 (r_{bAO}) and a twice lower absolute FA variation ($\Delta r_{AO} (r_{bAO} - r_{fAO}) = +0.110$) were reported in the duplex excess range. In this case, it is worth noting that the homo-RET process thwarted the anisotropy rise in the high dye coverage regime, as earlier described (Kubota and Steiner, 1977).

We next performed the same experiments with shorter and longer dsDNA model templates (8 and 16 bp, Fig. 1B). As expected for a conventional behavior, Δr_{AO} was respectively lower and higher for the 8 and 16 bp molecules. On its side, the absolute anisotropy change of SG varied inversely with the duplex length over the DNA excess range (Δr_{2SG}) or was minimally affected under homo-RET conditions (Δr_{1SG}). Thus, as compared to AO, the FA response of SG was improved or at least roughly invariant when the size of the targeted species decreased. These findings highlight the potentialities of this dye to particularly probe small dsDNA molecules by steady-state FA.

The measured FA variation upon DNA addition can be assessed through the well-known additive features of the anisotropy (Lakowicz, 2006):

$$r = \frac{m_b r_b + m_f r_f}{m_b + m_f} = \frac{m_b \frac{q_b}{q_f} r_b + m_f r_f}{m_b \frac{q_b}{q_f} + m_f} \quad (2)$$

where J , m and q are the fractional intensity, molar fraction and quantum yield of the probe in the free (f) and DNA-bound (b) states. From Eq. (2), one can see that, for a given molar fraction of complexed dye, the generated FA signal will depend not only on the difference between r_b and r_f but also on the magnitude of the q_b/q_f ratio. Considering the greatest measured anisotropy change (Δr_{1SG}) and the tremendous quantum yield enhancement of SG upon DNA binding (nearly proportional to the lifetime change, ~ 1500 fold) (Dragan et al., 2012; Cosa et al., 2001), even a very small m_b value will engender a strong FA variation in the high d/b ratio range. Let us envisage a 12 bp DNA-bound molar fraction of SG as low as 1%. Assuming a q_b/q_f ratio of 1500 (q_b is generally not greatly perturbed by homo-RET due to the identical nature of donor and acceptor) (Lopez et al., 2012) and assimilating r_{1bSG} to the r_b value associated with the large dye density regime, we predict a r value of 0.098 which would equal to a FA change ($r - r_{fSG}$) as large as -0.207 . By applying the same estimation for AO (using a q_b/q_f ratio of 3 (Lober, 1981) and ignoring the antagonist homo-RET contribution), it is found that 1% of complexed dye would produce a negligible response ($+0.003$).

3.2. SG-based FA intercalator displacement (FA-ID) assays

The attractive signaling properties of the SG probe under high dye:DNA stoichiometry conditions were then considered for developing steady-state FA-ID assays. The ID assays are largely used for identifying nucleic-acid ligands, determining their affinity/selectivity and characterizing their interaction mode (Verga et al., 2014; Kumar et al., 2011; Boger et al., 2001). The principle relies on the photochemical changes of a DNA-binding fluorescent species upon its ligand-induced release from the complex formed with DNA. Previous works have employed FA as ID assay reporting method (Genest et al., 1985; Richardson and Schulman, 1981). However, these assays have been only described using high molecular weight dsDNA templates such as calf-thymus DNA, making this approach of little value in terms of structure/sequence selectivity spectrum as well as tested ligand range.

The proof-of-principle of the SG-based FA-ID assay was first established using the probe complexed to the 12 bp model DNA, at a d/b ratio of 0.45. The binding of SG to the DNA helix ($K_d \sim 200$ nM under 250 mM salt concentration conditions) (Dragan et al., 2012) covers a ~ 3 –4 bp site and involves, depending on the d/b range, intercalation and minor groove interaction (Zipper et al., 2004). Known intercalating and minor groove binders were chosen as potential displacers, i.e., actinomycin D (Richardson and Schulman, 1981) and 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Barcellona and Gratton, 1996), respectively. The dissociation constants between these two ligands and dsDNA are in the nano-to-micromolar range in relation to the oligonucleotide sequence and experimental conditions (Chen and Sha, 2002; Boger et al., 2001). The addition of increasing amounts of selected compounds into the pre-incubated SG:dsDNA solution led to a large increase in the FA signal (Fig. 2). The result is consistent with the competitor-induced release of SG from the DNA molecule in both cases. Δr_H ($r_H - r_{1bSG}$, where r_H is the FA at the highest tested ligand concentration) and DC_{50} (displacer concentration required to increase the FA signal of SG by 50%) varied from +0.120 (DAPI) to +0.160 (actinomycin D) and from 8 μ M (actinomycin D) to 250 μ M (DAPI),

respectively. Under the d/b conditions used in the present study, SG is known to interact with dsDNA mostly through an intercalative binding mode (Zipper et al., 2004). This could partially explain the easier SG displacement ability of actinomycin D as compared to DAPI.

SG is known to interact not only with duplexes but also with ssDNA and G-quadruplex (G4) elements, although with lessened affinities (Cosa et al., 2001; Zipper et al., 2004; Xu et al., 2010). Moreover, the SG binding to 30 mer poly-T and 27 mer c-MYC promoter G4 governed a decrease in the FA signal. The response at large dye loading was delayed and of lower amplitude relative to dsDNA (Fig. S1). It could be attributed to the weaker affinity and lifetime enhancement (Cosa et al., 2001; Zipper et al., 2004; Xu et al., 2010) as well as a less effective homo-RET. A consequent FA variation was still reached, with Δr_{1SG} values in the -0.130 – -0.150 range (Fig. S1). Ligands of G-quadruplex (rutin) (Tawani and Kumar, 2015) or ssDNA (single-stranded DNA binding protein, SSB) (Zhu et al., 2012) were added to a pre-incubated mixture of SG and c-MYC G4 or poly-T (d/b ratio=0.40), respectively. Positive response curves similar to those reported with dsDNA were observed when the ligand concentration increased, with DC_{50} ranging from 75 nM for SSB to 300 μ M for rutin (Fig. 2). The significant difference in the binding affinity of the two binders for their corresponding DNA targets ($K_d \sim 50$ nM for the SSB: poly-T complex (Zhu et al., 2012) and in the micromolar range for rutin: G4 complexes (Tawani and Kumar, 2015)) as well as the weaker affinity of SG for ssDNA (Fig. S1) likely contributed to the disparity in the probe displacing capability of the SSB and rutin ligands. Although preliminary, all these results suggest that the SG dye could become a convenient FA probe for investigating the binding ability of ligands towards a variety of small DNA molecules with pre-defined sequences and structures.

3.3. SG-based FA biosensors

We subsequently investigated the possibility to use the SG-based FA strategy for developing sensing platforms. In the analytical field, the FA transduction technique is commonly coupled to recognition elements (REs) such as functional oligonucleotides or antibodies for designing highly specific assays. For the DNA-based detection of proteins (Huang et al., 2015; Guthrie et al., 2006; Fang et al., 2001) and small targets (Zhu et al., 2012; Perrier et al., 2016; Zao et al., 2015; Durand et al., 2014, 2016; Liu et al., 2013; Ruta et al., 2009; Ye and Yin, 2008), either the functional nucleic acid molecule or a reporting element is typically labelled by a fluorophore through a covalent linkage. However, the elaboration of sensitive FA sensing platforms requires, especially for small analytes, the laborious and time-consuming design of target-responsive probes and/or sophisticated amplification approaches. To overcome these limitations, label-free FA biosensors are highly desirable. To date, only one functional DNA-based label-free FA method has been developed using AO as G4 probe for the detection of K^+ (Zhen et al., 2015). However, due to the negligible change in the anisotropy upon the formation of the AO:G4 complex, the incorporation of graphene oxide as mass-amplifier agent was needed to generate response.

In contrast, significant variations in the measured anisotropy were anticipated by using solely functional DNAs as REs and SG as probe. We carried out experiments with three different model systems. Two aptamers with unstructured (23 mer) (Souard et al., 2015) and hairpin-like (25 mer) (Perrier et al., 2016) motifs as well as one T-rich functional DNA (22 mer) (Ono and Togashi, 2004; Wang and Liu, 2008) were used for the respective detection of tyrosinamide and adenosine molecules and Hg(II) ion (Fig. 3). Titration curves were constructed using pre-incubated target:DNA solutions (Perrier et al., 2016) and d/b ratio ranging from 1.30 to 5.75, at both ambient and low reaction temperatures (Fig. 3). According to the target nature and the well-known induced-fit binding process of functional DNA (Ruta et al., 2009), the occurrence of both competitive (Xing et al., 2015) and

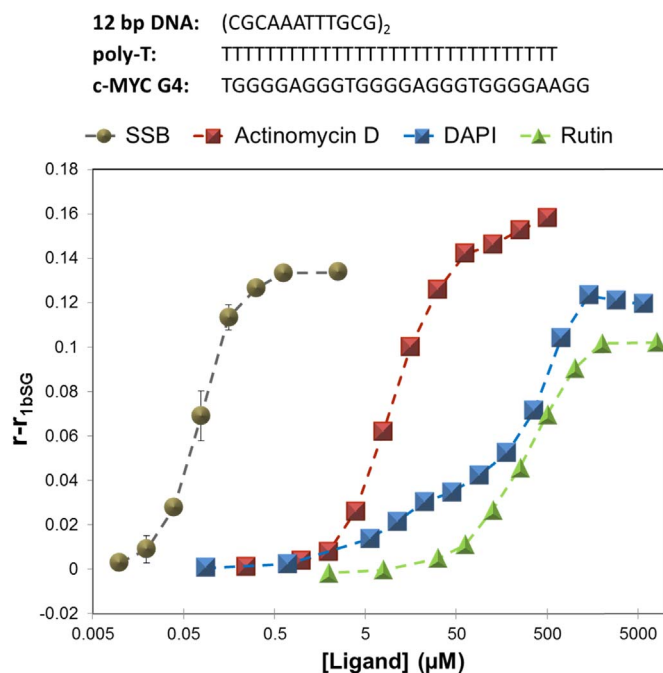


Fig. 2. SG-based FA intercalator displacement assays using 12 bp dsDNA (square), c-MYC G-quadruplex (triangle) and poly-T ssDNA (circle) templates and a selection of DNA-binding ligands. Binding buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl (for 12 bp dsDNA) or 250 mM KCl (for c-MYC G-quadruplex and poly-T ssDNA) with 2.5% ethanol.

Adenosine aptamer: CCTGGGGGAGTATTGCGGAGGAAGG
Tyrosinamide aptamer: TGTGGTGTGTGAGTGCGGTGCC
Hg(II) T-rich DNA: TTCTTCTTCCCCTGTGTTGT

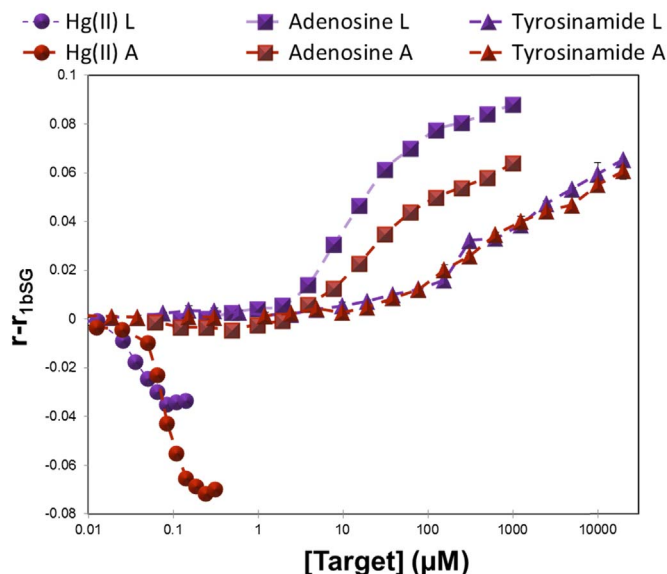


Fig. 3. Titration curves of targets using their corresponding functional DNAs at low (L) and ambient (A) temperatures. Binding buffer conditions: 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ (for small molecules) or 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl (for Hg(II)) with 2.5% ethanol.

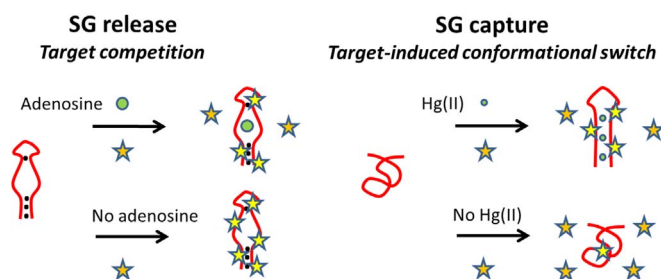


Fig. 4. Illustration of possible SG release or capture modes for biosensors. As dsDNA has a higher affinity for the dye than ssDNA, the folding of a random-coil single-stranded element into an active secondary structure induced by a very small target could promote the DNA binding of SG (right, Hg(II) system). In contrast, a direct competition between the dye and a larger target is assumed to prevent the DNA:SG complex formation for a pre-structured oligonucleotide (left, adenosine system). For the tyrosinamide system, the two mechanisms are expected to occur concomitantly due to the significant target-mediated transition from the unstructured to folded aptamer (Ruta et al., 2009; Souard et al., 2015).

conformational transition mechanisms (Wang and Liu, 2008) could trigger either release or capture of SG (Fig. 4). Therefore, we conjectured positive or negative FA responses depending on the relative contributions of competition and allosteric switch. The signal increase for the two molecules supported a dominant SG release (Fig. 4, left), with significant Δr_H responses (in the +0.060–0.090 range). On the other hand, the binding of Hg(II) to the T-rich sequence caused a reduction in the FA signal (Δr_H ranging from –0.035 to –0.070). The result means that the switch from the random-coil ssDNA into a T-Hg-T coordination-induced stem-loop motif (Ono and Togashi, 2004) determined enhanced binding of SG (Wang and Liu, 2008) (Fig. 4, right). Moreover, fluorescence intensity changes of SG upon target binding to functional oligonucleotides were consistent with the proposed signaling mechanisms (see Fig. S2). The reaction temperature affected the assay response especially for the adenosine and Hg(II) systems. At low reaction temperature, a Δr_H enhancement was observed for the adenosine sensing whereas the reverse occurred

Table 1

Detection limit and linear range of SG-based FA biosensors.

Analyte	Detection limit	Linear range
Adenosine	0.8 μ M	0.061–7.81 μ M
Adenosine*	1.5 μ M	0.061–7.81 μ M
Tyrosinamide	19.5 μ M	9.7–312.5 μ M
Tyrosinamide*	14.5 μ M	9.7–156 μ M
Hg(II)	12 nM	6–64 nM
Hg(II)*	28 nM	12–142 nM

Low and ambient* reaction temperatures.

for the Hg(II) detection. The understanding of these different behaviours is not obvious as the temperature change is expected to greatly impact the interaction of both the SG dye and targets with the functional oligonucleotides, the DNA structure stability as well as the FA signal (Jameson and Ross, 2010).

The repeatability of the measured anisotropy, determined at different concentrations (from ten to fifteen, $n=3$) within the working range of the titration curves, varied from 0.7% to 1%. For comparison, we found that the variability of measured signals was significantly increased by using fluorescence intensity as detection method (%RSD in the 2.2–3.8% range), corroborating the benefits of the FA assays over the fluorescence intensity ones in terms of precision (Thompson et al., 2002). The LOD and linear range of FA biosensors are presented in Table 1 and Fig. S3. The estimation of the detection limit was based on the $3\sigma/S$ procedure, where σ is the standard deviation of the response in absence of target and S the slope of the titration curve linear part. The limits of detection for adenosine and Hg(II) were better than or comparable to those attained with the best allosteric, non-amplified DNA-based FA biosensors for these analytes, i.e., 1 μ M for adenosine (Perrier et al., 2016; Zao et al., 2015) and 80 nM for Hg(II) (Zhang et al., 2012a, 2012b). On the other hand, a poorer detection limit was obtained for tyrosinamide, far from the lowest reported one with a FA aptasensor (40 nM, Perrier et al., 2016). We speculated that besides the dominant SG competitive release mechanism (see above), the capture mode could concomitantly occur upon the target binding to its unstructured aptamer (Fig. 4), leading to modest sensitivity. To note, the LOD values and linear ranges of the FA-based assays were, on average, comparable to those estimated from the fluorescence intensity-based titrations curves (compare Table 1 with Table SI). The selectivity of FA biosensors was finally investigated using guanosine, 3-methyl uric acid, and inosine for the adenosine aptamer, tyrosine and phenylalanine for the tyrosinamide aptamer and Cu(II), Mg(II) and Zn(II) ions for the Hg(II) T-rich DNA. As shown in Fig. S4, no significant response was obtained whatever the tested system, underlining the selective features of the different sensing platforms.

Although not described herein, it is very likely that the current FA biosensor strategy could be used to a similar extend for detecting biomacromolecules. Indeed, fluorescence intensity-based aptamer platforms relying on the protein-induced dye displacement mechanism have been previously reported using diverse intercalators (including SG) and aptamer motifs for the sensing of thrombin and oncoprotein platelet-derived growth factor (Sarpong and Datta, 2012; Zhou et al., 2006).

4. Conclusion

In summary, we report herein the first demonstration of steady-state FA DNA-based assays fully controlled by the lifetime changes of the tracer. The strategy is especially adapted to the monitoring of the ligand binding to short receptors, extending the scope of the label-free FA reporting method. The present SG-based approach has allowed the elaboration of several ID assays and biosensors that involve different DNA structures (duplex, hairpin, G-quadruplex and single-stranded), ligand types (ion, small organic molecule and protein), and binding

modes (intercalation, minor groove, allosteric switch). This wide applicability combined to the rapidity, simplicity and low-cost (label-free, weak DNA consumption) characteristics of the method constitute very attractive attributes. We believe that this work will open up promising perspectives in the design of a new class of FA assays.

Acknowledgments

We acknowledge the support of ANR program Labex Arcane (ANR-11-LABX-0003-01).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2016.11.049>.

References

- Barcellona, M.L., Gratton, E., 1996. *Biochemistry* 35, 321–333.
- Boger, D.L., Fink, B.E., Brunette, S.R., Tse, W.C., Hedrick, M.P., 2001. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 5878–5891.
- Chen, F.M., Sha, F., 2002. *Biochemistry* 41, 5043–5049.
- Cosa, G., Focsaneanu, K.S., McLean, J.R.N., McNamee, J.P., Scaiano, J.C., 2001. *Photochem. Photobiol.* 73, 585–599.
- Dragan, A.I., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A., Geddes, C.D., 2010. *Biophys. J.* 99, 3010–3019.
- Dragan, A.I., Pavlovic, R., McGivney, J.B., Casas-Finet, J.R., Bishop, E.S., Strouse, R.J., Schenerman, M.A., Geddes, C.D., 2012. *J. Fluoresc.* 22, 1189–1199.
- Duhamel, J., Kanyo, J., Dinter-Gottlieb, G., Lu, P., 1996. *Biochemistry* 35, 16687–16697.
- Durand, G., Lisi, S., Ravelet, C., Dausse, C., Peyrin, E., Toulmé, J.J., 2014. *Angew. Chem. Int. Ed.* 126, 7062–7065.
- Durand, G., Dausse, C., Goux, E., Fiore, E., Peyrin, E., Ravelet, C., Toulmé, J.J., 2016. *Nucleic Acids Res.* 44, 4450–4459.
- Fang, X., Cao, Z., Beck, T., Tan, W., 2001. *Anal. Chem.* 73, 5752–5757.
- Genest, D., Mirau, P.A., Kearns, D.R., 1985. *Nucleic Acids Res.* 13, 2603–2615.
- Gentilini, F., Turba, M.E., 2014. *Mutat. Res.* 766–767, 14–18.
- Guthrie, J.W., Hamula, C.L., Zhang, H., Le, X.C., 2006. *Methods* 38, 324–330.
- Huang, Y., Liu, X., Huang, H., Qin, J., Zhang, L., Zhao, S., Chen, Z.F., Liang, H., 2015. *Anal. Chem.* 87, 8107–8114.
- Jameson, D.M., Ross, J.A., 2010. *Chem. Rev.* 110, 2685–2708.
- Jia, T., Fu, C., Huang, C., Yang, H., Jia, N., 2015. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7, 10013–10021.
- Kubota, Y., Steiner, R.F., 1977. *Biophys. Chem.* 6, 279–289.
- Kumar, S., Xue, L., Arya, D.P., 2011. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7361–7375.
- Lakowicz, J.R., 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3rd ed.. Springer Science, New York, 354.
- Liu, J., Wang, C., Jiang, Y., Hu, Y., Li, J., Yang, S., Li, Y., Yang, R., Tan, W., Huang, C.Z., 2013. *Anal. Chem.* 85, 1424–1430.
- Lober, G., 1981. *J. Lumin.* 22, 221–265.
- Lopez, S.G., Ruedas-Maria, M.J., Casares, S., Alavarez-Pez, J.M., Orte, A., 2012. *J. Phys. Chem. B* 116, 11561–11569.
- Ono, A., Togashi, H., 2004. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43, 4300–4302.
- Perrier, S., Bouilloud, P., De Oliveira Coelho, G., Henry, M., Peyrin, E., 2016. *Biosens. Bioelectron.* 82, 155–161.
- Richardson, C.L., Schulman, G.E., 1981. *Biochim. Biophys. Acta* 652, 55–63.
- Ruta, J., Perrier, S., Ravelet, C., Fize, J., Peyrin, E., 2009. *Anal. Chem.* 81, 7468–7473.
- Sarpong, K., Datta, B., 2012. *J. Nucleic Acids ID*, (ID 247280).
- Sayed, M., Pal, H., 2015. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 17, 9519–9532.
- Schneenberger, C., Speiser, P., Kury, F., Zeillinger, R., 1995. *Genome Res.* 4, 234–238.
- Shaw, A.K., Pal, S.K., 2007. *J. Phys. Chem. B* 111, 4189–4199.
- Souard, F., Perrier, S., Noël, V., Fave, C., Fiore, E., Peyrin, E., Garcia, J., Vanhaverbeke, C., 2015. *Chem.-Eur. J.* 21, 15740–15748.
- Tawani, A., Kumar, A., 2015. *Sci. Rep.* 5, 17574.
- Thompson, R.B., Gryczynski, L., Malicka, J., 2002. *Biotechniques* 32, 34–42.
- Verga, D., Hamon, F., Poyer, F., Bompard, S., Teulade-Fichou, M.P., 2014. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 994–998.
- Wang, J., Liu, B., 2008. *Chem. Commun.*, 4759–4761.
- Wang, R., Zhou, X., Shi, H., Juo, Y., 2016. *Biosens. Bioelectron.* 78, 418–422.
- Xing, Y.P., Liu, C., Zhou, X.H., Shi, H.C., 2015. *Sci. Rep.* 5, 8125.
- Xu, H., Gao, S., Yang, Q., Pan, D., Fan, C., 2010. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2, 3211–3216.
- Ye, B.C., Yin, B.C., 2008. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 8386–8389.
- Yin, B.C., You, M., Tan, W., Ye, B.C., 2012. *Chem.-Eur. J.* 18, 1286–1289.
- Zao, Q., Lv, Q., Wang, H., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 70, 188–193.
- Zhang, D., Zhao, Q., Zhao, B., Wang, H., 2012b. *Anal. Chem.* 84, 3070–3074.
- Zhang, M., Le, H.N., Wang, P., Ye, B.C., 2012a. *Chem. Commun.* 48, 10004–10006.
- Zhen, S.J., Yu, Y., Li, C.M., Huang, C.Z., 2015. *Analyst* 140, 353–357.
- Zhou, C., Jiang, Y., Hou, S., Ma, B., Fang, X., Li, M., 2006. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1175–1180.
- Zhu, Z., Ravelet, C., Perrier, S., Guieu, V., Fiore, E., Peyrin, E., 2012. *Anal. Chem.* 84, 7203–7211.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F., 2004. *Nucleic Acids Res.* 32, e103.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

