



HAL
open science

Identification de nouvelles sondes moléculaires contre des biomarqueurs des maladies neurodégénératives

Alix Bouvier-Müller

► **To cite this version:**

Alix Bouvier-Müller. Identification de nouvelles sondes moléculaires contre des biomarqueurs des maladies neurodégénératives. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASL011 . tel-03920277

HAL Id: tel-03920277

<https://theses.hal.science/tel-03920277v1>

Submitted on 3 Jan 2023

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.

Identification de nouvelles sondes moléculaires contre des biomarqueurs des maladies neurodégénératives

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°577 : Structure et dynamique des systèmes vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, Molecular Imaging Research Center,
92265, Fontenay-aux-Roses, France
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse présentée et soutenue
à Fontenay-aux-Roses, le 11 décembre 2020, par

Alix BOUVIER-MÜLLER

Composition du Jury

Elias FATTAL Professeur à l'université Paris-Saclay	Président
Marcel HOLLENSTEIN Chargé de recherche à l'Institut Pasteur, HDR	Rapporteur & Examineur
Corinne RAVELET Maître de Conférence à l'Université Grenoble Alpes, HDR	Rapporteur & Examinatrice
Luc BOUSSET Chargé de recherche au CNRS	Examineur
Anne VARENNE Professeur à Chimie ParisTech	Examinatrice
Frédéric DUCONGÉ Directeur de Recherche au CEA	Directeur de thèse
Gérald PERRET Cadre dirigeant du Généthron	Membre invité

Cette thèse a été réalisée au Molecular Imaging Research Center (MIRGen) au sein de l'unité CEA/CNRS « laboratoire des maladies neurodégénératives » sous la direction de Frédéric Ducongé.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Le Docteur Corinne Ravelet et le Docteur Marcel Hollenstein d'avoir acceptés d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je remercie le Professeur Anne Varenne, le Docteur Luc Bousset, et le Docteur Gérald Perret d'avoir acceptés d'examiner ce travail. Je souhaiterais également remercier le Professeur Elias Fattal d'avoir accepté de présider ce jury.

Je souhaiterais remercier également le CEA et le concours Irtélis de m'avoir donné la possibilité d'effectuer ce doctorat, ainsi que la fondation France Parkinson d'avoir financé ma quatrième année de thèse.

Je tiens sincèrement à remercier Frédéric Ducongé mon directeur de thèse de m'avoir accueilli dans son équipe, et de m'avoir guidée tout au long de ces 4 ans et deux mois de thèse...pleines d'embuches et de rebondissements. Merci de m'avoir donnée la possibilité de réaliser mon doctorat en conception de biomolécules/évolution dirigée, c'était mon rêve.

Je souhaiterais remercier Ronald Melki et Luc Bousset ainsi que l'ensemble de l'équipe « Protein misfolding and aggregation in neurodegenerative diseases » de m'avoir donné la possibilité de travailler sur une thématique aussi intéressante que ces conformations de fibres d' α -syn.

Je souhaiterais également remercier toute l'équipe « aptamère » : Anna la première à m'avoir formé à la manipulation des acides nucléiques (Tous unis contre les RNAses !); Nam pour son accueil et son « coaching » sur la vie d'un doctorant au CEA ; Cynthia pour son aide et tout son soutien au cours de sa période au CEA ! J'ai également appris énormément à ton contact, que ce soit à la paillasse ou pour la gestion du cahier de manip ;) ; Romain pour ces 6 mois passés en tant que stagiaire à mes côtés ; Adrien pour avoir rendu le logiciel performant au-delà de toute expression.

Un grand merci à Noëlle de nous avoir initié Frédéric et moi aux manipulations au niveau P3, ta gentillesse et ton enthousiasme étaient précieux ! Un grand merci également à Kristell pour son aide et son accompagnement dans la gestion des risques. Grâce à toi j'ai pu manipuler des molécules radioactives avec des protéines neurotoxiques dans des conditions de sécurité optimales ! (C'est un vrai prodige que l'armoire de décroissance P^{32} n'ait finalement été saturée à aucun moment...même le covid s'en est mêlé !)

Je souhaiterais également remercier l'ensemble du laboratoire MIRGen pour sa bonne ambiance qui permet de travailler dans les meilleures conditions. Dédicace spéciale à ma promotion doctorant : Anastasie, Camille, Pauline et Francesco (oui oui c'est bien moi le « Tanguy » du groupe)

Un immense merci à mon bataillon de correcteurs orthographiques : Christine, Florian, Hubert, Maman et Mathilde. Grâce à vous je suis passée à côté de la catastrophe (oui, je ne maîtrise toujours pas l'usage du participe passé...il est où le COD d'abord ??)

Je souhaiterais remercier Aymar, Jean et Louis Antoine, mes aînés dans le doctorat. Vos récits de vécus, conseils et soutiens ont été comme des phares dans la nuit dans les moments les plus difficiles.

Un grand merci à Caroline et Hubert qui ont partagés ma vie de doctorant au plus près...un immense merci pour votre soutien et vos remontages de moral dans cette voie tortueuse du doctorat.

Un immense merci enfin à mes parents pour leur soutien au cours de ces quatre années de thèse. Vous pouvez être rassurés (fiers ?!) car maintenant je suis Docteur (enfin presque). Me voici partie désormais pour de nouveaux chemins verdoyants et pleins de promesses ;)

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION.....	9
I. Présentation générale des Maladies Neurodégénératives et des Synucléinopathies	12
A. Points communs des maladies neurodégénératives	12
1) Présentation générale des maladies neurodégénératives.....	12
2) Des protéinopathies aux origines encore mal cernées.....	13
3) Des maladies avec un besoin critique de nouvelles solutions de diagnostic	17
B. Les Synucléinopathies, des maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation anormale d'agrégats de protéine α -synucléine	19
1) Maladie de Parkinson	20
2) Démences à corps de Lewy.....	22
3) Atrophie multi-systématisée.....	24
II. L'α-synucléine, la protéine centrale chez des synucléinopathies	25
A. Structure et fonction d' α -synucléine à l'état physiologique dans les neurones	25
1) Une protéine à la structure versatile.....	25
2) Une protéine aux multiples fonctions encore mal cernées	27
B. Les mécanismes à l'origine de l'agrégation la propagation de l' α -synucléine	29
1) Un mécanisme d'agrégation et propagation de type prion.....	29
2) Propagation de l' α -syn dans les synucléinopathies.....	30
3) Les mécanismes de passage de cellules à cellules lors de la propagation des formes agrégées d' α -syn dans le cerveau	31
4) Quels mécanismes pourraient expliquer l'apparition de mauvais repliement d' α -syn ?	34
C. Le mécanisme de la neurotoxicité encore mal cerné	34
1) Des dysfonctions au niveau des organites.....	35
2) Des dysfonctions à l'échelle cellulaire et tissulaire	36
3) Des dysfonctions dans les voies autophagiques et lysosomales.....	36
III. Mise en évidence de différentes conformations de fibres d'α-synucléine	37
A. Développement <i>in vitro</i> et caractérisation biochimique des différentes conformations de fibres d' α -synucléine	37
B. Conformations de fibre déclenchant différents symptômes <i>in vivo</i>	39
C. Des synucléinopathies distinctes ayant pour origine des conformations d' α -synucléine différentes : Une nouvelle hypothèse	40
D. Structures atomiques des conformations de fibres d' α -syn	41
IV. Les différents ligands existants pour la détection d'α-synucléine	43
A. Ligand chimique aux multiples utilisations : La Thioflavine T.....	43
1) Présentation de la Thioflavine T.....	43
2) Techniques et méthodes utilisant la ThT pour la détection des formes agrégées.....	45
B. Ligands biologiques : Anticorps.....	47
1) Anticorps non-spécifique de forme.....	47
2) Anticorps spécifique de forme.....	49
V. Présentation des aptamères, des ligands synthétiques novateurs.....	51
A. Le SELEX, un processus d'évolution dirigée pour la sélection d'aptamères.....	51
1) Avant-propos sur la structure des acides nucléiques et des aptamères.....	52
2) Principe général du SELEX, un processus d'évolution dirigée pour la sélection d'aptamères	54

B. La multiplicité des stratégies réalisables permet de moduler au mieux les propriétés des futures aptamères.....	56
1) Choix de la banque de départ.....	56
2) Choix du tampon de sélection.....	59
3) Choix de la technique de séparation.....	59
4) Outils utilisés par l'opérateur pour guider la sélection : contre-sélections et gestion de la pression de sélection.....	60
5) Suivre l'évolution de la banque au cours du SELEX.....	61
C. Le développement du Séquençage Haut débit à l'usage du SELEX permet de multiplier les possibilités	62
1) Amélioration de l'identification et de la caractérisation des aptamères grâce à l'utilisation du séquençage à haut débit.....	62
2) Le séquençage haut débit permet d'utiliser avec plus de facilité certaines variantes du SELEX.....	64
3) Présentation d'un logiciel développé au sein de l'équipe pour l'analyse des données de séquençage haut débit issues d'un SELEX : Patternity-seq.....	64
D. Une grande variété de méthodes pour mesurer l'affinité des candidats aptamères issu du SELEX.....	68
1) Avant-propos sur la mesure d'affinité d'un aptamère pour son ligand.....	68
2) Méthodes de mesure via des techniques de séparation.....	70
3) Méthodes de mesure de l'affinité à l'aide de fluorophore.....	71
4) Méthodes de mesure sans marquage.....	71
E. Un large éventail d'applications.....	72
1) Les aptamères pour la détection et le diagnostic.....	72
2) Les aptamères pour l'imagerie.....	75
3) Les aptamères pour la purification.....	75
4) Les aptamères pour la thérapie.....	75
5) Les aptamères comme théranostique.....	78
F. Forces et faiblesses des aptamères, ces anticorps « synthétiques ».....	78
VI. Aptamères précédemment obtenus contre la protéine α-synucléine.....	79
A. M5-15, le premier aptamère dirigé contre α -synucléine.....	79
B. T-SO508, un aptamère spécifique de la forme oligomère d' α -synucléine.....	80
C. F5R1 et F5R2, deux aptamères visant à bloquer l'oligomérisation d' α -synucléine.....	82
D. Essai de sélection pour isoler un aptamère reconnaissant la forme oligomérique d'Amyloïde- β	84
VII. Objectifs de la thèse.....	85
RESULTATS.....	89
I. Premier essai de sélection d'aptamères contre les fibres d'α-synucléine.....	91
A. Conception et mise en œuvre des sélections.....	91
1) Choix des stratégies de sélection mise en œuvre.....	91
2) Mise en œuvre des sélections en parallèle.....	96
B. Analyse de l'évolution des SELEX par séquençage haut débit à l'aide de l'outil PATTERNITY-seq®.....	98
1) Choix de la taille de la fenêtre aléatoire des séquences à inclure dans l'analyse.....	98
2) Analyse de l'évolution globale des SELEX.....	99
3) Analyse de l'évolution des familles au sein des SELEX.....	100
4) Recherche des motifs communs aux séquences s'étant enrichies au sein des banques durant les SELEX.....	102
5) Choix des candidats à tester.....	103
C. Première évaluation de l'affinité des candidats aptamères pour les différentes conformations de fibres d' α -synucléine.....	104
1) Conception de ce premier test d'affinité des séquences candidates.....	104
2) Analyse des résultats du premier test d'affinité.....	105
D. Essais de sélections branchées multiples.....	107

1) Nouvelle stratégie pour isoler des aptamères plus spécifiques au sein des banques partiellement évoluées : la sélection branchée multiple	107
2) Réalisations des sélections branchées multiples et séquençage Haut débit des banques en résultantes	108
3) Analyse des données de séquençage haut débit obtenues	109
4) Choix des candidats aptamères intéressants	110
E. Découverte et résolution d'un problème de reproductibilité majeur	113
1) Mise en évidence d'un problème de reproductibilité	113
2) Découverte de problèmes d'adsorption et test de tubes à faible adsorption	114
II. Deuxième essai de sélection d'aptamères contre les fibres d'α-synucléine	116
A. Conception et mise en œuvre des sélections.....	116
1) Choix des stratégies de sélection mises en œuvre.....	116
2) Mise en œuvre des SELEX « F » et « F spécifique »	122
B. Analyse de l'évolution des SELEX par séquençage haut débit.....	125
1) Analyse de l'évolution globale des SELEX	125
2) Analyse de l'évolution des familles	127
3) Recherche des motifs communs aux séquences s'étant enrichies au sein des banques durant les SELEX	129
4) Choix des candidats à tester en binding	131
C. Criblage des candidats aptamères radiomarqués	133
1) Mise au point d'une nouvelle méthode de marquage des oligonucléotides ARN2'F : Hybridation avec un oligonucléotide ADN marqué.....	133
2) Premier criblage de l'affinité des candidats sur colonne d'exclusion stérique	136
3) Mise au point d'une méthode de mesure d'affinité sur nitrocellulose	137
4) Criblage des candidats des nouveaux SELEX « F », « F spécifique », des anciens SELEX « R » et « 4F » et de la sélection branchée multiple	144
III. Caractérisation de l'affinité pour les aptamères les plus prometteurs et comparaison avec les aptamères précédemment développés.....	148
A. Mesure de l'affinité pour différentes fibres de protéines retrouvées dans les maladies neurodégénératives, par filtration sur nitrocellulose.....	148
1) Premières mesures de l'affinité de certains candidats aptamères contre les fibres F et R d' α -synucléine.....	148
2) Mesures d'affinités des aptamères les plus prometteurs et des aptamères déjà publiés contre différents types de protéines.....	153
3) Mesure de l'affinité pour la fibre F et les monomères d' α -synucléine par Thermophorèse à micro-échelle	170
B. Test de compétition entre les différents aptamères, et des anticorps anti - α -synucléine pour les fibres F et R d' α -synucléine par filtration sur nitrocellulose	175
1) Résultats des tests de compétitions pour la fibre F	176
2) Résultats de compétition pour la fibre R	179
C. Essais de détection de fibres d' α -synucléine à l'aide d'aptamères	182
DISCUSSION	185
CONCLUSION & PERSPECTIVES	201
MATERIEL & METHODES	207
I. Techniques utilisées pour la sélection in vitro	209
A. Sélection de banque lors des SELEX	209
1) Obtention des banques de départ	209
2) Protéines mises à disposition.....	209
3) Sélection sur nitrocellulose (SELEX « R » et « 4F », et sélection branchée multiple)	210

4) Sélection sur colonne d'exclusion stérique (SELEX « F » et « F spécifique »).....	212
5) Extraction des ARN2'F-Py sélectionnés	213
6) Quantifications des fractions d'ARN2'F-Py	213
B. Amplification des banques après sélection.....	214
1) Traitement à la DNase - Pour les SELEX « 4F » et « R »	214
2) Transcription inverse des ARN2'F-Py en ADN	214
3) Amplification par PCR.....	215
4) Transcription par l'ARN polymérase T7	217
C. Purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).....	217
1) Préparation du gel acrylamide 6% en TBE	217
2) Purification des produits de transcription	218
D. Séquençage haut débit des banques des tours des SELEX	219
1) PCR avec amorce contenant des index spécifiques pour chaque banque.....	219
2) Quantification sur Gel d'Agarose et mélange des banques.....	220
3) Purification sur Gel d'Agarose et quantification de l'échantillon final	221
E. Analyses des résultats de séquençage Haut débit.....	221
II. Techniques utilisées pour la mesure d'affinité des candidats aptamères contre les cibles	
protéiques.....	221
A. Production des candidats aptamères ARN2'F-Py	221
B. Mesure de l'affinité par filtration sur nitrocellulose ou par colonne d'exclusion stérique.....	222
1) Marquage des candidats au P ³²	222
2) Préparation des mélanges d'incubation : candidats aptamères radiomarqués et protéine.....	222
3) Etape de séparation :.....	224
4) Mesure des quantités liées et non liées des oligonucléotides.....	225
5) Révélation par Western Blot des protéines α -syn sur une membrane nitrocellulose.....	225
C. Mesure d'affinité par Thermophorèse à micro-échelle.....	226
REFERENCES.....	227
Annexe A	253
Annexe B.....	267

ABREVIATIONS

α -syn : α -synucléine

A β : Amyloïde- β :

AMS : Atrophie multi-systématisée

BHE : Barrière hémato-encéphalique

DCL : Démence à corps de Lewy :

Hrp : Horseradish peroxidase

MA : Maladie d'Alzheimer

MNs : Maladies neurodégénératives

MP : Maladie de Parkinson

PAGE : Electrophorèse par gel de polyacrylamide

PMCA : Amplification cyclique à repliement protéique

RT : Rétro-transcription

RT-QuIC : Conversion induite par tremblement en temps réel

SLA : Sclérose latérale amyotrophique

SNpc : Subtentia nigra pars compacta

ThT : Thioflavine-T

INTRODUCTION

Avant-Propos

Les maladies neurodégénératives (MNs) sont un groupe de maladies caractérisées par une lente dégénération neuronale. Ces pathologies, très invalidantes, entraînent une perte d'autonomie progressive des malades. Les MNs sont pour la plupart liées à l'âge. De par l'augmentation de la durée de vie, le nombre de patients augmente actuellement de manière forte, et les conséquences sociaux-économiques des MNs sont donc appelées à être de plus en plus importantes. Les MNs restent malheureusement à ce jour toujours principalement dépourvues de solutions thérapeutiques. Cette situation peut en partie être expliquée par le fait que la communauté scientifique peine à identifier avec certitude les causes à l'origine de ces pathologies. Un second frein majeur est que les MNs aux stades précoces présentent souvent des symptômes similaires, et un diagnostic précis ne peut généralement être posé qu'aux stades les plus avancés de la maladie.

Cette thèse avait pour but d'aider la communauté scientifique à mieux comprendre et diagnostiquer les MNs. Mon travail visait à développer des sondes moléculaires, appelées aptamères, spécifiques de plusieurs conformations de fibres d' α -synucléine (α -syn). Les fibres d' α -synucléine sont retrouvées accumulées au sein d'agrégats dans le cerveau des patients pour plusieurs maladies neurodégénératives, qui sont regroupées sous le nom de «Synucléinopathies». Parmi elles on retrouve notamment la maladie de Parkinson (MP), l'atrophie multi-systématisée (AMS) ou la démence à corps de Lewy (DCL). Ces aptamères spécifiques des conformations permettraient à la communauté scientifique d'étudier l'hypothèse selon laquelle l'existence des différentes synucléinopathies (MP, AMS, DCL) pourraient être dues à des conformations différentes de fibres.

Dans l'introduction, nous justifierons le bien-fondé de l'approche choisie dans ce travail : l'intérêt des cibles choisies, et la pertinence du choix des aptamères comme sondes moléculaires pour celles-ci. Dans un premier temps, nous présenterons les caractéristiques générales des MNs. Nous décrirons ensuite la protéine α -syn et les facteurs déclenchant son agrégation sous forme de fibres. Nous exposerons ensuite les travaux ayant mis en évidence l'existence de différentes conformations de fibres d' α -syn, et les études ayant évaluées leurs liens avec le développement de différentes synucléinopathies. Nous décrirons enfin les différents ligands déjà existants pour la détection de la protéine α -syn. Dans un second temps, nous présenterons la technique du SELEX, et les différentes étapes menant à l'identification des aptamères. Cette étape permettra de justifier la pertinence du choix des aptamères pour la recherche de ligands spécifiques des conformations d' α -syn. Nous décrirons ensuite les aptamères ayant déjà été développés pour les différentes formes de la protéine α -syn.

I. Présentation générale des Maladies Neurodégénératives et des Synucléinopathies

A. Points communs des maladies neurodégénératives

1) Présentation générale des maladies neurodégénératives

« Neurodégénération » est un terme fréquemment employé, dont le sens est facilement intelligible. Il est composé des termes « neuro », qui désigne les neurones, et de « dégénérescence » qui fait référence dans le cas d'un tissu ou organe à une perte de structure ou de fonction. Ainsi, « neurodégénération » désigne toute condition pathologique affectant les neurones. Néanmoins, le terme « maladies neurodégénératives » (MNs) ne désigne pas l'ensemble des pathologies pour lesquelles on observe une neurodégénérescence, mais seulement celles dont la cause première est la mort des neurones. Ainsi, les hémorragies et traumatismes du système nerveux qui entraînent la mort des neurones ne sont pas considérés comme des maladies neurodégénératives. De même, la sclérose en plaque qui est une maladie d'origine auto-immune, n'est pas considérée comme une MN, bien que la neurodégénérescence soit un phénomène central dans cette pathologie (Przedborski et al., 2003; Williams, 2002).

Les MNs désignent un groupe de pathologies aux symptômes cliniques très divers qui ont pour point commun d'être des maladies chroniques à évolution lente caractérisées par un dysfonctionnement et une mort progressive des cellules nerveuses (Figure 2) (Gao and Hong, 2008). Les troubles induits par cette neurodégénérescence peuvent être d'ordre moteur, cognitif ou même sensoriel. Ils s'aggravent au fur et à mesure de l'évolution de la maladie et handicapent de manière croissante les patients (Trojsi et al., 2018; McIsaac et al., 2018; Levenson et al., 2014; Batista and Pereira, 2016). Les MNs les plus connues sont : la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), la maladie de Huntington et la Sclérose latérale amyotrophique (SLA).

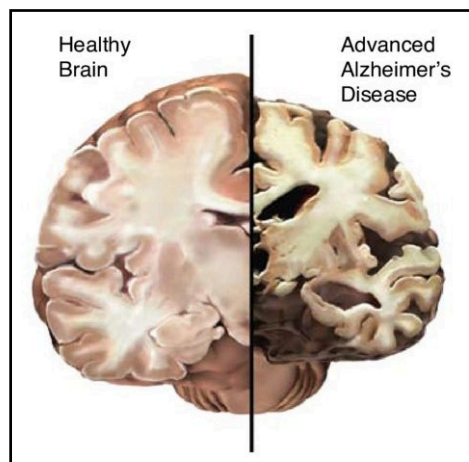


Figure 1 - Illustration du phénomène de Neurodégénérescence. Les MNs se caractérisent par une perte neuronale importante. Ici on peut par exemple observer qu'un cerveau d'un patient à un stade avancé de la MA est sujet à une importante perte de volume. Venant de (Kidd, 2008).

La fréquence des MNs augmente de manière importante avec l'âge. Or, en raison du vieillissement progressif de la population, le nombre de personnes souffrant de MNs a considérablement augmenté au cours des dernières décennies et devrait croître de manière régulière dans les années à venir (Heemels, 2016). Par exemple, l'Organisation mondiale de la Santé estime aujourd'hui à 50 millions le nombre de personnes souffrant de démence dans le monde, et prévoit 250 millions de patients à l'horizon 2050 (World Alzheimer Report, 2019; Naqvi, 2017). Les MNs sont des pathologies extrêmement invalidantes qui entraînent progressivement une perte d'autonomie des patients. Ces maladies impactent donc non seulement la vie des patients mais aussi celle de leur entourage. Les conséquences socio-économiques des MNs sont particulièrement importantes. Ainsi, la fondation Médéric Alzheimer estime que le coût médical et paramédical (établissement du diagnostic, soins, etc.) de la MA en France est de 5.3 milliards d'euros par an. De plus, les coûts de l'aide informelle prodiguée par l'entourage du malade et le coût médico-social (prise en charge de la dépendance à domicile ou en institution) ont été estimés à respectivement 14 et 13 milliards d'euros par an. Le coût global de la MA est donc d'environ 32 milliards d'euros par an en France (www.fondation-mederic-alzheimer.org, 2017). Par conséquent, les organisations gouvernementales considèrent les MNs comme un défi majeur, contre lequel elles doivent organiser un plan d'action. Ainsi, la France qui compte plus d'un million de personnes souffrant de MNs, a mis en place un plan Alzheimer pour la période 2008-2012 suivi d'un plan Maladies neurodégénératives en 2014-2019 (World Alzheimer Report, 2019).

2) Des protéinopathies aux origines encore mal cernées

Les causes des MNs restent à ce jour largement méconnues (Przedborski et al., 2003). En outre, lorsque l'origine de la maladie a été identifiée, les mécanismes moléculaires menant à la mort des neurones restent mal compris. Par exemple, bien que cela fasse un quart de siècle que les causes génétiques de la maladie de Huntington aient été identifiées, on n'a toujours pas déterminé avec certitude le mécanisme par lequel un surnombre de répétition du triplet CAG dans la séquence codant pour la protéine Huntingtine peut aboutir à la mort des neurones chez les patients (Grima et al., 2017). La compréhension des causes et des mécanismes menant à la neurodégénérescence chez les patients atteints de MN demeure donc un défi d'importance pour la communauté scientifique.

Des observations histologiques ont très tôt mis en évidence que les maladies neurodégénératives ont pour point commun important une singularité : la présence anormale de dépôts intra ou extra-neuronaux dans le cerveau des patients. Il a été démontré que ces dépôts contenaient souvent des protéines mal repliées et agglomérées entre elles formant ce qu'on appelle des « agrégats » de protéine (Dugger and Dickson, 2017). Cette accumulation d'agrégats protéiques est un phénomène commun caractéristique de l'ensemble des MNs. On appelle « protéine amyloïde », l'ensemble des protéines formant des agrégats de ce type (Knowles et al., 2014). Les protéines les plus fréquemment retrouvées dans les MNs sont les protéines : Amyloïde- β (A β), Tau, α -synucléine (α -syn), la protéine de liaison à l'ADN TAR 43 (TDP-43) et la protéine de liaison à l'ARN fusionnée dans le sarcome (FUS). Ainsi, dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, on observe des dépôts nommés

plaques Amyloïdes composés en partie d'agrégats de la protéine Amyloïde- β . De même, chez les patients atteints de la maladie de Parkinson on observe des dépôts nommés corps de Lewy composés en partie d'agrégats de la protéine α -syn. Lorsque ce dépôt n'est pas observé dans un corps de neurone mais dans une neurite (axone ou dendrite) du neurone, on parle de neurite de Lewy (Figure 2 – A). On désigne sous le terme « protéinopathies », les MNs ayant pour caractéristique l'accumulation d'agrégats de protéines, et l'on distingue différents types de protéinopathies, en fonction des protéines retrouvées agrégées dans les dépôts. Ainsi, on appelle synucléinopathies l'ensemble des maladies caractérisées par l'accumulation anormale d'agrégats de protéine α -syn. De même, on appelle Tauopathies l'ensemble des maladies caractérisées par l'accumulation anormale de protéine Tau agrégée. Une particularité importante des MNs est qu'une même protéine peut s'agréger et former des dépôts dans plusieurs pathologies différentes (Figure 2 – B) . Par exemple, la protéine α -syn agrégée est retrouvée dans des dépôts à la fois chez les patients Parkinsoniens mais aussi chez ceux souffrant d'atrophie multisystématisée (AMS). La seule exception concerne la protéine Huntingtine : la seule maladie où elle est retrouvée agrégée est la maladie de Huntington. Plusieurs protéines différentes peuvent également s'agréger et former des dépôts au sein d'une maladie. Ainsi, chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les protéines $A\beta$ et Tau s'agrègent toutes les deux et s'accumulent ensuite au sein de dépôts nommés plaque Amyloïde et enchevêtrement neurofibrillaires (Figure 2 – B) (Briston and Hicks, 2018).

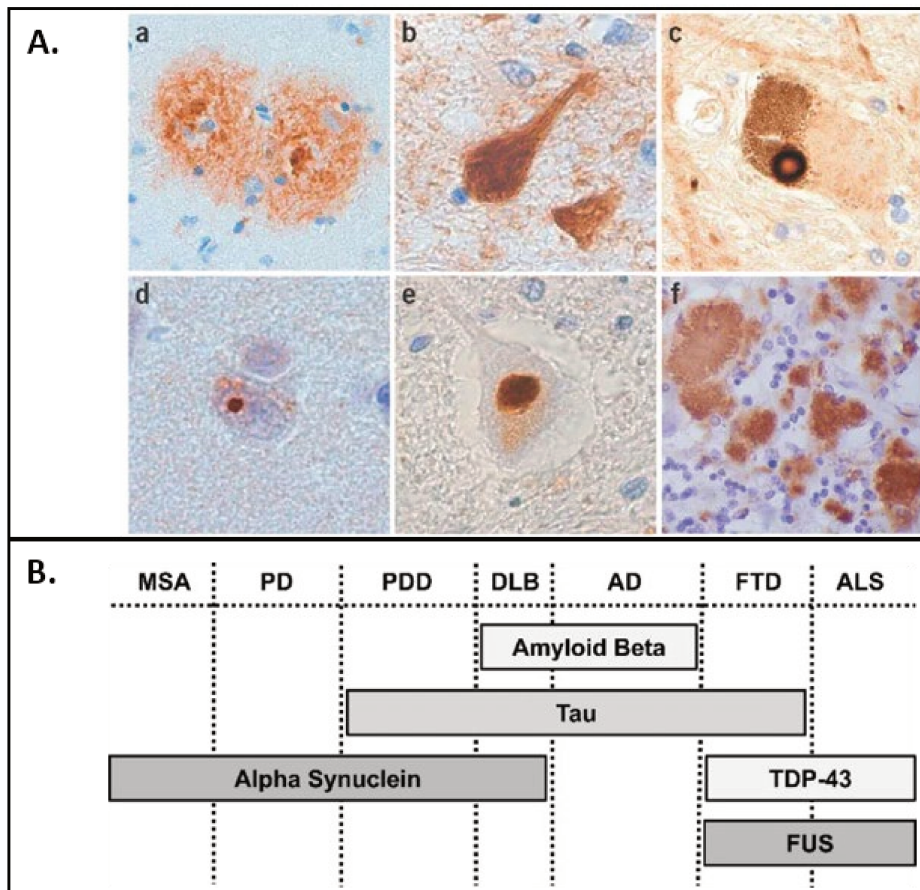


Figure 2 - Les MNs se caractérisent par des dépôts qui contiennent des agrégats de protéines. A - Exemple de dépôt de protéines agrégées que l'on retrouve dans le cerveau de personnes atteintes de MN : (a) Plaques séniles dans le néocortex de la MA (b) enchevêtrement neurofibrillaire dans l'hippocampe de démence frontotemporale (c) Corps de Lewy dans la substance noire de la MP (d) Inclusion intranucléaire de polyglutamine dans le néocortex de la maladie de Huntington (e) Inclusion ubiquitinylée dans le neurone moteur de la moelle épinière de la SLA (f) Protéine Prion résistante aux protéases dans le cervelet de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. Venant de (Forman et al., 2004). B – Protéines s'agrégant dans les différentes MNs. MSA = Atrophie Multi-systématisée ; PD = Maladie de Parkinson ; PDD = Maladie de Parkinson avec démence associée ; DLB = Démence à corps de Lewy ; AD = Maladie d'Alzheimer ; FTD = démence fronto-temporale ; ALS = Sclérose latérale Amyotrophique. (Briston and Hicks, 2018).

L'hypothèse selon laquelle l'accumulation de ces agrégats de protéines pouvait être la cause de la mort des neurones a été très largement étudiée depuis une quarantaine d'année. Dans les années 1980-1990, la communauté scientifique s'est intéressée à certaines formes rares de MNs se transmettant familialement et débutant de manière précoce. Des études ont montré que ces formes familiales étaient dues à des mutations héréditaires dans la séquence de protéines pouvant former des agrégats. Par exemple, en 1991, il a été découvert qu'une mutation dans la séquence du gène APP, qui code pour un précurseur de la protéine Amyloïde- β , pouvaient augmenter la probabilité d'agrégation d'A β et était liée à une forme familiale d'Alzheimer (Goate et al., 1991). On pouvait donc logiquement émettre l'hypothèse que ce phénomène d'accumulation d'agrégats protéiques était à l'origine de la neurodégénérescence. En 1992, Hardy et Higgins ont proposé une théorie appelée « cascade A β » en proposant que

l'accumulation d'agrégat de la forme d'A β à 42 acides aminés (A β ₄₂) dans le cerveau soit l'évènement déclencheur d'une cascade d'évènements entraînant la neurodégénérescence et la MA (Hardy and Higgins, 1992). Par la suite, une hypothèse plus générale s'est répandue au sein de la communauté scientifique : pour toutes les MNs, la neurodégénération pourrait avoir pour origine un phénomène d'accumulation d'agrégat de protéines mal repliées.