A Lifetime-Sensitive Fluorescence Anisotropy Probe for DNA-based Bioassays: the Case of SYBR Green

Benoit Chovelon,^{a,b} Emmanuelle Fiore,^a Patrice Faure,^{b,c} Eric Peyrin^{*a} and Corinne Ravelet^{*a}

^aUniversity Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble; CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

^bDépartement de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble site Nord - Institut de biologie et de pathologie, F-38041 Grenoble, France

^cUniversity Grenoble Alpes, Laboratory of Hypoxy Physiopathology Study Inserm U1042, 38700 La Tronche, France

Table of contents

I. Figure S1	2
II. Figure S2	3
III. Table SI	4
IV. Figure S3	5
V. Figure S4	7
VI. References	8

Figure S1. Fluorescence anisotropy of SG probe using poly-T (purple) and c-MYC G4 (grey) templates at different d/b ratios. SG concentration was 4.2 μ M. Binding buffer conditions: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM KCl with 2.5% ethanol. Ambient reaction temperature. Triplicate experiments.

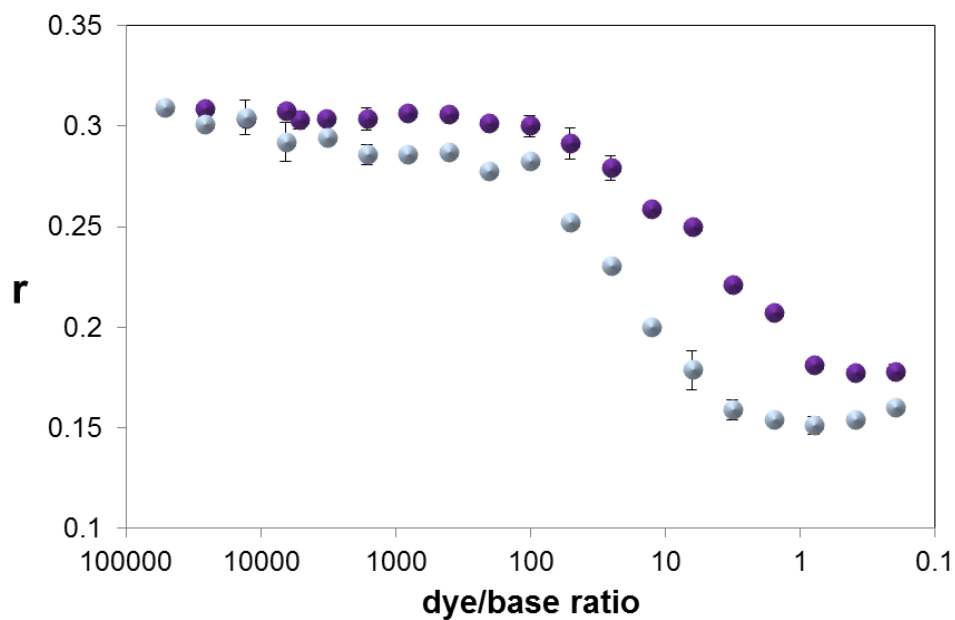


Figure S2. Titration curves for fluorescence intensity-based biosensors (FI: fluorescence intensity; $FI_{\max}$: maximal fluorescence intensity). See legend and experimental conditions in Figure 3. Fluorescence intensity of SG decreased upon target binding for the tyrosinamide and adenosine systems, consistent with a dominant dye release (Sarpong and Datta, 2012). In contrast, an increase in the fluorescence intensity was observed upon Hg(II) binding to its functional DNA, suggesting a SG capture mechanism (Wang and Liu, 2008).

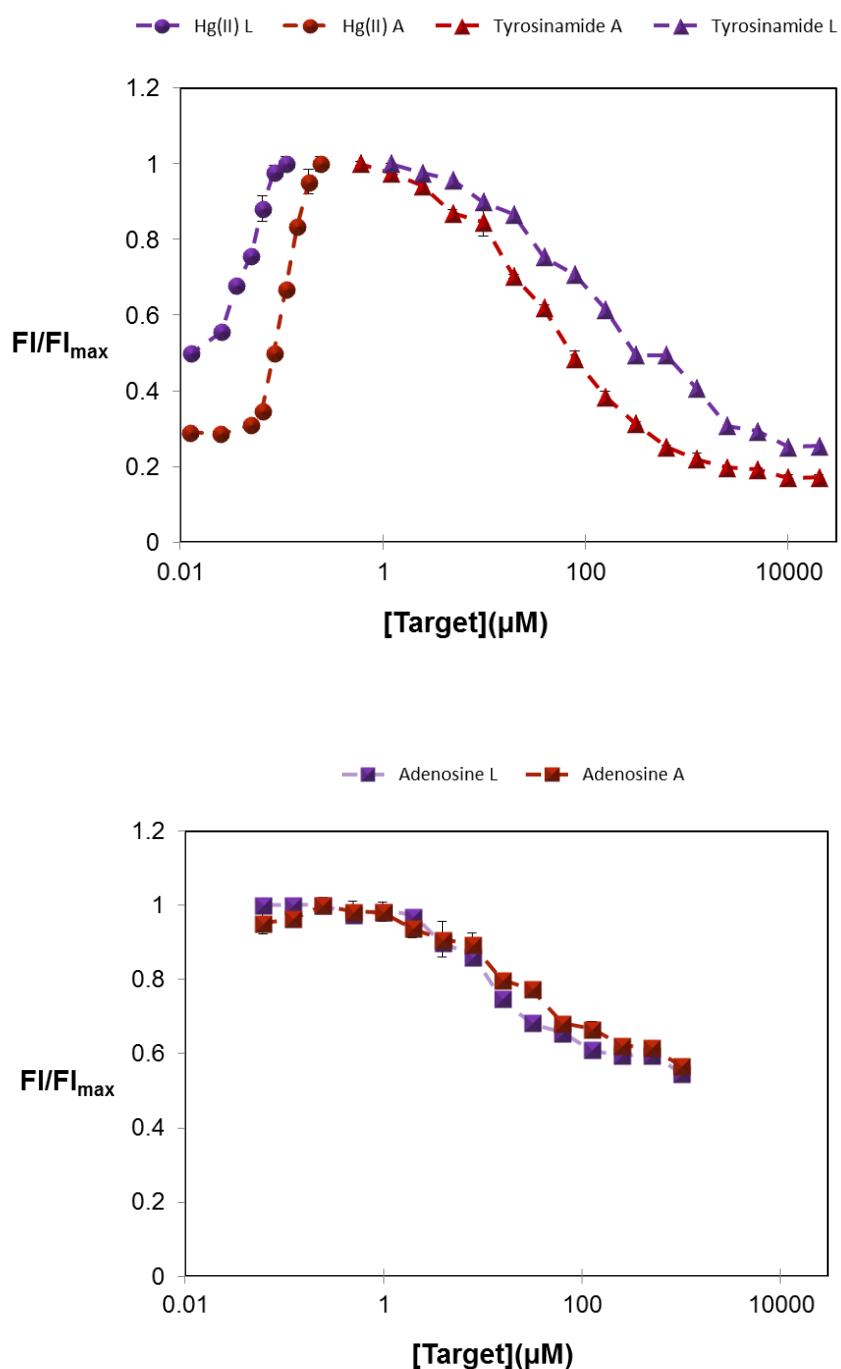


Table SI. Detection limit and linear range of fluorescence intensity-based biosensors

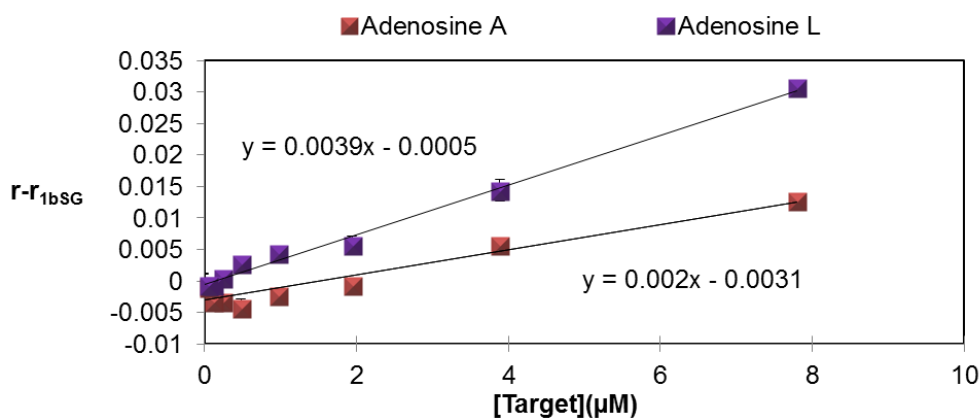
Analyte	Detection limit	Linear range
adenosine	3.7 μM	0.061-15.6 μM
adenosine*	5.2 μM	0.122-15.6 μM
tyrosinamide	14.8 μM	1.2-39 μM
tyrosinamide*	3.4 μM	0.6-19.5 μM
Hg(II)	15.1 nM	6-84 nM
Hg(II)*	34 nM	24-184 nM

Low and ambient* reaction temperatures.

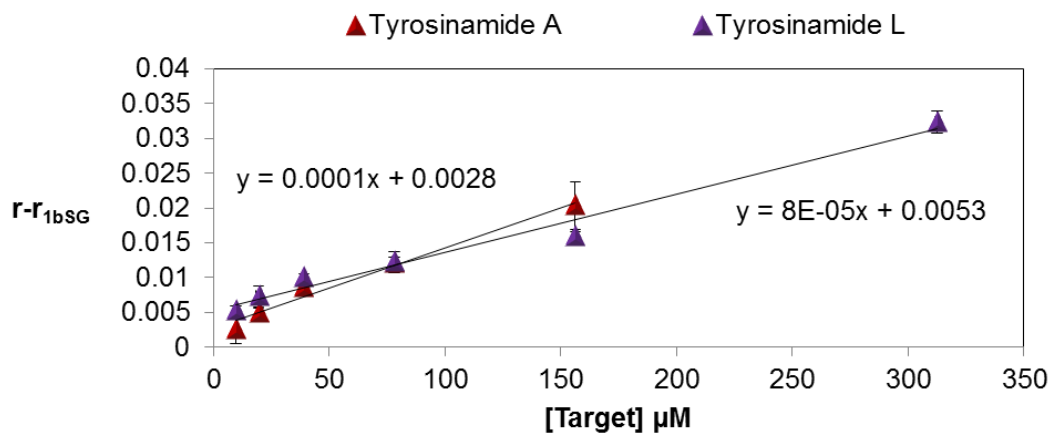
Figure S3. Linear part of titration curves for FA-based biosensors.

a) adenosine aptamer (32 nM), **b)** tyrosinamide aptamer (32 nM), **c)** Hg(II) T-rich DNA (8.33 nM). Ambient temperature (A) and low reaction temperature (L). SG concentration was 1.05 μM . Triplicate experiments.

a)



b)



c)

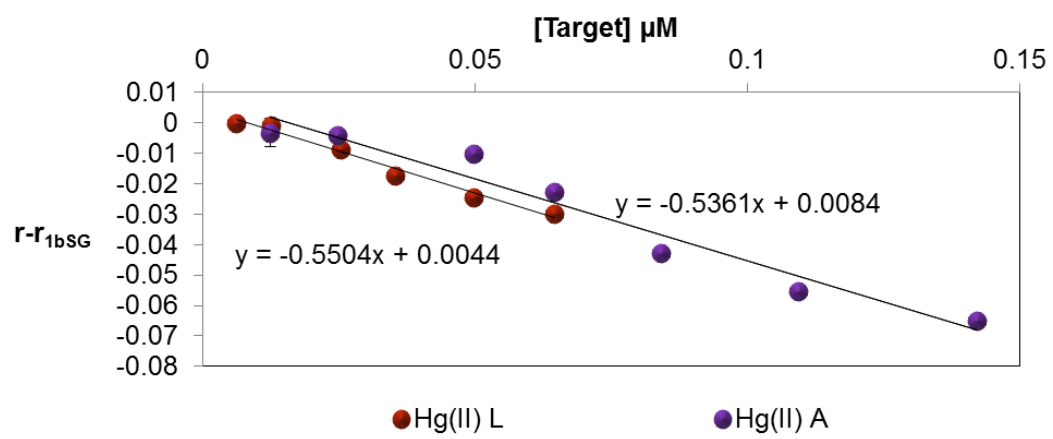
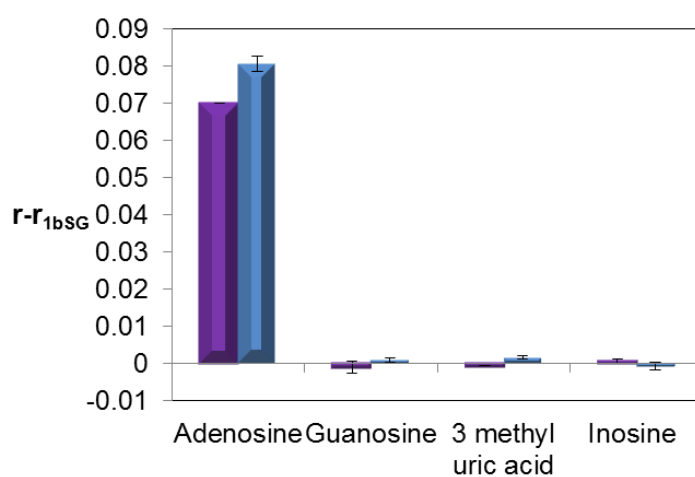
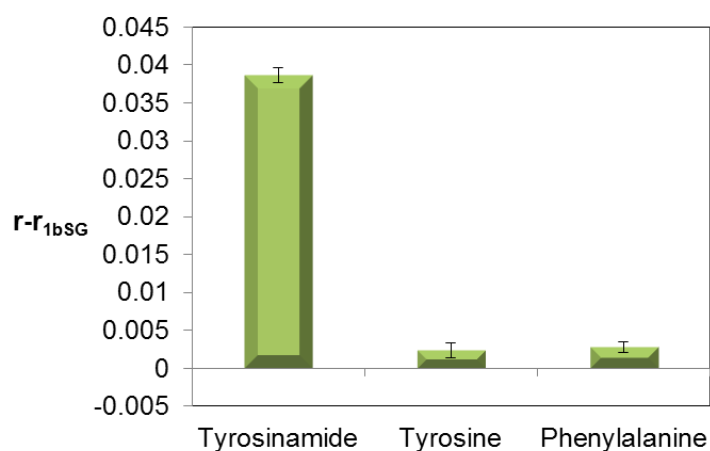


Figure S4. Selectivity of FA-based biosensors. The $r - r_{1bSG}$ values for **a)** adenosine aptamer (32 nM) in presence of 62.5 μ M (purple) and 250 μ M (blue) of adenosine, guanosine, 3-methyl uric acid or inosine, **b)** tyrosinamide aptamer (32 nM) with 1000 μ M of tyrosinamide, tyrosine or phenylalanine, **c)** Hg(II) T-rich DNA (8.33 nM) with 142 nM of HgCl₂, CuCl₂, MgCl₂ or ZnCl₂. Low reaction temperature. SG concentration was 1.05 μ M. Triplicate experiments.

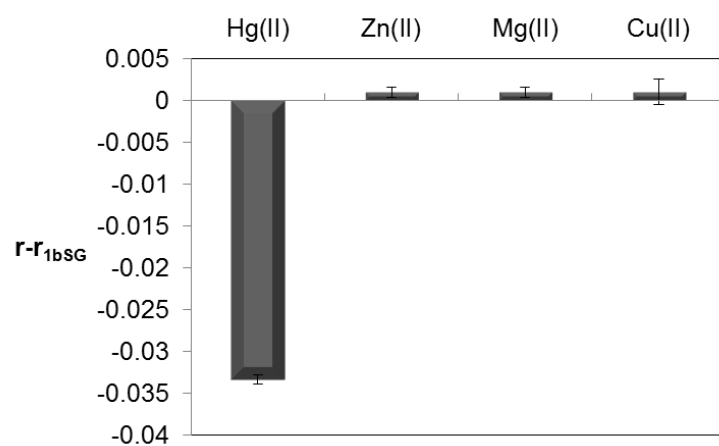
a)



b)



c)



References

- Sarpong, K., Datta, B., 2012. J. Nucleic Acids ID 247280.
Wang, J., Liu, B., 2008. Chem. Comm. 4759-4761.

Conclusion

Dans une première partie, les comportements du SYBR Green et de l'acridine orange en présence d'oligonucléotide double brin de taille variable (8, 12 et 16 paires de bases) ont été comparés. Lors de la fixation du SYBR Green sur les acides nucléiques, son temps de vie de l'état excité (τ) augmente considérablement quand son temps de corrélation rotationnelle (θ) n'augmente que modérément. L'anisotropie de fluorescence diminue alors significativement en raison de l'augmentation du rapport τ / θ (voir équation de Perrin). En comparaison, la fixation sur l'ADN de l'acridine orange (agent intercalant) entraîne l'augmentation de l'anisotropie de fluorescence car le rapport τ / θ diminue : τ relativement stable quand θ subit une importante augmentation. Le phénomène d'homo-RET (Resonance energy homotransfer) observable lorsque plusieurs fluorophores se fixent sur un oligonucléotide (dans la pratique pour les faibles concentrations d'oligonucléotide) favorise la dépolarisation de la lumière émise, ce qui explique la chute très précoce (rapport dye/base important) de l'anisotropie de fluorescence avec le SYBR Green et au contraire ralentit la montée (rapport dye/base faible) d'anisotropie de fluorescence avec l'acridine orange. Il faut également remarquer qu'avec le SYBR Green la chute d'anisotropie de fluorescence est d'autant plus importante que l'oligonucléotide est de petite taille. Des essais d'interactions du SYBR Green avec un oligonucléotide simple brin et avec un oligonucléotide s'organisant en G-quadruplex ont également été réalisés et ont montré une chute de signal plus tardive et de moindre amplitude en raison d'une affinité plus faible que pour les oligonucléotides double brin.

Nous avons par la suite montré qu'il était possible de créer des bioessais pour petites molécules, simples et sensibles, en utilisant le SYBR Green comme sonde de révélation. Selon que l'oligonucléotide fonctionnel soit structuré ou non en l'absence de la cible, il peut être observé une importante augmentation ou une importante diminution de l'anisotropie de fluorescence. Il s'agit donc d'une méthode de révélation très innovante utilisant les caractéristiques physico-chimiques des acides nucléiques et la capacité du SYBR Green à devenir un très bon fluorophore une fois fixé à l'ADN.

Enfin, nous avons décrit une méthode très simple d'étude de divers ligands de l'ADN : intercalant, ligand du petit sillon, ligand de G-Quadruplex et ligand d'oligonucléotides simples brin. Le signal généré par cette méthode sera d'autant plus important que l'oligonucléotide est de petite taille.