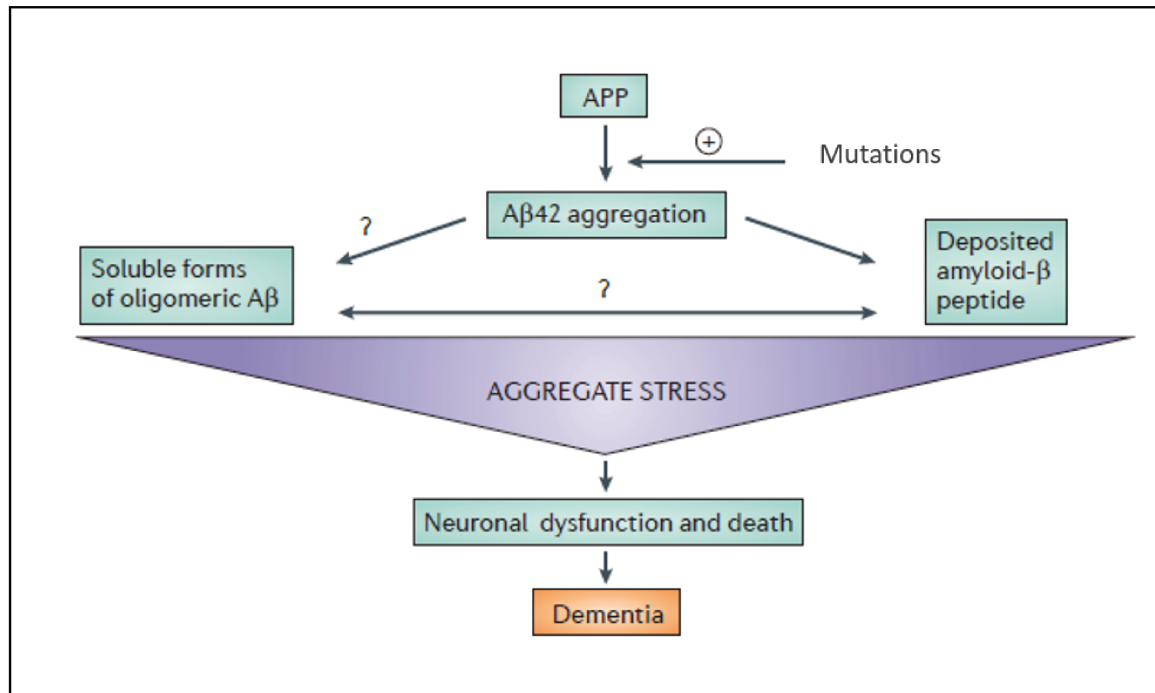


Figure 3 - Schéma de l'hypothèse de la cascade Amyloïde. L'hypothèse de la cascade amyloïde propose que l'agrégation de la protéine A β ₄₂ soit le phénomène déclenchant une cascade d'évènements qui mène finalement à la MA. Des mutations peuvent augmenter la probabilité d'agrégation d'A β , conduisant aux formes « familiales » de la MA. Il n'a toujours pas été clairement identifié quel était l'agent exact déclenchant la cascade. De nombreuses formes intermédiaires existent entre les dépôts d'A β agrégés et les « oligomères » (des formes composées de quelques protéines A β agrégées). Chacun de ces intermédiaires peut potentiellement être le générateur d'un stress conduisant à des dysfonctions et à la mort des neurones. L'étude de ces intermédiaires est très compliquée et leur structure exacte demeure méconnue. De plus, les mécanismes précis (désigné sur le schéma sous le nom de « Stress liés aux agrégats ») par lesquels ils entraînent des dysfonctions et la mort neuronale sont incertains et font l'objet de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. Adapté à partir de (Karran et al., 2011).

L'agrégation de protéines a également été largement étudiée chez les patients souffrant d'une forme sporadique de la maladie. Ces formes sporadiques représentent environ 90% de cas de MNs. Il a été montré que les erreurs de repliement des protéines peuvent se produire spontanément dans les neurones. Il a été également mis en évidence, que ces formes mal repliées pouvaient naturellement former des agrégats, et que la vieillesse augmentait la probabilité que cet évènement survienne. (Agbas, 2018). De nombreuses études ont été par la suite menées pour identifier les facteurs génétiques et environnementaux pouvant accroître

les chances de voir se produire le phénomène d'agrégation de protéine, déclenchant ensuite la neurodégénérescence (Bertram and Tanzi, 2005; Brown et al., 2005; Bradley et al., 2018).

La recherche de la compréhension du mécanisme de neurodégénérescence des MNs, en vue de l'élaboration de stratégies thérapeutiques, s'est donc majoritairement concentrée sur trois axes de recherche. Le premier concernait la recherche de causes génétiques ou environnementales favorisant le mauvais repliement et l'agrégation des protéines dans les MNs. Le deuxième était la recherche de l'élément neurotoxique précis entraînant la mort des neurones : était-ce plutôt les protéines mal repliées, les agrégats ou le dépôt final composé d'agrégats? (Ross and Poirier, 2004). Le troisième concerne l'étude des mécanismes par lesquels ces agents neurotoxiques peuvent entraîner la mort des neurones (Jellinger, 2010).

Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle la neurodégénération a pour origine un phénomène d'accumulation d'agrégat de protéines mal repliées est aujourd'hui l'objet de débat au sein de la communauté scientifique (Ricciarelli and Fedele, 2017). En effet, des essais thérapeutiques ont montré une efficacité à réduire la présence d'agrégat de protéines mais n'ont montré aucune amélioration sur l'évolution de la maladie chez les patients (Hardy, 2006, 2018). De plus, les dysfonctions neuronales observées chez les MNs sont nombreuses et variées : dysfonctionnement mitochondrial, stress oxydatif, neuroinflammation, problème dans les voies de dégradation, etc... (Jellinger, 2010). Or, le mécanisme par lequel l'accumulation d'agrégats de protéines entraînerait à elle seule cet ensemble de problèmes n'a toujours pas été identifié. De nouvelles hypothèses sont ainsi étudiées et on considère aujourd'hui que le développement des MNs ne serait pas uniquement dû à l'apparition d'une protéine mal repliée, mais pourrait être une combinaison de facteurs conduisant à un dysfonctionnement cellulaire général lié à la vieillesse. L'accumulation observée des protéines pourrait par exemple être un signe d'une diminution de l'efficacité des voies de dégradation autophagique et endo-lysosomale dans les neurones (Malik et al., 2019)(Hardy, 2019). Ces nouvelles théories complexifient la recherche de solutions thérapeutiques pour les MNs car empêcher le vieillissement cellulaire général est plus complexe que de simplement stopper l'accumulation d'un composé neurotoxique unique.

3) Des maladies avec un besoin critique de nouvelles solutions de diagnostic

a) Un diagnostic actuellement difficile à poser

Aujourd'hui, l'élaboration de solutions thérapeutiques pour les MNs demeure un challenge car on ne connaît toujours pas la cible moléculaire ou le mécanisme précis à cibler pour la plupart des maladies. De plus, deux autres problèmes fondamentaux se posent.

Le premier problème est la difficulté rencontrée par les médecins pour réaliser un diagnostic précis de la pathologie. Actuellement, le diagnostic des MNs repose sur l'observation des troubles cognitifs, moteurs et sensoriels éprouvés par les patients. Ce diagnostic est délicat à faire car des MNs différentes peuvent conduire à des symptômes similaires, surtout aux premiers stades de la maladie. Souvent, un diagnostic certain ne peut être posé que lorsque la maladie a atteint un stade avancé et que le patient souffre des formes

les plus sévères des symptômes (Gómez-Río et al., 2016). La solution la plus fiable pour identifier la maladie demeure l'analyse histologique des lésions présentes dans le cerveau. Elle permet d'identifier les régions cérébrales touchées par la neurodégénérescence et la caractérisation des dépôts protéiques présents dans les tissus. Néanmoins, ces analyses histologiques se font post-mortem, et ne permettent donc qu'une validation à posteriori du diagnostic. Il est donc capital de pouvoir mettre au point de nouvelles méthodes de diagnostic permettant de faire une distinction fiable entre les différentes MNs. En sus, un meilleur diagnostic permettrait de donner aux patients et à leurs proches un pronostic plus fiable de l'évolution de la maladie.

Le deuxième problème des MNs concerne les phases précliniques (début de la maladie en absence de symptôme détectable) et prodromales (symptômes avant-coureurs légers) qui peuvent être très longues. Ainsi, lorsque que les symptômes des MNs se déclarent chez les patients, cela fait en réalité plusieurs années que la neurodégénérescence est à l'œuvre (Katsuno et al., 2018). Par exemple, on estime que lorsque les symptômes moteurs de la maladie de Parkinson apparaissent, 50% des neurones dopaminergique de la *substantia nigra* sont déjà morts (Cheng et al., 2010). Pouvoir détecter le début des MNs avant l'apparition des symptômes est donc essentiel, car cela permettrait de commencer des traitements plus tôt, lorsque le phénomène de neurodégénérescence n'a pas encore pris trop d'ampleur. Pour certaines MNs des changements physiologiques et psychiques sont parfois observés lors de la phase préclinique (Katsuno et al., 2018). Par exemple, pour la MP, certains troubles sont souvent observés chez les patients quelques années avant le début des premiers symptômes comme la dépression, l'anxiété, la constipation ou des troubles de l'équilibre (Schrag et al., 2015). Malheureusement, ces signes ne sont pas assez significatifs pour prédire l'arrivée de la MP. Il est donc nécessaire de se tourner vers d'autres méthodes pour pouvoir diagnostiquer le début d'une MN en phase préclinique ou prodromale.

b) Recherches de nouveaux marqueurs pour établir des méthodes de diagnostic plus fiables et plus précoces

Pour diagnostiquer avec précision les MNs, deux types de marqueurs ont été plus particulièrement étudiés: les biomarqueurs génétiques et biochimiques.

Les biomarqueurs génétiques sont des séquences d'ADN dans le génome qui prédisposent à la maladie. Ces marqueurs permettent ainsi d'identifier une population « à risque » qui a une plus forte probabilité de développer des MNs. Il peut s'agir d'allèles qui sont retrouvés chez les patients atteints de formes familiales, et qui peuvent déclencher des formes précoces de la maladie. Par exemple, des mutations dans le gène *Parkin* sont retrouvées dans 50% des formes familiales de la maladie de Parkinson (Pankratz et al., 2003). Ces marqueurs génétiques peuvent également être identifiés en comparant des cohortes de patients atteints de formes sporadiques de la maladie avec des personnes non malades. Ainsi, l'allèle E4 du gène *ApoE* est retrouvé dans 40 à 50% des cas sporadiques de la maladie d'Alzheimer et il est considéré comme un facteur de risque important pour la maladie d'Alzheimer (Bekris et al., 2010).

Les marqueurs biochimiques sont des biomolécules dont la quantité est corrélée à l'évolution de la pathologie. Par exemple, la MP est marquée d'un point de vue histologique par l'accumulation d' α -syn au sein de corps de Lewy (Katsuno et al., 2018). Les marqueurs biochimiques sont donc considérés comme des marques du développement de la maladie alors que les biomarqueurs génétiques sont plutôt des facteurs de prédisposition à développer la maladie.

L'identification de marqueurs biochimiques peut permettre de détecter l'apparition d'une maladie de manière précoce, de réaliser des diagnostics plus précis, de suivre l'évolution de la maladie plus facilement, et aussi d'évaluer avec précision l'efficacité d'une thérapie. Actuellement, de nombreux efforts sont donc à l'œuvre pour identifier des biomolécules présentes dans les tissus ou fluides biologiques des patients : sang, sérum, fluide cérébrospinal etc. (Agrawal and Biswas, 2015; Beach, 2017). Par exemple, chez les patients atteints de MA, on observe une diminution de la quantité $A\beta_{42}$ dans le fluide cérébro-spinal (Lewczuk et al., 2017). Des études se sont aussi concentrées sur la phase pré-symptomatique des MNS, afin d'identifier des biomarqueurs permettant de détecter une MN avant l'apparition de symptômes. Par exemple, une étude menée sur une population « à risque » pour la SLA, a permis de mettre en évidence que la quantité d'un type de neurofilament appelé « light » augmentait dans le sérum et le liquide cérébro-spinal environ 12 mois avant l'apparition des premiers symptômes cliniques chez les patients. Les neurofilaments de type « light » seraient donc de bons candidats pour diagnostiquer l'apparition de la SLA chez une population à risque (Benatar et al., 2018).

Une fois qu'un marqueur biochimique est identifié, il est également important de développer une méthode de détection efficace de ce marqueur. Cette méthode doit avoir une sensibilité et une spécificité suffisantes pour permettre la détection de ces marqueurs biochimiques dans des échantillons de patients. Le coût de cette détection est également un facteur à prendre en compte pour permettre de réaliser des mesures dans des populations importantes. La mise au point de ces méthodes de détection est donc elle-même un champ de recherche important.

B. Les Synucléinopathies, des maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation anormale d'agrégats de protéine α -synucléine

Les Synucléinopathies sont des maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation anormale d'agrégats de protéine α -synucléine. Je vais ici présenter les trois principales synucléinopathies : la maladie de Parkinson (MP), la démence à corps de Lewy (DCL) et l'atrophie Multi-Systématisée (AMS). Ces MNS partagent de symptômes similaires et des caractéristiques anatomopathologies (morphologie des anomalies macroscopiques et microscopiques des tissus et des cellules) semblables. Les caractéristiques de ces trois synucléinopathies sont présentées Tableau 1.

1) Maladie de Parkinson

a) Présentation et épidémiologie de la maladie de Parkinson

La MP a été décrite pour la première fois en 1817, par James Parkinson dans un article nommé « An essay of shaking palsy » qui décrivait des patients avec des troubles moteurs sans atteinte intellectuelle (Parkinson, 1817). C'est seulement 50 ans plus tard que Jean-Martin Charcot donnera à cette pathologie le nom de maladie de Parkinson (Charcot, 1872).

La maladie de Parkinson est une maladie liée à l'âge : l'âge moyen des patients au moment du diagnostic est de 60 ans. Bien qu'extrêmement invalidante, cette maladie ne réduit pas l'espérance de vie. Actuellement, la maladie de Parkinson touche 200 000 personnes en France (www.franceparkinson.fr, 2020). En 2016, on estimait à 6.1 millions le nombre de patients dans le monde, et on prévoit 12 millions de personnes atteintes en 2050 (Rocca, 2018).

b) Symptômes et diagnostic de la maladie de Parkinson

Le premier critère pour poser le diagnostic de la MP est une observation des symptômes moteurs asymétriques. Quatre symptômes sont regardés. 1) Tremblement au repos : tremblement du pouce lorsque la main est posée sur le genou, on peut observer aussi des tremblements de la main, du bras, des pieds etc. 2) Rigidité : Lorsque l'on fait tourner le poignet ou le coude du patient, on observe une résistance. 3) Akinésie ou bradykinésie : Lenteur dans les mouvements du patient, hésitation lors de l'initiation de ceux-ci. 4) Instabilité posturale : survient au stade avancé de la maladie, besoin de se tenir à quelqu'un pour marcher ou se lever. Actuellement, pour pouvoir faire le diagnostic de la MP, le patient doit avoir au moins deux symptômes sur quatre, mais un deuxième critère est nécessaire : le patient doit aussi répondre à la L-DOPA (dopamine synthétique). C'est-à-dire que les symptômes moteurs éprouvés par le patient doivent être inhibés par l'administration de L-DOPA (D'Costa et al., 1995). En effet, la MP est caractérisée par une perte des neurones dopaminergiques qui produisent la dopamine dans la substantia nigra pars compacta (SNpc). L'administration de L-DOPA compense cette perte et permet de réduire les symptômes moteurs des patients. Néanmoins ce traitement ne fonctionne que quelques années pendant une période appelée « lune de miel » (Tableau 1) (Holford and Nutt, 2008).

On peut distinguer au sein de la MP différents « sous-types » composés de patients avec différentes combinaisons de troubles moteurs (Marras and Lang, 2013). Différentes classifications existent, néanmoins deux principaux sous-types sont communément admis. Le premier sous-groupe comprend des patients avec des tremblements dominants, souvent sans autres symptômes moteurs. Le deuxième sous-groupe est composé de patients présentant au contraire une forte rigidité sans tremblement (Eggers et al., 2012).

	Maladie de Parkinson		Démence à corps de Lewy		Atrophie multi-systématisée		
Age au diagnostic	≈ 60 ans		≈ 70 ans		≈ 60 ans		
Incidence (nombre de cas pour 100 000 personnes par an)	10 à 18		3,5		0,1 à 3 (12 chez les plus de 70 ans)		
Prévalence (nombre de cas pour 100 000 personnes)	1903 cas chez les plus de 65 ans		700 cas chez les plus de 65 ans		1,9 et 4,9 cas 7,8 cas pour les plus de 40 ans		
Nombre de cas en France	200 000		150 000		ND		
Principales zones du cerveau touchées	○ Neurones dopaminergiques de la SNpc		○ SN ○ Tronc cérébral		<i>-Multiples zones touchées -</i> MSA-C : Cervelet Pont MSA-P : SNpc, striatum ○ Moelle épinière, etc.		
Réponse à la L-DOPA	Oui		Variable		Non		
Principales Cellule affectées	Neurone		Neurone		Oligodendrocyte		
Symptômes prodromaux	○ Troubles du comportement en sommeil paradoxal ○ Dépression ○ Perte de l'odorat ○ Constipation ○ Fatigue		○ Troubles du comportement en sommeil paradoxal ○ Dépression ○ Perte de l'odorat		○ Trouble de comportement du sommeil paradoxal ○ Dépression ○ Anxiété ○ Troubles urogénitaux		
Symptômes moteurs	<i>-Asymétrique -</i> ○ Tremblement ○ Akinésie/Bradykinésie ○ Instabilité posturale		<i>-Symétrique-</i> ○ Rigidité ○ Ralentissement		<i>-Symétrique-</i> ○ Tremblement ○ Akinésie/Bradykinésie ○ Instabilité posturale ○ Ataxie cérébelleuse (maladresse)		
Symptômes non moteurs	<i>-Tardifs-</i> ○ Défaillance du système autonome ○ Troubles des systèmes exécutif et visuospatial		○ Troubles cognitifs : perte de mémoire, Troubles des systèmes exécutif et visuospatial, etc. ○ Symptômes psychiatriques : hallucinations, dépression, etc.		○ Défaillance du système autonome		
Sous-Types	Tremblement dominant	Rigidité dominante	« Pure » Troubles surtout exécutif et pas mémoriel	« DCL associée à la MA » Maladie à déclin rapide	« MP avec démence » Troubles prodromaux de la MP	MSA cérébelleuse (MSA-C) Ataxie principalement	MSA avec parkinsonisme (MSA-P) Symptômes moteurs parkinsoniens

Tableau 1 - Comparaison des caractéristiques des différentes Synucléinopathies : Démence à corps de Lewy (DLB) , Maladie de Parkinson (PD) et Atrophie Multi-systématisée (MSA) , ND : non déterminé. Données épidémiologiques à partir de (Bower et al., 1997; Schrag et al., 1999; Tison et al., 2000; Chrysostome et al., 2004; Mayo and Bordelon, 2014; Pringsheim et al., 2014). Données des symptômes prodromaux à partir de (Gilman et al., 2008; Bonnet et al., 2012; Postuma et al., 2012; Jellinger, 2018). Données concernant les sous types : (Camicioli, 2004; Gilman et al., 2008; McCann et al., 2014; Fujishiro et al., 2015; Jellinger, 2018)

Le diagnostic de la MP est néanmoins délicat à poser car il existe d'autres pathologies présentant un ou plusieurs des symptômes similaires à ceux de la MP (tremblement, rigidité, bradykinésie, instabilité posturale). Par conséquent, l'ensemble de ces pathologies est communément appelé « syndrome parkinsonien » ou « Parkinsonisme » (Fernandez, 2015). Les autres maladies présentant des syndromes Parkinsoniens les plus connues sont : l'atrophie multisystématisée (AMS), la paralysie supranucléaire progressive, la dégénérescence corticobasale et la démence à corps de Lewy (DCL). Certains syndromes Parkinsoniens sont aussi des synucléinopathies, comme par exemple l'AMS ou la DCL. D'autres sont au contraire des tauopathies comme la paralysie supranucléaire progressive ou la dégénérescence corticobasale. Quelques-uns des syndromes parkinsoniens ne sont pas des MNs, mais ont une origine infectieuse ou ont pour origine l'ingestion de composés toxiques (Dickson, 2012).

Le diagnostic de la MP peut être confirmé par autopsie après la mort du patient. En plus d'une perte de neurones dopaminergiques, la présence d'inclusions (de dépôts) éosinophiles cytoplasmiques nommés « corps de Lewy » est observée. Ces corps de Lewy ont été décrits en 1912 par F.H. Lewy qui leur donna son nom. Les corps de Lewy sont observés principalement dans SNpc (substantia nigra pars compacta), néanmoins des études ont aussi montrées qu'ils pouvaient être retrouvés dans d'autres régions du cerveau (mésencéphale, diencephale, le cerveau antérieur basal, amygdale, bulbe olfactif...) mais aussi dans la moelle épinière, et même dans les neurones de la région du plexus entérique du tractus gastro-intestinal (Lebouvier et al., 2008; Dickson et al., 2009).

On retrouve souvent parmi les patients des symptômes communs lors de la phase prodromique et même parfois préclinique de la MP. Ces symptômes sont très variés et peuvent être d'ordre physiologique ou psychique (Tableau 1). Néanmoins ces marqueurs sont compliqués à utiliser pour une détection en phase prodromique de la MP. Certes leur sensibilité est très forte (c'est-à-dire un fort pourcentage de personnes atteinte de la MP a éprouvé ces symptômes) mais leur spécificité est généralement faible (Beaucoup de personnes âgées sont touchées par ces symptômes, et le plus grand nombre ne développeront pas la MP). Le marqueur le plus prometteur est le symptôme des troubles du comportement en sommeil paradoxal : le patient présentant ce symptôme a un risque de 65% de développer la MP dans les dix années qui suivent (Postuma et al., 2012).

2) Démences à corps de Lewy

a) Présentation et épidémiologie de la démence à corps de Lewy

La démence à corps de Lewy (DCL) a été décrite pour la première fois en 1961 (Okazaki et al., 1961). Okasaki et son équipe décrivaient deux patients souffrant de démence associée à des troubles moteurs. Ils reportaient aussi des inclusions ressemblant à des corps de Lewy dans les neurones corticaux des patients. Néanmoins, la DCL ne sera pleinement décrite et réellement reconnue qu'en 1996 (McKeith et al., 1996). Des évolutions seront apportées par la suite dans la description des symptômes secondaires ainsi que dans les méthodes de diagnostic de la DCL (McKeith et al., 2005; McKeith, 2006).

On estime aujourd'hui que la DCL est la 2^{ème} MN la plus répandue après la MA, elle représente environ 20% des cas de MNs. En France, plus de 150 000 personnes seraient atteintes de la MCL, cependant deux tiers des malades ne seraient pas diagnostiqués. Cela est dû en partie au fait que la DCL est souvent confondue avec la MA ou la MP lors du diagnostic. C'est une maladie très invalidante qui réduit l'espérance de vie (www.a2mcl.org).

b) Symptômes et diagnostic de la démence à corps de Lewy

La DCL est principalement caractérisée par 3 groupes de symptômes. 1) Des troubles cognitifs : perte de mémoire, problèmes d'orientation, déficit des compétences visuo-spatiales et de l'attention. Ces symptômes ressemblent à la démence de la MA, expliquant la confusion parfois faite entre ces deux maladies. 2) Des troubles moteurs symétriques: ralentissement physique et rigidité. Ces troubles s'apparentent à des symptômes Parkinsoniens, expliquant la confusion parfois faite avec la MP. 3) Symptômes psychiatriques : hallucinations visuelles, dépression. Si le patient présente au moins deux des trois groupes de symptômes, on fait alors un diagnostic probable de DCL. Si le patient présente seulement un des trois groupes de symptômes, c'est alors un diagnostic de DCL possible qui est fait. (Papka et al., 1998; Mayo and Bordelon, 2014).

Ces symptômes sont souvent accompagnés de trois autres types de troubles qui sont considérés comme des caractéristiques secondaires pour le diagnostic. 1) Troubles du comportement en sommeil paradoxal. 2) Sensibilité accrue aux neuroleptiques. 3) Activité dopaminergique réduite dans les ganglions de la base (observé par imagerie SPECT ou TEP) (Mrak and Griffin, 2007). Les DCL sont aussi caractérisées par pas ou peu de réponse à la L-DOPA, ce qui permet d'effectuer une distinction avec la MP lors du diagnostic (Mayo and Bordelon, 2014).

Comme pour la MP, poser un diagnostic certain est très compliqué car il existe des variations dans les symptômes éprouvés par les patients. Ainsi, certains distinguent plusieurs sous-types. Les 3 sous-types les plus communément reconnus sont les DCL « pures », la MP avec démences, ou encore les DCL associées à la MA (Tableau 1).

Les patients éprouvent aussi lors de la phase prodromique de la DCL des symptômes caractéristiques, qui sont proches de ceux éprouvés par les patients qui développeront la MP (Tableau 1).

Le diagnostic de DCL peut être confirmé par histologie après la mort du patient. Au contraire de la MP, on retrouve des corps de Lewy dans les régions corticales et sous-corticales du cerveau. Ces corps de Lewy sont décrits comme étant plus diffus et plus abondants (Kosaka, 1978). Des corps de Lewy sont aussi observés dans les noyaux de la substantia nigra et du tronc cérébral, mais également dans le système limbique, le cortex parahippocampiques, l'amygdale et le cortex (Kosaka, 1990; Mayo and Bordelon, 2014). Les observations neuropathologiques ont aussi permis de distinguer, 3 sous-types différents de DCL. Le type « tronc cérébral » où les corps de Lewy sont identifiés uniquement dans le diencephale et le tronc cérébral, ce qui est assez proche de la MP. Le type « transitionnel » où de nombreux corps de Lewy sont

présents dans le diencephale et le tronc cérébral, mais très peu dans le cortex cérébral et les ganglions de la base. Et le type «diffus» où les corps de Lewy sont largement distribués dans le cortex cérébral, les noyaux gris centraux, le diencephale et le tronc cérébral (Kosaka et al., 1980; Papka et al., 1998; Mrazek and Griffin, 2007).

3) Atrophie multi-systématisée

a) Présentation et épidémiologie de l'Atrophie multi-systématisée

L'AMS est définie en 1969 par Graham et Oppenheimer, qui ont rassemblé sous le même nom des pathologies jusque-là distinctes : l'atrophie olivopontocérébelleuse, le syndrome de Shy-Drager et la dégénérescence striatonigrale. Les patients de ces pathologies présentaient des symptômes parfois très différents mais avaient en commun des perturbations du système autonome et une issue fatale rapide (quelques années). De plus, les études histologiques post-mortem ont mis en évidence que ces pathologies présentaient toutes une série de dégénération neuronale (atrophie) à de multiples endroits, ce qui a donné son nom à la pathologie (Graham and Oppenheimer, 1969; Jellinger, 2018).

L'AMS est une maladie rare, dite « orpheline » dont le diagnostic est compliqué. Elle survient en majorité chez des personnes allant de 50 à 70 ans (www.orpha.net, 2006). L'AMS réduit l'espérance de vie des personnes (Petrovic et al., 2012).

b) Symptômes et diagnostic de l'Atrophie multi-systématisée

L'AMS est caractérisée par des combinaisons variées de symptômes très divers : syndromes parkinsoniens, syndrome cérébelleux, dysfonction des systèmes autonome et moteur.

Deux critères sont nécessaires pour prononcer un diagnostic d'une AMS « probable ».

- 1) le patient souffre d'une défaillance sévère du système autonome : système gastro-intestinal, cardiovasculaire (sévere hypotension orthostatique) ou urogénital (incontinence, impuissance).
- 2) Ces troubles doivent être accompagnés de symptômes Parkinsoniens ne répondant pas à la L-DOPA ou alors d'ataxie cérébelleuse (se caractérisant par de la maladresse ou des déséquilibres). Aux stades les plus avancés de la maladie, les patients peuvent développer de nouveaux symptômes : dysphonie (trouble de la voix), dysphagie (sensation de gêne ou de blocage ressentie lors du passage des aliments dans la bouche, le pharynx ou l'œsophage) et dystonie (trouble du mouvement) (Gilman et al., 2008; Jellinger, 2018)

Les patients éprouvent aussi lors de la phase prodromique de l'AMS des symptômes caractéristiques, qui sont proches de ceux éprouvés par les patients qui développeront la MP et de la DCL (Tableau 1).

Le diagnostic de l'AMS ne peut être confirmé de manière certaine que post-mortem par une analyse histologique (Jellinger, 2018). Le caractère principal de l'AMS est la présence d'inclusion d' α -syn dans le cytoplasme des cellules gliales du système nerveux, et plus

principalement des oligodendrocytes (Trojanowski et al., 2007). Néanmoins, des inclusions dans des neurones ont parfois été observées (McCann et al., 2014). Les principales régions du cerveau affectées par la neurodégénérescence (les plus atrophiées) sont : le cervelet et le pont (surtout pour MSA-C), la SNpc et le striatum (surtout MSA-P), ainsi que la moelle épinière et le système nerveux entérique (Benarroch et al., 2005; Pouclet et al., 2012; Jellinger, 2018).

II. L' α -synucléine, la protéine centrale chez des synucléinopathies

A. Structure et fonction d' α -synucléine à l'état physiologique dans les neurones

1) Une protéine à la structure versatile

L' α -syn est une protéine de 14 kDa, composée de 140 acides aminés, qui tient son nom des vésicules synaptiques où elle a été isolée pour la première fois en 1988 (Maroteaux et al., 1988). L' α -syn, qui est codée par le gène *SNCA*, est principalement exprimée dans le cerveau, où on la trouve surtout au niveau des terminaisons présynaptiques des neurones (Burré, 2015). Néanmoins, son expression a aussi été reportée dans d'autres tissus : on la trouve en quantité importante dans les globules rouges et en quantité plus faible dans d'autres tissus (Askanas et al., 2000; Tamo et al., 2002; Kim et al., 2004; Nakai et al., 2007). Cette protéine a deux homologues : les protéines β et γ -synucléines, qui sont aussi retrouvées principalement dans les terminaisons présynaptiques des neurones. Ces formes β et γ semblent capables d'assurer en partie les fonctions exercées par l' α -syn (Jakes et al., 1994; Lavedan et al., 1998; Ninkina et al., 2012). Les protéines β et γ -Synucléines ne sont pas présentes dans les corps de Lewy, mais elles ont été retrouvées accumulées avec l' α -syn sous forme de dépôt dans les axones et dendrites des neurones chez des patients atteints de la maladie de Parkinson ou de la démence à corps de Lewy (Galvin et al., 1999).

L' α -syn est composée de deux domaines : en N-terminal, le domaine de fixation aux lipides (résidus 1 à 95) et en C-terminal (résidus 96 à 140) un domaine dit « non structuré » (Figure 4 – A) (Burré, 2015). Le domaine de fixation aux lipides est composé de 7 répétitions de 11 acides aminés ayant pour séquence consensus « KTKGEV ». Ces 11 répétitions, forment des hélices α qui permettent l'interaction de l' α -syn avec les membranes lipidiques (Davidson et al., 1998; Bussell and Eliezer, 2003). C'est dans le domaine N-terminal qu'est situé le fragment tenu pour responsable de l'agrégation d' α -syn dans les synucléinopathies (Ueda et al., 1993). Ce fragment (résidus 60 à 95) appelé « NAC » (composant non Amyloïde- β), est aussi impliqué dans l'interaction avec les lipides et détermine le degrés d'affinité de l' α -syn pour les membranes lipidiques (Fusco et al., 2014). C'est dans le domaine N-terminal que sont retrouvées toutes les mutations associées aux formes familiales dominantes des synucléinopathies : A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, et A53T. Ceci semble indiquer qu'une perturbation de la liaison de l' α -syn aux membranes lipidiques pourrait être liée aux synucléinopathies (Pasanen et al., 2014; Flagmeier et al., 2016). Le domaine C-terminal non structuré est la cible de plusieurs modifications post-traductionnelles (Oueslati et al., 2010).