Ensuite, nous avons envisagé le dosage de l'arginine-vasopressine par l'intermédiaire de cette stratégie pour répondre à notre objectif premier, de développement d'une méthode analytique rapide, facile à mettre en œuvre et à haut débit. Ayant travaillé exclusivement sur l'ADN dans

le cadre de ce travail sur le SYBR Green, nous avons utilisé dans un premier temps l'aptamère dirigé contre la D-arginine-vasopressine en série D-ADN.¹⁶⁶ Voici la courbe de calibration obtenue (figure 27) :

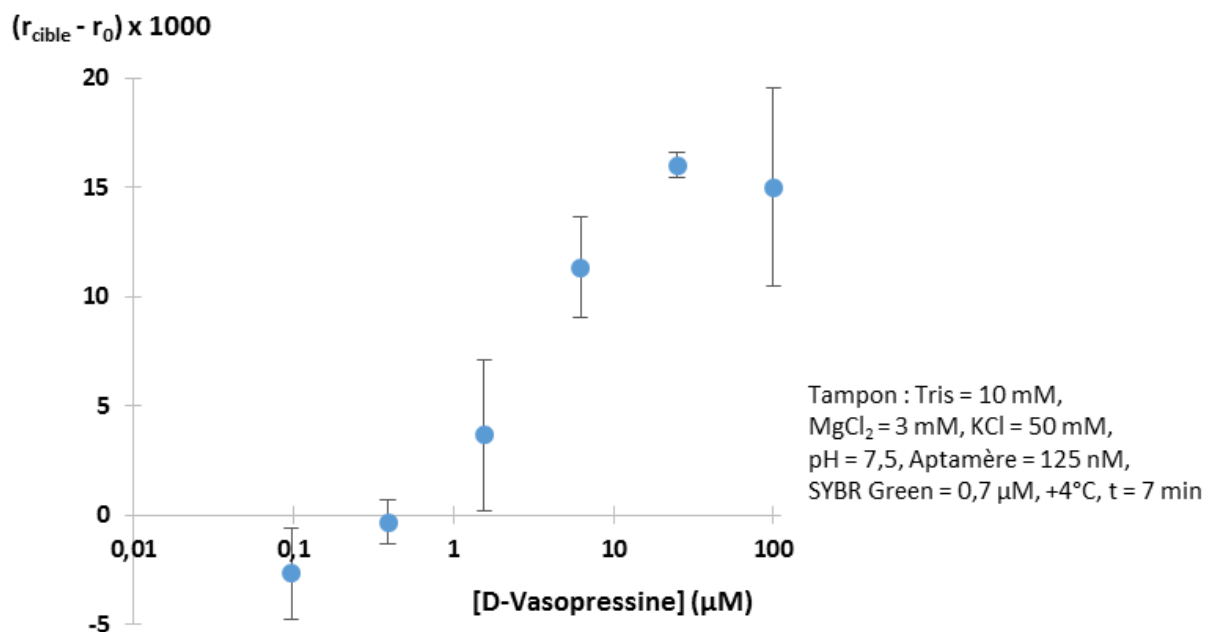


Figure 27 : Courbe de calibration pour la D-arginine-vasopressine avec le SYBR Green

L'anisotropie de fluorescence augmente en présence de la cible, ce qui est en faveur d'une compétition entre la D-arginine-vasopressine et le SYBR Green (figure 28) :

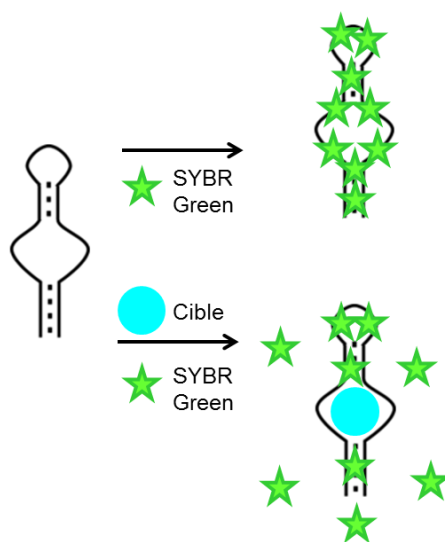


Figure 28 : Schématisation de la compétition entre le SYBR Green et la cible

La limite de détection de ce système semble relativement importante, de l'ordre de la dizaine de micromolaires. On peut émettre l'hypothèse que la tige importante de l'aptamère, non

impliquée dans la reconnaissance de la cible, va à l'encontre de la sensibilité de la méthode. En effet, le SYBR Green pourrait se fixer sur cette structure secondaire de l'aptamère sans être déplacée par la cible. A titre de comparaison le mécanisme compétitif décrit dans l'article concernant le dosage de l'adénosine est basé sur un aptamère anti-adénosine pour lequel la fixation de la cible implique une région plus importante de la structure globale de l'oligonucléotide. Afin d'exalter la compétition, il pourrait être intéressant de raccourcir l'aptamère en éliminant certaines bases n'intervenant pas dans la reconnaissance de la cible. Cette étape est néanmoins délicate car elle pourrait entraîner une perte d'affinité partielle ou totale.

Enfin, la stratégie de dosage « label-free » avec l'aptamère dirigé contre la D-arginine-vasopressine en série D-ARN (47 bases) a également été testée.¹⁶⁷ Nous avons dans un premier temps fait varier la concentration de l'aptamère en présence d'une concentration fixe de SYBR Green (4,2 μ M) en l'absence et en présence de la cible (10 μ mol/L). Ainsi, les courbes d'anisotropie de fluorescence mesurée en fonction du ratio dye/base (figure 29) ont pu être tracées. Celles-ci mettent en évidence la forte diminution puis la légère augmentation de l'anisotropie de fluorescence lors de l'augmentation de la concentration d'aptamère (diminution du ratio dye/base) ce qui est en faveur d'une interaction entre le SYBR Green et l'ARN. En revanche, il n'est pas observé de différence significative en présence de la cible, ce qui nous a conduits à abandonner cette stratégie. Il serait intéressant d'essayer cette méthode de dosage « label-free » avec d'autres aptamères en série ARN tels que l'aptamère anti-théophylline¹⁷³ ou l'aptamère anti-GTP¹⁷⁴ qui sont des aptamères présentant de nombreuses applications dans la littérature, ce qui n'est pas le cas de l'aptamère dirigé contre la D-arginine-vasopressine en série D-ARN.

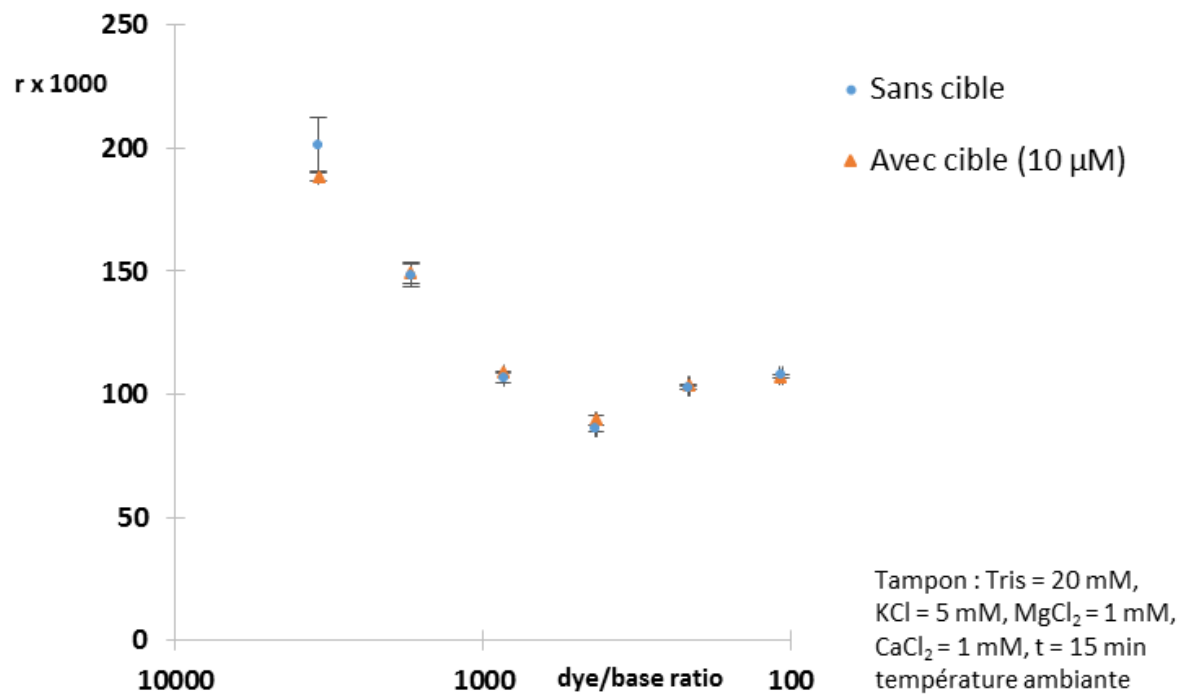


Figure 29 : Evolution de l'anisotropie de fluorescence en fonction du ratio dye/base, en l'absence et en présence (10 μ M) de la cible

Conclusion et perspectives

A travers ce travail nous avons développé trois stratégies innovantes pour doser des petites molécules d'intérêt biologique en LBM. Les deux premières, basées sur des techniques de marquage conventionnelles, ont permis des dosages de cibles de petite taille grâce à la stratégie d'interaction boucle-boucle (complexe-kissing) développée au laboratoire (en collaboration avec l'équipe du Docteur Jean-Jacques Toulmé, Laboratoire ARNA - Université de Bordeaux).¹²³ La mise en jeu d'une double reconnaissance permet d'accroître la spécificité du dosage, ce qui confère un avantage certain par rapport à l'immunoanalyse de type compétitive (à une seule reconnaissance) utilisée pour les molécules de masse moléculaire inférieure à 3000 Da. Cela permet d'envisager le dosage spécifique à haut débit des petites molécules d'intérêt biologique.

Le premier travail a été développé en phase hétérogène tandis que le second l'a été en phase homogène. Les techniques en phase hétérogène ont l'inconvénient d'être souvent chronophages mais ont l'avantage d'être simples à mettre en œuvre : elles ne nécessitent généralement qu'un appareillage simple (exemple : spectrophotomètre UV-visible). Elles sont ainsi très appréciées pour le développement de nouvelles méthodes. Au cours de mon travail de thèse, le principal avantage de la phase homogène a donc été le gain de temps considérable lié à l'absence de phases d'immobilisation de l'aptamère et de lavages des puits. Les réactifs peuvent ainsi être ajoutés de façon concomitante ce qui pourrait faciliter l'automatisation de la technique.

La transposition de ces techniques en milieu complexe a été une étape difficile pour ces deux premiers travaux. Pour la méthode ELAKCA, en raison de l'utilisation d'oligonucléotides naturels non modifiés, nous avons fait subir un prétraitement au plasma afin d'éliminer les protéines et en particulier les nucléases. Des essais non publiés de prétraitement du plasma par précipitation des protéines ont été réalisés avec succès, mais nous avons finalement retenu le choix de l'ultrafiltration du plasma, car très souvent décrit dans la littérature. Pour le dosage de la L-arginine-vasopressine avec les oligonucléotides en série L, aucun prétraitement du plasma surchargé n'a été effectué pour mettre en évidence l'intérêt du spiegelmer (la part de méthanol utilisée n'étant pas suffisante pour faire précipiter les protéines). Les oligonucléotides en série L se sont montrés résistants à l'action des nucléases mais sujets à la fixation sur les protéines plasmatiques. Cette dernière impose de n'utiliser qu'un faible pourcentage de plasma dans le milieu réactionnel.

Le troisième travail utilisant l'interaction SYBR Green – acides nucléiques, est particulièrement novateur. En plus de la description d'une méthode très simple d'étude de divers ligands de l'ADN, nous présentons une nouvelle technique de dosage pour petites

molécules, sans marquage préalable d'un des réactifs (« label-free »). Cette méthode a l'avantage d'être peu coûteuse et très rapide ce qui permet d'envisager de nombreuses applications en LBM.

En conclusion, les aptamères sont des outils de reconnaissance moléculaire présentant de réels atouts comparativement aux anticorps : bonne stabilité thermique ; synthèse chimique à faible coût, reproductible d'un lot à un autre ; très large panel de molécules cibles potentielles. Leur principal inconvénient pour une application en milieu biologique est l'instabilité des oligonucléotides naturels, en raison de la présence de nucléases, et de leur fixation sur les protéines plasmatiques. Les solutions décrites dans la partie bibliographique et mises en pratiques dans les deux premiers travaux sont basées sur le prétraitement de l'échantillon ou l'utilisation de bases nucléotidiques non naturelles pour la synthèse des oligonucléotides.

Actuellement, les techniques basées sur la reconnaissance moléculaire utilisées en routine au sein des LBM emploient quasi-exclusivement la reconnaissance d'un antigène par un anticorps. Certaines méthodes apparentées à l'immunoanalyse utilisent également des protéines (autres que des immunoglobulines) pour la reconnaissance de certains analytes, mais il s'agit d'applications marginales : nous pouvons par exemple citer l'utilisation du facteur intrinsèque pour le dosage de la vitamine B12 (cobalamine). En revanche bien que largement décrites dans la littérature, les techniques utilisant des oligonucléotides fonctionnels sont absentes du panel des méthodes utilisées en LBM. Cette omniprésence des anticorps s'explique principalement par leur antériorité sur les aptamères : la découverte des anticorps date de la fin du 19^{ème} siècle quand celle des aptamères date de la fin du 20^{ème} siècle. De plus, mis à part pour les dosages des petites molécules où les techniques d'immunoanalyse sont perfectibles, il faut souligner les très bonnes performances des méthodes basées sur la reconnaissance antigène – anticorps.

Ainsi le développement de techniques utilisant les aptamères avec applications en LBM doit être focalisé sur les analytes de petites tailles en utilisant des méthodes innovantes. Le développement de systèmes sans marquage (« label-free ») est par exemple un véritable atout. Ces techniques peuvent prétendre concurrencer à plus ou moins long terme l'immunoanalyse exploitant également l'utilisation d'éléments de reconnaissance moléculaire ainsi que les méthodes séparatives relativement lourdes à mettre en œuvre. Les petits peptides, les hormones stéroïdiennes, les vitamines ou encore les médicaments représentent des cibles d'intérêt potentiel pour des développements futurs. Les aptamères pourraient également concurrencer les méthodes complexométriques, potentiométriques et spectrales en analyse élémentaire. Notre équipe a d'ailleurs ciblé comme analyte d'intérêt, le lithium, qui est un élément présent dans

certaines spécialités pharmaceutiques, indiqué principalement dans le traitement des troubles bipolaires. Il s'agit de médicaments à marge thérapeutique étroite imposant des dosages plasmatiques réguliers. La méthode utilisée par une très large majorité de laboratoires est une technique colorimétrique basée sur la formation d'un complexe organométallique. Il est décrit un manque de spécificité de ces techniques notamment lorsque le plasma est hémolysé. Notre équipe est actuellement en train de sélectionner un aptamère dirigé contre le lithium, avec l'objectif de développer par la suite une technique de dosage « label-free » en milieu biologique utilisant le SYBR Green.

Annexe

Panoply of Fluorescence Polarization/Anisotropy Signaling Mechanisms for Functional Nucleic Acid-Based Sensing Platforms

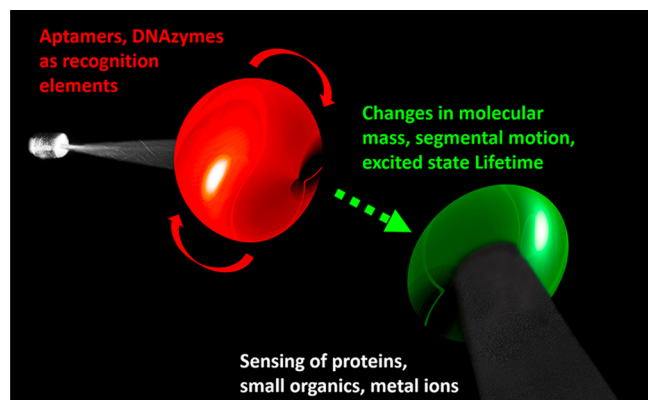
Fluorescence polarization/anisotropy is a very popular technique that is widely used in homogeneous-phase immunoassays for the small molecule quantification. In the present Feature, we discuss how the potential of this signaling approach considerably expanded during the last 2 decades through the implementation of a myriad of original transducing strategies that use functional nucleic acid recognition elements as a promising alternative to antibodies.

Sandrine Perrier,^{†,‡} Valérie Guieu,^{†,‡} Benoît Chovelon,^{†,‡,§} Corinne Ravelet,^{†,‡} and Eric Peyrin^{*,†,‡,§}

[†]University Grenoble Alpes, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

[‡]CNRS, DPM UMR 5063, F-38041 Grenoble, France

[§]Département de Biochimie, Toxicologie et Pharmacologie, CHU de Grenoble Site Nord–Institut de Biologie et de Pathologie, F-38041 Grenoble, France



The development of highly sensitive and specific sensing methods for the analysis of complex matrixes is a constant growing research field due to its crucial importance in diverse societal areas. Besides the analysis of environmental, food, or forensic media, the most broadly investigated matrixes are human biological fluids. Indeed, for the medical diagnosis, several fundamental pathological markers are routinely quantified in biofluids. In therapeutic monitoring or clinical toxicology, the detection of drugs, drugs of abuse, and toxins in blood, urine, or appendages is also very widely carried out in the practice of clinical laboratories. To successfully perform analyte quantification in these diverse complex media, the reference methodology consists of a pretreatment procedure through a typical solid-phase extraction followed by analyses including high-performance separation techniques coupled to mass spectrometry detection. Although these approaches are the most sensitive and accurate ones, they require sophisticated/expensive instruments, quite qualified experimenters and time-consuming manipulations.¹

Therefore, sensing platforms based on the affinity and specific recognition of the analyte (implying in many cases an enzyme or an antibody) constitute a more convenient way for portable, high-throughput, or fully automated analyses. With the notable exception of the enzyme-based glucose biosensing devices, immunoassays are undoubtedly the most mature laboratory tests. Moreover, microparticle-based heterogene-

ous-phase and homogeneous-phase immunoassays are two of the more useful bioanalytical methodologies found in commercial clinical analyzers.² As compared with heterogeneous assay methods, homogeneous assay techniques do not require separation and washing steps and are thus easier and faster to handle and automate. Among them, fluorescence polarization immunoassays (FPIAs) have considerably grown since 1980s with the availability of both specifically developed instruments (first commercialization by Abbott laboratories of the TDx batch analyzer in 1981) and high-throughput microplate readers.³ Since then, FPIA has undoubtedly become a predominant method for the rapid monitoring of low-molecular mass organic species, including not only drugs and drugs of abuse in clinical chemistry but also toxins and pollutants in environmental and food control.⁴

Over the last 3 decades, reviews that tackled the FP-based sensing platforms mainly focused on the FPIA methodology and its applicative aspects.^{4–7} Instead, the present Feature aims at critically discussing the signaling mechanisms of newly reported FP assays based on functional nucleic acids (FNAs), with a special emphasis on their implications in terms of scope and analytical performances. After a brief reminder on the basis of both FP measurements and existing FPIAs, we will subsequently cover the promising advances in FP detection schemes that result from the usage of FNAs instead of antibodies. The methods will be subdivided into aptamer- and DNzyme-based approaches for which the different assay strategies will be discussed in relation to the FP factors that are mainly involved in the signal generation. Finally, the practical considerations for the development of these FP assays will be addressed.

■ BACKGROUND PRINCIPLES OF THE STEADY-STATE FLUORESCENCE POLARIZATION ASSAYS

Fluorescence Polarization Factors. The basic principle of measurements relies on the absorption of a linearly polarized excitation light by a fluorophore in relation to its orientation.