Des études ont montré que ce domaine pouvait être potentiellement impliqué dans : des interactions avec des protéines ; des ions, des polycations (Brown, 2007); la modulation de la liaison à la membrane (Sevcsik et al., 2011); la protection contre l'agrégation de l' α -syn (Hoyer et al., 2004).

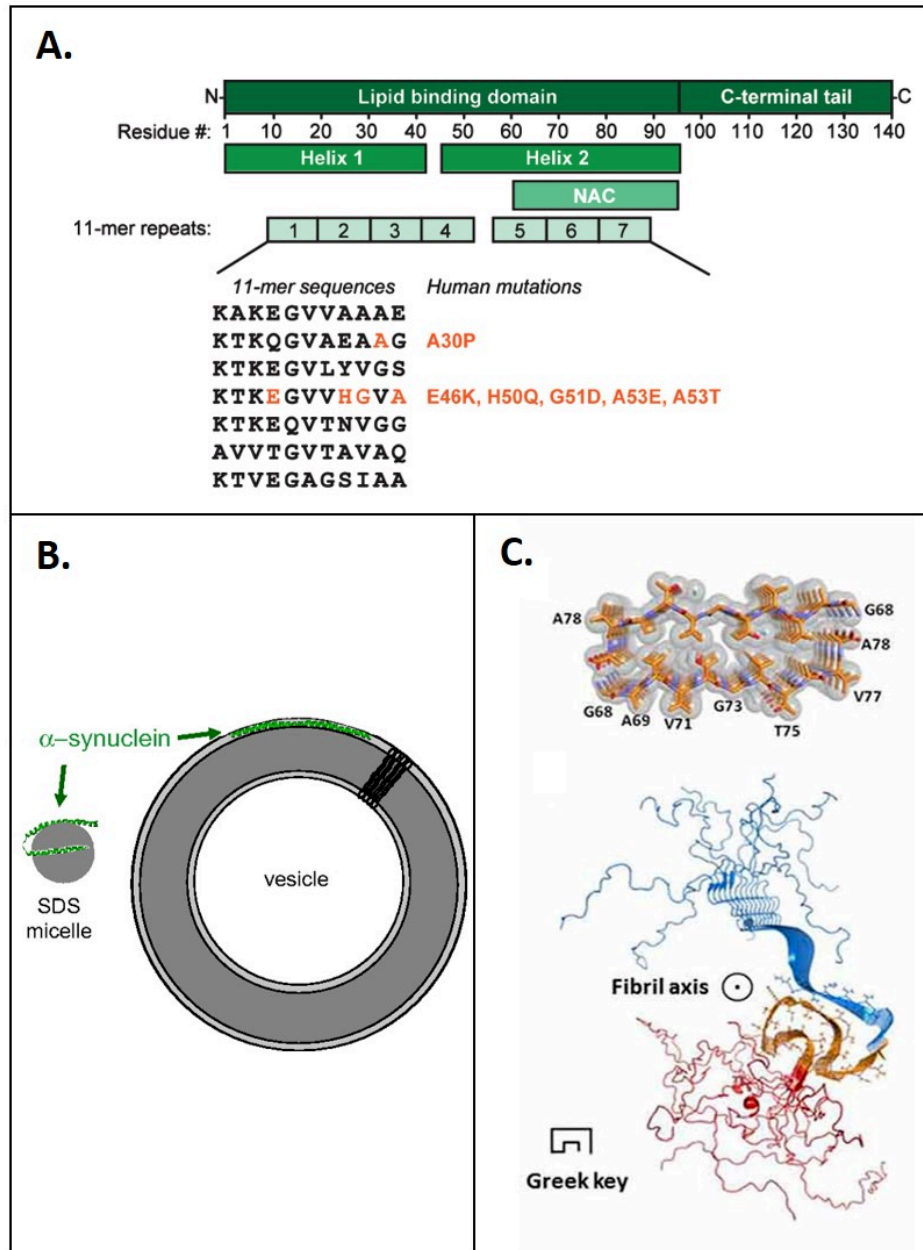


Figure 4 - Structures et conformations de la protéine α -syn. A - Structure des domaines d' α -syn. Lors de la liaison aux membranes lipidiques, le domaine N-terminal se replie en deux hélices. Ce domaine de liaison aux lipides peut être divisé en sept séquences hautement conservées de 11 acides aminés. C'est l'hélice n° 2 qui contient le domaine NAC sujet à l'agrégation. Toutes les mutations liées aux synucléinopathies sont localisées dans les tronçons de 11 acides aminés du domaine N-terminal (Burré, 2015). B - Schéma des structures adoptées par l' α -syn lorsqu'elle est enchâssée au sein des micelles et des vésicules. Les petites micelles très incurvées ne peuvent pas accueillir la structure hélicoïdale étendue, l' α -syn adopte donc une structure en 2 hélices (Jao et al., 2008). C - Modélisations structurales à partir de données de résonance magnétique nucléaire. En haut, structure du

domaine NAC de l' α -syn au cœur des fibres (Protein Data Bank: 4RIL). En bas, modèle structurel d'une fibre de l' α -syn (Protein Data Bank: 2N0A) (Wang et al., 2016)

A l'état physiologique, la protéine α -syn peut être soluble ou bien liée à une membrane. A l'état soluble dans le cytosol, l' α -syn a une structure désordonnée (Fauvet et al., 2012). En présence de membrane lipidique, la partie N-terminale de l' α -syn adopte une structure en hélice α qui permet son enchâssement au sein de membranes lipidiques (Eliezer et al., 2001). Lorsqu'elle est liée à une membrane de large diamètre (au moins 100 nm), l' α -syn adopte la forme d'une grande hélice allongée (Figure 4 – B) (Trexler and Rhoades, 2009). Lorsqu'au contraire elle interagit avec des petites vésicules (et donc à forte courbure), l' α -syn adopte une structure composée de deux petites hélices α (Figure 4 - B)(Chandra et al., 2003).

L' α -syn peut également adopter des conformations dites « pathologiques » riches en feuillet- β . Ces conformations pathologiques ont une forte propension à former des agrégats fibrillaires qui sont retrouvés sous forme de dépôts intracellulaires dans les synucléinopathies (Figure 4 - C) (El-Agnaf et al., 1998a).

Les modifications post-traductionnelles de l' α -syn pourraient influencer sa structure, son affinité pour les membranes, sa capacité à s'agréger et à former des fibres (McFarland et al., 2008; Paleologou et al., 2008, 2010; Bartels et al., 2014; Zhang et al., 2019). Ainsi, l' α -syn est souvent retrouvée phosphorylée dans les corps de Lewy : il a été reporté que dans les cerveaux de patient atteint de la MP ou de la DCL, 90% des protéines α -syn étaient phosphorylées au niveau du résidu S129 (Oueslati, 2016).

2) Une protéine aux multiples fonctions encore mal cernées

La fonction physiologique de l' α -syn est encore mal connue en dépit de plusieurs décennies de recherche. Même si l' α -syn est principalement localisée dans les terminaisons présynaptiques des neurones, des études ont rapporté qu'elle pouvait aussi être située dans les mitochondries, dans le réticulum endoplasmique dans l'appareil de golgi et dans le noyau. Ces différentes localisations suggèrent que l' α -syn pourrait avoir une multitude de fonction.

La localisation présynaptique de l' α -syn et sa capacité à interagir avec des membranes à forte courbure et des protéines synaptiques, suggèrent fortement une fonction associée à la synapse (Burré, 2015). Des résultats suggèrent cependant que l' α -syn, ainsi que ces homologues les β et γ -Synucléines, ne sont pas vitales ou que leur fonction peut être en partie compensée par d'autres protéines. Elles pourraient avoir un rôle dans la régulation et le maintien à long terme de la fonction synaptique (George, 2002; Burré, 2015). Ainsi, des études ont montré que l' α -syn était exprimée seulement après la formation des synapses dans des cultures primaires de neurone de rat de l'hippocampe (Murphy et al., 2000). Dans une autre étude, des souris transgéniques ont été générées avec un triple knock-down des formes α , β et γ -Synucléines. Ces souris étaient viables mais présentaient une altération dans la structure synaptique ainsi qu'une espérance de vie diminuée (Greten-Harrison et al., 2010; Anwar et al., 2011). Une diminution de l'assemblage du complexe SNARE (Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) a également été observée dans ce modèle animal (Burré et al., 2010).

Des études ont montré que l' α -syn pourrait avoir un rôle dans la gestion des vésicules synaptiques (Figure 5). Par exemple, il a été montré que la liaison de l' α -syn à la membrane induit une courbure de cette dernière, menant des vésicules de grandes tailles à se convertir en petites vésicules à fort courbure (Mizuno et al., 2012; Westphal and Chandra, 2013). D'autres travaux suggèrent aussi que l' α -syn pourrait stabiliser les vésicules synaptiques qui ont des courbures très fortes (Braun et al., 2012). De plus, de manière plus globale, des études ont montré que l' α -syn jouait un rôle sur le nombre de vésicules et sur leur mobilité à la synapse (Figure 5) (Scott and Roy, 2012). En effet, il a été montré dans des cultures de neurones de souris, qu'un excès de l' α -syn réduisait le nombre de vésicules et diminuait leur trafic intersynaptique. De manière inverse, une délétion de l' α -syn a conduit à un nombre de vésicules plus grand et un trafic intersynaptique de vésicule accru.

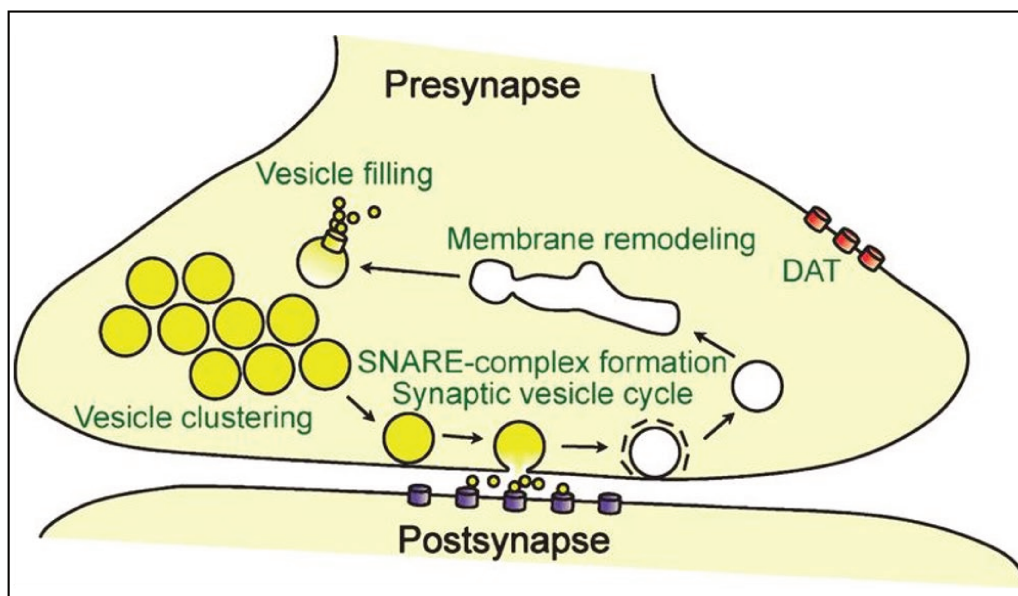


Figure 5 - Les fonctions d' α -syn à la synapse. L' α -syn pourrait être impliquée dans la gestion du pool de vésicules synaptiques (remplissage, remodelage et regroupement de vésicules) ; aide à l'assemblage du complexe SNARE ; régulation du transporteur DAT de la dopamine (Burré, 2015).

Il a aussi été reporté que l' α -syn pouvait avoir un rôle dans la composition et l'organisation des membranes (Figure 5) (Jenco et al., 1998; Madine et al., 2006; Adamczyk et al., 2007). Des observations indiquent aussi que l' α -syn pourrait avoir une activité de protéine chaperonne en aidant à la formation du complexe SNARE, qui est impliqué au niveau de la synapse dans la libération des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules (Figure 5) (Burré et al., 2010). Enfin, d'autres études montrent que l' α -syn aurait un impact sur la régulation de la dopamine à la synapse en régulant le transporteur de la dopamine DAT (Figure 5) (Butler et al., 2015). Ainsi, il a été mis en évidence que le transporteur DAT et l' α -syn peuvent entrer en interaction de manière transitoire au niveau de la membrane plasmique. De plus, il a aussi été montré dans des cultures neuronales qu'une surexpression de l' α -syn menait à une augmentation du fonctionnement du transporteur DAT. Ces dernières observations donnent une piste intéressante pour expliquer pourquoi le fonctionnement des neurones dopaminergiques serait impacté par les dysfonctions concernant l' α -syn.

B. Les mécanismes à l'origine de l'agrégation la propagation de l' α -synucléine

1) Un mécanisme d'agrégation et propagation de type prion

Un prion est un agent pathogène constitué d'une protéine cellulaire possédant une conformation erronée. Cet agent pathogène est à l'origine d'encéphalopathie spongiforme, humaine et animale. L'encéphalopathie la plus ancienne est la tremblante du mouton (ou « scrapie » en anglais). La protéine cellulaire PrP^C une fois convertie dans sa forme pathogène est appelée PrP^{Sc} pour « scrapie ». Les formes PrP^{Sc} ont la capacité de se propager d'une cellule infectée à une autre encore saine, et là de transmettre leur mauvaise conformation aux protéine saines PrP^C, générant des formes autonomes se propageant elles-mêmes dans les tissus sains (Prusiner, 1991).

Il existe de grandes similitudes fonctionnelles entre le prion et les protéines amyloïdes. Par exemple, leurs formes pathogènes agrégées sont riches en feuillet β et s'accumulent au sein de dépôt. Il a été suggéré que l'agrégation et la propagation des protéines dans les synucléinopathies pourrait avoir un mécanisme de type prion (Figure 6). Selon cette hypothèse, une protéine, de structure fonctionnelle native riche en hélice α , pourrait subir un changement de conformation et adopter une structure mal repliée riche en feuillet β et non fonctionnelle. Cette nouvelle conformation, selon le mécanisme de type prion, aurait la capacité d'interagir avec d'autres protéines natives qui adopteraient alors la conformation mal repliée, pour former un complexe nommé oligomère. Ces oligomères s'allongeraient ensuite par le recrutement successif de protéines natives, jusqu'à former de grandes fibres qui sont retrouvées dans les dépôts protéiques (Dunning et al., 2013).

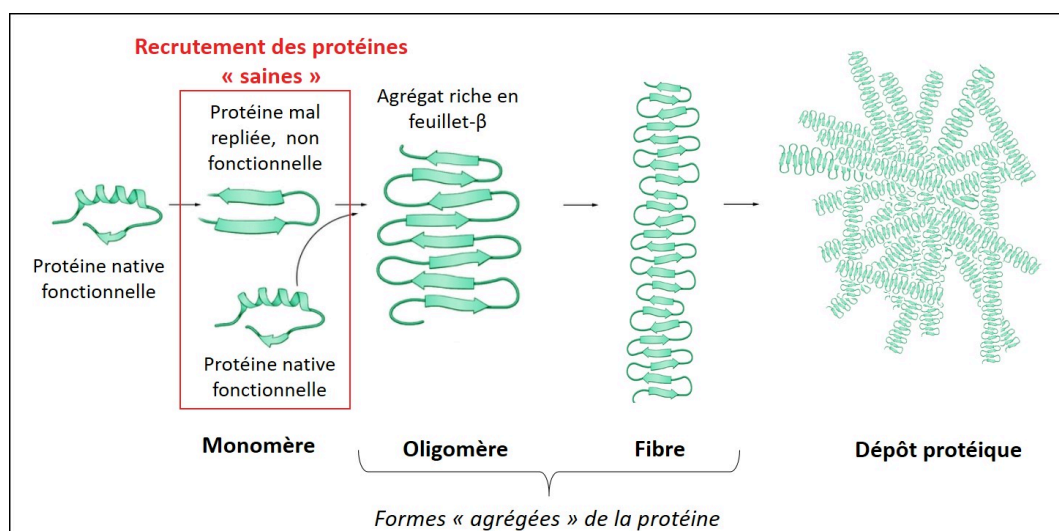


Figure 6 – Un mécanisme d'agrégation de type prion. Une protéine native fonctionnelle acquiert un mauvais repliement. Sa nouvelle structure riche en feuillet β , la rend non fonctionnelle. Néanmoins elle lui procure une nouvelle compétence de type prionique : la capacité de recruter des protéines natives en changeant leur conformation pour s'agréger ensemble en formant des oligomères. Ces oligomères s'allongent par recrutement successif de protéine native pour former des longues fibres qui sont retrouvées accumulées dans des dépôts protéiques. Adapté de (Wolf, 2012).

Ce mécanisme de type « prion » a été particulièrement étudié pour la protéine α -syn : de nombreuses études ont en effet permis de mettre en évidence la capacité de protéines d' α -syn mal repliées à propager leur mauvaise conformation à d'autres α -syn natives selon un mécanisme de type prion. Ainsi, deux études ont rapporté en 2008 que des patients atteints de la MP qui avaient subi une greffe de neurones fœtaux dopaminergiques lors d'essais thérapeutiques, avaient développés quelques années plus tard des corps de Lewy dans ces neurones greffés (Kordower et al., 2008; Li et al., 2008a). De plus, des expériences *in vitro* ont montré qu'il était possible de purifier des formes agrégées d' α -syn (Conway et al., 1998; Uversky, 2007). Il a été reporté que ces fibres d' α -syn étaient capables de recruter et de convertir des α -syn solubles en fibre lorsqu'elles étaient internalisées par différents types de cellules. Ces expériences ont été réalisées à la fois *in vitro* dans des cultures cellulaires et *in vivo* suite à des injections dans des cerveaux d'animaux (Volpicelli-Daley et al., 2011; Luk et al., 2012; Peelaerts et al., 2015). De plus, il a été observé qu'une très faible quantité de fibre était suffisante pour aboutir à cette propagation (Luk et al., 2009; Volpicelli-Daley et al., 2011).

2) Propagation de l' α -syn dans les synucléinopathies

Une étude histologique de grande ampleur réalisée par Braak sur une centaine de patients atteints de la MP a permis de mettre en évidence une apparition progressive des formes agrégées dans le cerveau. Selon cette étude, la progression de la MP peut être catégorisée en 6 stades, chacun correspondant à la progression de l'apparition des corps de Lewy dans le cerveau des malades atteints de la MP (Figure 7). La pathologie débiterait au niveau du bulbe olfactif, du tronc cérébral, avant de se propager dans le cerveau (Braak et al., 2003). La découverte d'agrégats d' α -syn dans les tissus intestinaux des patients atteints de la MP, en particulier dans les neurones du système entérique, suggère également que la pathologie pourrait débiter dans l'épithélium gastrique avant d'être transmise via le nerf vagal jusqu'au mésencéphale basal et le cerveau antérieur puis atteindre le cortex cérébral (Braak et al., 2006; Gelpi et al., 2014). De plus, Braak a mis en évidence que les types et la sévérité des symptômes rencontrés par les patients étaient corrélés à la progression des stades histologiques. Par exemple, le stade 1 correspond aux troubles digestifs (Pfeiffer, 2003) tandis que le stade 3 correspond à l'apparition des symptômes moteurs, lorsque 50 à 60 % des neurones dopaminergiques de la SNpc sont morts (Lee et al., 1994; Dickson et al., 2009; Kordower et al., 2013).

Une propagation en plusieurs stades semble moins évidente pour les autres synucléinopathies. Pour la DCL, certains proposent que la pathologie débiterait dans le mésencéphale avant de se propager au néocortex (McCann et al., 2014), tandis que d'autres au contraire soutiennent que la DCL commencerait dans les régions corticales avant de se propager dans le mésencéphale (Kosaka, 2014)

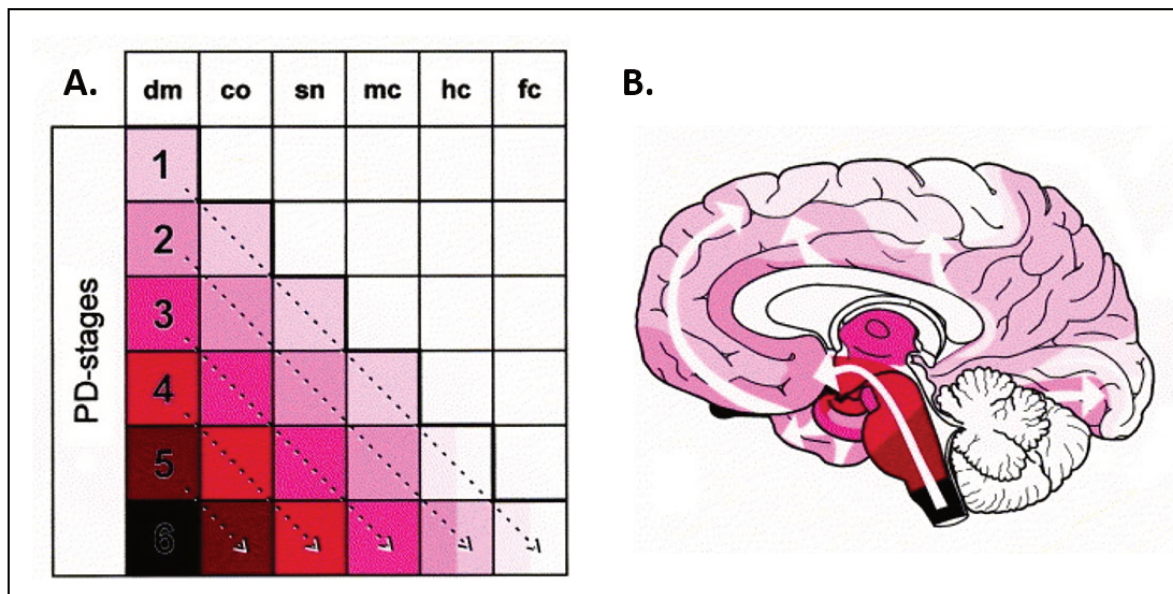


Figure 7 - Les différents stades de Braak pour la maladie de Parkinson. Selon l'hypothèse de Braak, la propagation des dépôts protéiques est progressive dans le cerveau au cours de la maladie de Parkinson et suit différents stades. A - Zones du cerveau affectées selon les 6 stades de Braak chez les patients atteints de la MP. Pour chaque stade, plus la couleur est foncée plus la zone est affectée. B - Progression de la maladie de Parkinson dans le cerveau. dm: noyau moteur dorsal du nerf glosso-pharyngien et du nerf vague; co: complexe coeruleus – subcoeruleus ; sn: substantia nigra ; mc: mésocortex temporal antéromédial ; hc: zones d'association sensorielle d'ordre élevé et champs préfrontaux ; fc: zones d'association sensorielle du premier ordre, zones prémotrices et champs sensoriels et moteurs primaires. Adapté de (Braak et al., 2003).

Ces différentes observations semblent indiquer que les formes agrégées se propagent progressivement dans le cerveau des patients atteints de synucléinopathies. Ces observations pourraient être expliquées par une propagation des formes agrégées de l' α -syn dans le cerveau suivi d'un recrutement de type « prion » des protéines α -syn sous formes monomériques.

3) Les mécanismes de passage de cellules à cellules lors de la propagation des formes agrégées d' α -syn dans le cerveau

Des études ont montré que les formes monomériques, oligomériques et fibrillaires de l' α -syn pouvaient passer de cellules à cellules dans le cerveau. On a ainsi reporté des transferts de protéines α -syn de neurone à neurone (Abounit et al., 2016) , d'astrocyte à astrocyte (Rostami et al., 2017), de neurone à astrocyte (Lee et al., 2010) et de neurone à oligodendrocyte (Reyes et al., 2014) .

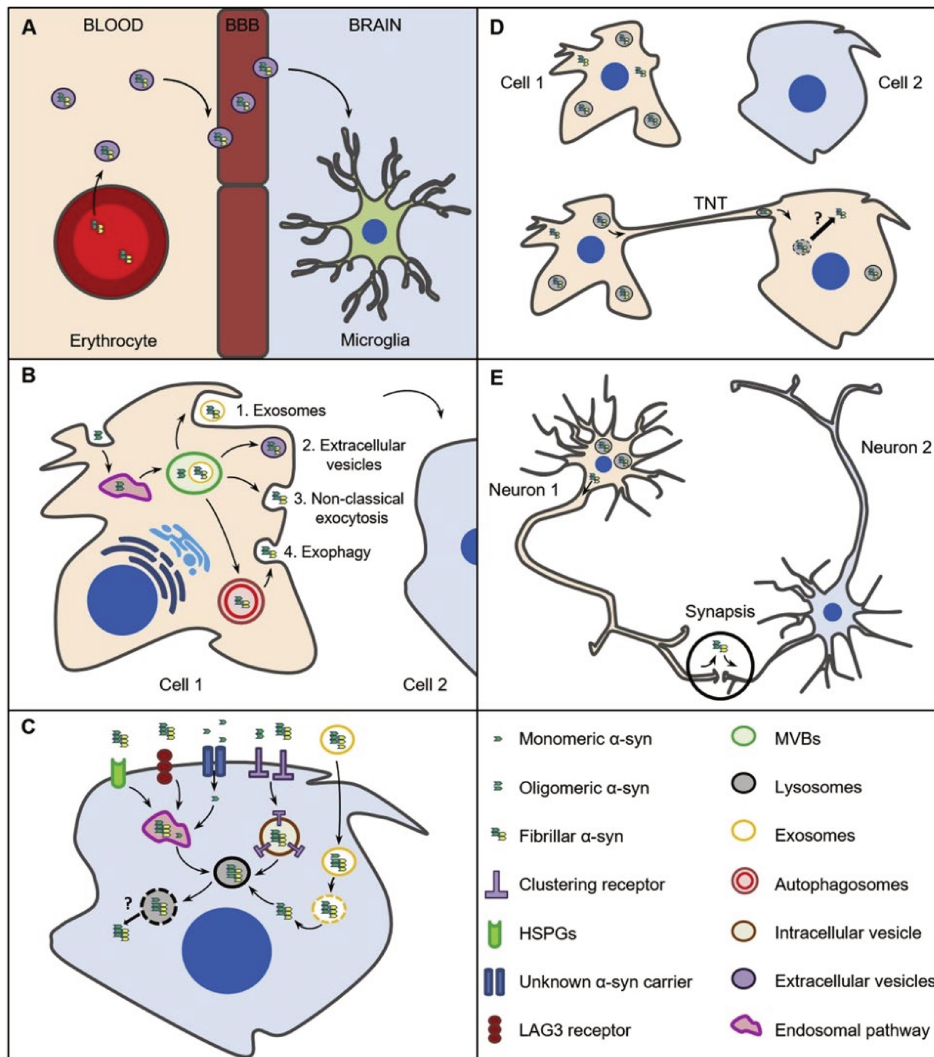


Figure 8 - Mécanismes possibles de propagation des agrégats α -syn. A - Transcytose par adsorption de vésicules extracellulaires contenant des agrégats α -syn. Les érythrocytes peuvent libérer des vésicules extracellulaires contenant de l' α -syn dans la circulation sanguine. Ces vésicules peuvent ensuite traverser la BHE par transcytose et atteindre le cerveau. B - Exocytose des agrégats de l' α -syn. Les agrégats d' α -syn peuvent être dérivés des corps multi-vésiculaires (MBV) et libérés dans le milieu dans des exosomes (1) ou à l'intérieur d'autres types de vésicules extracellulaires (2). Ces agrégats peuvent également être libérés directement via un mécanisme d'exocytose non classique (3) ou via l'exophagie (4). C - Internalisation des espèces agrégées α -syn extracellulaires. Les espèces monomères, oligomères et fibrillaires d' α -syn agrégées peuvent être internalisées par la cellule par endocytose de différents récepteurs à la surface cellulaire reconnaissant α -syn. Une fois internalisée, l' α -syn est adressée au compartiment lysosomal, dont elle peut parfois s'échapper par rupture de la membrane lysosomale. D - Transfert de α -syn via les TNT (tunneling nanotube). Les lysosomes contenant des agrégats de α -syn peuvent voyager d'une cellule à l'autre à l'intérieur des TNT. Après son arrivée dans la cellule accepteur, α -syn pourrait s'échapper des lysosomes et commencer à recruter les α -syn native pour former de nouveaux agrégats. E - Propagation trans-synaptique de α -syn. Les lysosomes contenant l' α -syn, peuvent se déplacer le long de l'axone des neurones pour atteindre les terminaux présynaptiques, où ils sont libérés, et peuvent ensuite être internalisés par les neurones voisins. Adapté de (Vargan et al., 2019).

a) Mécanismes de sécrétion de l' α -syn

Des études ont mis en évidence que des fibres d' α -syn pouvaient passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) et être distribuées dans différentes régions du cerveau lorsqu'elles étaient injectées dans la veine caudale de rats (Peelaerts et al., 2015). De même, il a aussi été montré que des vésicules riches en α -syn venant des érythrocytes pouvaient passer la BHE par un mécanisme de transcytose (Figure 8 –A) (Matsumoto et al., 2017).

De nombreuses études ont démontré l'existence de différentes voies de sécrétion possible pour l' α -syn. Ainsi, l' α -Syn, présente dans le lumen des vésicules, peut être sécrétée par des cellules neuronales par une exocytose non classique qui ne met pas en jeu l'appareil de golgi mais le réticulum endoplasmique (Lee et al., 2005). D'autres travaux ont aussi mis en évidence que les formes monomériques, oligomériques et fibrillaires d' α -syn pouvaient être libérées par des exosomes sécrétés par les cellules. Ces structures sont de petites vésicules, générées par la fusion des corps multivésiculaires avec la membrane plasmique, et libérés dans le milieu extracellulaire (Colombo et al., 2014). Des exosomes contenant des espèces agrégées d' α -syn ont été retrouvées dans le fluide cérébrospinal de patient atteint de la MP (Stuendl et al., 2016). Dans les cellules neuronales dopaminergiques, il a aussi été démontré que des monomères et des formes agrégées d' α -syn peuvent être sécrétées par exophagie, un mécanisme de sécrétion peu conventionnel (Figure 8 –B) (Ejlerskov et al., 2013).

b) Mécanismes d'internalisation de l' α -syn

On ne connaît toujours pas avec certitude le mécanisme exact d'internalisation de l' α -syn. L' α -syn étant connue pour interagir avec les lipides ou des protéines au niveau de la membrane plasmique, cela pourrait faciliter son entrée de manière non spécifique (Fortin et al., 2004). Des récepteurs pouvant être impliqués dans l'endocytose d' α -syn ont également été identifiés comme par exemple la sous-unité $\alpha 3$ de la Na^+ / K^+ -ATPase (Shrivastava et al., 2015) ; la neurexine-1 β , la protéine-1 de type précurseur amyloïde- β et la protéine LAG3 (Mao et al., 2016).

c) Mécanismes de transmission directe de l' α -syn

De minuscules tunnels d'échange (Tunneling NanoTubes, TNT) pourraient également servir à la diffusion de l' α -syn. Ce sont des connexions tubulaires transitoires permettant une communication directe entre des cellules distantes permettant de transférer protéines, métabolites, ou organelles de cytoplasme à cytoplasme (Ariazi et al., 2017). Le transfert intercellulaire des fibrilles d' α -syn via les TNT a été observé pour la première fois dans une co-culture de cellules neuronales et de neurones primaires (Abounit et al., 2016). Un autre étude mettant en jeu une co-culture de cellules SH-SY5Y et de péricytes primaires du cerveau humain, dérivées de cerveaux post-mortem PD, ont montré que les transferts d' α -syn via TNT étaient possibles (Figure 8 –D) (Dieriks et al., 2017).

Enfin, un grand nombre d'études *in vivo* ont montré que les agrégats d' α -syn pourraient se propager préférentiellement le long des régions cérébrales anatomiquement interconnectées, suggérant que l' α -syn se propagerait par un mécanisme trans-synaptique (Recasens and Dehay, 2014). Le transport axonal d' α -syn agrégée a ainsi été étudié en utilisant des neurones primaires cultivés dans des dispositifs microfluidiques, permettant la séparation des compartiments somatodendritiques et axonaux. Il a été démontré que les fibrilles d' α -syn peuvent être internalisées par les neurones primaires corticaux, transportées à l'intérieur des axones, puis transférées à d'autres neurones (Freundt et al., 2012; Brahic et al., 2016).

4) Quels mécanismes pourraient expliquer l'apparition de mauvais repliement d' α -syn ?

On suppose que des erreurs de repliement donnant lieu à l'apparition des formes agrégées d' α -syn se produisent en proportion très faible de manière stochastique tout au long de la vie (Jarrett and Lansbury, 1993). Mais certains facteurs pourraient favoriser ces mauvais repliements. Par exemple, chez les personnes atteintes d'une forme familiale de la MP, des mutations présentes dans la séquence de l' α -syn pourraient augmenter la fréquence d'erreur de repliement (Devine et al., 2011).

Certaines formes de stress cellulaire (par exemple, celles associées à l'exposition aux pesticides et aux toxines environnementales) pourraient augmenter l'expression d' α -syn, et par conséquent le risque de formation d'espèces agrégées (Cicchetti et al., 2009). De même, le stress oxydatif et d'autres stimuli pourraient déclencher des modifications post-traductionnelles de l' α -syn qui augmentent sa propension à s'agréger (Giasson et al., 2000a).

En situation non pathologique, on suppose que les espèces d' α -syn mal repliées sont éliminées par des mécanismes de protéostase. Mais cette élimination pourrait être réduite avec l'âge conduisant à une augmentation de formes agrégées dans les neurones (Xilouri et al., 2013) (Brundin and Melki, 2017).

C. Le mécanisme de la neurotoxicité encore mal cerné

La communauté scientifique n'a toujours pas identifié avec certitude parmi les formes agrégées de l' α -syn (oligomères, fibres, formes phosphorylées ou tronquées...) lesquelles étaient les plus toxiques, et par quel(s) mécanisme(s) celles-ci pouvaient engendrer la dysfonction et la mort des cellules dans les synucléinopathies. (Wong and Krainc, 2017).

Certaines études suggèrent que les oligomères seraient les formes les plus toxiques. Bien que la communauté scientifique ne soit pas d'accord sur une définition précise du terme « oligomère ». Ce terme lorsqu'il est utilisé fait généralement référence à un assemblage de protéines α -syn de petite taille. Pour certains ces assemblages ont une conformation différente, pour d'autres il s'agit en réalité d'une fibre de très petite taille ayant la même conformation que les fibres de taille usuelle. Des études ont rapportées des niveaux accrus d'oligomères solubles dans le cerveau des patients atteints de PD et de DLB (Sharon et al., 2003). De plus, les mutations A53T et A30P liées à la MP accélèrent l'oligomérisation de l' α -syn mais pas son arrangement sous forme de fibre (Conway et al., 1998). Néanmoins, d'autres travaux récents *in*

in vitro et *in vivo* ont montré au contraire que les fibres de l' α -syn seraient la forme la plus neurotoxique. Ainsi, une équipe a montré *in vitro* sur des cultures cellulaires, que les fibres induisaient un taux d'apoptose plus fort que les oligomères (Pieri et al., 2012). Cette même équipe a réalisé une autre étude *in vivo* dans laquelle différents assemblages de l' α -syn ont été injectés dans la SNc de rats (Peelaerts et al., 2015). Ils ont observé que les fibres induisaient une plus grande quantité de troubles moteurs, une perte plus élevée de cellules dopaminergiques et une altération synaptique plus forte que l'injection d'oligomères.

Bien que l' α -syn à l'état normal soit surtout retrouvée au niveau des synapses, les formes agrégées, elles, sont observées partout dans le corps cellulaire, ce qui suggère que ces formes agrégées engendrent des dysfonctions cellulaires au-delà des terminaisons synaptiques. En effet, de multiples dysfonctions ont été observées au sein de nombreux organites cellulaires : mitochondries, appareil de golgi, réticulum endoplasmique, lysosomes et noyau cellulaire (Ingelsson, 2016).

1) Des dysfonctions au niveau des organites

Au niveau de la synapse, il a été montré que les oligomères de grandes tailles étaient capable d'empêcher la formation du complexe SNARE (Figure 9)(Choi et al., 2013). Ce phénomène inhiberait la fusion des vésicules transportant les neurotransmetteurs à la membrane synaptique, et entrainerait ainsi une diminution de la libération de la dopamine à la synapse (Choi et al., 2013). D'autres études, de manière plus générale, ont mis en évidence qu'une augmentation du niveau de l' α -syn diminuait la taille et la mobilité du pool de vésicules présynaptiques (Nemani et al., 2010; Scott and Roy, 2012).

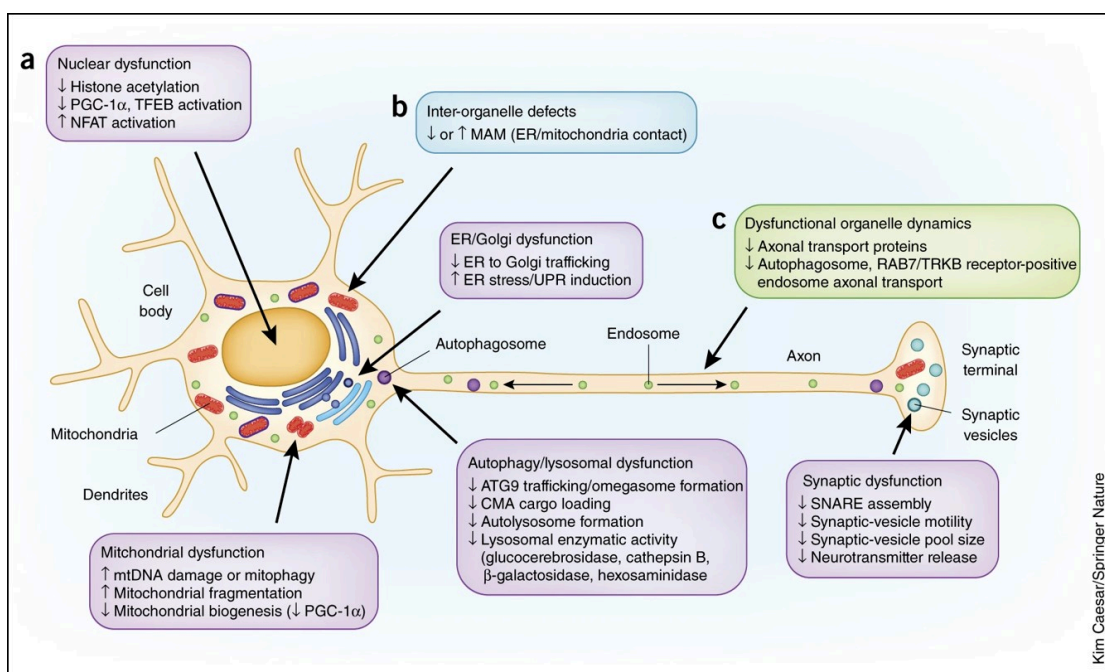


Figure 9 - Les différentes hypothèses des mécanismes de la neurotoxicité de l' α -syn. Le dysfonctionnement des organites (a, encadrés violets), les défauts des contacts entre les organites (b, encadré bleu) et la dynamique des organites dysfonctionnelles (c, encadré vert) sont tous potentiellement impliqués dans la toxicité de l' α -synucléine. Image de (Wong and Krainc, 2017)

L'agrégation de l' α -syn pourrait aussi être liée à des dysfonctions au niveau des mitochondries (Figure 9). Ainsi, une étude sur des souris portant la mutation A53T de l' α -syn a montré que celles-ci avaient un taux supérieur d'altération de l'ADN mitochondrial et de mitophagie. D'autre part, il a été montré que l' α -syn pouvait indirectement altérer la biogenèse mitochondriale : il a été observé chez des souris portant la mutation A30P et dans des cerveaux de patients parkinsoniens, une diminution du niveau du facteur PGC-1 α lié à la biogenèse mitochondriale.

Des dysfonctions au niveau de l'appareil de golgi et du réticulum endoplasmiques ont été aussi constatées (Figure 9). En effet, une étude a été réalisée dans des levures utilisées comme modèle de la MP chez lesquelles l' α -syn a été exprimée. Il a été observé une perturbation du transport vésiculaire du réticulum endoplasmique vers l'appareil de golgi, ainsi qu'une augmentation du stress au niveau du réticulum endoplasmique (Cooper et al., 2006).

D'autres études ont mis en évidence dans des modèles de drosophiles et de souris de la MP, que l' α -syn mutée avait une localisation plus importante au noyau (Fares et al., 2014; Kontopoulos et al., 2006). De nombreuses altérations du niveau transcriptionnel ont aussi été reportées (Figure 9). Par exemple dans un modèle de rat surexprimant la protéine α -syn, il a été observé une diminution de l'activation d'un facteur de transcription de la voie autophagolysosomale nommé TFEB (Decressac et al., 2013).

2) Des dysfonctions à l'échelle cellulaire et tissulaire

D'autres études mettent en lumière des dysfonctions au niveau de la dynamique (transport, fusion, fission) des organites cellulaires dues aux formes agrégées de l' α -syn (Figure 9). Ainsi, deux travaux rapportent des augmentations de la fragmentation des mitochondries en cas de surexpression d' α -syn (Calì et al., 2012; Guardia-Laguarta et al., 2014). Une autre étude a mis en évidence que les fibres de l' α -syn diminuent le transport axonal des autophagosomes (Volpicelli-Daley et al., 2011).

D'autres travaux ont rapporté que les oligomères d' α -syn pouvaient créer des pores dans la membrane cellulaire et ainsi perturber l'homéostasie cellulaire. Ces pores augmentent la perméabilité de la membrane permettant l'entrée d'ions venant du milieu extra-cellulaire et aboutissent à une dépolarisation de la membrane des neurones (Volles et al., 2001; Volles and Lansbury, 2002; Danzer et al., 2007).

De même, une neuroinflammation a été observée dans des modèles animaux chez lesquels l' α -syn est surexprimée (Theodore et al., 2008; Chung et al., 2009). Le rôle de cette neuroinflammation est encore inconnu, des études reportant des effets protecteurs ou au contraire délétères (Ingelsson, 2016).

3) Des dysfonctions dans les voies autophagiques et lysosomales

Les formes agrégées de l' α -syn sont aussi à l'origine de dysfonctions majeures dans les voies autophagiques et lysosomales (Figure 9). Cette déficience des mécanismes de nettoyage cellulaire favorise donc la propagation des formes agrégées qui sont moins dégradées. Ainsi, une étude sur des cultures de cellules ont mis en évidence que les formes mutantes de l' α -syn

A53T et A30P se liaient plus étroitement que l' α -syn normale au récepteur lysosomal LAMP2A, qui appartient à la voie autophagique des protéines chaperonnes (Cuervo et al., 2004). Ces formes mutantes bloquent le récepteur et inhibent alors leur propre dégradation par cette voie autophagique. D'autres études dans des cultures neuronales ont mis en évidence que la dégradation des fibres de l' α -syn par autophagie était bloquée (Tanik et al., 2013) : les autophagosomes se formaient normalement autour des fibres, mais la liaison aux lysosomes était défectueuse, ce qui donnait lieu à une accumulation d'autophagosomes ne pouvant pas mener à bien l'autophagie. Enfin, plusieurs études dans des cultures cellulaires ont mis en évidence que les activités des enzymes lysosomales, sur lesquelles reposent le mécanisme de l'autophagie, étaient réduites lorsque les formes agrégées de l' α -syn s'accumulaient dans les cellules (Mazzulli et al., 2016; Wong and Krainc, 2016).

Des dysfonctions des voies autophagiques et lysosomales ont aussi été détectées chez des patients atteints de MNs autre que des synucléinopathies. L'ensemble de ces observations a donné lieu à une nouvelle hypothèse au sein de la communauté scientifique : Ces dysfonctions des voies de « nettoyage cellulaire » pourraient être en réalité l'évènement majeur expliquant la mort des neurones dans les MNs (Hardy, 2019; Malik et al., 2019).

III. Mise en évidence de différentes conformations de fibres d' α -synucléine

Depuis la découverte que des protéines peuvent former des formes agrégées pathologiques dans les MNs, la communauté scientifique a cherché à caractériser de manière précise la structure de ces formes. Il a été mis en évidence qu'il était possible de reproduire *in vitro* l'agrégation et la formation de fibres amyloïdes à partir de protéines natives solubles, permettant ainsi leur isolation et leur étude.

A. Développement *in vitro* et caractérisation biochimique des différentes conformations de fibres d' α -synucléine

De nombreuses équipes ont mis en évidence que l' α -syn forme des fibres amyloïdes de morphologies variées en fonction des conditions d'assemblage ou de mutations ponctuelles (El-Agnaf et al., 1998b; Heise et al., 2005; Zibae et al., 2007). Lors de l'assemblage des filaments, un ou plusieurs structures amyloïdes peuvent se former et conduire à l'obtention d'un mélange de fibres amyloïdes polymorphes.

En 2013 Bousset et al. identifiaient deux types de fibres nommées F pour « fibre » et R pour « Ruban » (Bousset et al., 2013) pouvant être obtenues en l'absence de polymorphes. Ces fibres obtenues à partir de protéines recombinantes produites par une souche d'*Escherichia coli* surexprimant l' α -syn humaine. Les paramètres d'assemblage permettant d'obtenir l'un ou l'autre type de filament sont les tampons d'assemblage (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM KCl pour la fibre F ; 5mM Tris-HCl, pH 7.5 pour la fibre R). La protéine monomérique est dialysée à 4°C contre 1000 volumes de tampon de fibre R, tandis que la fibre F est obtenue directement dans le tampon de purification. L'assemblage est obtenu par incubation, sous agitation (600

rpm), à 37°C pendant 7 jours. La caractérisation précise par microscopie et RMN du solide de ces fibres a permis de mettre en évidence que ces fibres avaient des structures très différentes (Figure 10 - A). Ainsi, les fibres F ont un aspect cylindrique tandis que les R sont plus aplaties et entortillées sous forme de spirale. De même, bien que le pourcentage de la séquence d' α -syn impliquée dans les feuillets- β soit la même pour les fibres F et R (de l'ordre de 70%), la distribution des feuillets- β au sein de la séquence est très différente entre les fibre F et R (Figure 10 - B) (Gath et al., 2014). Des essais *in vitro* sur des cultures cellulaires ont montré que la fibre F induisait une mortalité cellulaire deux fois plus importante que la fibre R. La fibre F montrait aussi des capacités de propagation supérieures au sein de culture de neurones primaires.

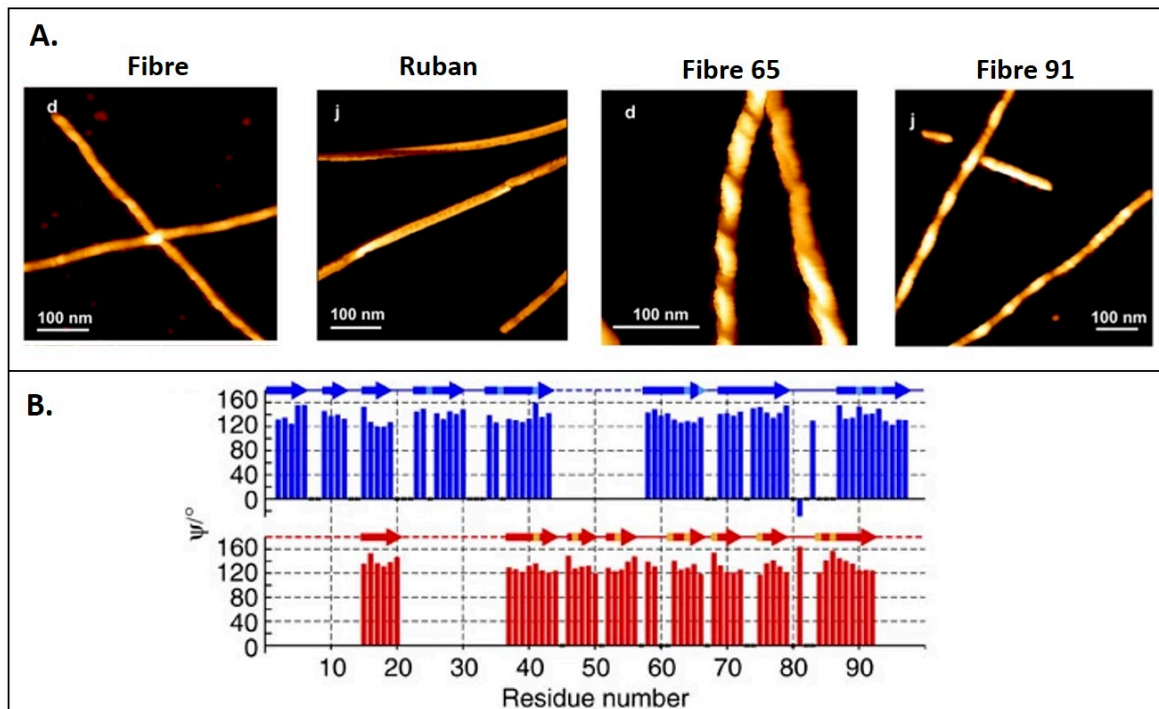


Figure 10 - Les différences structurales entre les conformations de fibres d' α -synucléine. A - Image par microscopie à force atomique de 4 conformations de fibre d' α -syn : Fibre, Ruban, Fibre 65 et Fibre 91. Adapté de (Makky et al., 2016). B- Prédiction des acides aminés d' α -syn impliqués dans les feuillets β pour les conformations de fibre d' α -syn Fibre F et Ruban à partir des données de RMN du solide. Les flèches symbolisent les feuillets β prédits. Adapté de (Bousset et al., 2013)

Il a été mis en évidence que ces fibres F et R étaient capables de transmettre leur conformation aux α -syn solubles générées selon un mécanisme de type « prion ». En effet, des tests *in vitro* ont montré que lorsque des fibres R ou des rubans étaient incubées avec des α -syn solubles dans le tampon d'assemblage de la fibre F, elles étaient capables de recruter des α -syn solubles pour allonger ces filaments en leur imposant leur propre conformation. Lorsque les fibres F et R étaient au contraire incubées dans le tampon d'assemblage de la fibre R, seules des fibres R étaient générées. D'autres tests ont été réalisés dans des cultures cellulaires. Après une infection de culture de neurones par des fibres F et R, une analyse par protéolyse ménagée à la protéinase K des lysats cellulaires a mis en évidence que les motifs de dégradation étaient très différents entre les neurones infectés par les fibres F et R. Ceci suggère que les fibres F et

R sont capables de transmettre leur conformation aux protéines α -syn endogènes de ces cultures cellulaires. Suite à ces expériences, les auteurs en ont déduit que ces conformations F et R de fibres pourraient être considérées comme deux « souches » de prions distinctes.

En 2016, deux nouvelles conformations de fibres nommées fibre 65 et fibre P91 ont été reportées (Makky et al., 2016; Verasdonck et al., 2016). Ces fibres sont obtenues par des protocoles similaires aux fibres F et R : une dialyse suivie d'une incubation longue à 37°C des α -syn solubles. Les seules différences résident dans le contenu des tampons d'assemblage. Ainsi, le tampon utilisé pour l'incubation de la fibre 65 est le suivant: 20 mM MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) pH 6.5, 150 mM NaCl, et le tampon: 20 mM KPO₄, pH 9.1, pour les fibres 91.

Des analyses par RMN du solide et microscopie à force atomique ont permis de préciser les différences structurales entre ces quatre fibres (Figure 10 - A). Ainsi les fibres sont longues de 1 à 2 μ m en moyenne, avec une largeur de l'ordre de 15 à 20 nm, les fibre F étant les moins larges, et les fibres 65 les plus larges. Leur hauteur est de l'ordre de 5 à 7 nm, les fibres R étant les moins hautes et les 65 les plus hautes. Enfin, les fibres 65 et 91 présentent des variations périodiques de la hauteur, au contraire des fibres F et R. D'autres analyses ont aussi mis en évidence que les quatre types de fibres avaient des propriétés mécaniques différentes. Ainsi, les fibres F sont les plus rigides, avec une mesure de la résistance à la flexion quatre fois supérieure à la fibre R et deux fois supérieure aux fibres 65 et 91.

B. Conformations de fibre déclenchants différents symptômes *in vivo*

Un modèle animal de rat a permis de mettre en évidence, que l'injection de fibres de type F et R dans le cerveau d'animaux, conduisait de deux phénotypes différents.

Les Fibres F et R ont été injectées dans les SN de rat, et les animaux ont été suivi pendant 4 mois avec des analyses comportementales, et histologiques. En parallèle, des rats témoin négatif et positif ont été inoculés avec des oligomères d' α -syn, ou des homogénats de cerveaux issus de souris transgéniques de 18 mois exprimant l' α -syn mutée A30P présentant une grande quantité d'alpha synucléine pathologique) (Peelaerts et al., 2015). Quatre mois après l'injection des fibres, il a été observé que la fibre R avait généré un plus grand nombre de corps de Lewy et de neurite de Lewy que la fibre F. Néanmoins, aucune perte significative de neurone dopaminergique n'a été observée pour les deux conformations (Figure 11- a). Cependant, lorsque cette inoculation a été conjuguée à une surexpression de l' α -syn par injection de vecteur viral adéno-recombinant (rAAV), il a été observé une perte de neurones dopaminergiques pour chacune des formes F et R injectées (Figure 11- c). Cette co-injection a également entraîné un fort déficit moteur pour chaque forme injectée, avec une perte plus importante pour la fibre F (Figure 11- d). Un déficit moteur plus léger a été observé lorsque les fibres étaient injectées seules avec également un déficit légèrement plus important pour la fibre F (Figure 11- b). En conclusion, la fibre F a provoqué dans ce modèle un déficit moteur plus important, tandis que le fibre R a engendré un nombre plus important de dépôts de types de corps et de neurite de Lewy.

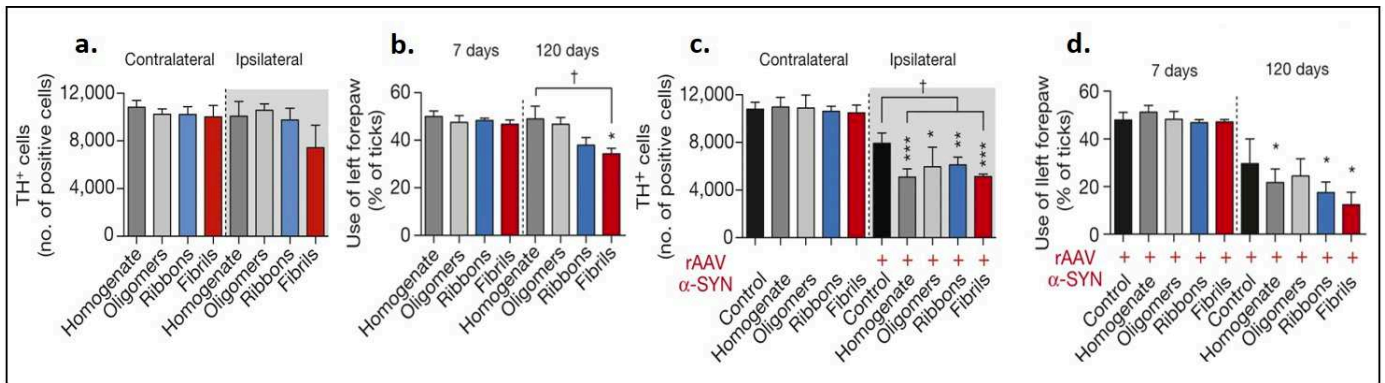


Figure 11 – Des différences dans les symptômes générés par les conformations F et R des fibres d’ α -syn. (a) et (c) : Quatre mois après l’injection des fibres F et R dans la SN de rat, quantification des cellules positives (TH +) à la tyrosine hydroxylase (une enzyme marqueur des cellules dopaminergiques) pour le côté dans lequel l’injection a été faite (ipsilatéral) et celui pour lequel aucune injection n’a été faite (contralatéral). (b) et (d) : Test quantifiant l’utilisation de la patte avant chez les souris. Adapté de (Peelaerts et al., 2015)

Une étude en 2019 a été réalisée sur les capacités de propagation des fibres F et R dans un réseau de neurone en culture dans un dispositif microfluidique (Gribaudo et al., 2019). Il a été observé que les fibres F et R étaient transportées de neurone à neurone, pouvaient recruter des α -syn solubles endogènes et ainsi se propager dans les cultures neuronales. De nouveau, les résultats indiquent que les fibres R induisent l’accumulation de l’ α -syn phosphorylée dans les neurones avec plus d’efficacité que les fibres F, ce qui est en accord avec les observations précédemment réalisées (Peelaerts et al., 2015).

C. Des synucléinopathies distinctes ayant pour origine des conformations d’ α -synucléine différentes : Une nouvelle hypothèse

L’ensemble de ces résultats ont conduit l’équipe de Ronald Melki et d’autres groupes à proposer une hypothèse : l’existence des différentes synucléinopathies (MP, AMS, DCL) pourrait être expliquée par le fait que ces pathologies sont dues à des « souches » différentes de fibres. Ces différentes souches auraient des capacités de propagation distinctes dans le cerveau, liées à leurs différences structurales. Cette hypothèse est supportée par de nouveaux résultats récents.

La PMCA « protein misfolding cyclic amplification » est une technique qui permet de multiplier *in vitro* par des cycles d’amplification successifs des formes agrégées prioniques (Saborio et al., 2001). Cette technique a été adaptée avec succès en 2019 pour la détection de formes agrégées d’ α -syn dans des échantillons de patients (Fenyi et al., 2019). La PMCA a été de nouveau utilisée avec succès dans une étude très récente, dans laquelle plusieurs nouveaux types de fibres d’ α -syn ont été isolés par PMCA à partir d’homogénats de cerveaux de patients souffrant la MP, d’AMS ou de DCL (Van der Perren et al., 2020). Les nouvelles fibres obtenues ont des formes différentes. Des essais de protéolyse limitée ont mis en évidence que les souches obtenues des patients souffrant de MP ou d’AMS se ressemblaient et ressemblaient plus à la fibre de type R tandis que les fibres issues des patients souffrant de DCL avaient un profil ressemblant plus à la fibre F. Ces souches ont été ensuite inoculées dans la SN de rat en même temps que des rAAV surexprimant la protéine α -syn. Les fibres issues de l’AMS sont

celles qui ont induit un plus grand déficit moteur. Des lésions au niveau du striatum ont été observées pour les fibres issues des 3 pathologies, celles issues de l'AMS présentant les pertes les plus fortes. Enfin, les dépôts d' α -syn étaient plus abondants lorsque les rats étaient injectés avec les fibres issus de patient souffrant d'AMS. Ces observations *in vivo* sont cohérentes avec les observations cliniques : l'AMS étant une pathologie très agressive.

D. Structures atomiques des conformations de fibres d' α -syn

La résolution de la structure des fibres amyloïdes présentes chez les patients permettrait aux chercheurs de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les fibres peuvent être toxiques et se propager. Cela permettrait également de comprendre par quels mécanismes différentes conformations de fibres pourraient donner lieu à des synucléinopathies distinctes.

Ce n'est que depuis quelques années qu'il est techniquement possible de résoudre la structure d'une fibre amyloïde hélicoïdale à la résolution atomique. La cryo-microscopie électronique permet l'observation par microscopie électronique en transmission des fibres amyloïdes congelées. Le traitement de ces images haute résolution avec des logiciels adaptés au traitement des fibres hélicoïdales permet de calculer des cartes de densité électronique pour ensuite réaliser un modèle atomique tridimensionnel très précis de la structure des fibres.

Plusieurs structures de fibres d' α -syn produites *in vitro* ont été résolues, et certaines d'entre elles sont présentées dans la Figure 12-A. On peut observer que chaque fibre est en fait composée de deux filaments symétriques en interaction, chacun constitué de répétitions de protéine α -syn repliées en feuillets- β .

Trois structures différentes ont été trouvées pour le polymorphe « 1a ». La structure 6cu7 a été résolue en 2018 par Li et son équipe (Li et al., 2018a), la 6a6b par une autre équipe (Li et al., 2018b), et la 6h6b par Guerrero-Ferreira et son équipe (Guerrero-Ferreira et al., 2018). Ces trois structures sont assez similaires et présentent de légères variations entre elles. La structure du polymorphe 1b, résolue en 2018 par Li et son équipe (Li et al., 2018a) est très différente de celles des structures du polymorphe 1a, tant au niveau du repliement des protéines α -syn que des sites d'interaction entre les deux filaments.

Les polymorphes 2a et 2b correspondent à deux structures différentes retrouvées dans les fibres F. Ces structures ont été résolues en 2019 par Guerrero-Ferreira et son équipe en 2019 (Guerrero-Ferreira et al., 2019). On peut remarquer que pour ces deux conformations, les protéines α -syn sont repliées de la même manière. Néanmoins, l'interaction entre les deux filaments se fait à des sites différents. Les structures des fibres R, 65 et 91, elles, n'ont pas encore été résolues.

Actuellement seul un travail reporte la résolution précise par cryo-microscopie électronique de la structure de fibre d' α -syn issues de patients atteints de synucléinopathies. Schweighauser et son équipe ont identifié deux structures distinctes de fibres d' α -syn à partir d'un échantillon de 5 patients souffrant d'AMS (Figure 12-B) (Schweighauser et al., 2020). Les filaments de type 1 ont été retrouvés chez les patients 1 à 4, tandis que les filaments de type 2

ont été retrouvés chez les patients 1, 2 et 5. Ces fibres issues de patients sont aussi composées de deux filaments en interaction constitués de répétitions de protéine α -syn repliées en feuillets- β . Contrairement aux fibres produites *in vitro*, les fibres issues de patients sont asymétriques.