Published: March 7, 2018

When submitted to a polarized light, fluorophores whose absorption transition moment is parallel to the electric vector of photons are preferentially excited, determining the well-known photoselection process. During the excited state lifetime, the rotational diffusion of fluorophores then randomizes their orientation in such a way that the light is emitted in a different plane from the excitation light, leading to the decrease in the fluorescence polarization. The polarization (P) and anisotropy (r) terms, both depending on the measured emission intensities parallel and perpendicular to the plane of the vertically polarized excitation light, can interchangeably be used for determining the polarization degree of a fluorescent rotating species.^{8–10} In all the following discussion, we will only refer to the r quantity that constitutes a more accurate function of the physical phenomena.⁸ The steady-state fluorescence anisotropy (FA) dependence on the excited state lifetime τ and the rotational correlation time θ of a fluorophore, assimilated to a sphere in the simplest case, can be expressed by the modified form of the Perrin formula:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta}} \quad (1)$$

where r_0 is the fundamental fluorescence anisotropy, i.e., the anisotropy in the absence of any depolarizing process. According to eq 1, the anisotropy signal depends on the rate of the rotational diffusion during the lifetime of the excited state, that is the magnitude of the τ/θ ratio. As θ is related to the diffusion coefficient, which in turn depends on the solvent viscosity (η), solution temperature (T), and the volume of the rotating spherical species (V), the following relation can be obtained:

$$r = \frac{r_0}{1 + \frac{\tau RT}{\eta V}} \quad (2)$$

where R is the gas constant. Equation 2 highlights the main factors that govern the anisotropy and its changes upon modification of the environmental parameters. For a fixed excitation wavelength, a constant τ , and in the absence of any additional phenomena such as resonance energy transfer (RET) or interfering factors, an increase in the apparent molecular volume (and then in the molecular mass) of the fluorescent species will produce high polarization. In fact, the causes for polarization/depolarization can be much more complicated, especially for large, flexible molecules that carry bound dyes. They originate not only from the global diffusion of the tracer but also from the segmental motion of the fluorophore itself (Figure 1a,i). The following relation can be formulated by introducing the segmental mobility component into eq 1:¹⁰

$$r = \frac{\alpha r_0}{1 + \left(\frac{1}{\theta_F} + \frac{1}{\theta_S}\right)\tau} + \frac{(1 - \alpha)r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta_S}} \quad (3)$$

where α is the fraction of depolarization due to the segmental motion of the dye independent of the overall diffusion of the macromolecule and θ_F and θ_S are the rotational correlation times associated with the local (fast) and global (slow) motions, respectively. In most cases, $\theta_F \ll \theta_S$ in such a way that the relation (eq 3) can be simplified as follows:¹⁰

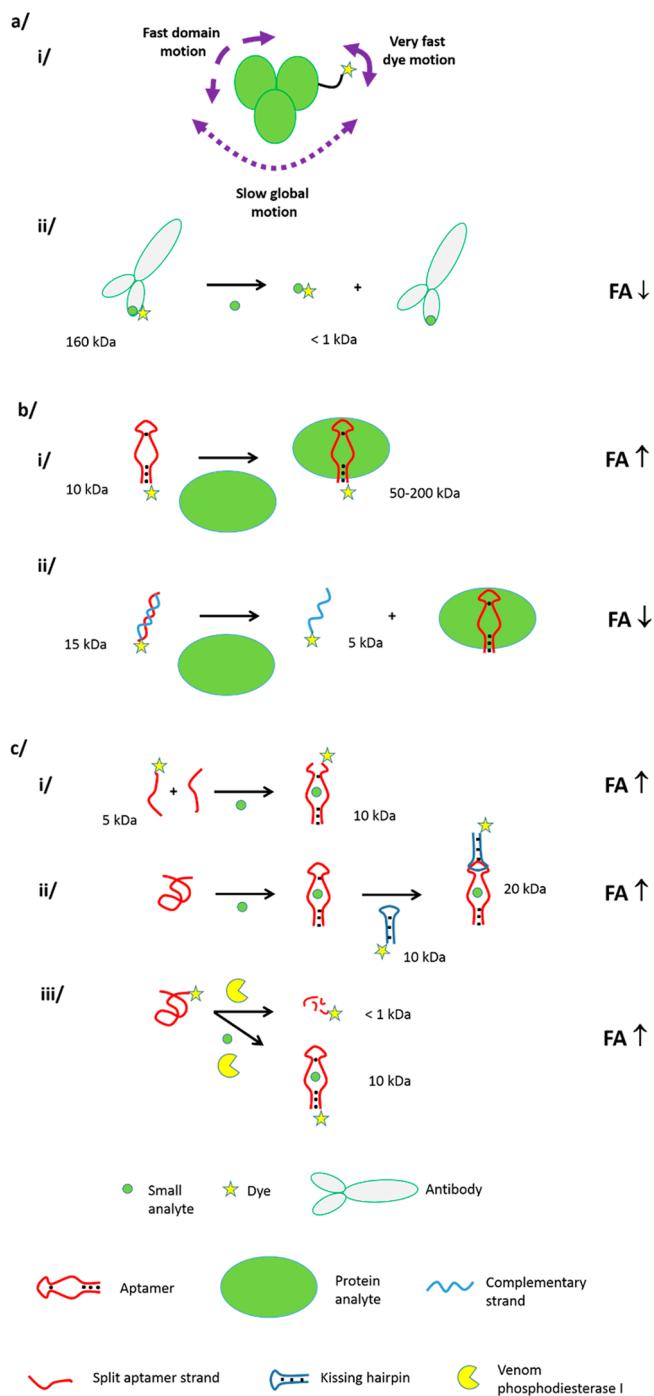


Figure 1. (a) (i) Fluorescence anisotropy contributions for a labeled macromolecule. Drawn from ref 9. (ii) Schematic representation of routine FPIA. (b) Schematic representation of mass-based FPAA for proteins: (i) noncompetitive format and (ii) competitive format based on the CS displacement. (c) Schematic representation of non-competitive mass-based FPAA for small species based on (i) split aptamer, (ii) aptamer kissing complex, and (iii) aptamer enzymatic protection.

$$r \approx \frac{\alpha r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta_F}} + \frac{(1 - \alpha)r_0}{1 + \frac{\tau}{\theta_S}} \quad (4)$$

For labeled macromolecules of identical size and shape, the degree of depolarization α depends on both the internal flexibility of the molecule domains and the localized movement

freedom of the bound dye (Figure 1a,i). This is intimately determined by the nature of both the species and the fluorophore, the labeling site, as well as the type and length of the linker between the bound dye and the tagged molecule.^{11,12} As a representative illustration, let us consider fluorescently tagged oligonucleotides. Some dyes including rhodamines typically display high coupling to the whole diffusion of the nucleic acid molecule due to their significant propensity to interact with nucleobases and/or helix motif. The local motion contribution of such fluorophores is then of weak magnitude as compared to the whole diffusion part of the entire oligonucleotide.¹² In contrast, another type of dyes such as the very popular anionic fluorescein derivatives are largely uncoupled from the global nucleic acid motion as the consequence of their electrostatic repulsion with the DNA/RNA backbone. This leads to a high α value that commonly causes a significant depolarization process and a low anisotropy value for labeled oligonucleotides.^{11,12}

Typical Detection Scheme and Scope of Routine FP Immunoassays. Previously reported FPIA as well as other FP assays almost exclusively operated on a single principle that was controlled by the change in effective molecular volume of a fluorescent rotating species upon either binding to the higher molecular mass specific receptor or being enzymatically cleaved into smaller fragments.^{9–11} Among these platforms, FPIA assuredly constitute the most popular one in the sensing field. By assuming almost constant r_0 and τ values under the binding assay conditions, the increase in the apparent mass and θ of a small fluorescent ligand (mass <1 kDa, $\theta \sim 100$ ps) upon antibody (mass ~ 160 kDa, $\theta \sim 100$ ns) binding typically results in the FA increment. This ranges from a very low anisotropy in free form r_f (near 0 for a dye of low nanosecond τ) to a high anisotropy in bound form r_b (0.200–0.300 commonly). The measured FA variation of the small fluorescent ligand upon addition of its specific antibody can be easily assessed using the well-known additive features of the anisotropy:¹⁰

$$r = F_b r_b + F_f r_f = \frac{m_b \frac{q_b}{q_f}}{m_b \frac{q_b}{q_f} + m_f} r_b + \frac{m_f}{m_b \frac{q_b}{q_f} + m_f} r_f \quad (5)$$

where F , m , and q are the fractional intensity, the molar fraction, and the quantum yield of the probe in the free (f) and antibody-bound (b) forms, respectively. FPIA is only performed (except for a naturally fluorescent target analyte) through the competitive binding event between a fluorescent antigen analogue and the unlabeled antigen of interest for a given antibody (Figure 1a,ii).^{4–7,9} According to eq 5 and considering invariant quantum yield of the probe upon antibody binding, the addition of antigen in the probe-antibody solution causes an increase in the free fractional intensity of the fluorescent analogue (and the concomitant decrease in the bound fractional intensity) that thus gives rise to the reduction of the FA signal (Figure 1a,ii). The larger the amount of the antigen, the more the fluorescent analogue dissociates from a limited number of antibody binding sites, leading to the classical target-responsive FA decrease.^{4–7,9,10} FPIA offers several advantages including notably its simplicity of use, its very high reproducibility, and the commercial availability of several antibodies directed against a large panel of relevant molecular analytes.

However, existing FPIA has also some limitations. One of the main drawbacks is related to its scope, which is quasi-

exclusively restricted in practice to the detection of low mass compounds.^{4–7,9,10} Indeed, it is difficult to obtain useful FA changes for high mass analytes such as proteins. Most popular fluorophores display a τ value in the low nanosecond range, which is too short if one considers the ~ 30 – 300 ns θ values of ~ 50 – 500 kDa proteins. The τ/θ ratio of fluorescently tagged proteins is then very low, generating a very high r_f value near the limiting r_0 value. This prevents any significant FA change of the dye-conjugated protein upon binding to its antibody. Although some interesting advances in the field were reported by Lakowicz and co-workers about 20 years ago via the use of longer τ dyes,¹³ the development of protein-targeting FPIAs has not really been pursued since that time. In addition, although inorganic ion-specific immunoassays are feasible by using antibodies raised against metal complexes,¹⁴ examples of FPIA are only marginally reported.¹⁵ Finally, the only available competitive detection format intrinsically leads to limited analytical performances. In association with the matrix interferences,^{4,7} this explains the moderate assay sensitivity reached with practical FPIA (typical LOD in the (sub)-nanomolar range).

From these considerations, several efforts were made by scientists over the last 2 decades to investigate the potential of other classes of recognition units (including molecular imprinted polymers^{16,17} and functional nucleic acids) in FP analysis. Among them, smart oligonucleotides such as aptamers and DNazymes are the most promising selective units for (i) enlarging the assay format range, (ii) expanding the application area, and (iii) potentially improving the analytical performances of the FP-based sensing methods. These achievements are discussed in the following sections.

■ FP APTAMER ASSAY MECHANISMS

Nucleic acid aptamers are single-stranded FNAs that are isolated from a very large library of candidates through an *in vitro* combinatorial approach (SELEX) for their ability to bind a peculiar species. Several reviews devoted to the aptamer selection can be found elsewhere.^{18–22} Aptamers are able to specifically target not only small organics, proteins, nucleic acids, or cells but also metal ions. More, other DNA motifs may specifically interact with metal ions (G-quadruplex) or can be designed for binding to Hg^{2+} or Ag^+ through coordination complexes between two specific nucleic acid strands.²³ Although they cannot be considered as aptamers (that is, selected from a large pool of random sequences), they are characterized by similar affinity properties. Aptamers are often referred to as chemical antibodies. For bioanalysis purposes, their synthetic nature notably allows facile tagging/immobilizing at precise locations and rational sequence engineering through a multitude of post-SELEX modifications. Other unique features of aptamers are their relatively small size (10 kDa on average), their high inherent structural flexibility, and their conformational reorganization ability upon target binding,²⁴ the so-called ligand-induced fit mechanism.

These properties stimulate growing interest in the development of reporting binding routes. The change in the conformational state is the simplest approach to trigger change in the physicochemical features of aptamers and then may produce a target-responsive signal for a functionalized FNA.²⁵ As this target-induced change can be limited, a more generic approach exploits the specific hybridization ability of DNA with its complementary strand (CS) for promoting an analyte-induced structure switching.²⁶ Upon the target binding to the

Table 1. List of Targets Currently Detected by FPAA and FPDA^a

targets	assay types	refs
Proteins		
Thrombin	Direct*; CS displacement*; nanomaterial amplification*; recycling amplification*; direct**	32,* 33,* 36,* 54,* 57,* 66,* 68,* 98,* 72**
VEGF	Direct*; recycling amplification*	33,* 68*
b-FGF	Direct*	33*
IMPDH	Direct*	33*
PDGF	Direct*; recycling amplification*; direct**	34,* 67,* 72**
IgE	Direct*	35*
Lysozyme	Direct*	37*
Lactoferrin	Nanomaterial amplification*	51*
Ricin B-chain	Recycling amplification*	65*
Small molecules		
Tobramycin	Target analogue displacement*	38*
Ochratoxin A	Target analogue displacement*; CS displacement*; direct*; enzymatic protection*; protein amplification*; recycling amplification*; direct**	39,* 41,* 44,* 31,* 39,* 67,* 74**
ATP	Target analogue displacement*; CS displacement*; nanomaterial amplification*; protein amplification*; direct**	40,* 43,* 53,* 55,* 56,* 40,* 60,* 61,* 75**
Adenosine	Split assembly*; kissing assembly*; enzymatic protection*; nanomaterial amplification*; protein amplification*; recycling amplification*; direct**; dye displacement***	45,* 30,* 31,* 57,* 45,* 62,* 66,* 67,* 71,* 81,* 87***
Tyrosinamide	CS displacement*; enzymatic protection*; direct**; dye displacement***	42,* 31,* 70,* 81,* 87***
Cocaine	Protein amplification*; recycling amplification*; direct**	61,* 69,* 77,**
Aflatoxins	Recycling amplification*	69*
Vasopressin	Direct**	76**
Histidine	Direct [#]	92 [#]
Metal ions		
Ag ⁺	Split assembly*	46*
Hg ²⁺	Nanomaterial amplification*; dye capture***	50,* 87***
K ⁺	Nanomaterial amplification*	58*
Pb ²⁺	Direct**; protein amplification [#] ; nanomaterial amplification [#] ; direct [#]	73,** 79,** 93, [#] 96, [#] 97 [#]
Cu ²⁺	Nanomaterial amplification [#]	94–96 [#]

^aDetected by FPAA (using the mass-based,* segmental motion-based** or excited state lifetime-based*** reporting mechanisms) and FPDA[#].

aptamer, the FNA structural rearrangement enables the displacement of the CS from the aptamer that signals the presence of the analyte through changes in properties of tagged CS and/or aptamer. An analogous strategy based on an intramolecular displacement is also feasible.²⁷ This relies on the construction of a unimolecular hairpin that contains the aptamer unit linked to a partially complementary sequence. Along lines analogous to those of molecular beacons, the target-induced switch of the stem-loop structure from the closed to the opened state allows revealing the presence of the analyte. The implementation of assembly based aptamers provides another class of designs that depends on the ligand-mediated formation of reporting high-order architectures. These approaches are based on (i) the split aptamer (target-induced assembly of two split strands of the FNA),²⁸ (ii) the modular aptamer (the target binding to aptamer unit promotes the active form of a connected signaling module),²⁹ or (iii) the aptamer kissing complex (the target-bound folded state of a hairpin aptamer is recognized by a reporting hairpin through loop–loop interaction).³⁰ The nucleic acid enzymatic digestion protection concept can be also exploited. The interaction of a target with its specific aptamer can protect the structure from nuclease cleavage, allowing enzyme-mediated size variation of the oligonucleotide.³¹ Finally, these different strategies can be easily allied to diverse nucleic acid amplification tools, enzyme recycling reactions, nanomaterial reporting/binding features, or a combination of them.

Altogether, the FNA characteristics offer opportunities for a plethora of FP sensing platforms (here called FPAA for FP

aptamer assays by analogy with FPIA) as compared with the typical analogue displacement FPIA. As highlighted in the following sections, these achievements imply reporting mechanisms that include (i) the molecular mass change of the probe, eventually coupled to mass amplifier elements, (ii) the segmental motion modification of the probe, and (iii) the excited state lifetime variation of the dye.

Mass-Based Signaling Strategies. The first reported use of aptamers as recognition units in FP analysis was published about 20 years ago and primarily focused on the mass change principle. Since then, several FPAA strategies were explored for both proteins and small species targets (molecules, metal ions) by using either unamplified or amplified approaches (see Table 1). These approaches are detailed in the following sections.

Strategies without Amplification. Proteins as Analytes. As depicted in Figure 1b,i, due to the smaller size of aptamers as compared with that of antibodies, popular short τ fluorophores (fluoresceins, texas red, tetramethylrhodamine...) were first employed for the protein detection under a direct format.^{32–35} In this simple approach, an aptamer terminally labeled with the dye is used as FA tracer. As a result of the higher size of the protein analyte (typically 50–200 kDa), an effective increase in the mass of the aptamer probe occurs upon complex formation. This appears as a significant advantage of the FPAA over FPIA for elaborating very simple assays dedicated to macromolecules.^{32–35} Unfortunately, the maximal FA variation experimentally observed is somewhat moderate, commonly ranging from 0.050 to 0.100. These responses can be explained in relation to the nature of the tethered fluorophores. For

aptamers conjugated to highly DNA diffusion-coupled dyes, the 10 kDa mass of the FNA is responsible for a modest τ/θ ratio that causes a consequent free tracer anisotropy (r_f typically in the 0.150–0.200 range). Therefore, the association with the protein may only engender a mild increase in the FA signal of the probe (<0.100). In the case of FNAs labeled with dyes largely uncoupled to the DNA rotation, the intense degree of freedom of the attached fluorophore typically occasions a low r_f value (~ 0.030 – 0.060 , essentially independent of the sequence size).³⁶ The local movement of the dye obscures in large part the mass change contribution originating from the protein binding and then provides a much more limited response. Altogether, these studies particularly highlight the importance of the fluorophore choice in the design of mass-based FPAA and it is clear that strongly DNA rotation-coupled dyes such as rhodamines should be favored in most cases. One group proposed an interesting strategy that relies on the ability of the aptamer-attached fluorescein to be coupled to the protein target upon the complex formation. The coupling event is ensured by electrostatic interactions between the anionic label and a cationic protein target.³⁷ Although the lysozyme protein displays a low mass value (~ 15 kDa), the approach gives rise to a significant FA variation of ~ 0.120 .³⁷ Nonetheless, the approach is not generic as it can be only applied to peculiar fluorophore/protein pairs of opposed charge. Besides, a displacement format based on the CS release was more recently reported (Figure 1b,ii). Upon protein binding to aptamer, the allosteric switch enables the removal of the fluorescent CS from the aptamer element in such way that the apparent size of the probe decreases.³⁶ However, a quite restricted anisotropy reduction of 0.030–0.040 is observed under this format, as the result of a limited size change between free and bound CS probe forms (about 10 kDa). Overall, LODs achieved with all these methods are in the (sub)nanomolar range.

Small Species as Analytes. The first elaborated FPAA followed the lines of FPIA (Figure 1a,ii) by applying the fluorescent target analogue-based displacement method.³⁸ Due to the aptamer mass smaller than that of antibodies, the FA variation observed with the FPAA approach (0.040–0.050)^{38,39} is lower than that of FPIAs. By using a competitor probe carrying a fluorophore susceptible to interact with DNA upon complexation (tetramethylrhodamine), an enhanced anisotropy change of about 0.140 may however be reached.⁴⁰ Besides, an alternative competitive format based on the aforementioned CS displacement (Figure 1b,ii) was also elaborated.^{41–43} Here again, the method commonly suffers from poor FA responses. Working under more attractive noncompetitive formats is theoretically much more difficult than for protein analytes, except in the rare case of the binding of an intrinsically fluorescent target to an unlabeled aptamer.⁴⁴ By using fluorescently tagged aptamers as probes, only a negligible change in the mass value of the tracer is expected upon the small target binding. Our group and others tried to overwhelm this constraint through the implementation of some aforementioned engineering tools (Figure 1c). Notably, assembly approaches can involve either fluorescent split aptamer fragment^{45,46} or kissing hairpin³⁰ that are able to hybridize in the target-dependent fashion with, respectively, the other split fragment or the complexed hairpin aptamer. These give rise to the mass change-dependent increase in the FA signal (Figure 1c,ii). However, the approaches are only devoted to splitting FNA and require, especially for the kissing complex approach, a

careful design of the two assembling modules. As a more generic alternative, the FP-based aptamer enzymatic digestion protection concept allows monitoring the enzymatic cleavage (mediated by the venom phosphodiesterase I) of the probe upon molecule binding³¹ (Figure 1c,iii). In the absence of ligand, the FA signal is relatively low due to cleaved fragments while the addition of target provokes the protection of the probe and then the increase in the apparent mass (about 10 kDa). Nonetheless, all these direct size-based assays exhibit modest anisotropy change and sensitivity (LODs in the nanomolar–micromolar range in relation to the nature of target–aptamer pairs).

Strategies with Amplification. While the proposed mass-based FPAAs provide significant advances over FPIAs in terms of assay schemes, the limited FA response, observed even in some cases for the direct detection of proteins, remains an important drawback that affects the assay performances. Thus, substantial efforts were devoted to the development of mass amplification methodologies. By using most of the previously considered analyte recognition routes, the principle resides in the coupling of the recognition molecules to a large mass species that enables to magnify the θ difference between the unliganded and liganded probes. To this end, nucleic acid-binding nanomaterials and proteins as well as their combination with enzyme recycling reactions were integrated into the sensing format. Below, we discuss these different strategies.

Nanomaterial Amplification. Numerous methods account the remarkable features of nanoelements to design sensors and chips using diverse transduction techniques.^{47,48} For the peculiar FP analysis purpose, the primary evident benefit of nanomaterials is connected to their large volume characteristics. Furthermore, several nanostructures specifically bind to single-stranded DNA, providing discriminating effects between the free, unstructured, and bound structured states of a FNA.⁴⁹ As depicted in Figure 2, the methods build on either the covalent/bioaffinity bridge or the noncovalent immobilization of a capture element on the nanomaterial.

The first application of mass amplification was described for the Hg^{2+} detection.⁵⁰ This involves gold nanoparticles conjugated to one T-containing DNA strand as binding module and another T-containing DNA fragment that serves as tracer. In the presence of the target, the formation of the helix depending on the $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$ coordination complex formation triggers an increase in the molecular volume of the probe (Figure 2a,i). This type of signaling mechanism was later translated to the protein detection by using Ag nanoparticles instead of gold particles.⁵¹ The authors state that an additional FA-enhancing effect arises, based on a metal enhancer fluorescence (MEF)⁵² mechanism that would result from the exposition of the fluorescein label to the Ag surface.⁵¹ Figure 2a,ii depicts another kind of amplified assay based on the split aptamer. One strand is labeled by a core–shell quantum dot while the other fragment is tethered to a digoxin molecule.⁵³ Addition of the target is responsible for the formation of the ternary complex, which subsequently binds to gold nanoparticles conjugated to an antidigoxin antibody via the antigen–antibody bridge. This leads to the augmentation of the probe mass. The use of a quantum dot label that exhibits a longer τ than that of common dyes is expected to further participate to the FA enhancement. A more common sandwich format is also practicable with conjugated nanomaterials (Figure 2a,iii). It requires two different aptamers (one capture element immobilized onto silica nanoparticles and one signaling unit)

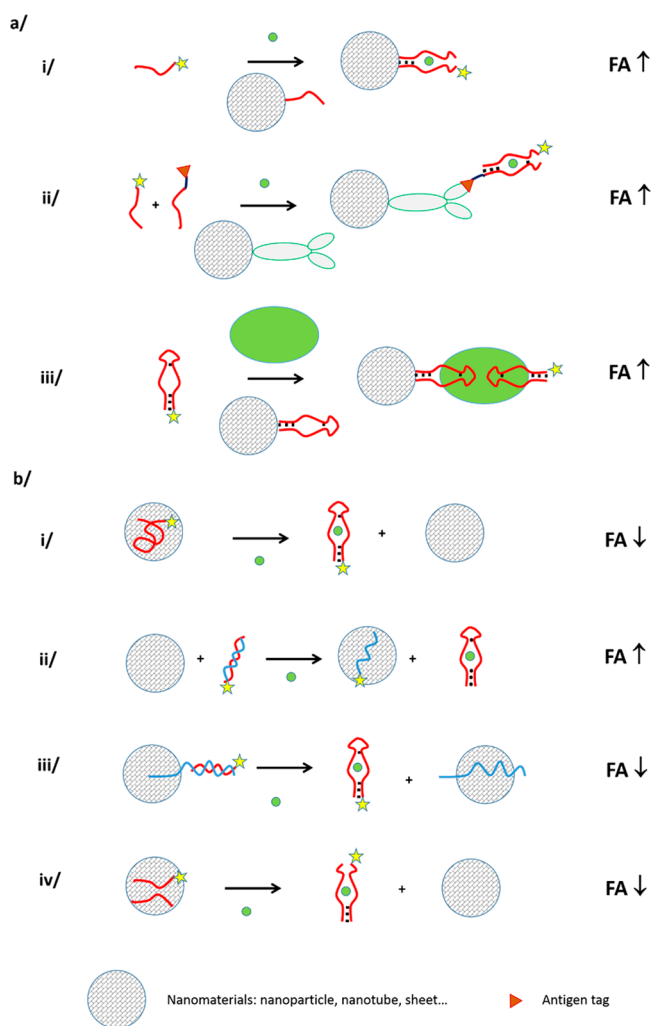


Figure 2. Schematic representation of mass-based FPAA using nanomaterial amplification. (a) Covalent (or bioaffinity bridge) immobilization of the capture unit with signaling based on (i) split aptamer and (ii) sandwich aptamer. (b) Noncovalent immobilization of the capture unit with signaling based on (i) nanomaterial displacement, (ii) CS displacement/"signal on", (iii) CS displacement/"signal off", and (iv) split aptamer displacement. See Figure 1 for additional caption details.

that bind to distinct domains of the target.⁵⁴ The approach can be solely dedicated to targets of sufficiently high accessible surface area (proteins) for allowing independent interaction of two FNAs.

Owing to the special single-stranded DNA binding properties of some nanostructures,⁴⁹ easier sensing platforms were also designed. In its simplest format, a fluorescently labeled aptamer adsorbs onto the surface of the large volume graphene through π - π stacking and van der Waals interactions, giving rise to an extreme increase in the r value.⁵⁵ When challenged with the target, the probe undergoes structuration that provokes the desorption of the aptamer from the material, which in turn leads to the strong mass diminution (Figure 2b,i). An identical scheme is described by using carbon nanoparticles instead of graphene.⁵⁶ In a "signal-on" configuration (Figure 2b,ii), the CS displacement concept is integrated into the assay scheme.⁵⁵ The double-stranded structure formed by the aptamer and the CS probe cannot significantly interact with the graphene material. Upon target binding to aptamer, the CS is displaced

from the aptamer unit and then available to strongly adsorb onto the nanosheet surface. A variation in this CS displacement assay may be possible through a "signal-off" configuration (Figure 2b,iii). The aptamer-CS complex is modified by incorporating a single-stranded poly-A sequence at the extremity of the CS in such way that the entire DNA architecture can bind to the nanomaterial surface.⁵⁷ Interaction of the target with the fluorescent aptamer produces its displacement from the graphene. Finally, a detection mechanism implying two split FNA strands decorating the graphene surface constitutes another option (Figure 2b,iv).⁵⁸ The presence of the target causes their release from the nanomaterial through the formation of the structured DNA motif. To note, the FP signaling method is not based on the covalent labeling of DNA but rather on the insertion of the acridine orange dye into the created nucleic acid motif.⁵⁸

The nanomaterial amplification may greatly improve the FA response (generally in the 0.150–0.250 range) and the assay sensitivity (LOD of picomolar in some cases). Nonetheless, one major drawback for the use of such nano-objects is the occurrence of light scattering. This classically produces interferences in the FA measurements as the result of its strong polarizing process (scattered light is 100% polarized) independent of the target concentration.¹⁰ Moreover, in many cases, the measured r value for the nanomaterial-bound probe exceeds the limiting r_0 value of 0.400. As compared with covalent approaches, the probe adsorption strategy is assuredly easier and faster to implement. However, the used materials are typically responsible for a very strong quenching phenomenon.^{55,59} This effect is unfavorable to the accuracy of the FA signal measurement because the light scattering contribution becomes more significant when the sample fluorescence intensity is low.^{10,57} The difficulty to competitively release the DNA tracer from such high-affinity surfaces constitutes another limiting factor.

Protein Amplification. Most of the strategies reported with nanomaterials can also be implemented by using high mass proteins as alternative amplifiers. They involve either the single-stranded DNA binding protein (SSB) or biopolymers capable to be linked to the capture module through a bioaffinity bridge.

The simplest assay relies on the propensity of SSB to bind the fluorescent aptamer in its free, unstructured state only.⁴⁵ Upon the formation of the aptamer complex in the presence of the target, the structuration of the FNA leads to the probe desorption from the protein surface. This format allows significant FA decrease originating from the mass diminution (~ 70 kDa) as well as possible increase in the segmental motion of the tracer in its liganded form. As compared with the analogous noncovalent nanomaterial strategy (Figure 2b,i), quenching and scattering effects are much less significant, potentially providing a more accurate measurement.

Other assays are based on high bioaffinity interactions between a capture element and a protein to promote the mass amplifying process. A duplex formed by a quantum dot-labeled CS and a digoxin-conjugated ATP aptamer is initially tethered to an antidigoxin antibody through the specific antigen-antibody interaction.⁶⁰ A target-induced CS displacement engenders the probe removal and then the decrease in the mass. Similar approaches are available by substituting the specific antigen-antibody association for the complex formed between the biotin and the streptavidin (mass ~ 60 kDa) or the streptavidin-IgG complex (mass ~ 200 kDa) and by using a fluorescent analogue instead of the CS competitor.³⁹ More

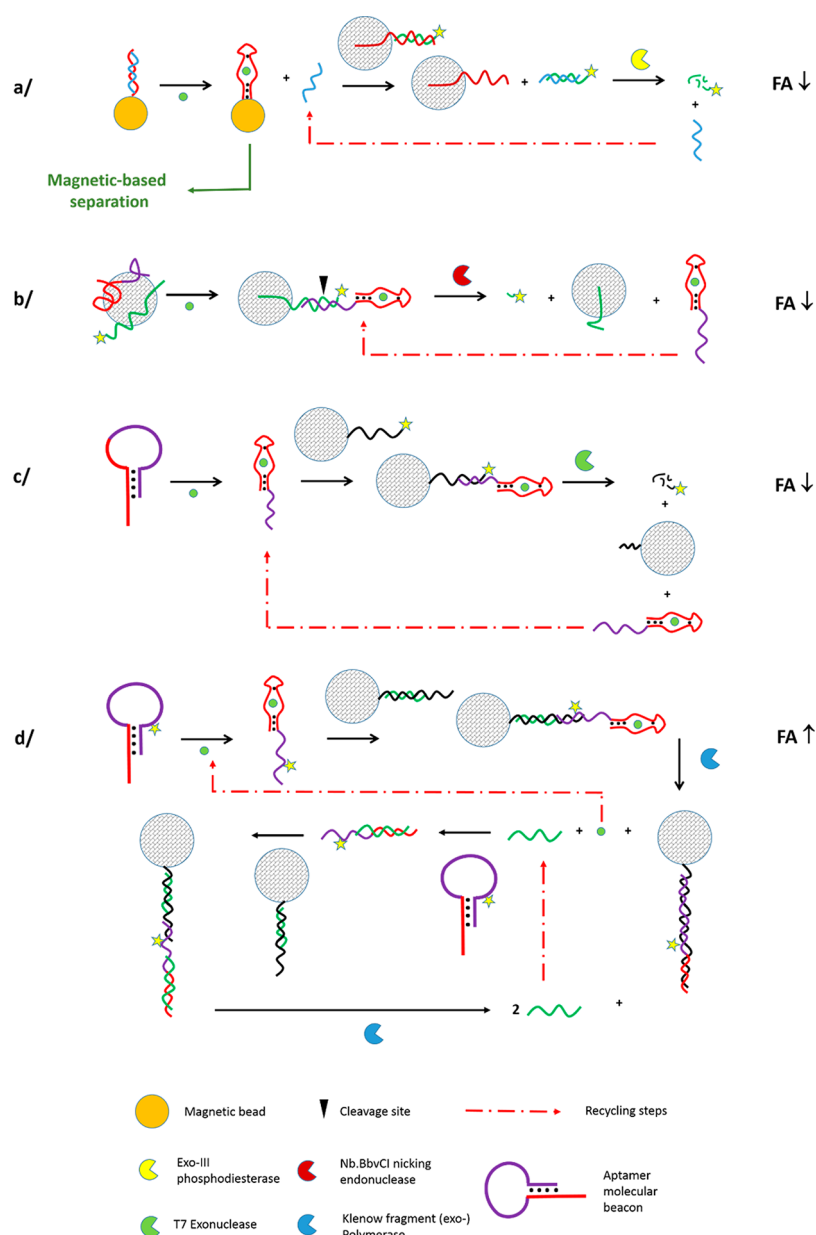


Figure 3. Schematic representation of FPAA based on a combination of mass-based amplification and recycling reactions using (a) Exo-III phosphodiesterase, (b) Nb.BbvCI nicking endonuclease, (c) T7 exonuclease, and (d) Klenow fragment (exo-) polymerase. See other figures for additional caption details.

sophisticated is the signaling mechanism that implies a fluorescein-labeled modular aptamer composed of two connected recognition units, one specific to the small target of interest and another one targeting the thrombin protein.⁶¹ A strand partially complementary to the two unit sequences denatures the entire FNA structure. In the presence of target, the folding of the small molecule aptamer causes the CS dissociation as well as the structural rearrangement of the thrombin aptamer, free for further protein complexation. This leads to a dual binding mechanism, the first one revealing the presence of the target and the second one potentially improving the mass change of the probe. Nonetheless, only a small FA increase is reached (no more than 0.030),⁶¹ probably originating from the relatively limited size of the protein (mass ~35 kDa) as well as some local motion effects of the fluorescein dye. Finally, the FA response of the aptamer

enzymatic digestion protection method (Figure 1c,iii) can be enhanced by introducing into the assay scheme an additional streptavidin-based mass amplification step.⁶²

Overall, as compared with the nanomaterial amplification, both assay response (no more than 0.100–0.200) and LOD (nM in the best cases) are more weakly improved. Other limitation for use of protein amplifiers in FP analysis is constituted by their batch-to-batch and supplier-to-supplier variabilities and the need to operate under precisely defined experimental conditions compatible with the properties and stability of biomolecules.

Combination of Enzyme Recycling Reactions with Mass-Based Amplification. Catalytic recycling systems based on enzymatic cascades were proposed some years ago in the sensing area to promote multiple binding/reporting events.^{63,64} The last generation of amplified FP methods relies on the

combined effects of mass enhancement and enzymatic-based recycling of the analyte and/or a signaling probe. The approaches developed along this principle may be classified in relation to the enzyme reactions involved.

One method relies on a double CS displacement method involving first an aptamer–CS complex immobilized to magnetic beads through a linkage between the biotinylated aptamer and the streptavidin-coated surface (Figure 3a).⁶⁵ When challenged with the target, the CS is removed in the solution and the bound aptamer conjugated to the particle is discarded under the action of a magnetic field. The resulting CS subsequently liberates a fluorescently labeled strand from a second duplex formed with a capture strand covering the graphene surface. The newly formed duplex is then subjected to the action of the double-stranded DNA-specific Exo-III phosphodiesterase that provokes the digestion of the probe and the concomitant recycling of the CS for another round of both probe displacement and catalysis. The state change from the high volume nanostructure-bound oligonucleotide to small digested fragments, associated with the recycling reaction, initiates the FA reduction.⁶⁵

A simpler approach is based on the involvement of an aptamer modified by a short sequence extension at its extremity and a fluorescent DNA both adsorbed onto a graphene surface (Figure 3b).⁶⁶ Upon target binding to FNA, the structuration of aptamer leads to the annealing between the aptamer terminal portion and a partially complementary part of the adsorbed probe through a base stacking hybridization enhancement mechanism. The resulting helix region, containing a recognition site for a nicking endonuclease (Nb.BbvCI), is then subjected to the cleavage. This induces both the release of a very small fluorescent strand and the recycling of the intact target–aptamer complex for another round of hybridization with the graphene-bound probe. A similar approach is feasible by using a split aptamer instead of the entire FNA.⁶⁶

Another strategy relying on the target–aptamer complex recycling was proposed by using a biotinylated probe immobilized on streptavidin-coated polystyrene nanoparticles (Figure 3c).⁶⁷ An aptamer molecular beacon is initially created. In the presence of target, the motif undergoes a structural reorganization that leads to the stem destabilization. The terminal single strand of the destabilized structure is then free to interact with the particle-bound probe sequence. The cleavage of the probe by T7 exonuclease can consequently occur, provoking the removal of the dye from the nanomaterial-tethered DNA architecture. Concomitantly, the released unstructured element can hybridize with another particle-bound probe and initiate further cycles of cleavage. The methodology can be extended to split aptamer or base stacking-induced hybridization approaches.⁶⁷

Further improvement can be achieved through a dual recycling procedure (Figure 3d).⁶⁸ A fluorescent aptamer molecular beacon, similar to that designed in the previous scheme,⁶⁷ is used. Upon binding of the target to the aptamer site, the fluorescently tagged terminal strand of the motif can partially anneal with a single-stranded portion of a helix formed between a biotinylated capture oligonucleotide (attached to streptavidin polystyrene nanoparticles) and an unlabeled CS. The action of the Klenow fragment (exo-) polymerase along the entire immobilized capture strand produces the displacement of both the target and the CS from the nano-object. This permits the target recycling for one additional round of probe destabilization, particle binding, and polymerization. More, the

released CS may further hybridize with the aptamer molecular beacon to form one partial duplex structure that can subsequently interact with another material-conjugated capture DNA–CS complex. The polymerization then generates the release of two CS molecules for additional cycles. A similar assay configuration implementing an additional nicking-based recycling step and a protein mass amplifier was also developed.⁶⁹

These combined methods display very large FA variation (>0.200 in most cases) and are by far the most sensitive ones (LOD as low as femtomolar–attomolar is sometimes attained). However, assays require the very careful engineering of the several interacting oligonucleotides and the strict control/optimization of the stoichiometry/concentration for the different involved species. This determines very sophisticated schemes of difficult practicability. In addition, the aforementioned limitations associated with the use of nanomaterials and biomolecules (enzymes) in FP analysis are here again relevant.

Segmental Motion-Based Signaling Strategies. Most of the discussed mass-based methods rely on the use of at least one competitor species and/or the design of complicated detection configurations, especially in the case of small analyte sensing. As an attractive alternative, direct aptamer assays simply based on the segmental motion changes of the aptamer-attached fluorophore exist (see Table 1). As reported in the following section, they take advantage of the extreme intrinsic conformational flexibility of the FNAs as well as their common target-induced structural adaptability.

The first reported segmental motion-based approach focused on fluctuations in the internal dynamics of the FNA upon the complex formation.⁷⁰ Typically, the FA signal increases with the small target binding-mediated structural stabilization of the aptamer fluorescently labeled at its extremity. The movement restriction of the terminal strand in the ordered structure causes the α reduction and then the anisotropy increase (eq 4). In such a case, the dye nature appears of importance in reporting the modification of the domain mobility. The use of labels that rotate almost independently of the whole aptamer (fluoresceins) constitutes the most convenient way for generating a FA response.⁷⁰ However, the method cannot be amenable to FNAs that undergo a small structural change when complexed to the target. To overcome this limitation, the aptamer can be rationally engineered to favor the magnitude of the domain motion change between the free and bound states of the probe.⁷¹ Nonetheless, the approach displays a restricted scope only devoted to aptamers that display a well-defined secondary structure.

Another strategy based on the α contribution change rather focuses on the modification of the intramolecular contact between the dye and adjacent bases upon target binding to FNA, along the lines of fluorescence-based aptasensors relying on the variation of the close dye environment.²⁵ In that case, several probes are constructed by varying the labeling location within the aptamer sequence in order to identify the most responsive tracers.^{72–77} Here again, the nature of the dye is especially crucial, and DNA rotation-coupled fluorophores such as tetramethylrhodamine (strong interaction with the guanine base)¹² must be privileged. The target-induced FNA reorganization produces changes in the dye freedom degree as well as a modification in the photoinduced electron transfer (PET) quenching between the fluorophore and the adjacent guanine bases.⁷⁸ The resulting variation in both the local mobility and τ of the label can trigger either a decrease (in many cases) or an

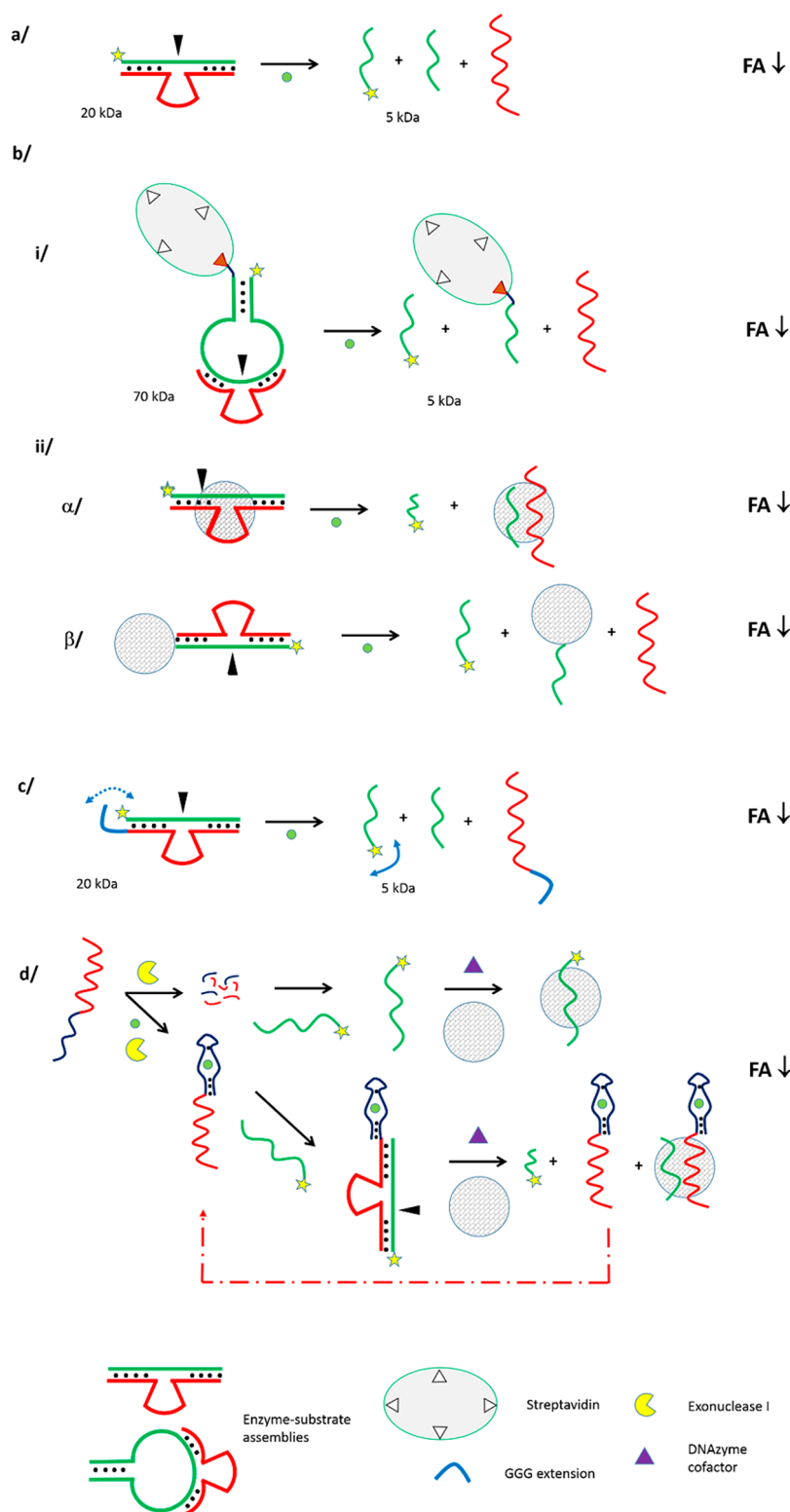


Figure 4. Schematic representation of FPDA: (a) without amplification and (b) with mass amplification involving (i) proteins, (ii) nanomaterials with (α) noncovalent and (β) covalent immobilization; and (c) with segmental motion amplification. (d) A peculiar scheme where the DNAzyme element is exclusively used for triggering a target recycling reaction in a nanomaterial amplified FPA. See other figures for additional caption details.

increase in the FA signal (eqs 1 and 4) in relation to the labeling site and FNA conformational change. Moreover, a significant reduction in the FA signal can occur even in the case of the protein binding to the aptamer probe.⁷² In such a case, the enhanced local mobility and the reduced PET effect are assumed to overwhelm the global θ enhancement related to the

apparent mass increase (eq 4). A similar strategy using a phosphate-perylene labeling instead of base labeling was also elaborated.⁷⁹ Labeling at positions near the target binding site is often needed to promote the FA response in such a way that this strategy can perturb the binding properties of the

aptamer.⁸⁰ Furthermore, in the case of highly prestructured aptamers, only a few bases are environmentally sensitive.⁷²

To facilitate the segmental motion change of aptamers that display a limited induced-fit mechanism, a recent assay strategy focuses on enhanced fluctuations of FNA dynamics induced by the use of an unlabeled, partial CS.⁸¹ The end-labeled aptamer and the target are first preincubated, and the CS only acts as a revealer of the unbound tracer fraction. The partial annealing between the CS and the unbound aptamer leads to the formation of a helix structure that carries a single-stranded extremity. This gives rise to an increased mobility of the labeled terminal domain that in turn favors the dye rotation in the aptamer–CS form as compared to the target-bound probe state. A mechanism rather based on the perturbation of the dye microenvironment instead of domain motion can be also promoted by using internally labeled aptamers.⁸¹

Despite some interesting features including the facile detection mode and the direct assay format, the segmental motion-based methods are commonly characterized by lower assay responses (no more than 0.100) and analytical performances (LOD in the nanomolar–micromolar range) than those of the mass-based amplified approaches. In addition, these sensing platforms typically require the preliminary screening of a large number of labeled aptamers.