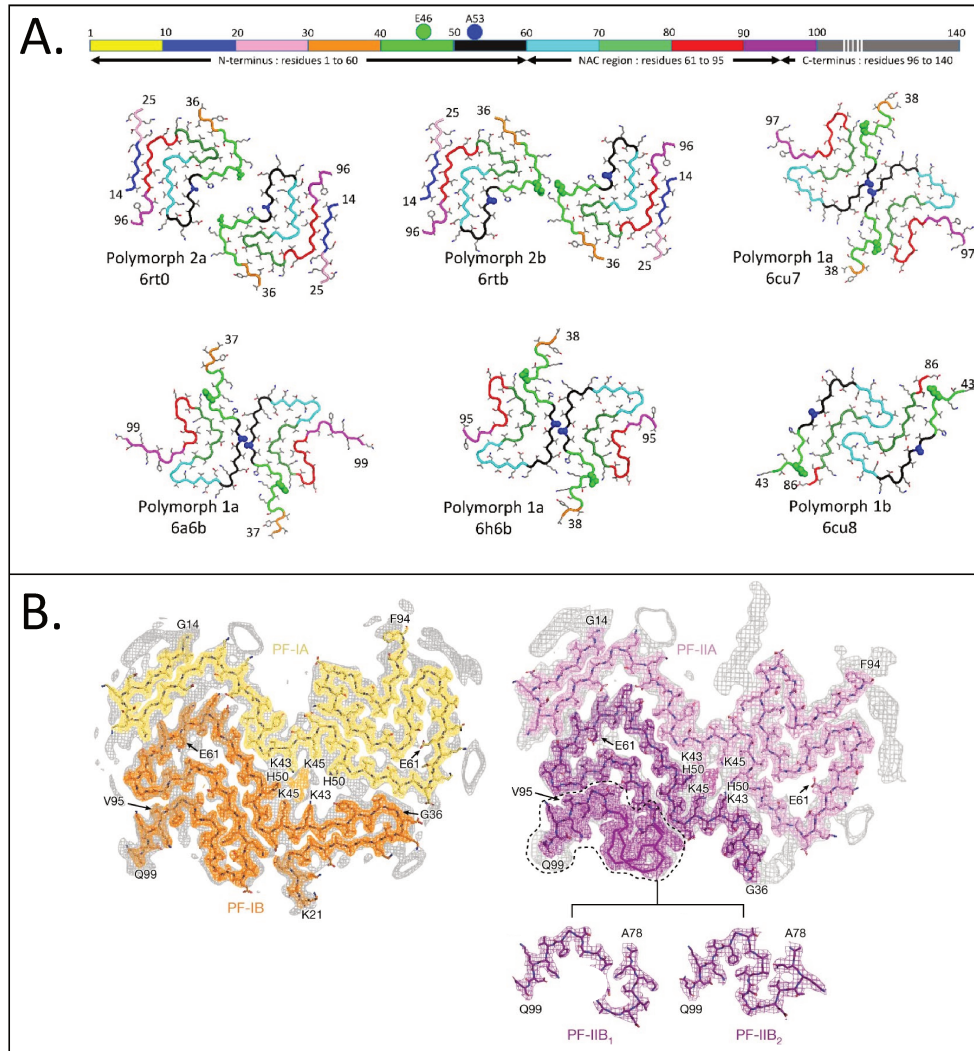


Figure 12 – Exemple de structures résolues de différentes conformations de fibres d' α -synucléine. A – comparaison des différents polymorphes 1a, 1b, 2a et 2b représentés en alternance de couleurs afin de distinguer l'emplacement des segments dans les différentes structures. Les résidus E46 et A53 sont montrés en vert et bleu respectivement. Chaque code d'accès à la PDB (Protein Data Bank) est donné à côté de chaque structure. Image issue de (Guerrero-Ferreira et al., 2019). B – Structures des fibres de type 1 et 2 retrouvées dans des échantillons de 5 patients atteints de d'AMS. On peut observer dans la structure de type 2, deux structures différentes (nommées PF-IIB₂) retrouvées pour le segment allant du résidu A78 au Q99. Adapté de (Schweighauser et al., 2020)

Il existe donc une grande variabilité des structures adoptées par l' α -syn et des différences de conformations importantes entre les fibres produites *in vitro* et celles existant chez les patients atteints de synucléinopathies. Les fibres produites *in vitro* constituent donc un matériel utilisable pour des études biochimiques *in vitro* qui nécessiteront leur validation sur des fibres issues de patients.

IV. Les différents ligands existants pour la détection d'α-synucléine

Un grand nombre de ligands pouvant interagir avec l'α-syn ont été décrits. Une attention particulière a été portée au développement de ligands pouvant reconnaître spécifiquement les formes agrégées pathologiques de l'α-syn, et les distinguer des formes monomériques natives.

En biologie, un ligand est une molécule qui se lie de manière réversible à une macromolécule par des interactions moléculaires dites « faibles », telles que les liaisons ioniques, les liaisons hydrogènes et les forces de van der Waals (Du et al., 2016). L'affinité d'un ligand pour sa cible peut être évaluée en mesurant sa constante de dissociation ou constante d'affinité nommée K_d qui correspond à la concentration nécessaire en ligand à l'équilibre pour occuper 50% des sites récepteurs sur la quantité de molécule cible totale présentée. Plus la liaison entre deux molécules est forte, plus le ligand est apte à saturer ces sites à une faible concentration, et donc plus le K_d est faible (Craig, 2010).

Dans le domaine de la biologie, les ligands sont souvent utilisés pour la détection des molécules auxquels ils se lient. Outre l'affinité pour sa cible, il est important de vérifier qu'un ligand soit spécifique, c'est-à-dire qu'il ait le moins d'affinité possible pour d'autres molécules. Cela est particulièrement important si on veut utiliser le ligand pour détecter la molécule cible dans un mélange de composés. D'un point de vue pratique, il est également important de prendre en compte son coût et la facilité avec laquelle il peut être couplé à un système de détection qui permettra de détecter un signal lorsque le ligand entre en interaction avec sa cible.

Actuellement deux types de ligands sont particulièrement utilisés pour détecter la protéine α-syn : des ligands chimiques, et plus particulièrement la Thioflavine-T (ThT), et des anticorps. Un échantillon des principaux ligands utilisés est présenté dans le Tableau 2.

A. Ligand chimique aux multiples utilisations : La Thioflavine T

1) Présentation de la Thioflavine T

La Thioflavine-T (ThT) est une molécule fluorescente qui, depuis sa première description en 1959, est devenue un ligand « étalon » largement utilisé pour la coloration sélective de fibrilles amyloïdes *ex vivo* et *in vitro*. La fluorescence de cette molécule augmente fortement lorsqu'elle se lie aux fibrilles amyloïdes, comme par exemple les fibres d'Aβ et les fibres d'α-syn (Groenning, 2010).

La ThT a été utilisée pour la première fois en 1959 pour la coloration de fibre amyloïde dans des coupes histologiques (Vassar and Culling, 1959). Depuis 1989, elle a également été utilisée pour la détection et la quantification *in vitro* de fibre amyloïde (Naiki et al., 1989). Elle est notamment utilisée pour mesurer la formation *in vitro* de fibres amyloïdes, comme les fibres d'Aβ (LeVine, 1993) et les fibres d'α-syn (Hashimoto et al., 1998).

La ThT est constituée d'une benzylamine et d'un cycle benzathiole reliés par une liaison carbone-carbone. Ces deux anneaux peuvent tourner librement l'un par rapport à l'autre lorsque la molécule est en solution (Figure 13-A). La rotation libre de ces anneaux entraîne l'atténuation de tout état excitation généré par des photons. Ainsi, lorsqu'elle n'est pas liée à une fibre amyloïde les propriétés de fluorescence de la ThT sont faibles. Cependant, lorsque la ThT se lie aux fibres amyloïdes, la rotation des deux anneaux est alors immobilisée et, par conséquent, cette molécule devient fluorescente (Figure 13 -B). Dans cette conformation liée à une fibre amyloïde, lorsque la ThT est excitée par une lumière avec une longueur d'onde aux alentours de 450 nm, elle peut émettre un signal fluorescent avec une longueur d'onde maximale proche 482 nm (Biancalana and Koide, 2010).

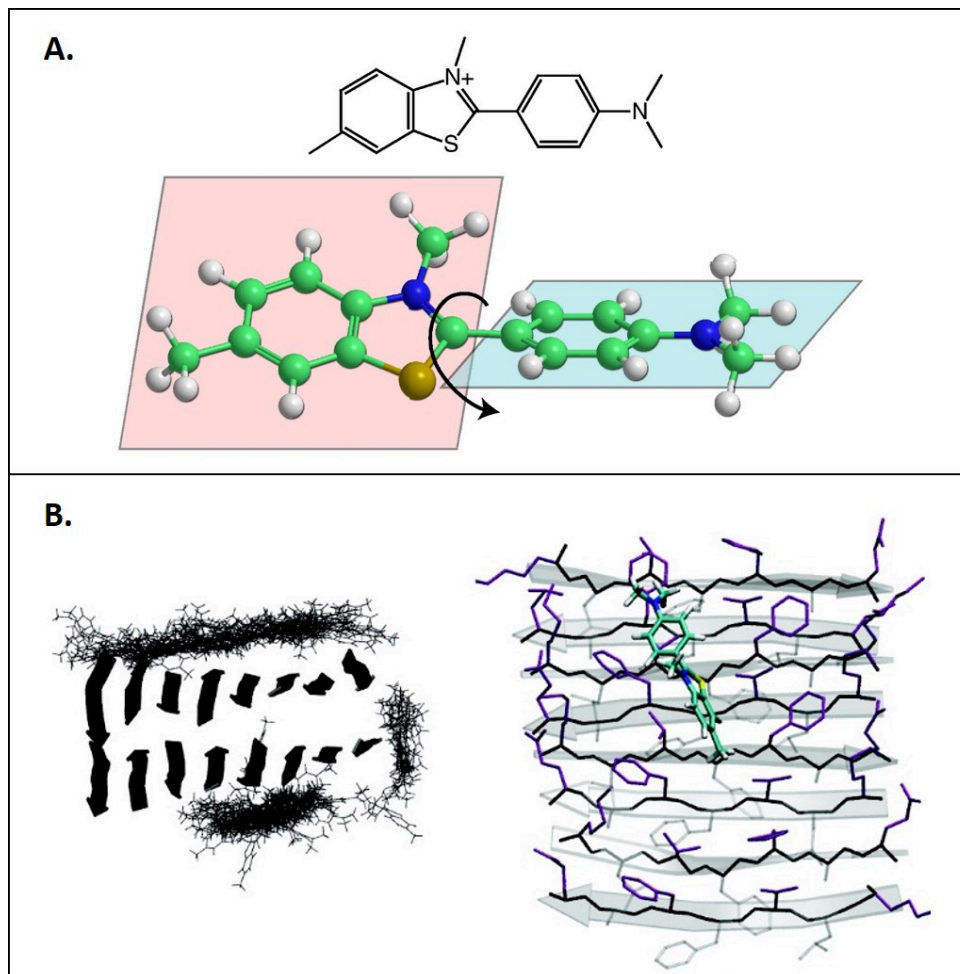


Figure 13 - Un ligand chimique de l' α -syn : La Thioflavine T (ThT). A – Structure chimique de la ThT (en haut). Représentation des deux segments plans de la ThT qui sont en rotation l'un par rapport à l'autre (en bas). Adapté de (Biancalana and Koide, 2010). B – Simulation de la liaison de molécules de ThT à une protofibrille ayant une structure en feuillet β et composée de protéines de séquence KLFFAE. A gauche : Liaison de plusieurs molécules de ThT (montrées en lignes pleines) à la protofibrille (montrée en dessin sous forme de flèches). A droite : Représentation de la liaison d'une molécule de ThT à la protofibrille. Les chaînes latérales de surface sont représentées en violet, et les chaînes latérales cachées sont grises. Des flèches représentent le sens de chaque feuillet- β . Les éléments H, O, C et S de la molécule de ThT sont en blanc, rouge, cyan et jaune. Adapté de (Wu et al., 2007).

L'affinité de la ThT varie selon les fibres amyloïdes. Cependant, bien qu'il y ait des tendances générales, il n'y a pas de consensus dans la littérature concernant l'affinité précise de la ThT pour chaque type de fibre. En effet, les protocoles de formation de fibre *in vitro* à partir de monomère diffèrent suivant les laboratoires. Les fibres obtenues peuvent donc avoir des formes différentes qui pourront avoir des affinités différentes pour la ThT. De plus, la mesure de l'affinité entre deux molécules varie en fonction des conditions salines et du pH, les résultats peuvent donc également différer en fonction des choix des tampons utilisés.

Ainsi, le K_d des fibres d'A β (1-42) pour la ThT a été calculé à 498 nM à pH7.4 (Maezawa et al., 2008). Le K_d de la ThT pour les fibres d' α -syn a été mesuré à 588 ± 2 nM à pH 7 et 948 ± 271 nM à pH7.4 (Ye et al., 2008; Yu et al., 2012) (Tableau 2).

Bien que la ThT soit le ligand chimique le plus largement utilisé pour la détection de l' α -syn, d'autres ligands chimiques sont aussi connus, comme par exemple le PIB (composé Pittsburgh B) (Ye et al., 2008) et le rouge congo (Conway et al., 2000). Comme la ThT, ces composés reconnaissent les fibres amyloïdes formées à partir de différentes protéines et ils ne sont donc pas spécifique de l' α -syn.

2) Techniques et méthodes utilisant la ThT pour la détection des formes agrégées

La ThT a été utilisée dans des tests ultrasensibles d'amplification de formes agrégées de protéines permettant de détecter les agrégats de protéines mal repliés : l'amplification cyclique de protéines mal repliées (« PMCA » - Protein-Misfolding Cyclic Amplification) et la conversion induite par sonication en temps réel (« RT-QuIC » - Real-Time Quaking-Induced Conversion). Ces deux techniques ayant été utilisées avec succès pour le diagnostic des maladies à prions, elles ont été récemment adaptées pour la détection des formes agrégées de l' α -syn dans des échantillons de patients atteints de synucléinopathies (Paciotti et al., 2018). Actuellement, seules quelques études avec un petit nombre d'échantillons ont été réalisées afin d'éprouver la fiabilité diagnostique des techniques de PMCA et de RT-QuIC : ils ont montré que ces techniques détectaient les synucléinopathies avec sensibilité et une spécificité très élevée, et ce même au stade préclinique. Ainsi, les méthodes de la PMCA et de la RT-QuIC semblent avoir un bon potentiel dans la détection au stades précoces de personnes susceptibles de développer des synucléinopathies.

Les techniques RT-QuIC et PMCA sont basées sur le même principe : l'amplification des agrégats de protéines mal repliées présentes dans des échantillons de patients, en utilisant leur propriété d'élongation prionique. Les échantillons des patients sont incubés dans une solution tampon contenant des formes natives d' α -syn monomériques. Si des agrégats sont présents, ils s'allongent selon un mécanisme de type prionique en recrutant à leur extrémité les monomères. En introduisant une étape d'agitation (pour la RT-QuIC) ou de sonication (pour la PMCA), les agrégats allongés peuvent être fragmentés pour générer un plus grand nombre d'agrégats. Les cycles d'incubation/allongement et de fragmentation sont ainsi répétés plusieurs fois, ce qui permet d'obtenir une amplification exponentielle des agrégats initialement présents dans les échantillons. Cette amplification progressive des agrégats est

suivie généralement par fluorescence à l'aide de la ThT. La vitesse d'augmentation de la fluorescence de la ThT étant proportionnelle à la quantité d'agrégat initialement présente, ces techniques peuvent permettre de déterminer la quantité d'agrégat initialement présente dans l'échantillon.

Plusieurs essais de détection de synucléinopathies par RT-QuIC ont été réalisés (Fairfoul et al., 2016; Sano et al., 2018; Groveman et al., 2018). Ainsi, Groveman et son équipe ont mené une étude sur des échantillons de liquide céphalo-rachidien provenant d'un groupe composé de 29 patients souffrant de synucléinopathies (12 de la MP, et 17 de DCL) et de 31 personnes contrôles (dont 16 atteints de la MA). Presque tous les échantillons de liquide céphalo-rachidien de synucléinopathies (27 sur 29) ont donné un résultat de RT-QuIC positif, alors qu'aucune amplification n'a été détectée dans les témoins. Le test effectué avait donc une sensibilité de 93% et une spécificité de 100%.

D'autres essais ont été effectués par PMCA (Roostae et al., 2009; Herva et al., 2014; Jung et al., 2017; Shahnawaz et al., 2017; Becker et al., 2018; Fenyi et al., 2019). Par exemple, Shahnawaz et son équipe ont mené une étude à partir d'échantillons de liquide céphalo-rachidien de 193 personnes. 96 de ces personnes souffraient de synucléinopathies : MP n = 76, DCL n = 10, AMS n = 10. Le groupe contrôle était composé de 3 types de personnes : 65 souffrants de troubles neurologiques divers (épilepsie, dystrophie musculaire ...), 14 personnes diagnostiquées comme souffrant de la MA et 18 personnes affectées par d'autres MN (maladie de Huntington, sclérose latérale amyotrophique...). Concernant les patients atteints de synucléinopathies : 67 des 76 patients souffrant de la MP, ont eu des résultats positifs de PMCA sur l' α -syn. Tous les patients souffrant de DCL, et 8 cas des 10 cas d'AMS étaient aussi positifs. Pour les groupes contrôles : 61 patients des 65 (94%) affectés par d'autres troubles neurologiques étaient négatifs. De manière intéressante, deux des patients qui avaient eu des résultats positifs ont été par la suite diagnostiqués comme souffrant de la MP quelques années après la collecte d'échantillons : la PMCA semble donc pouvoir identifier des patients au stade prodromique. Sur les 14 patients souffrant de la MA, 5 ont montré des résultats positifs. Néanmoins, ces résultats ne sont pas forcément des faux positifs, car les inclusions d' α -syn sont parfois observées chez les personnes souffrant de la MA. Enfin, 16 des 19 patients atteints d'autres MNs ont eu des résultats négatifs. Les auteurs de ce travail ont calculé la sensibilité et la spécificité de cette étude en excluant les patients atteints de la MA de l'analyse. La sensibilité était de 88,5% pour la MP, 100% pour la DCL et 80% pour l'AMS. La spécificité était de 94%, atteignant 97% en considérant les patients atteints de troubles neurologiques, mais pas neurodégénératifs.

Ainsi, la PMCA et la RT-QuIC sont deux techniques de détection très prometteuses. Des résultats récents, publiés par l'équipe de Ronald Melki ont aussi mis en évidence que les fibres d' α -syn obtenues par PMCA sur des échantillons de patients de différentes synucléinopathies avaient des conformations différentes (Van der Perren et al., 2020). Il semblerait donc que la PMCA conserve les conformations des fibres des échantillons des patients. Ainsi, il serait possible de coupler l'usage de la PMCA à une caractérisation des fibres obtenues en utilisant des ligands spécifiques de conformation. Ceci permettrait de diagnostiquer chez les patients

souffrant de MN non seulement s'il s'agit d'une synucléinopathie, mais en plus de déterminer quelles conformations de fibres sont présentes chez eux.

B. Ligands biologiques : Anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines complexes, produites par le système immunitaire adaptatif pour détecter et neutraliser les agents pathogènes de manière spécifique. On nomme « antigène », toutes les substances que le système immunologique d'un individu reconnaît comme étrangère. Les anticorps peuvent être divisés en deux catégories : les anticorps monoclonaux, qui se lient à un seul épitope, et les anticorps polyclonaux qui sont des mélanges d'anticorps reconnaissant plusieurs épitopes sur le même antigène. *In vivo*, la réponse immunitaire est généralement polyclonale, mais les anticorps utilisés comme outils moléculaires dans les laboratoires sont généralement des anticorps monoclonaux.

Les anticorps ont de fortes affinités pour leur molécule cible (K_d de l'ordre du pM au nM). Ils sont aujourd'hui principalement produits par des techniques de génie génétique. La technique la plus utilisée pour obtenir des anticorps monoclonaux est celle de l'immunisation (Kim et al., 2014). L'antigène (ou la molécule ciblée) est injecté à un animal de laboratoire (souris ou rat principalement), qui par réaction immunitaire produit des anticorps contre cet antigène. L'animal est ensuite sacrifié et on récupère alors les cellules B du système immunitaire qui produisent les anticorps. Ces cellules B sont ensuite fusionnées avec des cellules cancéreuses appelées myélomes, ce qui permet d'obtenir un « hybridome » capable de se multiplier rapidement pour produire un clone qui sécrète les anticorps exprimés chez les cellules B. Les clones et les anticorps qu'ils sécrètent peuvent ensuite être testés afin de sélectionner des anticorps ayant la meilleure spécificité de reconnaissance pour l'antigène/molécule d'intérêt.

Les anticorps sont de très bons ligands et sont donc couramment utilisés pour la détection et la quantification des protéines. Ils sont des outils très utiles pour les travaux de recherche fondamentale, mais aussi pour les applications biomédicales de diagnostic. Ainsi, les anticorps sont communément utilisés pour : localiser une protéine au sein de tissus (immunohistochimie), pour quantifier une protéine par immunodosage ou ELISA, comme réactif d'affinité pour la purification de protéines, pour détecter une protéine dans des échantillons (western blot), pour concentrer un antigène (immunoprécipitation), et pour neutraliser un antigène. Une dernière application est aussi actuellement en voie de développement : l'utilisation des anticorps comme inhibiteur, on parle alors d'anticorps thérapeutiques (Chatterjee and Kordower, 2019).

1) Anticorps non-spécifique de forme

De nombreux anticorps ont été générés contre la protéine α -syn. Des anticorps ont d'abord été générés contre des corps de Lewy purifiés (Baba et al., 1998), puis contre des protéines d' α -syn recombinantes (Crowther et al., 1998; Giasson et al., 2000b). Dans cette partie, j'ai choisi de présenter leurs caractéristiques communes principales en prenant pour exemple les anticorps les plus utilisés.

Nom de la molécule	Affinité pour l' α -syn	Spécificité de « protéine »	Spécificité de « forme » (monomère, oligomère, fibre)	Références
<i>Exemple de ligand chimique le plus couramment utilisé</i>				
Thioflavine-T (ThT)	$K_d = 588 \pm 2$ nM (Ye et al., 2008) $K_d = 948 \pm 271$ nM (Yu et al., 2012)	× Reconnait tous les type de fibres amyloïdes	✓ Ne reconnaît que les fibres amyloïdes à feuillet β	(Vassar and Culling, 1959)
<i>Exemple d'anticorps non spécifiques de forme les plus courant</i>				
Syn-1	ND	✓ Spécifique de l' α -syn	× Reconnait toutes les formes	(Perrin et al., 2003; Choi et al., 2006)
5G4	ND	✓ Résidus 46 à 53 de l' α -syn	× Reconnait toutes les formes	(Kovacs et al., 2012)
nSyn8, nSyn14 et nSyn24	ND	✓ Spécifiques de la forme nitrée de l' α -syn	× Reconnait toutes les formes	(Giasson et al., 2000a)
81a, EP1536Y, MJF-R13, et pSyn#64	ND	✓ Spécifiques de l' α -syn phosphorylée en position 129	× Reconnait toutes les formes	(Delic et al., 2018)
<i>Anticorps spécifiques de forme existants pour l'α-syn</i>				
mAb49/G	CI_{50} (oligomère) = 0.7 nM CI_{50} (monomère) = 80 nM	ND	Généré contre les oligomères α -syn - HNE ✓ Inhibe l'agrégation de l' α -syn	(Näsström et al., 2011)
mAb38F mAb38E2	mAb38F : CI_{50} (oligomère) = 3 nM CI_{50} (monomère) = 1 μ M mAb38E2 : CI_{50} (oligomère) = 10 nM CI_{50} (monomère) = 1.5 μ M	✓ Ne reconnaissent pas les protéines A β et Tau	Générés contre les oligomères α -syn - HNE ✓ Reconnait les formes agrégées	(Fagerqvist et al., 2013)
Syn9029-03 Syn75015	ND	✓ Ne reconnaissent pas les protéines A β et Tau	✓ Reconnait les formes agrégées ✓ Syn9029-03 = spécifique « fibre de souche B » ✓ Syn75015 = spécifique « fibre de souche A »	(Guo et al., 2013; Covell et al., 2017)
Syn9048	ND	✓ Ne reconnaît pas les protéines A β et Tau	✓ Reconnait les formes agrégées uniquement; Inhibe l'agrégation de l' α -syn	(Fagerqvist et al., 2013)
Syn-F1 Syn-F2 Syn-O1 Syn-O2 Syn-O3 Syn-O4	Syn-O2 : CI_{50} (monomère) = 0.12 nM CI_{50} (fibre) = 3.283 μ M K_d (fibre) = 96 pM	✓ Ne reconnaissent pas les protéines β et γ -synucléine, amyloïde- β et Tau.	✓ Reconnait les formes agrégées uniquement	(Vaikath et al., 2015)
<i>Aptamères sélectionnés contre l'α-syn</i>				
M5-15	ND	✓ Ne reconnaît pas A β	× Reconnait toutes les formes	(Tsukakoshi et al., 2010)
T-SO508 T-SO530	K_d (oligomère) = 68 nM K_d (oligomère) = 63 nM	× Reconnait les oligomères d'A β	✓ Meilleure affinité pour les oligomères que pour les monomères et les fibres d' α -syn	(Tsukakoshi et al., 2012)
F5R1 F5R2	K_d (fibre) = 68 nM K_d (fibre) = 63 nM	✓ Ne reconnaissent pas A β	✓ F5R2 n'a pas d'affinité pour les formes monomériques (F5R1 n'a qu'une affinité légère pour celle-ci)	(Zheng et al., 2018; Ren et al., 2019)

Tableau 2 - Comparaison des différents ligands déjà existants pour α -synucléine. Certaines études plutôt que de mesurer l'affinité d'un anticorps pour sa cible de manière directe (mesure du K_d), mesure celle-ci de manière indirecte en mettant cet anticorps en compétition entre sa cible d'intérêt et une autre, pour laquelle son interaction est quantifiée. Dans ce cas-là on mesure la concentration inhibitrice médiane (CI_{50}), qui correspond à la concentration de la cible d'intérêt nécessaire pour inhiber à 50% la liaison de l'anticorps à l'autre cible (Aykul and Martinez-Hackert, 2016). ND : non déterminé

Même si les anticorps sont souvent générés contre la protéine α -syn recombinante entière, ils reconnaissent généralement un épitope plus restreint sur la protéine. Ainsi, l'anticorps Syn-1, très utilisé dans les laboratoires, a été décrit dans un premier temps comme reconnaissant les résidus 15-123 de l' α -syn humaine. Néanmoins, des études ultérieures ont montré que cet anticorps était en réalité dirigé contre les résidus 91-99 (Perrin et al., 2003). De même l'anticorps 5G4, qui a été généré par immunisation des souris avec un peptide correspondant aux résidus 44 à 57 de l' α -syn, reconnaît en fait l'épitope 46-53 (Kovacs et al., 2012).

Du fait des grandes similitudes entre les séquences de l' α -syn des différentes espèces, les anticorps développés contre l' α -syn d'une espèce peuvent souvent reconnaître celle d'une autre espèce. Ainsi, l'anticorps Syn-1, au départ développé contre l' α -syn humaine, reconnaît aussi l' α -syn de rat car les séquences sont les mêmes au niveau de la région reconnue par cet anticorps (Perrin et al., 2003).

Les anticorps dirigés contre l' α -syn native détectent à priori toutes les formes (natives ou agrégées) de cette protéine dans le cerveau, y compris la protéine endogène trouvée dans le cerveau de patients sains, et ne peuvent pas être de bons marqueurs des formes pathogènes agrégées de l' α -syn.

Certains anticorps ont été développés contre des formes de la protéine α -syn avec des modifications post-traductionnelles. Ainsi, les anticorps nSyn8, nSyn14 et nSyn24, reconnaissent de manière spécifique la forme nitrée de l' α -syn. Ces anticorps ne reconnaissent pas la forme native non modifiée de l' α -syn. Ces anticorps, en révélant seulement la forme nitrée de la protéine α -syn, ont permis de mettre en évidence par immunohistochimie que les formes nitrées de l' α -syn étaient retrouvées en grande quantité dans les corps de Lewy (Giasson et al., 2000a). D'autre part, il a été mis en évidence que les formes phosphorylées favorisaient l'agrégation et l'accumulation de la protéine α -syn : ainsi, il a été reporté que dans les cerveaux de patients atteints de la MP ou de la DCL, 90% des protéines α -syn étaient phosphorylées au niveau du résidu S129 (Oueslati, 2016). Beaucoup d'anticorps ont donc été développés contre la protéine α -syn phosphorylée en position 129, comme par exemple les anticorps 81a, EP1536Y (IgG de lapin), MJF-R13 (IgG de lapin), et pSyn#64 (IgG de souris). Des études d'immunohistochimie ont mis en évidence que l'anticorps EP1536Y avait la meilleure sensibilité et la meilleure spécificité pour la protéine α -syn phosphorylée en position 129 (Delic et al., 2018).

2) Anticorps spécifique de forme

Des anticorps reconnaissant spécifiquement les formes agrégées ont également été générés.

En 2011, une équipe a généré un anticorps nommé mAb49/G contre des oligomères d' α -syn formés *in vitro* (Näsström et al., 2011). Ces oligomères ont été formés par une incubation longue d' α -syn monomériques avec du 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), qui est une molécule impliquée dans les synucléinopathies. En effet, un grand nombre de protéines modifiées par des HNE ont été observées dans les zones touchées des cerveaux de patients

atteint de synucléinopathies. De plus, des études ont aussi montré que les molécules de HNE induisaient la conversion des α -syn monomériques en oligomères (Näsström et al., 2009). Des tests sur des cultures cellulaires ont montré que l'anticorps mAb49/G était capable d'être internalisé et d'inhiber l'oligomérisation à l'intérieur de cellules (Näsström et al., 2011). mAb49/G est donc un candidat intéressant pour une éventuelle piste thérapeutique. La même équipe a généré une deuxième fois des anticorps contre des oligomères HNE par immunisation de souris (Fagerqvist et al., 2013). Les anticorps obtenus nommés mAb38F et mAb38E2, ont été capables de mettre en évidence par immunohistochimie les corps de Lewy dans les cerveaux des patients atteints de MP ou de DCL. L'anticorps mAb38F a été utilisé dans la même étude pour faire un test ELISA en sandwich. Ce test a permis de détecter avec succès des oligomères et des fibres d' α -syn dans des extraits de cerveau de souris.

En 2015, une équipe a généré 6 anticorps reconnaissant spécifiquement les agrégats de la protéine α -syn mais pas sa forme native soluble (Vaikath et al., 2015). Ces anticorps ont été générés contre des fibres d' α -syn formées *in vitro*. Une étape de sélection des clones d'anticorps obtenus par immunisation a permis d'identifier quelles souches reconnaissent spécifiquement les fibres d' α -syn. Les 6 anticorps finalement retenus ont été nommés en fonction de leur préférence pour les oligomères « Syn-Os » ou bien pour les fibres matures « Syn-Fs » d' α -syn : Syn-F1, Syn-F2, Syn-O1, Syn-O2, Syn-O3 and Syn-O4. La caractérisation des anticorps par ELISA a permis de montrer que les anticorps avaient une très forte spécificité pour les fibres par rapport aux monomères, avec un ratio de l'ordre du millier, au contraire de l'anticorps Syn-1 qui reconnaît à la fois monomères et fibres. D'autres tests ont aussi montré que ces anticorps ne reconnaissent pas les autres protéines amyloïdes. Des analyses en immunohistochimie utilisant ces anticorps ont permis d'observer que ceux-ci avaient la capacité de révéler des agrégats et des neurites de Lewy de très petite taille chez des patients atteints de la MP ou de la DCL, et qui ne sont usuellement pas observables avec des anticorps habituels. L'anticorps Syn-O2 a été aussi utilisé pour construire un ELISA de type sandwich. Des tests avec ce dispositif ELISA ont permis de mettre en évidence un niveau plus important de formes oligomériques d' α -syn dans des lysats de cerveaux de patients atteints de DCL par rapport à des patients souffrant de MA ou à des personnes saines. Ces anticorps ont été par la suite utilisés pour détecter des agrégats de la protéine α -syn dans des modèles animaux de MNs (Kim et al., 2016; Sharrad et al., 2017; Duffy et al., 2018), mais aussi sur des biopsies de nerfs cutanés venant de personnes souffrantes de la MP (Donadio et al., 2018), et sur des coupes histologiques post-mortem de patients atteints de la MP et de DCL (Vaikath et al., 2019).

Une autre équipe a réussi à générer deux anticorps arrivant à distinguer deux conformations différentes de fibres d' α -syn formées *in vitro* (Guo et al., 2013; Covell et al., 2017). Ces conformations nommées « souche A » et « souches B », sont toutes les deux formées à partir d' α -syn monomériques tronquées (résidu 1 à 120). Les conditions d'obtention de ces deux conformations de fibres sont différentes, et les fibres obtenues ont des structures et des capacités de propagation différentes (Guo et al., 2013). Les anticorps Syn75015 et Syn9029-03 ont été générés respectivement contre les souches A et B. Des tests ELISA ont mis en évidence que ces deux anticorps reconnaissent chacun 3 fois mieux la souche contre

laquelle ils ont été générés que l'autre (Covell et al., 2017). Les deux anticorps ont été testés en immunohistochimie sur un groupe de 50 patients atteints de la MP. Le Syn7015 détecte à la fois les corps de Lewy et les neurites de Lewy, tandis que le Syn9029 détecte les corps de Lewy mais moins bien les neurites de Lewy.