Excited State Lifetime-Based Signaling Strategies. A general feature of the reporting mechanisms yet summarized is that the principle is primarily based on the change in the θ value, even if the τ variation may favorably contribute to the response in some approaches.^{37,72–77} In addition, in nearly all these schemes, the FNA molecule is labeled by the fluorophore through a covalent linkage. To further simplify the analytical procedure, the use of noncovalently bound dyes is highly desirable for signaling the presence of target. The approach is potentially amenable as double-stranded DNA or other ordered structures can specifically interact by intercalation and groove binding with a great variety of fluorescent species. These dyes are widely used for the DNA detection in a variety of molecular biology analyses^{82,83} as well as in some fluorescence aptasensors.^{84–86} One example of FP analysis uses the acridine orange dye.⁵⁸ However, due to the low mass change upon the formation of the complex between the fluorophore and the DNA structure, the incorporation of a mass amplifier into the assay scheme is required to generate a useful response.⁵⁸

A more recent work proposed to use SYBR Green as an alternative reporting dye.⁸⁷ The signaling mechanism radically differs as the FA signal fully depends on the extreme τ change of SYBR Green between the free and DNA-bound states. Due to the very rapid decay of the SYBR Green excited state (in the picosecond range) relative to the time scale of rotation (in the subnanosecond range), the anisotropy of the free dye is very high, about 0.300 (eq 1). Upon binding to an unlabeled FNA, a strong FA decrease occurs due to both the considerable increase in τ (in the nanosecond range) and a RET effect between closely located dyes within the DNA motif. In the presence of target, either a displacement or a capture of dye takes place in relation to both the structure and the target-induced reorganization of the FNA, producing either an increase or a decrease in the FA signal (from 0.060 to 0.090 in relation to the studied systems, with LODs in the nanomolar–micromolar range, see Table 1).⁸⁷

The approach is characterized by its easiness, wide applicability, and original signaling feature. However, it is impaired by (i) possible antagonist mechanisms due to

concomitant displacement/capture phenomena upon target binding to FNA and (ii) the very weak fluorescence intensity of SYBR Green in its free form, affecting the method accuracy.

■ FP DNAZYME ASSAY MECHANISMS

Another class of FNAs isolated from *in vitro* selection are DNazymes, which possess a large repertoire of catalytic activities ranging from bond-cleaving/bond-forming to peroxidase-like catalysis.⁸⁸ Numerous reviews focusing on their selection process, enzymatic features, and applications are available.^{89–91} Most of the attractive features of aptamers (see the introduction of the **FP Aptamer Assay Mechanisms** section) are also applicable to DNazymes. The general principle of all FP DNzyme assays (FPDA) reported to date is quite simple. As the DNzyme reaction requires metal cations (or sometimes small organics) serving as cofactors (see Table 1), it relies on the ability of a catalytic FNA to cleave a single (ribo)phosphodiester bond of a substrate module in the presence of its specific cofactor.⁸⁸

In the simplest form, the catalytic DNA core is preassembled with the fluorescently labeled substrate domain through complementary regions at their extremities.^{92–94} The cofactor addition causes the substrate splitting at the cleavage site, initiating the stem destabilization and the release of two single strands of smaller size (Figure 4a). An unimolecular design that involves enzyme and substrate modules linked together through a terminal loop is also feasible.⁹² Whatever the assay, only a modest response is achieved (from 0.005–0.050)^{92–94} as the main consequence of the small change in the molecular mass of the probe between the entire assembly and the cleaved state (from ~20 kDa to ~5 kDa).

As aforementioned for FPAA, improvements in FPDA are expected through the incorporation of mass amplifiers into the assay scheme (Figure 4b). For example, an assembly consisting in a biotinylated, fluorescein-tagged substrate hairpin and an enzyme module is preliminarily attached to the streptavidin protein in such way that its apparent mass is significantly increased (~70 kDa vs ~20 kDa, Figure 4b,i).⁹³ Upon the cofactor addition, the cleavage of the substrate hairpin liberates a small sized fluorescent fragment from the protein conjugate, then producing a better FA reduction as compared with the unamplified approach. However, the FA response remains of low magnitude (0.025), due likely to the segmental motion contribution of the fluorescein dye. FPDAs that imply nanomaterials use either noncovalent or covalent methods for the assembly immobilization (Figure 4b,ii). In the noncovalent one, several nanostructures are tested through their ability to adsorb the enzyme–substrate complex.⁹⁴ In the presence of the most efficient graphene material, the addition of cofactor leads to the release of a small tetramethylrhodamine-labeled strand from the large volume object (Figure 4b,ii, α). A similar method was later proposed by using gold nanorods instead of graphene.⁹⁵ The second strategy relies on the covalent grafting of the fluorescein-tagged enzyme–substrate assembly onto the gold nanoparticle surface (Figure 4b,ii, β).⁹⁶ The analyte-induced substrate domain cleavage triggers the mass decrease. Here again, the fluorescein intrinsic mobility impedes, at least in part, the efficiency of the mass amplification (r change ~0.050).

Another option for assay advancement consists in amplifying variations in the dye segmental motion. The tetramethylrhodamine dye, end-attached to the substrate probe, can significantly interact with the opposite strand of the enzyme

module by incorporating a short sequence of guanine bases at its extremity (Figure 4c).⁹⁷ As previously discussed,⁷⁸ both dye mobility restriction and PET effects enhance the FA signal of the enzyme–substrate architecture in the absence of cofactor.

Finally, coupling the catalytic properties of a DNAzyme to the binding features of an aptamer is also feasible (Figure 4d).⁹⁸ In this case, the DNAzyme unit is exclusively used for triggering a target recycling reaction, instead of the naturally occurring enzymes employed in the above-mentioned methods. A dual module comprising both the aptamer and the DNAzyme sequences is first constructed. Along the lines of the aptamer enzymatic digestion protection strategy (Figure 1c,iii), the binding of the target to the aptamer region preserves the whole DNA structure from the exonuclease I attack. The DNAzyme sequence is then free to associate with the fluorescently labeled substrate domain. The subsequent addition of the DNAzyme cofactor leads to the cleavage of the substrate probe site into short strands. The dual module motif released from this initial DNAzyme reaction can thus initiate a further cycle of splitting through the annealing with another substrate. The working principle is finally combined to a mass amplification by using TiS_2 sheet nanomaterials.⁹⁸

The assay response and analytical performances of FPDA are globally similar to those observed with FPAA. Analogous potential interfering phenomena may also occur in the DNAzyme-based FP methods. The major difference between the two types of assays is related to their scope: FPDA are mainly dedicated to the quantification of metal ions (due to their common use as cofactor in the selection process of DNAzymes)⁹⁹ while FPAA exhibit a much broader range of detectable analyte types, from inorganic ions to proteins (see Table 1).

■ PRACTICAL CONSIDERATIONS

Whatever the reporting route adopted, there are a few crucial aspects to bear in mind when developing practical FPAA/FPDA. One important parameter to control is assuredly the nature of the fluorophore. It has to be carefully selected in considering (i) the detection configuration (related to global or segmental θ or eventually τ); (ii) the FNA sequence/structure, the target-induced conformational change, and the labeling region; and (iii) the target nature. As aforementioned in many examples of literature data, an inadequate dye may be dramatic for the assay response and performance even if the approach displays interesting signaling potentialities.

Another critical point to integrate into the assay development is the transposition from the buffered to complex real sample conditions. Interferences originating from fluorescent matrix species, nonspecific binding to nucleic acid molecules and the nuclease vulnerability of FNA can significantly limit the practical interest of FPAA/FPDA. Moreover, most of the reported platforms solely function under highly diluted sample conditions (1–5%), which are not necessarily applicable in cases of analyte sensing at the trace level. As recommended in FPIA,⁷ background correction of fluorescence intensities from blank sample as well as the use of long wavelength dyes may significantly reduce the matrix autofluorescence effect. The addition of competitor molecules (including unlabeled nucleic acids or other anionic polymers) to the reaction solution are able to impair at least in part the nonspecific binding of complex sample components.¹⁰⁰ The nuclease susceptibility can be thwarted by using chemically modified oligonucleotides¹⁰¹ or by applying the mirror-image concept.¹⁰² As a last resort,

sample pretreatment may still be possible to avoid matrix effects, evidently at the cost of the handling/automation easiness and analysis speed. Identifying FNA in a selection medium whose composition would be as close as possible of that of real samples could constitute an option for improving the assay practicability.

Finally, the panel of aptamers and DNAzymes currently used in FNA-based methods in general and in FPAA/FPDA in particular is relatively restrained. Thus, the existing assays enable the sensing of only few analytes of real interest in the medical, pharmaceutical, environmental, or food control areas (see Table 1), constituting a limitation for the development of widely practicable analytical tools. However, considering the recent advances in the SELEX technology,¹⁰³ we can reasonably envision a significant enlargement of the range of targeted compounds in the near future. Another progress could also result from the development of *in vitro* selection methods especially devoted to the specific FA sensing application, as previously demonstrated for some fluorescence-based devices.^{104,105} For example, peculiar SELEX procedures such as GO-SELEX¹⁰⁶ could select FNA candidates capable to directly convert the target binding into a mass amplified anisotropy change.

■ CONCLUSION

The homogeneous mix-and-read format, the measurement ratiometric nature, the single dye labeling, and the potential to generate response depending on fluorophore diffusional rotation and/or photochemical changes both constitute advantages of the FP technique. As highlighted in the Feature, the FP sensing platforms based on FNAs take full account of these features and offer new avenues in terms of scope, versatility, and sensitivity. As compared to existing FPIA, direct detection of proteins, small organics, or free metal ions can be achieved by using simple assay modes and commercially available dyes as label. In such cases, the assay performances appear to be primarily dependent on the original binding affinity of the FNA for its target. The implementation of many amplification mechanisms can further improve both the assay response and analyte detection limit, but at the expense of the biosensor simplicity in most cases.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: eric.peyrin@univ-grenoble-alpes.fr.

ORCID

Eric Peyrin: 0000-0001-5558-6369

Notes

The authors declare no competing financial interest.

Biographies

Sandrine Perrier is an assistant professor in the Institute of Technology at University Grenoble Alpes where she teaches general and analytical chemistry. She earned her Ph.D. in Pharmaceutical Sciences from Paris Descartes University under the guidance of Professor Jean-Claude Chottard (2003). Thereafter she was a postdoctoral fellow at the CEA (Grenoble) working with Dr. Jean-Luc Ravanat and then in Professor Michel Luhmer's team at ULB (Belgium). Her research areas were focused on DNA–metal and DNA–protein interactions, DNA reactivity, and photochemistry of organic and metal compounds. She joined Professor Eric Peyrin's team in 2008 where she contributed in developing new assays based on the molecular recognition of nucleic acid aptamers.

Valérie Guieu is lecturer in analytical chemistry in faculty of pharmacy at Grenoble Alpes University, France. She received her Ph.D. from the University of Toulouse (France) in 2005. She did her postdoctoral research in photophysics at Trinity College Dublin (Ireland) under the supervision of Professor Sylvia Draper. From 2007 to 2009, she was at the University of Bordeaux working with Raman spectroscopy with Professor François Lagugné Labarthe. In the mean time, she also had the opportunity to teach analytical chemistry at the University of Toulouse. In 2009, she joined the Département de Pharmacochimie Moléculaire and Eric Peyrin's team. Her current research interests include developing new analytical tools using synthetic bioreceptors (aptamers) to detect small molecules of interest such as pesticides and hormones.

Benoit Chovelon is a clinical chemist at Grenoble University Hospital. He is a Ph.D. student in the research group of Professor Eric Peyrin in the Département de Pharmacochimie Moléculaire at University Grenoble Alpes, France. His research focuses on the development of biological target assays usable in clinical chemistry.

Corinne Ravelet is an assistant professor in faculty of pharmacy where she teaches analytical chemistry. She is a member of the Département de Pharmacochimie Moléculaire (DPM) at Grenoble Alpes University since 2003. After a research experience in environmental sciences, she joined the group of Eric Peyrin and worked on the use of the enantioselective properties of the aptamers for chiral separation. Her research interests focus on the development of diagnostic tools based on the molecular recognition properties of aptamers using optical spectroscopy and separation methods. More recently, she has been working on the aptamer selection and has been in charge of the development of CE-SELEX methodology in the DPM lab.

Eric Peyrin is a professor in analytical chemistry in the Faculty of Pharmacy at Grenoble Alpes University, France. After he obtained his clinical chemist diploma in 1995 (Besançon University Hospital, France) and his Ph.D. in 1998 (Franche-Comté University, France), he joined in 2002 the Département de Pharmacochimie Moléculaire, in which he created the bioanalytical chemistry team. His research group has interest in both the selection of nucleic acid aptamers and the development of homogeneous-phase aptasensing devices based on optical signaling methods. His current research interest also focuses on the chiral discrimination properties of oligonucleotide molecules, with a special emphasis in the enantioselective separation and sensor fields.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the support of ANR program Labex Arcane (Grant ANR-11-LABX-0003-01) and AGIR POLE 2016 (Project ADH-KISSPLEX). We would like to thank R. Gandolfi (Rigando Photographie) for his valuable contribution to the TOC graphic.

REFERENCES

- (1) Wu, A. H. B.; French, D. *Clin. Chim. Acta* **2013**, *420*, 4–10.
- (2) Sokoll, L. J.; Chan, D. W. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 356R–362R.
- (3) Sporstman, J. R.; Leytes, L. J. *Drug Discovery Today* **2000**, *5*, 27–32.
- (4) Smith, D. S.; Eremin, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1499–1507.
- (5) Maragos, C. *Toxins* **2009**, *1*, 196–207.
- (6) Eremin, S. A.; Smith, D. S. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2003**, *6*, 257–266.
- (7) Gutierrez, M. C.; Gomez-Hens, A.; Perez-Bendito. *Talanta* **1989**, *36*, 1187–1201.
- (8) Mocz, G. J. *Fluoresc.* **2006**, *16*, 511–524.
- (9) Jameson, D. M.; Ross, J. A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2685–2708.
- (10) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science: New York, 2006.
- (11) Kumke, M. U.; Li, G.; McGown, L. B.; Walker, G. T.; Linn, C. P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 3945–3951.
- (12) Unruh, J. R.; Gokulrangan, G.; Lushington, G. H.; Johnson, C. K.; Wilson, G. S. *Biophys. J.* **2005**, *88*, 3455–3465.
- (13) Terpetschnig, E.; Szmecinski, H.; Lakowicz, J. R. *Anal. Biochem.* **1995**, *227*, 140–147.
- (14) Blake, D. A.; Jones, R. M.; Blake, R. C., II; Pavlov, A. R.; Darwish, I. A.; Yu, H. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 799–809.
- (15) Johnson, D. K. *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2003**, *6*, 245–255.
- (16) Ton, X. A.; Acha, V.; Haupt, K.; Tse Sum Bui, D. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *36*, 22–28.
- (17) Chen, Y. C.; Wang, Z.; Yan, M.; Prahl, S. A. *Luminescence* **2006**, *21*, 7–14.
- (18) Joyce, G. F. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1994**, *4*, 331–336.
- (19) Jayasena, S. D. *Clin. Chem.* **1999**, *45*, 1628–1650.
- (20) Stoltenburg, R.; Reinemann, C.; Strehlitz, B. *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 381–403.
- (21) Kong, H. Y.; Byun, J. *Biomol. Ther.* **2013**, *21*, 423–434.
- (22) Darmostuk, M.; Rimpelova, S.; Gbelcova, H.; Ruml, T. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1141–1161.
- (23) Ono, A.; Torigoe, H.; Tanaka, Y.; Okamoto, I. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5855–5866.
- (24) Latham, M. P.; Zimmermann, G. R.; Pardi, A. J. *Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5052–5053.
- (25) Merino, E. J.; Weeks, K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12370–12371.
- (26) Nutiu, R.; Li, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4771–4778.
- (27) Hamaguchi, N.; Ellington, A.; Stanton, M. *Anal. Biochem.* **2001**, *294*, 126–131.
- (28) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122* (46), 11547–11548.
- (29) Stojanovic, M. N.; Kolpashchikov, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9266–9270.
- (30) Durand, G.; Lisi, S.; Ravelet, C.; Dausse, E.; Peyrin, E.; Toulmé, J. J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2014**, *53*, 6942–6945.
- (31) Kidd, A.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Peyrin, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 3229–3234.
- (32) Potyrailo, R. A.; Conrad, R. C.; Ellington, A. D.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3419–3425.
- (33) McCauley, T. G.; Hamaguchi, N.; Stanton, M. *Anal. Biochem.* **2003**, *319*, 244–250.
- (34) Fang, X.; Cao, Z.; Beck, T.; Tan, W. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5752–5757.
- (35) Gokulrangan, G.; Unruh, J. R.; Holub, D. F.; Ingram, B.; Johnson, C. K.; Wilson, G. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1963–1970.
- (36) Huang, H.; Wei, H.; Zou, M.; Xu, X.; Xia, B.; Liu, F.; Li, N. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 2748–2754.
- (37) Zou, M.; Chen, Y.; Xu, X.; Huang, H.; Li, N. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, *32*, 148–154.
- (38) Wang, Y.; Killian, J.; Hamasaki, K.; Rando, R. R. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12338–12346.
- (39) Samokhvalov, A. V.; Safenkova, I. V.; Eremin, S. A.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *962*, 80–87.
- (40) Li, Y.; Sun, L.; Zhao, Q. *Talanta* **2017**, *174*, 7–13.
- (41) Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 8853–8855.
- (42) Zhu, Z.; Schmidt, T.; Mahrous, M.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Peyrin, E. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *707*, 191–196.
- (43) Goux, E.; Lespinasse, Q.; Guieu, V.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fiore, E.; Peyrin, E. *Methods* **2016**, *97*, 69–74.
- (44) Geng, X.; Zhang, D.; Wang, H.; Zhao, Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 2443–2449.
- (45) Zhu, Z.; Ravelet, C.; Perrier, S.; Guieu, V.; Fiore, E.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7203–7211.
- (46) Hong, X.; Huang, H.; Chen, M.; Liu, F.; Li, N. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 3156–3162.