La même équipe en 2020 a de nouveau produit de anticorps contre la conformation B de fibres d' α -syn (Henderson et al., 2020). Les anticorps ont été sélectionnés pour leur capacité à reconnaître de manière spécifique les fibres d' α -syn et à inhiber le recrutement des monomères par des fibres d' α -syn dans des cultures neuronales. Un anticorps a finalement été retenu : le Syn9048. Il a été montré que cet anticorps était plus efficace en immunohistochimie que l'anticorps Syn9029 précédemment sélectionné pour révéler les corps de Lewy. L'efficacité thérapeutique de cet anticorps a ensuite été testé *in vivo* sur des souris. Des fibres d' α -syn ont été injectées directement dans le striatum de souris, qui ont été ensuite traitées chaque semaine pendant 6 mois par une injection de l'anticorps Syn9048. Le Syn9048 n'a pas été capable d'atténuer ni les déficits moteurs, ni les pertes neuronales observées chez les souris dû à l'injection des fibres d' α -syn. Néanmoins, le niveau mesuré de dopamine dans le striatum était meilleur lorsque les souris avaient été traitées par l'anticorps Syn9029.

Même si des anticorps différenciant les formes monomériques des formes fibrillaires ont récemment été décrits, ils ne sont pas encore utilisés « en routine » dans les laboratoires. Les 6 anticorps publiés par Vaikath et son équipe en 2015, sont à priori les plus prometteurs puisqu'ils ont été utilisés avec succès en immunohistochimie sur des coupes de modèles animaux, mais aussi sur des échantillons de patients. Les études publiées par Guo, Covell et leur équipe et 2013 et 2017 sur les souches « A » et « B » de fibres d' α -syn montrent qu'il serait possible d'obtenir des anticorps différenciant des conformations différentes de fibres.

V. Présentation des aptamères, des ligands synthétiques novateurs

Les aptamères sont des oligonucléotides dont la structure tridimensionnelle leur permet d'interagir avec une molécule cible. Isolés par une méthode d'évolution dirigée, ils sont souvent considérés comme des « anticorps synthétiques ».

A. Le SELEX, un processus d'évolution dirigée pour la sélection d'aptamères

Les aptamères sont isolés *in vitro* par une méthode d'évolution moléculaire dirigée à partir d'une banque composée d'un grand nombre de séquences aléatoires. Les méthodes d'évolution moléculaires d'acides nucléiques ont émergées à partir des années 60 (Haruna and Spiegelman, 1965). Cependant, c'est à partir de 1990 qu'elles ont été considérablement améliorées par plusieurs équipes en combinant différentes avancées techniques en biologie moléculaire (synthèse chimique d'oligonucléotides, méthode de sélection *in vitro*, amplification par PCR) (Blackwell and Weintraub, 1990; Blackwell et al., 1990; Ellington and Szostak, 1990; Green et al., 1990; Pollock and Treisman, 1990; Robertson and Joyce, 1990; Thiesen and Bach, 1990; Tuerk and Gold, 1990).

Le terme « aptamère » a été proposé par Andrew D. Ellington et Jack W. Szostak en associant l'adjectif latin *aptus* qui signifie « adapter à » ou « apte à », avec le terme oligomère qui est une molécule caractérisée par une chaîne constituée d'un petit nombre de motifs monomères (les nucléotides) (Ellington and Szostak, 1990). La technique d'évolution moléculaire pour identifier les aptamères a été appelée SELEX (pour systematic evolution of ligands by exponential enrichment) par Graig Tuerk and Larry Gold (Tuerk and Gold, 1990).

1) Avant-propos sur la structure des acides nucléiques et des aptamères

Les oligonucléotides, à l'instar des protéines, ont une structure primaire résultant de l'enchaînement des acides nucléiques qui peut se replier pour adopter des structures secondaires, pouvant elle-même interagir entre elles pour former des structures tertiaires. La structure tridimensionnelle d'un oligonucléotide peut lui permettre naturellement d'interagir avec d'autres molécules. Il est aussi possible d'utiliser cette propriété pour créer ces ligands de manière synthétique. Ainsi, la méthode du SELEX permet d'isoler des séquences nommées aptamères dont la structure tridimensionnelle entre en interaction avec un molécule-cible.

a) Les nucléotides

Les oligonucléotides sont constitués d'une suite de nucléotides reliés par des liaisons phosphodiester entre le 5' et le 3' de leur ribose. Les nucléotides comprennent un groupement phosphate, un ribose, et une base pyrimidique ou purique. L'ARN se différencie de l'ADN par la présence d'un groupement hydroxyle en position 2' du sucre. Les bases purines sont l'adénine et la guanine, les bases pyrimidiques sont la cytosine, la thymine (pour l'ADN) et l'uracile (pour l'ARN). Les nucléotides ne sont pas des éléments figés et peuvent adopter de nombreuses conformations. En effet, l'orientation de la base et du phosphate peuvent varier par rapport à celle du sucre, et de nombreuses rotations sont possibles. Ceci est un paramètre important pour expliquer la grande diversité de structures que peuvent adopter les acides nucléiques.

Un autre paramètre important est le nombre d'interactions faibles que les nucléotides peuvent générer. Les nucléotides peuvent réaliser des liaisons hydrogènes, des liaisons électrostatiques par l'intermédiaire de leur groupement phosphate et de Van der Waals dans les interactions d'empilements entre plateaux des bases.

b) Structures secondaire et tertiaire adoptées par les oligonucléotides

Un certain nombre de motifs structuraux secondaires récurrents chez les acides nucléiques ont été identifiés, et peuvent être prédits à partir de la séquence primaire d'un oligonucléotide (Andersen, 2010).

Les tiges-boucles sont les structures les plus rencontrées. Les tiges sont composées de deux fragments d'oligonucléotides de séquences complémentaires, c'est-à-dire composées de bases pouvant s'apparier par une interaction de type « Watson-Crick ». La boucle fermant la

tige est composée de bases n'ayant pas de séquence complémentaire pouvant s'apparier (Figure 14 – A). Ces boucles peuvent adopter des structures tridimensionnelles particulières pour interagir avec une cible (Förster et al., 2012).

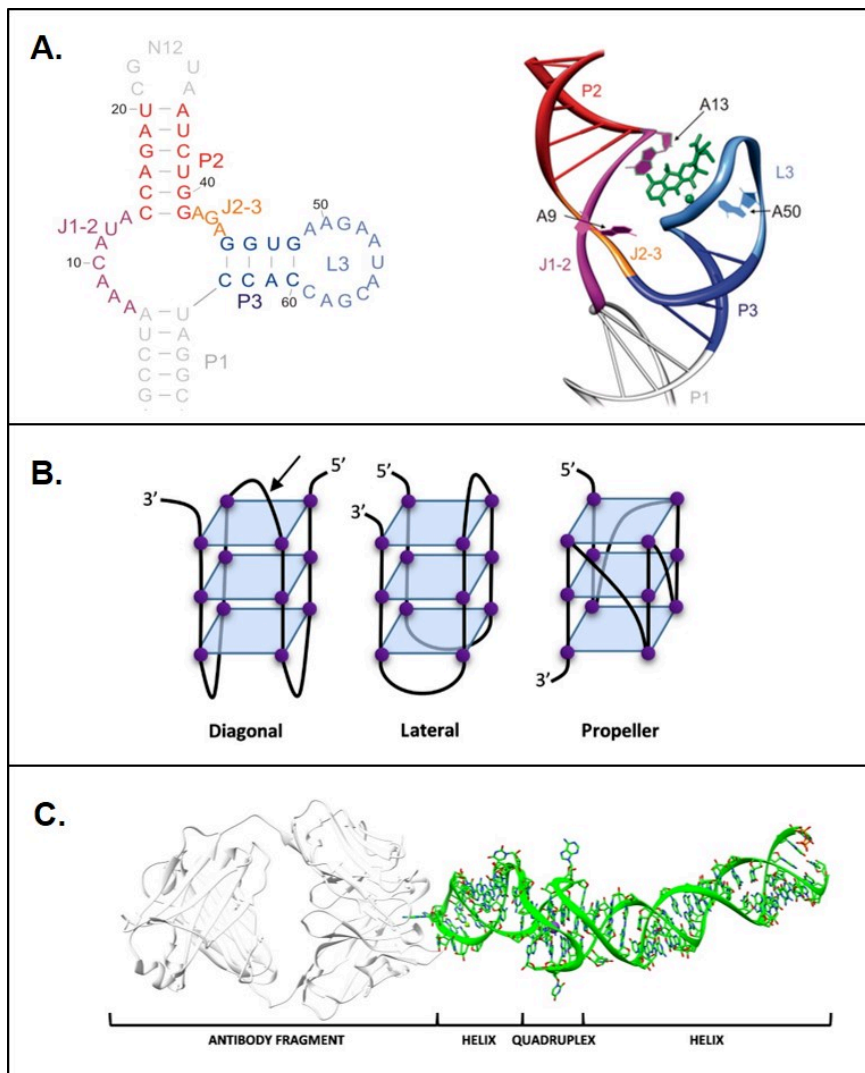


Figure 14 –Exemple de structures secondaires et tertiaires adoptées par les aptamères.

A – Présentation de la structure en tige-boucle adoptée par un aptamère anti-tétracycline. On peut observer sa structure secondaire en tige-boucle (gauche), et son repliement en 3D lui faisant adopter une structure tertiaire (droite) enveloppant la molécule de tétracycline. Les tiges P1-P3, leurs régions de jonction J1-2 et J2-3 ainsi que la boucle L3 sont colorées. La tétracycline est présentée en vert, et les atomes de magnésium en boule verte. Adaptée de (Förster et al., 2012). B- Exemple d'organisation des structures G-quadruplex. Les guanines sont représentées par des boules violettes. Les structures peuvent être ordonnées en diagonale (conformation aussi connue sous le nom de panier), latérale (aussi connue sous le nom de chaise) ou bien sous un modèle de type hélice. Adapté de (Lightfoot et al., 2019). C-Structure cristallographique d'un aptamère ARN nommé « Spinach » en complexe avec le fragment Fab d'un anticorps. Cet aptamère a une structure allongée contenant deux domaines hélicoïdaux séparés par un motif G-quadruplex. Le motif G-quadruplex et les nucléotides adjacents comprennent le site de liaison de l'aptamère à son ligand, un fluorophore. Adapté de (Lightfoot et al., 2019).

Les G-quadruplex sont un autre type de structure souvent rencontré chez les aptamères (Platella et al., 2017). Ce type de structures, à forme globulaire, se retrouve dans les séquences riches en G. Le cœur de la structure de type « G-quadruplex » est une tétrade de guanine : un arrangement plan cyclique de quatre guanines liées par des liaisons hydrogène. L'empilement de deux tétrades de guanine ou plus génère un motif G-quadruplex, qui est stabilisé par des cations hébergés dans la cavité centrale des tétrades de G (Figure 14 –B). Au sein d'un aptamères, différents types de structures peuvent se combiner (par exemple un motif G-quadruplex avec une tige boucle, voir Figure 14 –C).

2) Principe général du SELEX, un processus d'évolution dirigée pour la sélection d'aptamères

Le SELEX est une méthode d'évolution dirigée utilisée pour sélectionner un oligonucléotide capable de se lier à une molécule-cible. Depuis sa mise au point, le SELEX a permis d'isoler des aptamères contre une grande variété de cibles différentes : petites molécules (inorganique ou organique), des peptides, des protéines, des mélanges de molécule, des cellules, et parfois même des organismes entiers (Stoltenburg et al., 2007) (Cibieli et al., 2014; Civit et al., 2019). Cette méthode peut être également utilisée pour la sélection d'oligonucléotides ayant d'autres capacités, comme par exemple les ARN catalytiques appelés «ribozyme» (Green et al., 1990).

Cette technique a pour point de départ la synthèse chimique d'une population d'oligonucléotides qui contiennent une portion de séquence synthétisée de manière aléatoire (Figure 15 - A). Cette banque subit ensuite une itération de tours de sélection *in vitro* composés des mêmes étapes (Figure 15 - B): 1- la banque est incubée avec la molécule-cible, 2- les séquences s'étant liées à la cible sont sélectionnées lors d'une étape de séparation, 3- ces séquences sont ensuite amplifiées par PCR (ou RT-PCR et transcription *in vitro* pour l'ARN) pour obtenir une nouvelle banque enrichie en séquence ayant de l'affinité pour la cible. Cette nouvelle banque est ensuite utilisée comme point de départ pour un 2^{ème} tour de sélection *in vitro*, et ainsi de suite. Au fur et à mesure des tours de sélection la banque s'enrichit progressivement en séquence ayant une bonne affinité pour la cible (Bouvier-Muller and Duconge, 2018a). De manière empirique, l'opérateur peut décider d'augmenter la pression de sélection de manière à sélectionner les séquences répondant le mieux à la sélection. De plus, au cours des étapes d'amplifications, les polymérases peuvent introduire des mutations dans les séquences. Ces erreurs plutôt que d'être une contrainte, permettent d'augmenter la diversité de la banque. Les mutations sont ensuite elles-mêmes sélectionnées en fonction de leur capacité à répondre à la pression de sélection.

Le SELEX peut être considéré comme un processus d'évolution de type darwinien puisqu'il valide les principes fondamentaux de la théorie de l'évolution des espèces par sélection des individus les plus aptes, décrit par Charles Darwin : 1- Sélection : Seules les séquences les plus adaptées aux conditions de sélection pourront survivre, 2- Hérité : Seules les séquences ayant été sélectionnées peuvent être amplifiées, 3 - Variation : les polymérases peuvent induire des mutations lors de la réplication des séquences, ce qui donne alors de nouvelles séquences ayant de légères variations par rapport aux séquences initiales (Chauveau

et al., 2006). Si ces variations permettent une meilleure adaptation aux conditions de sélection imposées lors du SELEX, alors elles seront conservées et amplifiées dans la population des séquences.

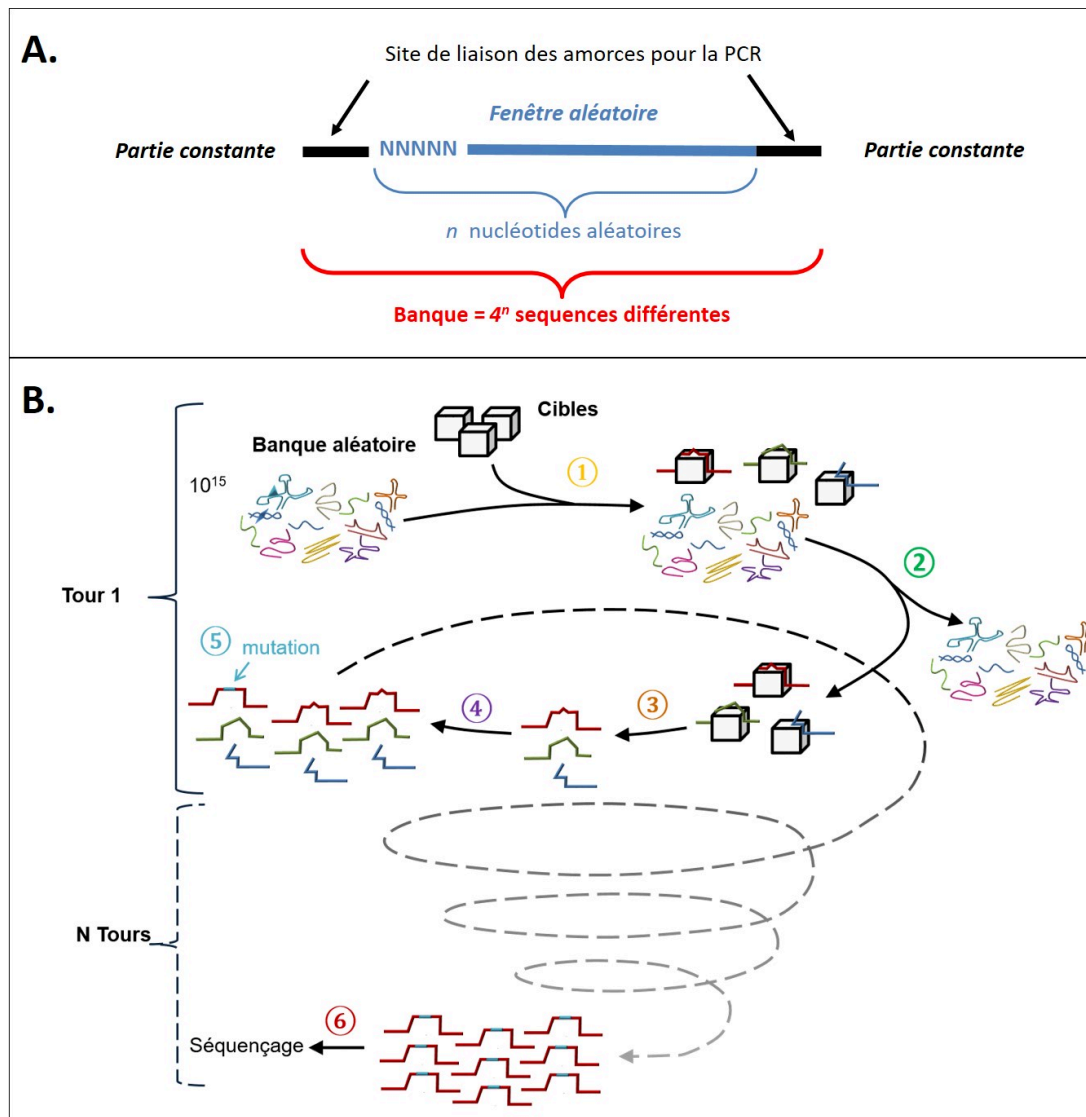


Figure 15 – Principe général du SELEX. A- Schéma d'une banque de nucléotide utilisée au départ d'un SELEX. La banque est généralement constituée d'une partie constante permettant l'amplification PCR et d'une partie aléatoire, à l'origine de la diversité des séquences au sein de la banque. B- Principe général de sélection des aptamères par SELEX. Une banque d'oligonucléotides aléatoire est incubée avec une cible (1). Lors de l'étape de séparation, les séquences qui se lient à la cible sont conservées, tandis que les autres sont éliminées (2). Les séquences sélectionnées sont ensuite extraites (3) et amplifiées par PCR (ou RT-PCR suivie d'une transcription in vitro pour les banques d'ARN) (4). Au cours de cette étape, des mutations peuvent apparaître (5). La nouvelle banque obtenue peut alors recommencer un nouveau cycle de sélection-amplification. Au cours des cycles successifs, les séquences ayant les meilleures affinités pour la cible sont amplifiées et peuvent être identifiées par séquençage (6) Adapté de (Bouvier-Muller and Duconge, 2018b).

A la fin du SELEX, on peut par séquençage déterminer quelles séquences se sont les mieux amplifiées lors de la sélection. Jusqu'à présent, la banque obtenue à l'issue du dernier tour de SELEX était tout d'abord clonée dans des bactéries, et une centaine de clones étaient ensuite séquencés afin de déterminer quelles séquences étaient les plus enrichies. Cette méthode a néanmoins pour inconvénient de devoir réaliser suffisamment de tours de sélection *in vitro* pour atteindre un niveau d'enrichissement significatif dans un si petit échantillon. De plus, la plupart du temps, ce type d'analyse était réalisé uniquement sur la banque issue du dernier tour de sélection et il était donc impossible d'avoir des informations sur l'évolution des séquences au cours des différents cycles de sélection. Récemment, l'utilisation du séquençage haut débit a permis de s'affranchir de ces inconvénients (Nguyen Quang et al., 2016). En effet, cette technologie permet d'analyser des millions de séquences des banques issues de chaque tour de sélection. On peut ainsi suivre l'évolution de la banque durant le SELEX, et non pas simplement le résultat à la fin de la sélection.

B. La multiplicité des stratégies réalisables permet de moduler au mieux les propriétés des futures aptamères

Le SELEX est un processus très flexible qui permet à l'opérateur de mettre en place les stratégies les plus adaptées pour obtenir les aptamères ayant les propriétés désirées. (Aquino-Jarquin and Toscano-Garibay, 2011; Cibiel et al., 2011).

De nombreux paramètres peuvent influencer le résultat d'un SELEX. Cependant, plus de 30 ans après les premières sélections d'aptamères, la plupart de ces paramètres sont choisis par les expérimentateurs de manière empirique et il n'existe pas de protocoles standards pour faire un SELEX. Dans cette partie différents paramètres seront présentés en expliquant quels peuvent être leur influence.

1) Choix de la banque de départ

Le SELEX commence par la constitution d'une banque aléatoire d'oligonucléotides ADN (Figure 15 –A). Cette banque est composée d'une fenêtre aléatoire de N nucléotides, encadrée aux extrémités par des séquences correspondantes à des sites de fixation d'amorces, de manière que l'on puisse amplifier la banque par PCR (Polymerase Chain Reaction) (Mullis et al., 1986). Ces banques ADN sont réalisées par synthèse chimique, un procédé fiable et relativement peu coûteux qui a été mis au point par Matteucci et Caruthers en 1981 (Matteucci and Caruthers, 1981).

a) Choix de la taille de la fenêtre aléatoire

Le choix de la banque initiale en vue d'un SELEX conditionne la diversité des structures présentes au début du processus de sélection. Généralement les aptamères sont identifiés à partir de banques ayant des fenêtres aléatoires de 20 à 50 nucléotides. Lorsqu'une séquence aléatoire de n nucléotides est synthétisée à partir d'une combinaison de 4 bases, le nombre de combinaison possible est 4^n . Ainsi, plus la fenêtre aléatoire de la banque est grande, plus le nombre de séquences différentes possibles est grand. Par exemple, pour une banque de séquence d'une longueur de 50 nucléotides : en considérant la masse molaire d'un nucléotide

égale à 330 g.mol^{-1} , la masse de la banque contenant toutes les séquences possibles serait de : $(330 \cdot 50 \cdot 4^{50}) \div N_A \approx 35\,000$ Tonnes, N_A correspondant au nombre d'Avogadro ($\approx 6,02 \times 10^{23}$ unités par mol). Expérimentalement, on travaille généralement avec des quantités de banque plutôt de l'ordre de la nanomole, soit $6,02 \cdot 10^{14}$ séquences. Cette quantité est proche de 4^{25} , cela signifie que toutes les séquences possibles ne seront pas présentes dans la banque de départ si la fenêtre aléatoire est plus grande que 25 nucléotides. Par exemple, 4^{25} ne correspond qu'à 1 billardième (10^{15}) des combinaisons possibles au sein d'une la banque avec une fenêtre aléatoire de 50 nucléotides.

Néanmoins, le fait que la banque soit incomplète au début d'un SELEX ne compromet pas les chances de réussite d'identification d'un aptamère. Certains pensent d'ailleurs qu'une fenêtre aléatoire de grande taille peut permettre de former des structures plus complexes qui sont nécessaires pour des molécules avec des propriétés rares comme par exemple les ribozymes.

b) Choix de la chimie de la banque

Le choix de la chimie de la banque utilisée pour le SELEX est également de première importance avant le début d'un SELEX. Les aptamères isolés peuvent être de chimie ADN ou ARN. Il a été montré que pour une même cible il est possible d'obtenir des aptamères ADN et ARN ayant tous deux une bonne affinité (Schneider et al., 1995; Tuerk et al., 1992). Le choix de la chimie dépend donc surtout de l'application envisagée pour l'aptamère. Ainsi, si la cible est une protéine connue pour se fixer à l'ADN, il semble plus judicieux d'utiliser une banque à ADN. De même, si le but est de faire exprimer l'aptamère obtenu au sein d'une cellule, alors la chimie ARN est la plus adaptée.

Des modifications chimiques peuvent également être utilisées pour augmenter l'affinité des aptamères pour certains types de cible ou pour augmenter leur résistance à la dégradation par des nucléases. Les oligonucléotides étant des molécules aisément modifiables, les modifications chimiques des aptamères après le SELEX est facilement réalisable. Néanmoins, ces modifications peuvent affecter la structure des aptamères et par conséquent changer leur affinité pour leur cible. Chaque modification doit donc être accompagnée d'une étape de contrôle de l'affinité. Pour pallier ce problème, des modifications chimiques ont été introduites durant le SELEX. Ces modifications chimiques peuvent être réalisées au niveau des bases, des sucres ou des phosphates des nucléosides triphosphates (Figure 16). Certains SELEX ont même été réalisés avec des bases issues d'alphabets génétiques artificiels (Rothlisberger and Hollenstein, 2018).

Les SELEX utilisant ces chimies modifiées ont néanmoins deux inconvénients. Tout d'abord, les bases modifiées sont généralement onéreuses, et augmentent donc le coût de SELEX mais aussi celui du futur aptamère. Ensuite, ces SELEX nécessitent des polymérases acceptant ces bases modifiées. Certaines polymérases ont d'ailleurs été modifiées par évolution moléculaire pour augmenter leur capacité à incorporer des bases modifiées (Dellafiore et al., 2016).

De très nombreuses modifications ont été utilisées, et je ne présenterai que les plus connues. Pour un descriptif exhaustif, voir la revue de (Rothlisberger and Hollenstein, 2018).

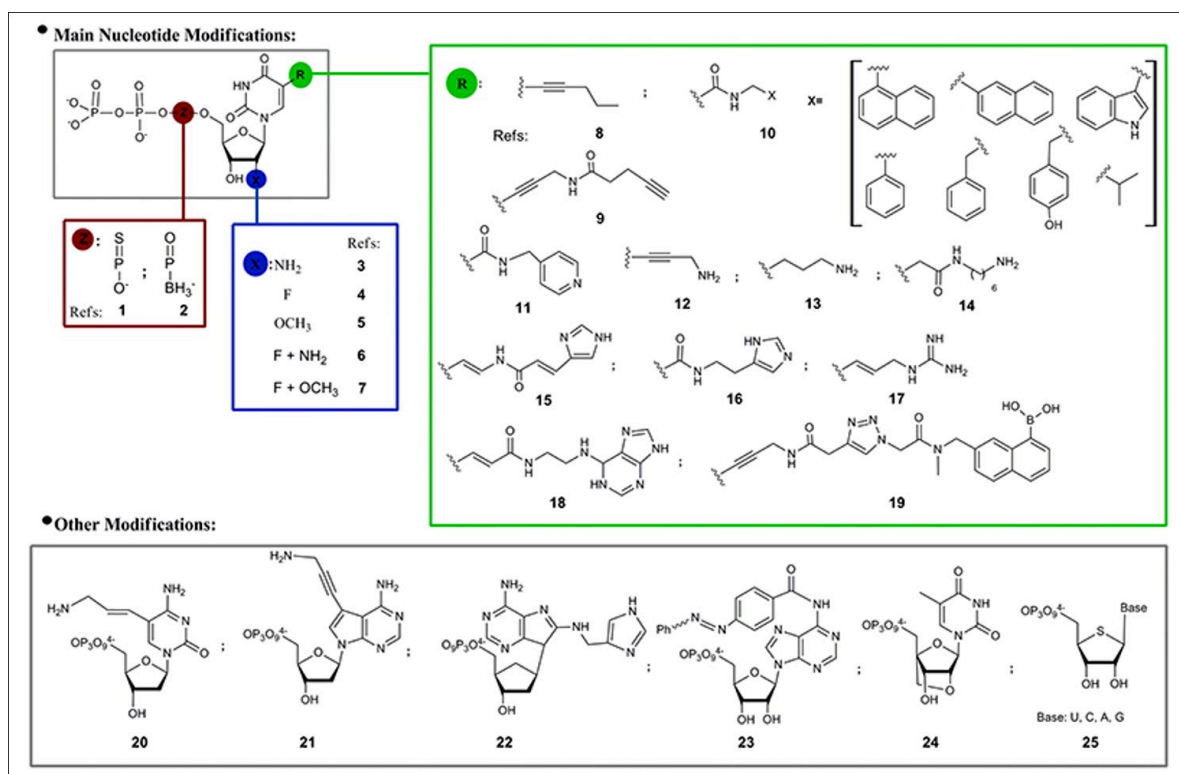


Figure 16 – Les différentes modifications pouvant être apportées aux nucléotides. Les oligonucléotides peuvent être modifiés au niveau de trois sites principaux : Au niveau du sucre (ribose), du groupement phosphate et de la base. Figure venant de (Dellafiore et al., 2016).

Une des modifications les plus communément utilisées est la substitution du résidu 2'hydroxyl du ribose des acides nucléiques par un atome de fluor (Référence 4 - Figure 16). Cette modification donne aux oligonucléotides une excellente résistance aux nucléases. Une banque composée d'oligonucléotides ayant des bases pyrimidines 2'-Fluoro et des bases purines naturelles a ainsi été utilisée dans de nombreux SELEX. Un aptamère sélectionné avec cette modification contre le facteur de croissance endothélial vasculaire humain 165 (vascular endothelial growth factor - VEGF₁₆₅) a permis de sélectionner l'aptamère Pegaptanib (aussi appelé Macugen), le seul médicament à base d'aptamère actuellement commercialisé (Stein and Castanotto, 2017). Il est utilisé pour le traitement néovasculaire de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Ng et al., 2006). Il est à noter que d'autres modifications ont été réalisées post-SELEX afin d'améliorer encore cet aptamère (Vinores, 2006).

Les modifications réalisées au niveau des bases des nucléotides triphosphates consistent généralement en l'ajout de groupements fonctionnels en position C5 des pyrimidines ou N7 des purines (Jäger et al., 2005)(Figure 16). Ces modifications peuvent améliorer l'affinité des aptamères en générant de nouvelles possibilités d'interactions (Hollenstein, 2011; Dellafiore et al., 2016). Ainsi, en 2013, Hollenstein et son équipe parviennent à sélectionner en utilisant la technique du SELEX une DNAzyme modifiée (avec des bases

contenant des groupements imidazole, ammonium et guanidinium) ayant une spécificité particulière de substrat.

La compagnie SOMALogic a largement investi ce champs d'études qui lui permet de développer des SOMAmers (Slow Off-rate Modified Aptamers) dont la particularité est de porter des groupements hydrophobes en position C5 (Vaish et al., 2003). Les SOMAmers ont souvent des chaînes latérales modifiées qui créent des surfaces hydrophobes pouvant interagir avec les régions hydrophobes des protéines. Ces nouvelles interactions hydrophobes améliorent la stabilité du complexe aptamère/cible, et donc diminuent la vitesse de dissociation des aptamères (K_{off}) (Gupta et al., 2014). Actuellement, SOMALogic a créé près de 3000 SOMAmers contre 3000 protéines. Ces SOMAmers sont utilisés sur une plateforme de criblage protéomique nommé « SOMAscans » qui a été développée parallèlement (Webber et al., 2014; Hathout et al., 2015).

2) Choix du tampon de sélection

Durant l'étape de sélection, la banque est mise en présence de sa cible dans un environnement dont les caractéristiques sont choisies par l'opérateur (pH, conditions salines, température etc.). Le choix de cet environnement est crucial. En effet, il joue un rôle prépondérant sur la structure des aptamères et de leur cible. Par exemple, la présence de cations permet de créer un effet « écran » sur les charges négatives des groupements phosphates. Ainsi, il a été montré que les ions magnésium stabilisaient permettant de contrer la répulsion des charges négatives des groupements phosphates lors de la formation d'une double hélice. Par conséquent, un aptamère sélectionné dans un tampon précis peut perdre avoir une affinité pour sa cible modifiée dans un autre tampon (Girardot et al., 2010). Pour cette raison, il est important de choisir des conditions de sélection qui soient les plus proches possibles des conditions dans lesquelles l'aptamère sera utilisé ultérieurement.