- (47) Farka, Z.; Juřík, T.; Kovář, D.; Trnková, L.; Skládal, P. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 9973–10042.
- (48) Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. *Front. Chem.* **2014**, *2*, 63.
- (49) Lu, C. H.; Yang, H. H.; Zhu, C. L.; Chen, X.; Chen, G. N. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 4785–4787.
- (50) Ye, B. C.; Yin, B. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8386–8389.
- (51) Chen, Z.; Li, H.; Jia, W.; Liu, X.; Li, Z.; Wen, F.; Zheng, N.; Jiang, J.; Xu, D. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 5900–5908.
- (52) Szmajcinski, H.; Lakowicz, J. R. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6260–6266.
- (53) He, Y.; Tian, J.; Hu, K.; Zhang, J.; Chen, S.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Zhao, S. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *802*, 67–73.
- (54) Yue, Q.; Shen, T.; Wang, L.; Xu, S.; Li, H.; Xue, Q.; Zhang, Y.; Gu, X.; Zhang, S.; Liu, J. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *56*, 231–236.
- (55) Liu, J.; Wang, C.; Jiang, Y.; Hu, Y.; Li, J.; Yang, S.; Li, Y.; Yang, R.; Tan, W.; Huang, C. Z. *Anal. Chem.* **2013**, *85*, 1424–1430.
- (56) Liu, J.; Yu, J.; Chen, J.; Yang, R.; Shih, K. *Mater. Sci. Eng., C* **2014**, *38*, 206–211.
- (57) Xiao, X.; Li, Y. F.; Huang, C. Z.; Zhen, S. J. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16080–16083.
- (58) Zhen, S. J.; Yu, Y.; Li, C. M.; Huang, C. Z. *Analyst* **2015**, *140*, 353–357.
- (59) Zhen, S. J.; Chen, L. Q.; Xiao, S. J.; Li, Y. F.; Hu, P. P.; Zhan, L.; Peng, L.; Song, E. Q.; Huang, C. Z. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8432–8437.
- (60) Tian, J.; Wang, Y.; Chen, S.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Zhao, S. *Microchim. Acta* **2013**, *180*, 203–209.
- (61) Cui, L.; Zou, Y.; Lin, N.; Zhu, Z.; Jenkins, G.; Yang, C. J. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5535–5541.
- (62) Kang, L.; Yang, B.; Zhang, X.; Cui, L.; Meng, H.; Mei, L.; Wu, C.; Ren, S.; Tan, W. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *879*, 91–96.
- (63) Zuo, X.; Xia, F.; Xiao, Y.; Plaxco, K. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1816–1818.
- (64) Liu, S.; Wang, Y.; Zhang, C.; Lin, Y.; Li, F. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2335–2337.
- (65) Xiao, X.; Tao, J.; Zhang, H. Z.; Huang, C. Z.; Zhen, S. J. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *85*, 822–827.
- (66) Huang, Y.; Liu, X.; Zhang, L.; Hu, K.; Zhao, S.; Fang, B.; Chen, Z. F.; Liang, H. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *63*, 178–184.
- (67) Huang, Y.; Liu, X.; Shi, M.; Zhao, S.; Hu, K.; Chen, Z. F.; Liang, H. *Chem. - Asian J.* **2014**, *9*, 2755–2760.
- (68) Huang, Y.; Liu, X.; Huang, H.; Qin, J.; Zhang, L.; Zhao, S.; Chen, Z. F.; Liang, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 8107–8114.
- (69) Huang, H.; Qin, J.; Hu, K.; Liu, X.; Zhao, S.; Huang, Y. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 86043–86050.
- (70) Ruta, J.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fize, J.; Peyrin, E. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7468–7473.
- (71) Perrier, S.; Ravelet, C.; Guieu, V.; Roy, B.; Perigaud, C.; Peyrin, E. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1652–1657.
- (72) Zhang, D.; Zhao, Q.; Zhao, B.; Wang, H. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 3070–3074.
- (73) Zhang, D.; Yin, L.; Meng, Z.; Yu, A.; Guo, L.; Wang, H. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *812*, 161–167.
- (74) Zhao, Q.; Lv, Q.; Wang, H. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1238–1245.
- (75) Zhao, Q.; Lv, Q.; Wang, H. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *70*, 188–193.
- (76) Liu, Y.; Zhao, Q. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 2383–2390.
- (77) Liu, Y.; Zhao, Q. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 3993–4000.
- (78) Zhang, D.; Shen, H.; Li, G.; Zhao, B.; Yu, A.; Zhao, Q.; Wang, H. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 8088–8094.
- (79) Wang, Z.; Pei, X.; Li, N.; Tang, X. J. *Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 4330–4336.
- (80) Zhang, D.; Lu, M.; Wang, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9188–9191.
- (81) Perrier, S.; Bouilloud, P.; De Oliveira Coelho, G.; Henry, M.; Peyrin, E. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *82*, 155–161.
- (82) Ihmels, H.; Otto, D. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *258*, 161–204.
- (83) Gentilini, F.; Turba, M. E. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2014**, *766–767*, 14–18.
- (84) Zhou, C.; Jiang, Y.; Hou, S.; Ma, B.; Fang, X.; Li, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 1175–1180.
- (85) Xing, Y. P.; Liu, C.; Zhou, X. H.; Shi, H. C. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 8125.
- (86) Zhao, Y.; Hu, S.; Wang, H.; Yu, K.; Guan, Y.; Liu, X.; Li, N.; Liu, F. *Anal. Chem.* **2017**, *89*, 6907–6914.
- (87) Chovelon, B.; Fiore, E.; Faure, P.; Peyrin, E.; Ravelet, C. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *90*, 140–145.
- (88) Hollenstein, M. *Molecules* **2015**, *20*, 20777–20804.
- (89) Zhou, W.; Ding, J.; Liu, J. *Theranostics* **2017**, *7*, 1010–1025.
- (90) Silverman, S. K. *Trends Biochem. Sci.* **2016**, *41*, 595–609.
- (91) Willner, I.; Shlyahovsky, B.; Zayats, M.; Willner, B. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1153–1165.
- (92) Amaral, N. B.; Zuliani, S.; Guieu, V.; Ravelet, C.; Perrier, S.; Peyrin, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 1173–1179.
- (93) Hu, P.; Yang, B. *Talanta* **2016**, *147*, 276–281.
- (94) Yu, Y.; Liu, Y.; Zhen, S. J.; Huang, C. Z. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1942–1944.
- (95) He, Y.; Tian, J.; Zhang, J.; Chen, S.; Jiang, Y.; Hu, K.; Zhao, Y.; Zhao, S. *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *55*, 285–288.
- (96) Yin, B. C.; Zuo, P.; Huo, H.; Zhong, X.; Ye, B. C. *Anal. Biochem.* **2010**, *401*, 47–52.
- (97) Zhang, D.; Fu, R.; Zhao, Q.; Rong, H.; Wang, H. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 4903–4909.
- (98) Li, X.; Ding, X.; Li, Y.; Wang, L.; Fan, J. *Nanoscale* **2016**, *8*, 9852–9860.
- (99) Zhou, W.; Saran, R.; Liu, J. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8272–8325.
- (100) Quang, N. N.; Pestourie, C.; Cibieli, A.; Ducongé, F. *Methods* **2016**, *97*, 35–43.
- (101) Meek, K. N.; Rangel, A. E.; Heemstra, J. M. *Methods* **2016**, *106*, 29–36.
- (102) Vater, A.; Klusmann, S. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **2003**, *6*, 253–261.
- (103) Blind, M.; Blank, M. *Mol. Ther.—Nucleic Acids* **2015**, *4*, e223.
- (104) Jhaveri, S.; Rajendran, M.; Ellington, A. D. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 1293–1297.
- (105) Nutui, R.; Li, Y. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1061–1065.
- (106) Nguyen, V. T.; Kwon, Y. S.; Kim, J. H.; Gu, M. B. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 10513–10516.

Bibliographie

1. Durand, G. & Beaudeau, J.-L. *Biochimie médicale: Marqueurs actuels et perspectives*. (Lavoisier, 2011).
2. Lebert, H. *Traité pratique des maladies cancéreuses et des affections curables confondues avec le cancer*. (Baillière, 1851).
3. Brooker, C. *Le corps humain: Étude, structure et fonction*. (De Boeck Supérieur, 2000).
4. Robin, C. & Verdeil, F. *Traité de chimie anatomique et physiologique normale et pathologique, ou, Des principes immédiats normaux et morbides: qui constituent le corps de l'homme et des mammifères*. (J.-B. Baillière, 1853).
5. Romero, R. *et al.* The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* **113**, 118–135 (2006).
6. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
7. Mathisen, M. S., Kantarjian, H. M., Cortes, J. & Jabbour, E. Mutant BCR-ABL clones in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* **96**, 347–349 (2011).
8. Massart, C. *Immunoanalyse: De la théorie aux critères de choix en biologie clinique*. (EDP Sciences, 2012).
9. Roberts, R. F. & Roberts, W. L. Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clinical Biochemistry* **37**, 489–493 (2004).
10. Irvine, D., Tuerk, C. & Gold, L. Selexion: Systematic evolution of ligands by exponential enrichment with integrated optimization by non-linear analysis. *Journal of Molecular Biology* **222**, 739–761 (1991).
11. Sekhon, S. S. *et al.* Defining the copper binding aptamotif and aptamer integrated recovery platform (AIRP). *Nanoscale* **9**, 2883–2894 (2017).

12. Lee, B. H., Nguyen, V. T. & Gu, M. B. Highly sensitive detection of 25-HydroxyvitaminD3 by using a target-induced displacement of aptamer. *Biosensors and Bioelectronics* **88**, 174–180 (2017).
13. Park, J. H. *et al.* A colorimetric sandwich-type assay for sensitive thrombin detection based on enzyme-linked aptamer assay. *Anal. Biochem.* **462**, 10–12 (2014).
14. Catuogno, S. & Esposito, C. L. Aptamer Cell-Based Selection: Overview and Advances. *Biomedicines* **5**, (2017).
15. Jayasena, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**, 1628–1650 (1999).
16. Chen, A. & Yang, S. Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors and Bioelectronics* **71**, 230–242 (2015).
17. Chen, Y., Zhu, Z. & Yu, Y. Novel methodologies in analysis of small molecule biomarkers and living cells. *Tumor Biol.* **35**, 9469–9477 (2014).
18. Torabi, S.-F. & Lu, Y. Small-molecule diagnostics based on functional DNA nanotechnology: a dipstick test for mercury. *Faraday Discuss.* **149**, 125-135; discussion 137-157 (2011).
19. Boer, N. C. den. *Clinical Chemistry: An Overview*. (Springer Science & Business Media, 2012).
20. Berger, M. M. Éléments traces. in *Traité de nutrition artificielle de l'adulte* (eds. Cano, N. *et al.*) 145–159 (Springer Paris, 2007). doi:10.1007/978-2-287-33475-7_11
21. El Balkhi, S. *et al.* Relative exchangeable copper: A new highly sensitive and highly specific biomarker for Wilson's disease diagnosis. *Clinica Chimica Acta* **412**, 2254–2260 (2011).

22. TNB : Recherche par code. Available at:
http://www.codage.ext.cnamts.fr/codif/nabm/index.php?p_site=AMELI. (Accessed: 30th August 2018)
23. Cristol, J.-P., Balint, B., Canaud, B. & Daurés, M.-F. Méthodes de dosage du sodium dans les liquides biologiques. *Néphrologie & Thérapeutique* **3**, S104–S111 (2007).
24. Chappuis, P. *Techniques d'analyse des oligoéléments chez l'homme*. (Lavoisier, 1995).
25. Levy, G. B. Determination of sodium with ion-selective electrodes. *Clinical Chemistry* **27**, 1435–1438 (1981).
26. Severinghaus, J. W. & Astrup, P. B. History of blood gas analysis. II. pH and acid-base balance measurements. *J Clin Monit* **1**, 259–277 (1985).
27. Oesch, U., Ammann, D. & Simon, W. Ion-selective membrane electrodes for clinical use. *Clinical Chemistry* **32**, 1448–1459 (1986).
28. Ladenson, J. H. Direct potentiometric measurement of sodium and potassium in whole blood. *Clinical Chemistry* **23**, 1912–1916 (1977).
29. Sena, S. F. & Bowers, G. N. [23] Measurement of ionized calcium in biological fluids: Ion-selective electrode method. in *Methods in Enzymology* **158**, 320–334 (Academic Press, 1988).
30. Severinghaus, J. W. & Bradley, A. F. Electrodes for Blood pO₂ and pCO₂ Determination. *Journal of Applied Physiology* **13**, 515–520 (1958).
31. Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D. & Taylor, Z. Continuous Recording of Blood Oxygen Tensions by Polarography. *Journal of Applied Physiology* **6**, 189–193 (1953).
32. Moorehead, W. R. & Biggs, H. G. 2-Amino-2-methyl-1-propanol as the alkalizing agent in an improved continuous-flow cresolphthalein complexone procedure for calcium in serum. *Clin. Chem.* **20**, 1458–1460 (1974).

33. Gitelman, H. J., Hurt, C. & Lutwak, L. An automated spectrophotometric method for magnesium analysis. *Analytical Biochemistry* **14**, 106–120 (1966).
34. Performance of a novel spectrophotometric lithium assay on a routine biochemistry analyser. *Ann Clin Biochem* **38**, 684–686 (2001).
35. Smith, F. E., Herbert, J., Gaudin, J., Hennessy, D. J. & Reid, G. R. Serum iron determination using ferene triazine. *Clin. Biochem.* **17**, 306–310 (1984).
36. Tiffany, T. O., Jansen, J. M., Burtis, C. A., Overton, J. B. & Scott, C. D. Enzymatic Kinetic Rate and End-Point Analyses of Substrate, by Use of a GeMSAEC Fast Analyzer. *Clinical Chemistry* **18**, 829–840 (1972).
37. Bulger, H. A. & Johns, H. E. The Determination of Plasma Uric Acid. *J. Biol. Chem.* **140**, 427–440 (1941).
38. Fossati, P. *et al.* A step forward in enzymatic measurement of creatinine. *Clinical Chemistry* **40**, 130–137 (1994).
39. Marbach, E. P. & Weil, M. H. Rapid Enzymatic Measurement of Blood Lactate and Pyruvate: Use and Significance of Metaphosphoric Acid as a Common Precipitant. *Clinical Chemistry* **13**, 314–325 (1967).
40. van Anken, H. C. & Schiphorst, M. E. A kinetic determination of ammonia in plasma. *Clinica Chimica Acta* **56**, 151–157 (1974).
41. Rautela, G. S. & Liedtke, R. J. Automated enzymic measurement of total cholesterol in serum. *Clinical Chemistry* **24**, 108–114 (1978).
42. Klotzsch, S. G. & McNamara, J. R. Triglyceride measurements: a review of methods and interferences. *Clinical Chemistry* **36**, 1605–1613 (1990).
43. Kristoffersen, L., Skuterud, B., Larssen, B. R., Skurtveit, S. & Smith-Kielland, A. Fast quantification of ethanol in whole blood specimens by the enzymatic alcohol

- dehydrogenase method. Optimization by experimental design. *J Anal Toxicol* **29**, 66–70 (2005).
44. Frezzotti, A., Margarucci Gambini, A. M., Coppa, G. & De Sio, G. Total carbon dioxide measured by the Vitros enzymatic method. *Clin. Chem. Lab. Med.* **36**, 43–46 (1998).
45. Giampietro, O., Pilo, A., Buzzigoli, G., Boni, C. & Navalesi, R. Four methods for glucose assay compared for various glucose concentrations and under different clinical conditions. *Clinical Chemistry* **28**, 2405–2407 (1982).
46. Price, C. P. & Spencer, K. A Rapid Kinetic Assay for Glucose using Glucose Dehydrogenase. *Ann Clin Biochem* **16**, 100–105 (1979).
47. Ogawa, Z., Kanashima, M. & Nishioka, H. Improvement of the quantitative method for glucose determination using hexokinase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Clin. Chem. Lab. Med.* **39**, 396–400 (2001).
48. Erhardt, J. G., Biesalski, H. K., Malaba, L. C. & Craft, N. E. Improved Method for Measurement of Retinol and Didehydroretinol in the Modified Relative Dose Response Test to Detect Vitamin A Deficiency. *Clinical Chemistry* **49**, 338–339 (2003).
49. Simon, E., Paul, J.-L., Soni, T., Simon, A. & Moatti, N. Plasma and erythrocyte vitamin E content in asymptomatic hypercholesterolemic subjects. *Clinical Chemistry* **43**, 285–289 (1997).
50. Washko, P. W., Welch, R. W., Dhariwal, K. R., Wang, Y. & Levine, M. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid analyses in biological samples. *Analytical Biochemistry* **204**, 1–14 (1992).
51. Talwar, D., Davidson, H., Cooney, J. & JO'Reilly, D. S. Vitamin B1 Status Assessed by Direct Measurement of Thiamin Pyrophosphate in Erythrocytes or Whole Blood by HPLC: Comparison with Erythrocyte Transketolase Activation Assay. *Clinical Chemistry* **46**, 704–710 (2000).

52. Rybak, M. E. & Pfeiffer, C. M. Clinical analysis of vitamin B6: Determination of pyridoxal 5'-phosphate and 4-pyridoxic acid in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography with chlorite postcolumn derivatization. *Analytical Biochemistry* **333**, 336–344 (2004).
53. Wei, T. Q. *et al.* Automated Homogeneous Immunoassay for Gentamicin on the Dimension Clinical Chemistry System. *Clinical Chemistry* **45**, 388–393 (1999).
54. Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P. & Horvat, M. Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **24**, 383–393 (2005).
55. Møesch, C. Utilisation de l'ICP-MS en biologie clinique. *Ann Toxicol Anal* **19**, 11–21 (2007).
56. Taylor, P. J., Cooper, D. P., Gordon, R. D. & Stowasser, M. Measurement of Aldosterone in Human Plasma by Semiautomated HPLC–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* **55**, 1155–1162 (2009).
57. Watson, D., Setchell, K. D. R. & Ross, R. Analysis of vitamin D and its metabolites using thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* **5**, 153–160 (1991).
58. Le Goff, C., Cavalier, E., Souberbielle, J.-C., González-Antuña, A. & Delvin, E. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: A historical review. *Practical Laboratory Medicine* **2**, 1–14 (2015).
59. Suhara, Y., Kamao, M., Tsugawa, N. & Okano, T. Method for the Determination of Vitamin K Homologues in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **77**, 757–763 (2005).

60. Challa, B. R., Awen, B. Z., Chandu, B. R. & Rihanaparveen, S. LC–ESI-MS/MS method for the quantification of entecavir in human plasma and its application to bioequivalence study. *Journal of Chromatography B* **879**, 769–776 (2011).
61. Thomas, A. *et al.* Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes. *Anal. Chim. Acta* **707**, 107–113 (2011).
62. Zhang, D., Rios, D. R., Tam, V. H. & Chow, D. S.-L. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS assay for the quantification of arginine vasopressin in human plasma and urine: Application in preterm neonates and child. *J Pharm Biomed Anal* **99**, 67–73 (2014).
63. Krumpochova, P. *et al.* Amino acid analysis using chromatography–mass spectrometry: An inter platform comparison study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **114**, 398–407 (2015).
64. Skoog, D. A., Holler, F. J. & Nieman, T. A. *Principes d'analyse instrumentale*. (De Boeck Supérieur, 2003).
65. Baietto, L. *et al.* A UPLC-MS-MS method for the simultaneous quantification of first-line antituberculars in plasma and in PBMCs. *J Antimicrob Chemother* **70**, 2572–2575 (2015).
66. Musso, N. R., Vergassola, C., Pende, A. & Lotti, G. Reversed-phase HPLC separation of plasma norepinephrine, epinephrine, and dopamine, with three-electrode coulometric detection. *Clinical Chemistry* **35**, 1975–1977 (1989).
67. Shoup, R. E. & Kissinger, P. T. Determination of urinary normetanephrine, metanephrine, and 3-methoxytyramine by liquid chromatography, with amperometric detection. *Clinical Chemistry* **23**, 1268–1274 (1977).

68. Dutrieu, J. & Delmotte, Y. A. Simultaneous determination of vanilmandelic acid (VMA), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxy-3-indoleacetic acid (5-HIAA) in urine by high-performance liquid-chromatography with coulometric detection. *Fresenius' Z Anal Chem* **317**, 124–128 (1984).
69. Pussard, E., Guigueno, N., Adam, O. & Giudicelli, J. F. Validation of HPLC-amperometric detection to measure serotonin in plasma, platelets, whole blood, and urine. *Clinical Chemistry* **42**, 1086–1091 (1996).
70. Porter, W. H., Rutter, P. W. & Harry Yao, H. Simultaneous Determination of Ethylene Glycol and Glycolic Acid in Serum by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* **23**, 591–597 (1999).
71. Lefkowitz, R. J. & Williams, L. T. Catecholamine binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 515–519 (1977).
72. Kukreti, R. *et al.* Beta(2)-adrenergic receptor polymorphisms and response to salbutamol among Indian asthmatics*. *Pharmacogenomics* **6**, 399–410 (2005).
73. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* **59**, 1–41 (2015).
74. Houston, W. E., Pedersen, C. E., Cole, F. E. & Spertzel, R. O. Effects of antigen-antibody complexes on the primary immune response in Rhesus monkeys. *Infect. Immun.* **10**, 437–442 (1974).
75. Latchman, D. S. Transcription factors: an overview. *Int J Exp Pathol* **74**, 417–422 (1993).
76. Walter, N. G. & Engelke, D. R. Ribozymes: Catalytic RNAs that cut things, make things, and do odd and useful jobs. *Biologist (London)* **49**, 199–203 (2002).
77. Godonoga, M. *et al.* A DNA aptamer recognising a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly. *Sci Rep* **6**, (2016).