3) Choix de la technique de séparation

Un autre choix à réaliser par l'opérateur est celui de la méthode permettant de récupérer les oligonucléotides se fixant à la cible en les séparant des autres. De nombreuses méthodes ont été développées (voir pour une revue complète (Stoltenburg et al., 2007), j'ai choisi de présenter ci-dessous les plus courantes et celles que j'ai utilisée durant ma thèse.

La filtration sur membrane de nitrocellulose est une des premières techniques de séparation à avoir été utilisées : en 1990 Tuerk et Gold s'en sont servi pour identifier un aptamère contre l'ADN polymérase du phage T4 (Tuerk and Gold, 1990). Le principe est le suivant : les protéines sont retenues sur la membrane de nitrocellulose par interaction hydrophobe non spécifique tandis que les acides nucléiques ne sont pas retenus et passent au travers. Ainsi, seuls les oligonucléotides s'étant fixés sur la protéine sont retenus sur la membrane. Cette technique ne fonctionne néanmoins que si la cible est de nature protéique.

La technique de séparation par chromatographie d'affinité a aussi été l'une des premières utilisées : en 1990, Ellington et Szostak ont ainsi réussi à sélectionner des aptamères reconnaissant des petites molécules organiques (Ellington and Szostak, 1990). Cette technique

consiste à fixer la cible sur un support solide généralement immobilisé dans une colonne. Un tampon contenant la banque est ensuite déposé sur la colonne : les oligonucléotides se liant sur les cibles restent dans la colonne tandis que ceux non liés sont élués avec le tampon. Les oligonucléotides restés sur la colonne sont ensuite élués à l'aide d'un tampon capable de dénaturer la liaison avec la cible. Cette stratégie est compatible avec une grande diversité de cibles allant de petites molécules à des protéines.

Une adaptation de cette technique est d'utiliser des billes magnétiques comme support solide. La cible est immobilisée sur des billes magnétiques et incubée avec la banque. Lors de l'étape de séparation, un aimant permet de rassembler les billes magnétiques, en retenant avec celles-ci les oligonucléotides s'étant fixées aux cibles. Les oligonucléotides ne s'étant pas fixés sur les cibles restent, eux, dans le tampon.

4) Outils utilisés par l'opérateur pour guider la sélection : contre-sélections et gestion de la pression de sélection

Plusieurs objectifs sont communément retrouvés dans les SELEX : 1- Obtenir des aptamères ayant la meilleure affinité possible pour la cible 2- Obtenir des aptamères les plus spécifiques possibles de la cible choisie 3- Eviter que la sélection ne soit entravée par l'apparition de « séquences parasites » : des oligonucléotides n'ayant pas d'affinité pour la cible désirée mais qui s'enrichissent tout de même au fur et à mesure de la sélection. De nombreux facteurs peuvent être choisis par l'opérateur afin de guider la sélection et d'obtenir l'aptamère correspondant le mieux à son cahier des charges.

a) Usage des contre-sélections

Fréquemment lors de l'étape de sélection, on peut ajouter une autre étape dite de « contre-sélection » qui permet d'éviter de sélectionner des aptamères ayant des propriétés indésirables. Ainsi, une étape de contre-sélection contre le support (nitrocellulose, colonne d'agarose ou bille magnétique etc.) sans cibles est souvent réalisée avant l'étape de sélection avec la cible afin de ne pas isoler des aptamères reconnaissant le support plutôt que la cible. Cette stratégie a été utilisée en 1992 par Ellington et Szostak : constatant que les oligonucléotides sélectionnés après 3 tours de SELEX se fixaient surtout sur la matrice agarose de leur colonne de chromatographie, ils ajoutèrent au tour n°4 du SELEX une contre-sélection contre ce support qui leur permis d'enrichir de manière significative leur banque en séquence se fixant spécifiquement à leurs cibles (Ellington and Szostak, 1992).

Cette étape de contre-sélection peut être aussi ajoutée dans un SELEX afin d'obtenir des aptamères ayant une spécificité pour une cible précise. Ainsi, en 1994, Jenison et son équipe parvinrent à isoler un aptamère reconnaissant avec une affinité 10 000 fois meilleure la molécule de théophylline de la caféine alors que ces deux molécules ne diffèrent que d'un groupement méthyl sur l'atome d'azote n°7 de la molécule (Jenison et al., 1994). Pour obtenir ce résultat, ils avaient utilisé des contre-sélection contre la caféine lors des tours 5 à 8 du SELEX. Ce SELEX a été réalisé avec comme technique de séparation une colonne chromatographique. A chaque tours la banque ARN était incubée avec de la théophylline greffée sur une colonne de sépharose, et les ARN étaient élués par l'addition de 0.1M de théophylline dans la colonne.

Lors des tours 5 à 8, avant l'addition de théophylline, les ARN ont d'abord été élués avec 0.1M de caféine afin d'éliminer de la colonne les oligonucléotides ayant de l'affinité pour cette molécule. Cette méthode a en effet permis de sélectionner des aptamères capables de discriminer la théophylline de la caféine.

b) Gestion de la pression de sélection

Généralement, durant les premiers tours de SELEX, l'opérateur fait le choix de maintenir une pression de sélection peu intense afin de récupérer un maximum d'oligonucléotide pouvant se lier à la cible choisie. Ensuite, il est possible de faire varier certains paramètres afin de favoriser la sélection d'oligonucléotides avec une forte affinité pour la cible.

Le temps d'incubation joue sur la vitesse d'association des aptamères. En choisissant des temps d'incubation courts on favorisera la sélection d'aptamère pouvant interagir rapidement avec leur cible.

Ajouter des lavages lors de l'étape de séparation permet également d'augmenter la pression de sélection (Ellington and Szostak, 1992). La technique du lavage consiste au moment de l'étape de séparation à laver le support où se trouve les cibles (membrane de nitrocellulose, billes etc.) avec du tampon : les séquences finalement sélectionnées sont celles qui sont capables de rester attachées longtemps à la cible.

Un autre moyen d'augmenter la pression de sélection est l'ajout lors de l'étape d'incubation de compétiteur non spécifique (comme l'ARN de transfert) qui permet de saturer sur la cible les sites d'interaction non spécifique et donc de favoriser la sélection d'oligonucléotides se fixant de manière spécifique

Il est aussi possible de diminuer la quantité de cible présentée à la banque lors de l'étape d'incubation. Ceci permet de mettre en compétition entre eux les oligonucléotides de la banque, afin de sélectionner seulement les meilleurs d'entre eux.

5) Suivre l'évolution de la banque au cours du SELEX

Afin de pouvoir réguler au mieux la pression de sélection ou bien pour pouvoir décider à quel moment arrêter les tours de sélection, il peut être utile de suivre l'évolution de la banque au fur et à mesure des tours de SELEX.

Un des moyens les plus simples est de quantifier le pourcentage de la banque ayant réussi à être sélectionné à l'issue de chaque tour de sélection. La mesure de l'absorbance à 260 nm est une méthode simple pour déterminer la concentration en oligonucléotide d'une solution. Elle permet de pouvoir calculer la quantité d'oligonucléotides sélectionnée ou bien au contraire celle ne l'ayant pas été. Néanmoins, si le pourcentage de la banque sélectionnée est petit, le signal peut être trop faible pour être mesuré. Pour un résultat plus précis, il est possible de marquer la banque radioactivement (avec du P^{32} à l'extrémité 5' par exemple), ou de manière fluorescente afin de mesurer la quantité fixée par respectivement un compteur à scintillation ou un spectrofluorimètre (Dobbelstein and Shenk, 1995; Meng et al., 2014).

Il est aussi possible de mesurer non pas le pourcentage d'oligonucléotide sélectionné de la banque à l'issue du tour de sélection, mais la diversité de la banque. Ainsi, la méthode du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (ou RFLP, de l'anglais restriction fragment length polymorphism) permet de visualiser la diversité de la banque au fur et à mesure des tours de SELEX (Bartel and Szostak, 1993; Ducongé and Toulmé, 1999). A chaque tour de SELEX, un échantillon de la banque est soumis à une combinaison d'enzyme de restriction, et le résultat de la digestion est observé par migration sur gel. Au début du SELEX, la diversité de la banque étant grande, le nombre de fragments différents obtenu est élevé, il n'y a donc pas de bandes distinctes. Au fur et à mesure que la banque s'enrichit en certaines séquences, les fragments de restriction de celles-ci commencent à être visibles sur le gel. Ceci permet donc d'estimer le degré d'enrichissement de la banque lors du SELEX.

Enfin, on peut aussi mesurer le degré d'enrichissement de la banque au fur et à mesure du SELEX à l'aide du séquençage. Cette technique ne pouvait pas vraiment être mise en place avec la technique du séquençage classique, mais les récentes avancées techniques réalisées dans le domaine du séquençage à haut-débit permettent un suivi des banques au fur et à mesure des tours de SELEX (Nguyen Quang et al., 2016).

C. Le développement du Séquençage Haut débit à l'usage du SELEX permet de multiplier les possibilités

La technique du séquençage haut débit a déjà permis de grands progrès pour les analyses de génomique et de transcriptomique, et est appelée à changer la façon dont sont réalisées les techniques d'évolution dirigées comme celle du SELEX. En effet, cette technologie permet d'analyser des millions de séquences des banques issues de chaque tour de sélection et ouvre de nouvelles voies pour mieux identifier les aptamères (Nguyen Quang et al., 2016).

1) Amélioration de l'identification et de la caractérisation des aptamères grâce à l'utilisation du séquençage à haut débit

Le séquençage haut débit peut améliorer l'identification et la caractérisation des aptamères par différents moyens (Figure 17) (Nguyen Quang et al., 2016) :

- Le séquençage haut débit rend possible la détection des séquences enrichies à très faible pourcentage à l'intérieur des banques (inférieur à 1%). Ainsi, on peut observer de manière plus précoce l'enrichissement des séquences, et moins de cycles de sélection sont nécessaires lors d'un SELEX.
- Il est possible d'analyser l'évolution des séquences au sein des banques lors du SELEX.
- On peut aussi suivre l'évolution non pas des séquences entières, mais des motifs présents au sein des séquences. En effet, généralement seule une partie de la séquence d'un aptamère correspond au site de liaison à la cible. Cette portion sera généralement très conservée tandis que le reste de la séquence, n'étant pas nécessaire à son interaction, peut tolérer plus de mutations. Cette étude peut permettre de prédire quelle partie de la séquence permet de réaliser la liaison à la cible.

- De la même manière, il est aussi possible de développer des outils permettant de prédire les motifs structuraux et de suivre leur enrichissement lors de l'évolution.
- Il est aussi possible d'identifier pour des séquences bien enrichies, des mutations étant apparues à de très faible pourcentage mais dont l'enrichissement entre les tours de SELEX est encore meilleur que la séquence initiale. Ces séquences mutées sont alors potentiellement des candidats aptamères ayant une affinité encore meilleure pour la cible.
- Le séquençage haut débit permet également de comparer l'effet des variations des conditions de sélection (ex : augmentation de la pression de sélection) au cours des différents tours SELEX afin de déterminer quelles sont les séquences répondant le mieux à la pression de sélection.

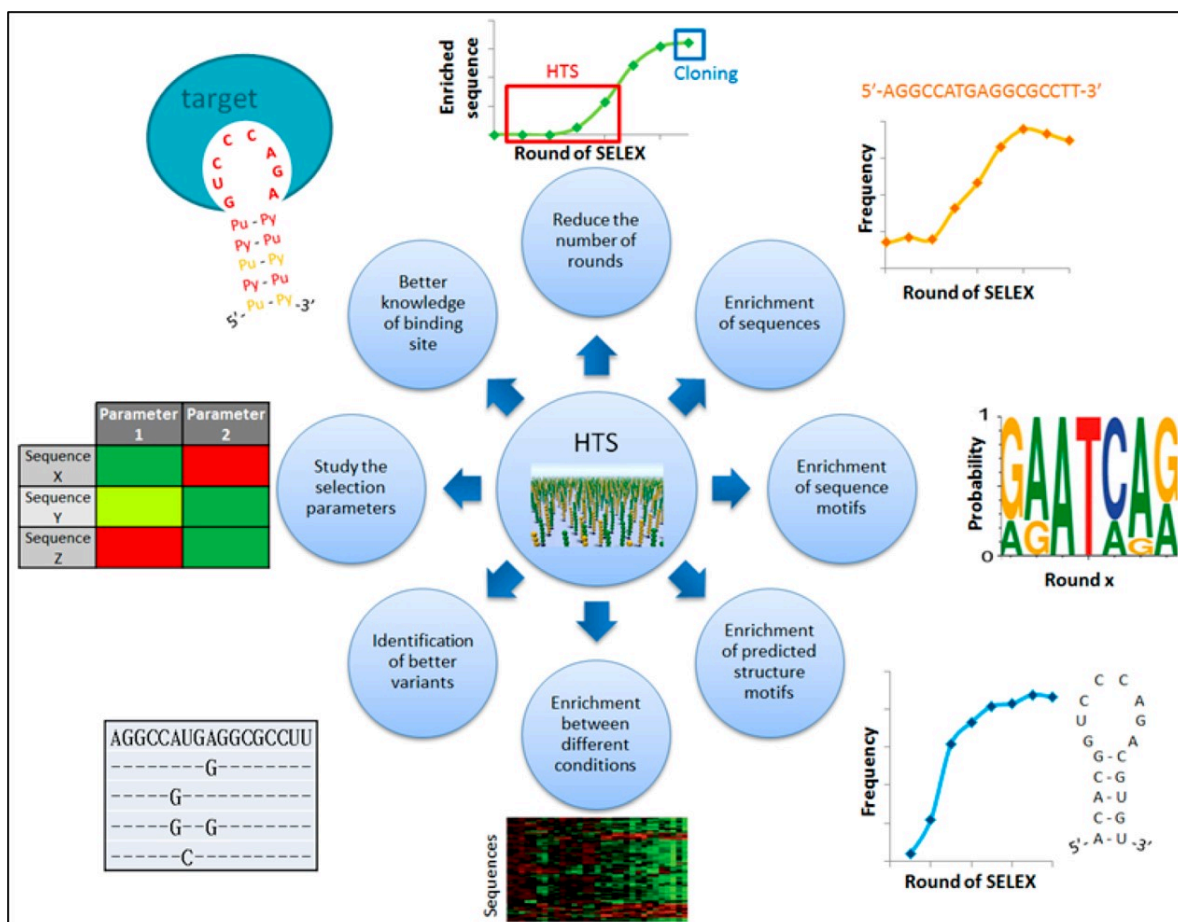


Figure 17 – Schéma de l'amélioration de l'identification et de la caractérisation des aptamères grâce à l'utilisation du séquençage à haut débit (Nguyen Quang et al., 2016).

Cependant, le séquençage haut débit présente quelques contraintes. Ainsi, cette technique nécessite de manipuler une très grande quantité de données (jusqu'à plusieurs gigaoctets), ce qui n'est pas pris en charge par les logiciels d'analyses bioinformatiques classiques. Ainsi, au cours de ces dernières années plusieurs équipes de recherche ont développé de nouvelles approches bioinformatiques pour répondre à cet enjeu.

Une plateforme connue appelée « Galaxy Project » met à disposition des outils bioinformatiques de base. Cette plateforme permet de manipuler des données de séquençage haut débit, en utilisant différentes fonctions pouvant se combiner selon un pipeline organisé par l'opérateur. Néanmoins, bien que très utile pour des analyses préliminaires, d'autres outils sont nécessaires pour une analyse plus approfondie de l'évolution lors des SELEX. Des équipes ont donc développé leur propre pipeline ou logiciel adapté à l'analyse des SELEX (Voir pour une revue (Nguyen Quang et al., 2016).

2) Le séquençage haut débit permet d'utiliser avec plus de facilité certaines variantes du SELEX

Grâce au séquençage haut débit, certaines formes adaptées du SELEX peuvent désormais être utilisées de manière optimale.

Le SELEX dégénéré (ou doped-SELEX) est une méthode utilisée pour améliorer l'affinité d'un aptamère connu ou pour modifier sa spécificité (Knight and Yarus, 2003). Ce SELEX est constitué de quelques tours partant d'une banque non pas aléatoire, mais dégénérée à partir de la séquence d'un aptamère connu. Cette banque est constituée de manière à ce qu'à chaque position on retrouve majoritairement la base d'origine de l'aptamère mais également un certain pourcentage des trois autres bases. Le séquençage haut débit permet ainsi d'analyser de manière très fine l'influence des mutations au sein de la séquence pour déterminer quelles mutations peuvent améliorer l'affinité de l'aptamère pour sa cible et quelles positions sont cruciales et ne tolèrent aucune mutation.

Le SELEX branché est une autre variante du SELEX qui consiste, après quelques tours de SELEX « classique », à diviser la banque pour réaliser plusieurs cycles de sélection en parallèle, généralement pour comparer des conditions de sélection différentes. L'utilisation du séquençage haut débit peut comparer de manière précise les enrichissements des séquences entre les différentes branches. Cette technique a été notamment utilisée par Dupont et son équipe, pour caractériser les sites de liaison d'un aptamère et déterminer des mutations pouvant favoriser une meilleure affinité pour différentes conformations de la cible (Dupont et al., 2015).

3) Présentation d'un logiciel développé au sein de l'équipe pour l'analyse des données de séquençage haut débit issues d'un SELEX : Patternity-seq

Je vais présenter plus en détail le logiciel PATTERNITY-seq qui a été développé au sein de notre équipe et que j'ai utilisé au cours de cette thèse. Le logiciel PATTERNITY-seq est composé de 2 parties : le prétraitement et la chaîne d'analyse. L'architecture générale du logiciel est présentée sur la Figure 18.

a) Première partie de PATTERNITY-seq : Prétraitement des séquences

A la fin du séquençage haut-débit des banques issues de différents cycles du SELEX, on obtient pour chacune des banques un fichier en format FASTQ. Le prétraitement consiste alors

à ouvrir chaque fichier un par un, et créer un nouveau fichier FASTQ pour chaque fichier contenant uniquement les séquences sans leurs amorces au format FASTQ. Une fois cette étape réalisée, il faut alors transformer les FASTQ en FASTA en ne gardant que les séquences qui ont un bon score de qualité. Le score de qualité dans un FASTQ est codé en ASCII. Lors de la conversion en FASTA, il est possible de choisir un score de qualité afin de garder uniquement les séquences supérieures à ce score.

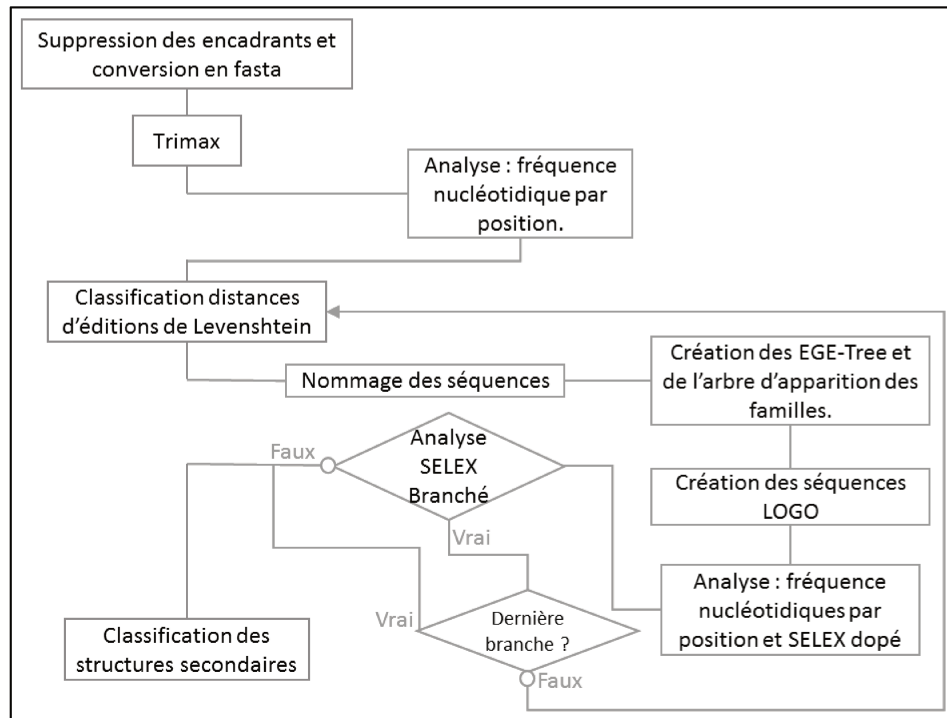


Figure 18 - Architecture des principales méthodes du logiciel PATTERNITY-seq.

b) Seconde partie de PATTERNITY-seq : Chaîne d'Analyse

La première étape du traitement, appelée Trimax, est ensuite réalisée. Durant cette étape de nombreux calculs sont réalisés. Tout d'abord chaque fichier est ouvert afin d'identifier toutes les séquences et de calculer leur pourcentage d'occurrence. Ces données sont mises dans des objets ou des tableaux. Le pourcentage d'occurrence d'une séquence correspond au pourcentage qu'elle représente dans un fichier (donc dans un tour donné du SELEX) et dépend donc du nombre de fois où la séquence est comptée dans un fichier mais aussi au nombre total de séquences dans le fichier. Les fichiers pouvant contenir plusieurs millions de séquences différentes, un seuil d'affichage permet de trier les séquences afin de ne récupérer que les séquences dépassant ce seuil. Ce seuil permet de rendre les résultats plus lisibles en se concentrant sur les séquences les plus abondantes.

En analysant plusieurs SELEX, notre équipe s'est rendu compte que les séquences les plus intéressantes, celles qui correspondent aux aptamères, ne sont pas forcément celles qui ont un pourcentage d'occurrence très élevé. En effet, certaines séquences peuvent avoir un pourcentage d'occurrence faible mais être intéressantes car celles-ci s'enrichissent plus entre deux tours que d'autres séquences ayant un pourcentage plus fort. Ainsi, pour chaque séquence, un score d'évolution normalisé (ou *Score d'évolution*) est calculé en prenant en

compte l'enrichissement de cette séquence aux cours des différents tours caractérisant ainsi leur évolution.

Une fois les pourcentages d'occurrences obtenus et stockés, les séquences sont regroupées selon leur éloignement. Pour cela, le logiciel utilise les travaux de Vladimir Levenshtein sur la distance d'édition qui permet de comparer 2 chaînes de caractères afin de déterminer le nombre de différence entre celles-ci en comprenant les insertions et les délétions de lettres (Levenshtein, 1966). Cette distance donne donc la valeur minimale de changements nécessaires entre deux séquences. Pour cela, l'utilisateur doit choisir une valeur de distance minimale (généralement 1/5ème de la taille des séquences) au-delà de laquelle les séquences ne seront plus considérées comme appartenant à une même famille. Les pourcentages d'occurrence de chaque séquence d'une famille sont alors sommés par tour pour obtenir les pourcentages d'occurrence de la famille par tour et ainsi pouvoir calculer un score d'évolution pour cette même famille. Au cours de cette étape, toutes les séquences seront nommées afin d'identifier à quelle famille elles appartiennent et quelle mutation elle peuvent avoir par rapport à la séquence majoritaire de la famille (par exemple F000/024A>G correspond à une séquence de la famille F000 et par rapport à la séquence majoritaire de cette famille, elle a un G en position 24 à la place d'un A).

c) Tableaux et graphiques générés par Pattertnity-seq

PATTERNITY-seq permet également de tracer des graphiques présentant l'évolution de la fréquence des nucléotides à toutes les positions de la fenêtre aléatoire. Au début du SELEX la fréquence de chaque base (A-G-C-T/U) est la même pour toutes les positions (en théorie 25% chacun si la banque initiale est sans biais). Mais au fur et à mesure que certaines séquences s'enrichissent lors des tours de SELEX, certaines bases sont présentes à des pourcentages plus importants à certaines positions, tandis que d'autres au contraire sont moins représentées. Les graphiques permettent donc de rendre compte du degré d'enrichissement, et donc d'évolution générale des banques à chaque tour de SELEX (Figure 19-A).

Le logiciel permet également de générer des fichiers d'export permettant de produire à l'aide du logiciel Cytoscape des arbres hiérarchiques qui représentent l'évolution d'espèces moléculaires (des familles ou des séquences au sein d'une famille) au cours de différentes générations successives (générations correspondantes ici aux tours de SELEX) (Nguyen Quang et al., 2018). Par exemple pour chaque famille, un arbre d'évolution généalogique empirique pourra être construit. Cet arbre combine les alignements de séquences avec le suivi de l'évolution de chacune des séquences pour inférer quand sont apparues les mutations et à partir de quelle séquence. Cet arbre ressemble à l'arbre utilisé par Darwin dans son livre "*On the Origin of species*" pour expliquer sa théorie de l'évolution des espèces animales (Darwin, 1860). Les nœuds correspondent aux séquences de la famille avec leur occurrence en pourcentage dans la famille qui est représentée par la taille et la couleur des nœuds (allant de 100% à 0%) (Figure 19 – C) . La couleur des arêtes correspond au score d'évolution de la séquence observée (le rouge signifie que la séquence a un bon score d'évolution, alors que le vert signifie qu'elle en a un mauvais, le jaune étant neutre). Les traits en pointillés signifient que la séquence a disparue. Le logiciel permet également de construire un arbre retraçant

l'apparition des familles au fil des tours de SELEX avec les représentants de chaque famille et les pourcentages d'occurrences des familles entières (Figure 19 – B).

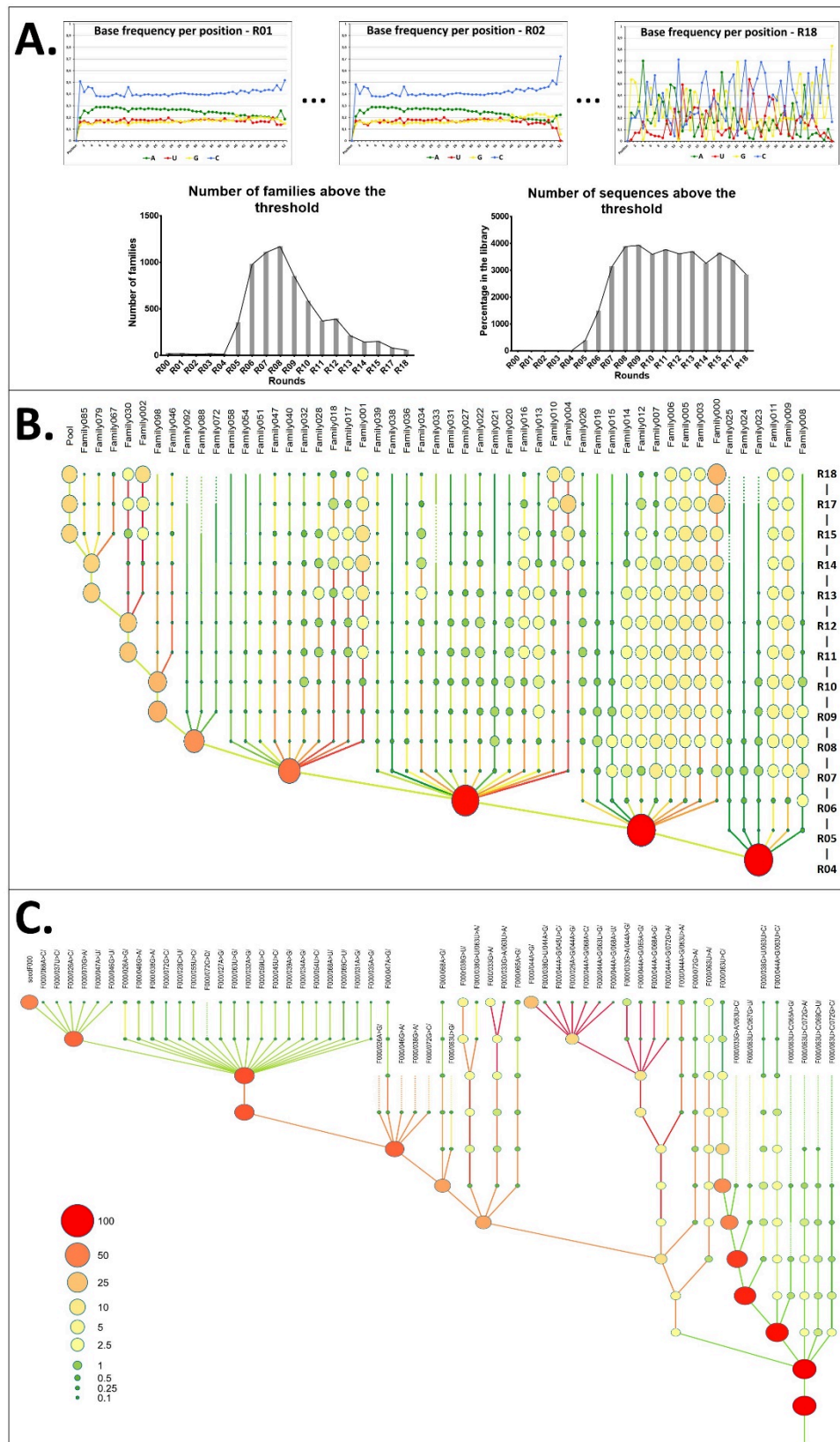


Figure 19 – Présentation de certaines analyses fournies par le logiciel PATTERNITY-seq v4.0. A - Outils pour l'analyse de l'évolution globale du SELEX. Les graphiques présentent :

La fréquence des nucléotides à toutes les positions de la fenêtre aléatoire dans la banque naïve initiale et aux tours 2 et 18 d'un SELEX ; L'évolution au fur et à mesure des tours du nombre de séquences et de famille au-dessus du pourcentage seuil. B - Outils pour l'analyse de l'évolution globale des familles : Arbre des familles représentant l'apparition des familles lors du SELEX et l'évolution de leur importance. Plus le point représentant la famille est gros et rouge, plus la fréquence de la famille au sein de la banque est grande. Plus le tiret reliant les points d'une famille entre deux tours est rouge, plus l'enrichissement de la famille dans la banque est fort. C - Outils pour l'analyse de l'évolution des séquences au sein des familles : Arbre empirique de l'évolution généalogique. Cet arbre représente l'apparition des séquences dans la famille F0 lors du SELEX et l'évolution de leur importance au sein de la famille. Plus le point représentant la séquence est gros et rouge, plus la fréquence de la séquence au sein de la famille F0 est grande. Plus le tiret reliant les points d'une séquence est rouge, plus l'enrichissement de la séquence au fur et à mesure des tours est important dans la famille F0 est fort.

Patternity-seq est aussi équipé de programmes permettant de prédire des structures secondaires (tige-boucle, boucles internes et tétrade de guanine). Patternity-seq génère donc également un tableau permettant de suivre l'évolution de la présence de chaque motif. De même, le logiciel calcule aussi le facteur d'évolution de chacun des motifs. Il est aussi calculé pour chaque motif, un score de structure secondaire (Secondary Structure Score) qui correspond à la chance de trouver ce motif par hasard.

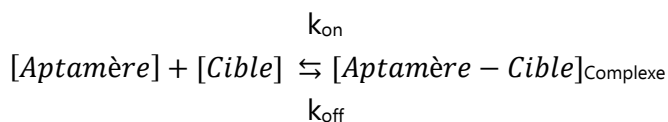
Toutes ces informations peuvent être utilisées pour mieux connaître les positions cruciales pour les aptamères et orienter le choix des séquences à tester.

D. Une grande variété de méthodes pour mesurer l'affinité des candidats aptamères issu du SELEX

Après avoir analysé l'évolution des séquences lors de la sélection, et identifié les séquences les plus intéressantes, il est nécessaire de quantifier précisément leur affinité pour la cible.