78. Buck, J., Noeske, J., Wöhnert, J. & Schwalbe, H. Dissecting the influence of Mg²⁺ on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing riboswitch aptamer domain. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4143–4153 (2010).
79. Kim, B. B. *et al.* Evaluation of dissociation constants of antigen-antibody complexes by ELISA. *Journal of Immunological Methods* **131**, 213–222 (1990).
80. Kantha, S. S. A centennial review; the 1890 tetanus antitoxin paper of von Behring and Kitasato and the related developments. *Keio J Med* **40**, 35–39 (1991).
81. Hanly, W. C., Artwohl, J. E. & Bennett, B. T. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR J* **37**, 93–118 (1995).
82. Hanack, K., Messerschmidt, K. & Listek, M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. in *Protein Targeting Compounds: Prediction, Selection and Activity of Specific Inhibitors* (ed. Böldicke, T.) 11–22 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-32805-8_2
83. Köhler, G. & Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495–497 (1975).
84. Monoclonal Antibody Definition | Monoclonal Antibody. *NeoBioLab Research* (2015).
85. Ouchterlony, O. In Vitro Method for Testing the Toxin-Producing Capacity of Diphtheria Bacteria. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* **25**, 186–191 (1948).
86. Ouchterlony, O. Antigen — Antibody Reactions In Gels. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* **26**, 507–515 (1949).
87. Thuillier, F. *et al.* Nephelometry or turbidimetry for the determination of albumin, ApoA, CRP, haptoglobin, IgM and transthyretin: which choice? *Annales de Biologie Clinique* **66**, 63–78 (2008).

88. Mali, B., Armbruster, D., Serediak, E. & Ottenbreit, T. Comparison of immunoturbidimetric and immunonephelometric assays for specific proteins. *Clinical Biochemistry* **42**, 1568–1571 (2009).
89. McMillin, G. A., Juenke, J. M., Tso, G. & Dasgupta, A. Estimation of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide concentrations in plasma using mathematical equations generated with two carbamazepine immunoassays. *Am. J. Clin. Pathol.* **133**, 728–736 (2010).
90. Monneret, D. *et al.* Evaluation of LOCI® technology-based thyroid blood tests on the Dimension Vista® analyzer. *Clinical Biochemistry* **46**, 1290–1297 (2013).
91. Järvenpää, M.-L. *et al.* Rapid and sensitive cardiac troponin I immunoassay based on fluorescent europium(III)-chelate-dyed nanoparticles. *Clinica Chimica Acta* **414**, 70–75 (2012).
92. Dubiel, E. A., Fülöp, T., Vigier, S. & Vermette, P. Quartz crystal microbalance as an assay to detect anti-drug antibodies for the immunogenicity assessment of therapeutic biologics. *Anal Bioanal Chem* **409**, 7153–7167 (2017).
93. Fang, Y.-S., Wang, H.-Y., Wang, L.-S. & Wang, J.-F. Electrochemical immunoassay for procalcitonin antigen detection based on signal amplification strategy of multiple nanocomposites. *Biosensors and Bioelectronics* **51**, 310–316 (2014).
94. Vashist, S. K., Schneider, E. M., Barth, E. & Luong, J. H. T. Surface plasmon resonance-based immunoassay for procalcitonin. *Anal. Chim. Acta* **938**, 129–136 (2016).
95. Ullman, E. F. *et al.* Luminescent oxygen channeling assay (LOCI): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clinical Chemistry* **42**, 1518–1526 (1996).
96. Ellington, A. D. & Szostak, J. W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* **346**, 818–822 (1990).

97. Goux, E. *et al.* An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine. *Anal Bioanal Chem* **407**, 6515–6524 (2015).
98. Chaloin, L., Lehmann, M. J., Sczakiel, G. & Restle, T. Endogenous expression of a high-affinity pseudoknot RNA aptamer suppresses replication of HIV-1. *Nucleic Acids Res* **30**, 4001–4008 (2002).
99. Jiang, B. *et al.* Aptamer Pseudoknot-Functionalized Electronic Sensor for Reagentless and Single-Step Detection of Immunoglobulin E in Human Serum. *Anal. Chem.* **87**, 3094–3098 (2015).
100. Li, T., Shi, L., Wang, E. & Dong, S. Multifunctional G-Quadruplex Aptamers and Their Application to Protein Detection. *Chemistry – A European Journal* **15**, 1036–1042 (2009).
101. Kong, D.-M., Ma, Y.-E., Guo, J.-H., Yang, W. & Shen, H.-X. Fluorescent Sensor for Monitoring Structural Changes of G-Quadruplexes and Detection of Potassium Ion. *Anal. Chem.* **81**, 2678–2684 (2009).
102. Liu, Y., Cheng, D., Ge, M. & Lin, W. The Truncated Human Telomeric Sequence forms a Hybrid-Type Intramolecular Mixed Parallel/antiparallel G-quadruplex Structure in K(+) Solution. *Chem Biol Drug Des* **88**, 122–128 (2016).
103. Vianini, E., Palumbo, M. & Gatto, B. In vitro selection of DNA aptamers that bind l-tyrosinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **9**, 2543–2548 (2001).
104. Cox, J. C. & Ellington, A. D. Automated selection of anti-Protein aptamers. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **9**, 2525–2531 (2001).
105. Sefah, K., Shangguan, D., Xiong, X., O'Donoghue, M. B. & Tan, W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nature Protocols* **5**, 1169–1185 (2010).
106. Tuerk, C. & Gold, L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505–510 (1990).

107. Song, K.-M., Lee, S. & Ban, C. Aptamers and Their Biological Applications. *Sensors (Basel)* **12**, 612–631 (2012).
108. Mendonsa, S. D. & Bowser, M. T. In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **76**, 5387–5392 (2004).
109. Bailey, T. L. *et al.* MEME Suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res* **37**, W202–W208 (2009).
110. Nguyen Quang, N. *et al.* Applications of High-Throughput Sequencing for In Vitro Selection and Characterization of Aptamers. *Pharmaceuticals* **9**, 76 (2016).
111. Lassmann, T., Frings, O. & Sonnhammer, E. L. L. Kalign2: high-performance multiple alignment of protein and nucleotide sequences allowing external features. *Nucleic Acids Res* **37**, 858–865 (2009).
112. Lauridsen, L. H., Shamaileh, H. A., Edwards, S. L., Taran, E. & Veedu, R. N. Rapid One-Step Selection Method for Generating Nucleic Acid Aptamers: Development of a DNA Aptamer against α -Bungarotoxin. *PLoS One* **7**, (2012).
113. Yu, X. & Yu, Y. A Mathematical Analysis of the Selective Enrichment of NECEEM-Based Non-SELEX. *Appl Biochem Biotechnol* **173**, 2019–2027 (2014).
114. Lisi, S. *et al.* Non-SELEX isolation of DNA aptamers for the homogeneous-phase fluorescence anisotropy sensing of tau Proteins. *Analytica Chimica Acta* (2018).
doi:10.1016/j.aca.2018.07.029
115. Stoltenburg, R., Nikolaus, N. & Strehlitz, B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J Anal Methods Chem* **2012**, 415697 (2012).
116. Cruz-Aguado, J. A. & Penner, G. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 10456–10461 (2008).

117. De Girolamo, A., Le, L., Penner, G., Schena, R. & Visconti, A. Analytical performances of a DNA-ligand system using time-resolved fluorescence for the determination of ochratoxin A in wheat. *Anal Bioanal Chem* **403**, 2627–2634 (2012).
118. Deng, Q., German, I., Buchanan, D. & Kennedy, R. T. Retention and Separation of Adenosine and Analogues by Affinity Chromatography with an Aptamer Stationary Phase. *Anal. Chem.* **73**, 5415–5421 (2001).
119. Ahirwar, R. & Nahar, P. Development of an aptamer-affinity chromatography for efficient single step purification of Concanavalin A from *Canavalia ensiformis*. *Journal of Chromatography B* **997**, 105–109 (2015).
120. Michaud, M. *et al.* A DNA Aptamer as a New Target-Specific Chiral Selector for HPLC. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 8672–8679 (2003).
121. Yao, C. *et al.* Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE. *Biosens Bioelectron* **24**, 2499–2503 (2009).
122. Farjami, E. *et al.* RNA Aptamer-Based Electrochemical Biosensor for Selective and Label-Free Analysis of Dopamine. *Anal. Chem.* **85**, 121–128 (2013).
123. Durand, G. *et al.* Riboswitches based on kissing complexes for the detection of small ligands. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 6942–6945 (2014).
124. Gao, S., Zheng, X. & Wu, J. A biolayer interferometry-based competitive biosensor for rapid and sensitive detection of saxitoxin. *Sensors and Actuators B: Chemical* **246**, 169–174 (2017).
125. Ye, S., Zhai, X., Wu, Y. & Kuang, S. Dual-primer self-generation SERS signal amplification assay for PDGF-BB using label-free aptamer. *Biosensors and Bioelectronics* **79**, 130–135 (2016).

126. Lu, C., Tang, Z., Liu, C., Kang, L. & Sun, F. Magnetic-nanobead-based competitive enzyme-linked aptamer assay for the analysis of oxytetracycline in food. *Anal Bioanal Chem* **407**, 4155–4163 (2015).
127. Gao, S. *et al.* Enzyme-linked, aptamer-based, competitive biolayer interferometry biosensor for palytoxin. *Biosensors and Bioelectronics* **89**, 952–958 (2017).
128. Stojanovic, M. N., de Prada, P. & Landry, D. W. Fluorescent Sensors Based on Aptamer Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 11547–11548 (2000).
129. Durand, G. *et al.* A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs; towards multiplex detection by switching hairpin aptamers. *Nucleic Acids Res* **44**, 4450–4459 (2016).
130. Goux, E. *et al.* A colorimetric nanosensor based on a selective target-responsive aptamer kissing complex. *Nanoscale* **9**, 4048–4052 (2017).
131. Takeuchi, Y. *et al.* Single-molecule observations of RNA-RNA kissing interactions in a DNA nanostructure. *Biomater Sci* **4**, 130–135 (2016).
132. Azéma, L. *et al.* Triggering nucleic acid nanostructure assembly by conditional kissing interactions. *Nucleic Acids Res.* **46**, 1052–1058 (2018).
133. Brumby, A. *et al.* Chiral Stationary Phase Based on a Biostable l-RNA Aptamer. *Anal. Chem.* **77**, 1993–1998 (2005).
134. Lin, Y., Qiu, Q., Gill, S. C. & Jayasena, S. D. Modified RNA sequence pools for in vitro selection. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5229–5234 (1994).
135. Schmidt, K. S. *et al.* Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res.* **32**, 5757–5765 (2004).
136. Nolte, A., Klussmann, S., Bald, R., Erdmann, V. A. & Fürste, J. P. Mirror-design of L-oligonucleotide ligands binding to L-arginine. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1116–1119 (1996).

137. Klussmann, S., Nolte, A., Bald, R., Erdmann, V. A. & Fürste, J. P. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1112–1115 (1996).
138. Cui, L. *et al.* Biostable L-DNAzyme for Sensing of Metal Ions in Biological Systems. *Anal Chem* **88**, 1850–1855 (2016).
139. Ke, G. *et al.* l-DNA Molecular Beacon: A Safe, Stable, and Accurate Intracellular Nanothermometer for Temperature Sensing in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18908–18911 (2012).
140. Quang, N. N., Pestourie, C., Cibiel, A. & Ducongé, F. How to measure the affinity of aptamers for membrane proteins expressed on the surface of living adherent cells. *Methods* **97**, 35–43 (2016).
141. Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V. & Grant, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **785**, 263–275 (2003).
142. Ma, J., Stoter, G., Verweij, J. & Schellens, J. H. M. Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations. *Cancer Chemother Pharmacol* **38**, 391–394 (1996).
143. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides* **72**, 4–15 (2015).
144. Drolet, D. W., Moon-McDermott, L. & Romig, T. S. An enzyme-linked oligonucleotide assay. *Nat. Biotechnol.* **14**, 1021–1025 (1996).
145. Barthelmebs, L., Jonca, J., Hayat, A., Prieto-Simon, B. & Marty, J.-L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control* **22**, 737–743 (2011).

146. Sun, L. & Zhao, Q. Competitive horseradish peroxidase-linked aptamer assay for sensitive detection of Aflatoxin B1. *Talanta* **179**, 344–349 (2018).
147. Zhang, D.-W. *et al.* An electrochemical aptasensor based on enzyme linked aptamer assay. *Biosensors and Bioelectronics* **31**, 363–368 (2012).
148. Nie, J. *et al.* A self-assemble aptamer fragment/target complex based high-throughput colorimetric aptasensor using enzyme linked aptamer assay. *Talanta* **106**, 309–314 (2013).
149. Zhu, Z. *et al.* Single-stranded DNA binding protein-assisted fluorescence polarization aptamer assay for detection of small molecules. *Anal. Chem.* **84**, 7203–7211 (2012).
150. Sharma, A. K., Kent, A. D. & Heemstra, J. M. Enzyme-Linked Small-Molecule Detection Using Split Aptamer Ligation. *Anal. Chem.* **84**, 6104–6109 (2012).
151. Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*. (De Boeck Supérieur, 2004).
152. Caplan, Y. H., Levine, B. & Goldberger, B. Fluorescence polarization immunoassay evaluated for screening for amphetamine and methamphetamine in urine. *Clinical Chemistry* **33**, 1200–1202 (1987).
153. Perrier, S., Guieu, V., Chovelon, B., Ravelet, C. & Peyrin, E. Panoply of Fluorescence Polarization/Anisotropy Signaling Mechanisms for Functional Nucleic Acid-Based Sensing Platforms. *Anal. Chem.* **90**, 4236–4248 (2018).
154. Samokhvalov, A. V., Safenkova, I. V., Eremin, S. A., Zherdev, A. V. & Dzantiev, B. B. Use of anchor protein modules in fluorescence polarisation aptamer assay for ochratoxin A determination. *Analytica Chimica Acta* **962**, 80–87 (2017).
155. Kang, L. *et al.* Enzymatic cleavage and mass amplification strategy for small molecule detection using aptamer-based fluorescence polarization biosensor. *Analytica Chimica Acta* **879**, 91–96 (2015).

156. Ruta, J., Perrier, S., Ravelet, C., Fize, J. & Peyrin, E. Noncompetitive Fluorescence Polarization Aptamer-based Assay for Small Molecule Detection. *Anal. Chem.* **81**, 7468–7473 (2009).
157. Chovelon, B., Fiore, E., Faure, P., Peyrin, E. & Ravelet, C. A lifetime-sensitive fluorescence anisotropy probe for DNA-based bioassays: The case of SYBR Green. *Biosens Bioelectron* **90**, 140–145 (2017).
158. Treschan, T. A. & Peters, J. The Vasopressin System Physiology and Clinical Strategies. *Anesthes* **105**, 599–612 (2006).
159. Camps, J. *et al.* Radioimmunoassay for arginine-vasopressin in cold ethanol extracts of plasma. *Clinical Chemistry* **29**, 882–884 (1983).
160. Umlauf, M. & Chasens, E. Sleep disordered breathing and nocturnal polyuria: nocturia and enuresis. *Sleep Medicine Reviews* **7**, 403–411 (2003).
161. Mellor, A. J. *et al.* Copeptin and arginine vasopressin at high altitude: relationship to plasma osmolality and perceived exertion. *Eur J Appl Physiol* **115**, 91–98 (2015).
162. ADH - Hormone antidiurétique - plasma | Référentiel des examens. *Eurofins Biomnis* Available at: <https://www.eurofins-biomnis.com/en/english-news/>. (Accessed: 12th September 2018)
163. Husain, M. K., Fernando, N., Shapiro, M., Kagan, A. & Glick, S. M. Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. *J Clin Endocrinol Metab* **37**, 616–625 (1973).
164. Tsukazaki, Y. *et al.* Development of a High-Sensitivity Quantitation Method for Arginine Vasopressin by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, and Comparison with Quantitative Values by Radioimmunoassay. *Anal Sci* **32**, 153–159 (2016).

165. Zhang, K., Wang, K., Zhu, X. & Xie, M. A label-free kissing complexes-induced fluorescence aptasensor using DNA-templated silver nanoclusters as a signal transducer. *Biosensors and Bioelectronics* **78**, 154–159 (2016).
166. Williams, K. P. *et al.* Bioactive and nuclease-resistant l-DNA ligand of vasopressin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11285–11290 (1997).
167. Purschke, W. G., Eulberg, D., Buchner, K., Vonhoff, S. & Klussmann, S. An l-RNA-based aquaretic agent that inhibits vasopressin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 5173–5178 (2006).
168. Roncancio, D. *et al.* A Label-Free Aptamer-Fluorophore Assembly for Rapid and Specific Detection of Cocaine in Biofluids. *Anal. Chem.* **86**, 11100–11106 (2014).
169. Wu, K., Ma, C., Zhao, H., He, H. & Chen, H. Label-Free G-Quadruplex Aptamer Fluorescence Assay for Ochratoxin A Using a Thioflavin T Probe. *Toxins (Basel)* **10**, (2018).
170. Zhen, S. J., Yu, Y., Li, C. M. & Huang, C. Z. Graphene oxide amplified fluorescence anisotropy for label-free detection of potassium ion. *Analyst* **140**, 353–357 (2014).
171. Schneeberger, C., Speiser, P., Kury, F. & Zeillinger, R. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *Genome Res.* **4**, 234–238 (1995).
172. Gentilini, F. & Turba, M. E. Optimization of the Divergent method for genotyping single nucleotide variations using SYBR Green-based single-tube real-time PCR. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **766–767**, 14–18 (2014).
173. Jenison, R. D., Gill, S. C., Pardi, A. & Polisky, B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* **263**, 1425–1429 (1994).

174. Davis, J. H. & Szostak, J. W. Isolation of high-affinity GTP aptamers from partially structured RNA libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11616–11621 (2002).

Utilisation des aptamères pour le dosage de petites molécules d'intérêt biologique

Résumé : La biochimie médicale est une discipline en constante évolution. L'enjeu du développement de nouvelles techniques est de permettre l'analyse à haut débit, de manière spécifique et à faible coût. Les techniques d'immunoanalyse omniprésentes en laboratoire de biologie médicale (LBM) répondent convenablement à ces critères, mais sont cependant perfectibles en ce qui concerne l'analyse des petites molécules d'intérêt biologique. L'objectif de ce travail est de développer des méthodes de dosage innovantes, pour les petites molécules, en utilisant les aptamères comme nouveaux outils de reconnaissance moléculaire. Il s'agit d'oligonucléotides fonctionnels simple brin, capables de reconnaître de manière spécifique une cible, isolés à partir d'une banque de candidats par une approche combinatoire *in vitro* nommée SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Ils sont en concurrence avec les anticorps, en particulier dans le domaine du diagnostic. Nous avons dans un premier temps travaillé sur le développement de systèmes de dosage à double reconnaissance pour petite molécule, impliquant la formation d'un complexe boucle-boucle. L'adénosine et la théophylline ont tout d'abord servi de cibles modèles pour le développement en phase hétérogène d'une technique de dosage colorimétrique avec amplification enzymatique du signal. Le développement a ensuite été axé sur un analyte ayant un réel intérêt biologique, l'arginine-vasopressine. Le système a été développé en phase homogène en utilisant la technique d'anisotropie de fluorescence. L'application en milieu biologique a été facilitée par l'utilisation d'oligonucléotides non naturels en série L. Enfin nous avons décrit une méthode particulièrement innovante, sans marquage (« label-free »), permettant l'analyse des cibles de petite taille. Cette méthode basée sur l'utilisation du SYBR Green en solution couplée à la technique d'anisotropie de fluorescence, permet également l'étude des ligands de l'ADN.

Mots clés : aptamère, petites molécules, biologie médicale, complexe boucle-boucle, complexe kissing

Use of aptamers for the determination of small molecules of biological interest

Abstract: Clinical chemistry is a constantly evolving discipline. The challenge of developing new techniques is to enable high throughput analysis specific and at low cost. Immunoassay techniques respond appropriately to these criteria, but are nevertheless perfectible with regards to the detection of small molecules of biological interest. The aim of this work is to develop innovative assay methods for small molecules of biological interest, using aptamers as alternative molecular recognition tools. They are single-stranded functional nucleic acids that are isolated from a very large library of candidates through an *in vitro* combinatorial approach (SELEX) for their ability to bind a peculiar species. They compete with antibodies, particularly in the area of diagnosis. First, we focused our work on the design of small molecule dual recognition assay systems that involved the formation of a loop-loop complex. Adenosine and theophylline served as model targets for the heterogeneous phase development of a colorimetric assay with enzymatic signal amplification. Subsequent works were performed by using arginine-vasopressin, an analyte with a real biological interest as target. A homogeneous phase fluorescence anisotropy detection system was constructed. Applications in complex matrix were facilitated by the use of non-natural L-oligonucleotides. Finally, a particularly innovative SYBR Green-based fluorescence anisotropy method, was reported allowing the detection of both small targets and DNA ligands.

Key words: aptamer, small molecules, clinical chemistry, loop-loop complex, kissing complex, label-free