1) Avant-propos sur la mesure d'affinité d'un aptamère pour son ligand

A l'équilibre, l'interaction d'un aptamère avec sa cible, lorsqu'il correspond à une interaction stoechiométrique 1:1 se traduit par l'équation suivante :



- Vitesse d'association $V_{on} = k_{on} \times [A] \times [C]$
- Vitesse de dissociation $V_{off} = k_{off} \times [AC]$

Avec $[A]$ = concentration en aptamère libre $[C]$ = concentration en cible libre
 $[AC]$ = concentration d'aptamère lié à la cible

Et k_{on} : constante d'association du complexe (en s^{-1})

k_{off} : constante de dissociation du complexe (en $M^{-1}s^{-1}$)

Or, lorsque la réaction est à l'équilibre, les vitesses d'association et de dissociation sont égales :

$$\text{Donc : } k_{\text{on}} \times [A] \times [C] = k_{\text{off}} \times [AC] \Leftrightarrow Kd = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = \frac{[A][C]}{[AC]}$$

Avec K_d = constante d'équilibre de dissociation (en M)

Il existe différentes méthodes pour calculer la constante d'équilibre de dissociation K_d avec cette équation. Néanmoins, une des méthodes les plus souvent utilisées est de faire varier la concentration de l'aptamère, en laissant celle de la cible constante. Lors des conditions de mesure de la quantité de complexe formée, on se place de manière que la concentration en cible soit tellement grande comparée à la concentration en aptamère, qu'on peut négliger la quantité de cible liée à l'aptamère comparée à la quantité de cible libre. Autrement dit : $[C] \gg [AC]$, ce qui entraîne : $[C] \cong [C]_{\text{tot}}$. Ceci transforme l'équation précédente de la manière suivante :

$$Kd = \frac{([A]_{\text{tot}} - [AC])[C]_{\text{tot}}}{[AC]} \Leftrightarrow [AC] = \frac{[A]_{\text{tot}} \times [C]_{\text{tot}}}{Kd + [C]_{\text{tot}}}$$

Cette dernière équation représente une hyperbole représentant $[AC]$ en fonction de $[C]_{\text{tot}}$. On peut calculer K_d et $[A]_{\text{tot}}$ à partir de cette hyperbole. $[C]_{\text{tot}}$ est souvent appelé B_{max} , la concentration maximale de ligand lié à la cible (Figure 20).

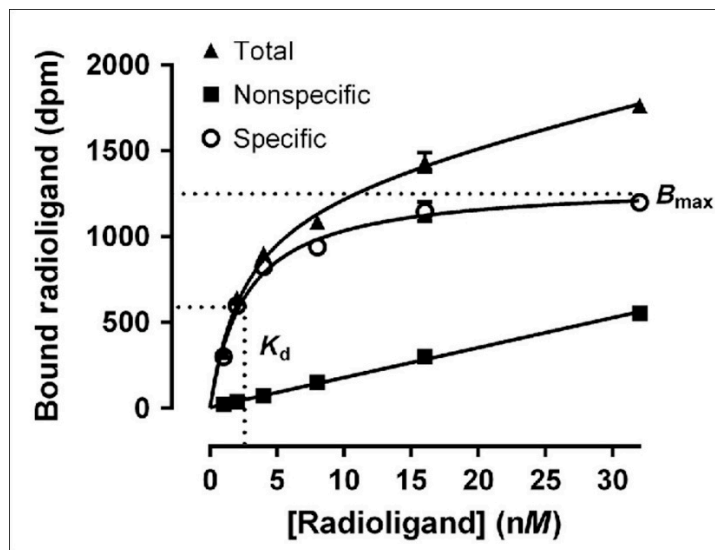


Figure 20 – Courbe d'affinité d'un radioligand pour sa cible. Ces données sont les résultats d'une expérience de liaison d'un radioligand à sa cible, et illustre les courbes de liaison totale du radioligand, mais aussi celle de sa liaison spécifique et non spécifique à sa cible. La liaison spécifique est obtenue en soustrayant la liaison non spécifique à la courbe de liaison totale. La concentration en ligand résultant en 50% de la liaison spécifique maximale est la valeur K_d , un paramètre d'affinité, tandis que l'asymptote horizontale est égale au nombre total de sites de liaison aux récepteurs (B_{max}) dans les conditions utilisées lors de cette expérience. Figure venant de (Wit et al., 2016).

Beaucoup de méthodes existent pour mesurer l'affinité (K_d et B_{max}) d'un aptamère à sa cible. Cependant, en fonction des méthodes de mesure, les résultats d'affinité peuvent varier. C'est pourquoi il est conseillé de tester plusieurs techniques différentes.

Aucune technique n'est optimale, et l'opérateur fait son choix en examinant les différentes limites des méthodes. Ainsi, certaines méthodes nécessitent une immobilisation ou un marquage de l'aptamère ou de la cible : ceci peut entraîner un changement dans l'interaction entre les deux molécules, et donc biaiser les mesures d'affinité. Certaines méthodes nécessitent une grande quantité d'échantillon, peuvent être coûteuse d'un point de vue des consommables ou nécessiter un appareil de mesure onéreux. D'autres sont compliquées à mettre en œuvre et demandent une vraie expertise. Certaines techniques ne peuvent pas être organisées de manière à avoir un grand nombre de conditions testées en même temps, et sont donc longues à mettre en pratique. Ces méthodes ne calculent pas non plus les mêmes paramètres, et certaines peuvent ne pas donner accès aux constantes cinétique k_{on} et k_{off} mais seulement calculer le K_d .

Le K_d des aptamères est souvent de l'ordre du nanomolaire pour les protéines, ce qui est comparable aux anticorps. L'affinité des aptamères développés contre les petites molécules sont généralement moins élevés, avec des K_d s de l'ordre du micromolaire.

2) Méthodes de mesure via des techniques de séparation

Les techniques de séparation sont basées sur la séparation des aptamères liés et non liés à la cible. Ces techniques nécessitent généralement le marquage de l'aptamère ou de la cible. L'un des inconvénients de cette technique est que l'étape de séparation peut parfois perturber l'interaction aptamère/cible et donc potentiellement biaiser les résultats obtenus.

Les techniques de filtration reposent sur la séparation des aptamères liés et non liés par une membrane. La solution d'incubation contenant l'aptamère et la protéine cible passe à travers la membrane entraînée par une pression, un vide ou une force centrifuge. L'aptamère lié à la cible est retenu par la membrane, ce qui permet d'évaluer la distribution de l'équilibre aptamère lié/aptamère libre sur une gamme de concentrations cibles. Un des types de membranes communément utilisés est la membrane nitrocellulose (décrite précédemment) qui est aussi utilisée comme technique de séparation lors du SELEX. Pour la quantification des fractions d'oligonucléotides liés et non liés, on utilise fréquemment la méthode du marquage des oligonucléotides au P^{32} , la quantification se fait alors à l'aide d'un écran photostimulable au phosphore, ou d'un compteur à scintillation (Carey et al., 1983). Néanmoins, cette méthode demande des conditions de sécurité et des infrastructure spéciales. La même approche peut être réalisée avec un marquage par fluorescence mais c'est nettement moins sensible.

La technique d'électrophorèse sur gel peut également être utilisée (Fried and Crothers, 1981). Les oligonucléotides étant chargés négativement ils migrent facilement dans un gel traversé par un courant électrique. Lorsqu'un aptamères est lié à une cible, sa migration peut être modifiée et ce décalage peut être mesuré (Ducongé and Toulmé, 1999).

D'autres techniques séparatives existent comme la dialyse, l'électrophorèse capillaire (Ravelet et al., 2006; Girardot et al., 2011; Fiore et al., 2015) et la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) (Jing and Bowser, 2011). Ainsi, en 2004 Michaud et son équipe en utilisant la technique de HPLC, ont été capable en utilisant des aptamères sélectionnés contre

la D-adénosine et la L-tyrosinamide, de les séparer de leurs énantiomères (Michaud et al., 2004).

3) Méthodes de mesure de l'affinité à l'aide de fluorophore

Certaines méthodes sont basées sur la mesure de la fluorescence. L'oligonucléotide ou sa cible sont marqués avec une molécule émettrice de fluorescence, un fluorophore. Il arrive souvent que la fluorescence d'un aptamère marqué avec un marqueur fluorescent soit modifiée lors de sa fixation sur sa cible. A partir de ce signal on peut calculer précisément les constantes d'affinité. Ces méthodes ont pour avantage de donner une mesure rapide des constantes de cinétique de l'interaction aptamère/cible par rapport aux techniques séparatives, et ce en solution. Pour pouvoir lire ce type de signal, un spectrofluorimètre est utilisé. Je vais ici présenter deux des méthodes utilisant des fluorophores les plus utilisées.

Ainsi, l'affinité des aptamères marqués de manière fluorescente peut-être mesurée par la méthode de la thermophorèse à micro-échelle (Breitsprecher et al., 2016). Cette technique mesure le mouvement des molécules à la suite d'une excitation laser. La mesure est faite en solution dans de fins capillaires de verres. Un des avantages de cette méthode est qu'elle ne nécessite aucune immobilisation d'un des deux partenaires (cible ou aptamère) dont on mesure l'interaction. Cette technique mesure la force de l'interaction entre une molécule marquée par un fluorophore (ici généralement l'aptamère) et sa cible tandis qu'un gradient de température microscopique, induit par un laser proche infrarouge, est appliqué au fil du temps. Le signal en résultant est détecté et tracé en fonction de la concentration du ligand pour obtenir une courbe dose-réponse, à partir de laquelle l'affinité de liaison est automatiquement calculée.

L'affinité des aptamères marqués de manière fluorescente peut également être mesurée par polarisation de fluorescence-anisotropie (Gokulrangan et al., 2005). L'anisotropie est une mesure de la dépolarisation de fluorescence. Lorsqu'une molécule fluorescente est illuminée par une lumière polarisée, les molécules fluorescentes sont excitées et émettent ensuite une lumière partiellement dépolarisée. Ce signal change lorsque l'aptamère entre en interaction avec sa cible. Il est ensuite possible par analyse des signaux obtenus de calculer l'affinité d'un aptamère pour sa cible (Zhu et al., 2012; Lisi et al., 2018).

4) Méthodes de mesure sans marquage

Des méthodes de mesures ne demandant pas de marquage d'un des deux partenaires ont été développées.

a) Méthodes sans marquage, mais avec greffage d'un des partenaires sur un support

La résonance plasmonique de surface (SPR) est un phénomène qui se produit sur une surface plane métallique : lorsque la lumière incidente est polarisée parallèlement au plan d'incidence, la lumière est réfléchié selon un certain angle. Dans le cas d'une surface métallique sur laquelle une molécule a été immobilisée, lorsque cette molécule interagit avec une autre

molécule, l'angle d'incidence de la lumière polarisée change. Ce changement d'angle peut-être mesuré et permet de suivre la liaison entre deux molécules (Di Primo and Lebars, 2007). Cette technique a de nombreux avantages, dont la rapidité de mesure et l'absence de marquage de l'aptamère. Néanmoins, l'immobilisation de l'aptamère sur la surface constitue aussi un biais potentiel. Cette technique requière de plus des machines onéreuses.

b) Méthodes sans marquage ni greffage d'un des partenaires

La calorimétrie de titrage isotherme (ITC) est une excellente méthode de mesure (Müller et al., 2006). Contrairement aux méthodes précédemment décrites, cette méthode calcule directement les paramètres thermodynamiques (enthalpie et entropie) et en déduit ensuite les paramètres d'affinité. L'ITC repose sur le fait que la formation du complexe de l'aptamère avec sa cible est un processus exothermique qui libère de la chaleur. Le calorimètre est constitué d'une cellule contenant un volume constant d'aptamère (ou de protéine), auxquels sont ajoutés de manière croissante les ligands. La chaleur est libérée lorsque des quantités croissantes de complexe se forment. Le signal est ensuite mesuré via la quantité d'énergie électrique nécessaire pour maintenir constante la température dans la cellule. Cette méthode est souvent considérée comme la meilleure méthode de binding, mais elle est malheureusement très peu utilisée car elle nécessite une grande quantité de molécules et des machines onéreuses.

E. Un large éventail d'applications

Les aptamères peuvent être utilisés pour un large éventail d'application : détection et diagnostic, imagerie, purification, thérapie et théranostique. L'utilisation de ces aptamères est facilitée par le fait qu'ils peuvent être facilement greffés à diverses molécules ou sur des surfaces (Rothlisberger et al., 2017). Cette étape de greffage doit néanmoins être couplée à la vérification du maintien de l'affinité de l'aptamère pour sa cible (Girardot et al., 2013). Actuellement, la majorité des aptamères sont sélectionnés à des fins biomédicales, particulièrement dans le domaine de la cancérologie (Bouvier-Muller and Duconge, 2018b).

1) Les aptamères pour la détection et le diagnostic

De nombreux aptamères sont isolés en vue de d'être utilisées comme détecteurs. Le plus souvent à des fins de diagnostic biomédical, mais également pour la détection de molécules dans l'environnement ou dans des produits alimentaires (Amaya-González et al., 2013; Ku et al., 2015; Zhang et al., 2018). Les aptamères sont des candidats idéals pour la détection : ils se lient avec une forte affinité et une spécificité élevée à leur molécules-cibles, leur production est peu coûteuse, et leur conjugaison à d'autres molécules jouant le rôle de rapporteur est très aisée. Certains systèmes de détection à base d'aptamères sont commercialisés, et beaucoup d'autres sont actuellement en phase de développement (Kaur et al., 2018). Les aptamères peuvent être aussi utilisés en histologie mais c'est assez peu courant.

a) Différents types de stratégies pour la détection

Une grande diversité de biocapteurs, utilisant différentes techniques, peuvent-être réalisés à partir d'aptamères. Ces biocapteurs se composent généralement d'un aptamère relié un élément transducteur qui convertit l'événement de la liaison de l'aptamère à sa cible en un signal détectable et mesurable analytiquement. Les aptamères expérimentent souvent des changements conformationnels lorsqu'ils interagissent avec leur cible, ce qui facilite la détection de l'évènement de la liaison de l'aptamère à sa cible (Song et al., 2008).

La plupart des tests de détection peuvent se répartir en deux catégories : ceux avec un seul aptamère se fixant sur la cible à détecter (single-site binding) et ceux avec deux molécules-sonde se fixant sur la cible, que l'on appelle « sandwich » (Song et al., 2008). Dans cette configuration en « sandwich », on peut utiliser en duo deux aptamères, ou bien un aptamère et un autre ligand comme par exemple un anticorps. La seule contrainte est que les deux molécules reconnaissent la cible à des sites de liaisons différents. Dans cette configuration en sandwich, généralement un des partenaires est immobilisé sur une surface (une électrode, une surface plane ou une nanoparticule) et est chargé de fixer la molécule cible, tandis que le deuxième partenaire est conjugué à une molécule permettant la détection d'un signal. Généralement, lorsqu'un aptamère se fixe à une petite particule, il l'englobe au sein d'une poche, les tests de détection en sandwich ne peuvent pas être réalisés puisqu'un 2^{ème} ligand ne pourrait se fixer sur la petite molécule. Les protéines étant plus grandes, les tests de détection de type « sandwich » peuvent être plus aisément réalisés.

b) Méthode détection à signaux optiques

Le signal optique est le type de signal le plus utilisé. Il existe une grande diversité de signaux utilisables : colorimétrique, fluorescent, bioluminescent, etc. Je vais présenter ici deux systèmes de détection à signaux optiques très utilisés pour les aptamères (Song et al., 2008).

Les aptamères peuvent être facilement greffés sur une surface ou couplés à une enzyme HRP (Horseradish peroxidase). Ils peuvent donc être utilisés dans un test ELISA, on parle alors de test ELASA (enzyme-linked apta-sorbent assay). Comme pour les tests ELISA, les tests ELASA peuvent être utilisés dans plusieurs configurations différentes : deux aptamères ou bien un aptamère et un anticorps, reconnaissant des sites différents sur une molécule peuvent être utilisés en sandwich (Toh et al., 2015) Figure 21-A.

Une autre forme de biocapteur fluorescent fréquemment utilisé est la technique dite « molecular beacon » : l'aptamère est organisé sous une forme d'épingle à cheveux, marqué en un bout avec un fluorophore et de l'autre avec une molécule éteignant le signal (quencher). Lorsque la cible se fixe sur l'aptamère, la tige de l'épingle à cheveux formé par l'aptamère se défait, et le fluorophore se retrouve spatialement éloigné du « quencher » libérant alors le signal fluorescent (Yamamoto et al., 2000) (Figure 21-A.)

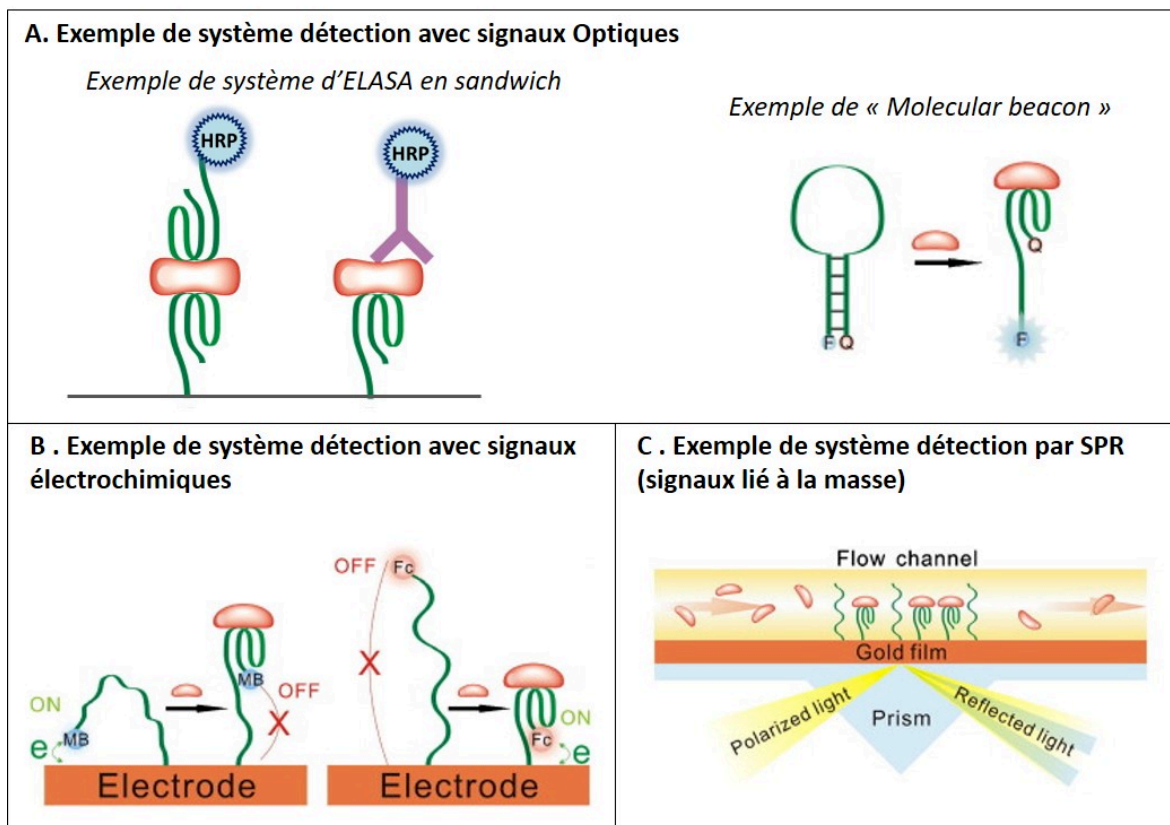


Figure 21 - Exemple de Système de détection à base d'aptamère. A - Exemple de système de détection avec un signal optique. A gauche : Exemple de système de test ELASA en « sandwich » avec deux aptamères ou bien un aptamère et un anticorps. A droite : Exemple d'aptamère en forme de « molecular beacon », lorsque l'aptamère se lie à la cible le fluorophore se retrouve spatialement éloigné du « quencher » libérant alors le signal fluorescent. B – Exemple de système à signaux « off » ou « on » électrochimique. A gauche : Lors de la liaison à la cible, l'aptamère se replie selon la structure permettant l'interaction avec la cible. La molécule oxydo-réductrice est alors éloignée de l'électrode, et le signal s'éteint. A droite : Dans le cas contraire, lors de liaison à la cible, l'aptamère en adoptant la structure permettant l'interaction avec la cible rapproche la molécule oxydo-réductrice de l'électrode, et le signal se déclenche. C - Exemple du système de détection par SPR à base d'aptamère. Adapté de (Song et al., 2008).

c) Méthodes utilisant d'autres types de signaux

Certains systèmes de détection peuvent utiliser des signaux électrochimiques. Les aptamères, conjugués à une molécule oxydo-réductrice sont alors immobilisés sur une surface conductrice (Figure 21-B). Lors de la formation du complexe aptamère/cible, le changement de conformation de l'aptamère modifie les caractéristiques d'électro-transfert entre la molécule oxydo-réductrice et la surface conductrice. Ceci génère un changement de signal mesurable (Song et al., 2008). Ainsi, l'entreprise CibusDx a mis au point une plateforme à base d'aptamères pour la détection de pathogènes aquatiques et de toxines (Kalra et al., 2018). Ce détecteur est composé d'un analyseur électrochimique portable compatible avec un smartphone ou une tablette, qui détecte la reconnaissance de la cible par l'aptamère

immobilisé sur une bandelette. Ce détecteur à faible coût est donc adapté aux utilisations en extérieur.

Le troisième type de signal utilisé est celui des systèmes de détection des signaux liés à la masse, comme par exemple la méthode de SPR (pour une description plus précise de la technique, voir paragraphe de la partie V.D.4)a) ci-dessus page 71) (Figure 21-C). Ces systèmes ont néanmoins pour inconvénient de demander des machines spécialisées, et sont donc difficilement utilisables comme méthode de détection courante.

2) Les aptamères pour l'imagerie

Au cours de ma thèse, j'ai participé à la rédaction d'une revue sur les aptamères utilisés pour l'imagerie moléculaire et les applications en théranostique (Bouvier-Muller and Duconge, 2018b). Cette revue est en Annexe A.

3) Les aptamères pour la purification

Bien que les aptamères aient les caractéristiques requises comme sonde de capture en vue de la purification de molécules, il y n'a actuellement que quelques essais qui ont été réalisés pour utiliser les aptamères pour la purification. En effet, leur haute affinité et leur spécificité élevée ainsi que leur capacité à être mobilisé facilement sur des surfaces en font des sondes de capture prometteuses (Beloborodov et al., 2018; Perret and Boschetti, 2018).

Ainsi, en 2017 Forier et ses collaborateurs utilisèrent des aptamères pour la purification de plusieurs protéines d'intérêt thérapeutique par chromatographie d'affinité (Forier et al., 2017). Cette expérience a été réalisée en vue de purification de protéines recombinantes à partir de culture cellulaire ou du lait d'animal transgénique. Trois protéines ont été ciblées : le facteur de coagulation VII (utilisé pour le soin des personnes hémophiles), le facteur H (impliqué dans la reconnaissance du non-soi) et le facteur IX (appartenant au système de coagulation dépendent de la vitamine K). Les aptamères Mapt2.2CS, Nonapta5.1 et Mapt1.2CS chacun reconnaissant spécifiquement une des protéines d'intérêt réussirent en une étape de purification par chromatographie d'affinité à purifier de manière très importante les protéines d'intérêt. L'éluat notamment du facteur IX avait une pureté de 98%, en partant d'une solution à seulement 0.5%.

4) Les aptamères pour la thérapie

Les aptamères peuvent être utilisés selon différentes stratégies thérapeutiques (Zhu and Chen, 2018). Il existe deux grands types de stratégie. Les aptamères peuvent être directement des molécules thérapeutiques ou ils peuvent être utilisés pour guider les molécules thérapeutiques vers le site d'intérêt chez le patient. Actuellement, le seul aptamère à but thérapeutique commercialisé est le Pegaptanib. D'autres sont en phase d'essais clinique (Kaur et al., 2018).

a) Les aptamères comme molécules thérapeutiques

Les aptamères peuvent être la molécule thérapeutique, qui module les voies biologiques dans le but de lutter contre de nombreux types de maladies telles que le cancer, les maladies infectieuses ou les maladies cardiovasculaires.

Le Pegaptanib (aussi appelé Macugen), le seul aptamère actuellement utilisé en thérapie, appartient à cette catégorie. Il est utilisé pour le traitement néovasculaire de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Ng et al., 2006). Le Pegaptanib est dirigé contre le facteur de croissance vasculaire endothéliale VEGF₁₆₅. Il bloque l'interaction du VEGF avec son récepteur et ainsi stoppe la croissance des vaisseaux sanguins dans l'œil. Ce médicament a été approuvé en 2004 par la FDA après des essais cliniques concluants (Gragoudas et al., 2004).

Le Pegaptanib est un aptamère ayant été sélectionné par SELEX contre le VEGF₁₆₅. Des modifications post-SELEX de la séquence obtenue ont été ensuite réalisées. La banque utilisée au départ du SELEX contre le VEGF₁₆₅ était composée d'oligonucléotides ayant des bases pyrimidines 2'-Fluoro et des bases purines naturelles (Ruckman et al., 1998). Sa séquence a été réduite à sa longueur minimale n'entraînant pas une baisse de l'affinité pour le VEGF₁₆₅. D'autres modifications ont ensuite été réalisées afin d'améliorer encore la résistance aux nucléases et à la clairance rénale de l'aptamère de chimie 2'Fluoro-pyrimidine obtenu à l'issue du SELEX. Toutes les bases purines, sauf deux adénines impliquées dans l'interaction avec le VEGF₁₆₅, ont été changées en bases 2'O-méthyl. Une molécule de polyéthylène glycol (PEG) a été ajoutée du côté 5'(Figure 22). Ces modifications n'entraînaient pas une baisse d'affinité trop importante : la molécule finale thérapeutique du Pegaptanib se lie à sa cible VEGF₁₆₅ avec une affinité très élevée ($K_d = 50 \text{ pM}$) (Vinores, 2006).

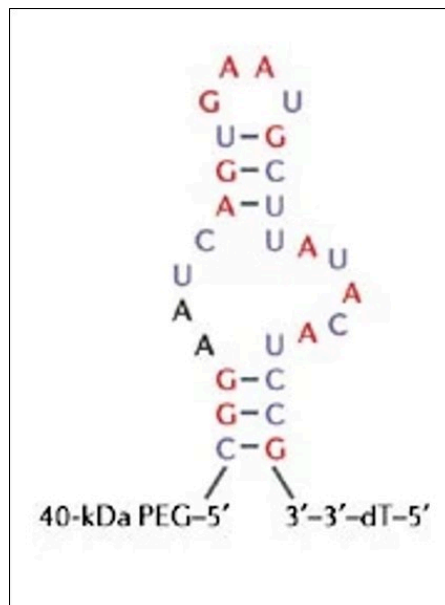


Figure 22 - Séquence et structure secondaire prédite du Pegaptanib. Les purines 2'-O-méthylées sont représentées en rouge, les pyrimidines modifiées par le 2'-fluor sont représentées en bleu et les nucléotides non modifiés sont représentés en noir. L'endroit de la conjugaison à la molécule de PEG de 40 kDa est indiqué. Figure adaptée de (Ng et al., 2006)

b) Les aptamères pour guider le transport de molécules thérapeutiques

Les aptamères peuvent aussi être utilisés pour guider les médicaments vers les sites d'intérêts. Dans ce contexte, il a été démontré que les aptamères conjugués à des molécules thérapeutiques peuvent améliorer la distribution sélective des médicaments, et permettent donc d'optimiser l'action de la molécule thérapeutique (Alshaer et al., 2018). Les aptamères ont ainsi été évalués en chimiothérapie, radiothérapie, et en thérapie génique (Zhu and Chen, 2018). Par exemple, Alshaer et son équipe ont montré qu'un aptamère (nommé Apt1) sélectionné contre les récepteurs CD44, qui sont retrouvés surexprimés dans un grand nombre de tumeurs, permettait d'augmenter l'absorption cellulaire des liposomes avec lequel il était conjugué (Ababneh et al., 2013; Alshaer et al., 2015).

Un grand nombre d'objets différents (organiques, inorganiques) peuvent être utilisés pour transporter les molécules thérapeutiques : liposome, particule d'or, dendrimère, quantum dot, particules magnétiques, etc. chacune ayant des particularités différentes. Différentes molécules thérapeutiques peuvent ensuite être associées aux nanoparticules : petites molécules chimiques comme des anticancéreux, siRNA (silencing RNA), anticorps, etc. La Figure 23 présente quelques exemples de complexes.

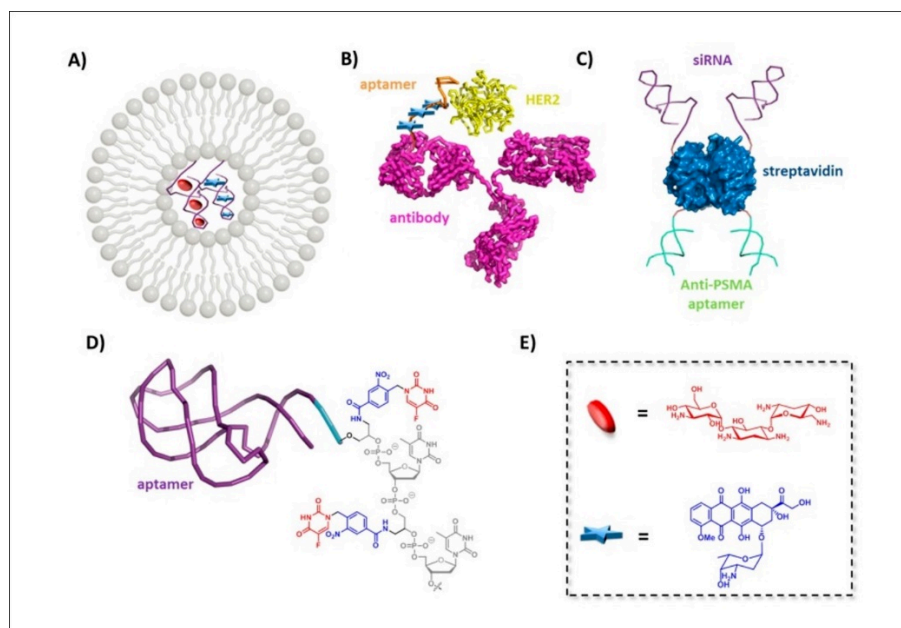


Figure 23 - Exemples de systèmes à base d'aptamères utilisés comme systèmes de transports de molécules thérapeutiques. A - Encapsulation dans un liposome de complexes aptamère-doxorubicine. B - Duo aptamère/anticorps permettant une reconnaissance en « sandwich » de la protéine HER2, spécifique des cellules cancéreuses et l'administration de doxorubicine. C - La streptavidine sert de noyau pour la connexion de deux aptamères anti-PSMA et de deux molécules de siRNA. D - Deux molécules thérapeutiques de 5-fluorouracile (montrée en rouge) sont connectées via un groupement de liaison photo-clivable (montré en bleu) à un complexe aptamère-oligonucléotide. E - Structures chimiques de la tobramycine (rouge) et de la doxorubicine (bleu). Figure issue de (Röthlisberger et al., 2017).

5) Les aptamères comme théranostique

Le terme « théranostique » est utilisé à propos des recherches menées pour combiner en un seul agent des capacités diagnostiques et thérapeutiques afin de développer des thérapies individualisées plus spécifiques. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la rédaction d'une revue sur les aptamères utilisés pour l'imagerie moléculaire et les applications en théranostique (Bouvier-Muller and Duconge, 2018b). Cette revue est en annexe A.

F. Forces et faiblesses des aptamères, ces anticorps « synthétiques »

Les aptamères sont souvent décrits comme des « anticorps synthétiques ». Ces deux types de molécule sont en effet capables de se fixer à un ligand-cible avec une haute affinité et une spécificité élevée. Les aptamères ont cependant de nombreux avantages par rapport aux anticorps : moins chers et beaucoup plus stables dans le stockage à long terme, ils peuvent être synthétisés chimiquement et sont beaucoup plus facile à conjuguer (Pestourie et al., 2005). De plus, les anticorps ne peuvent être conçus que contre des cibles immunogéniques alors que les aptamères peuvent être conçus contre n'importe quel type de cible (Tableau 3).

	Anticorps	Aptamères
Identification	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vivo</i> ○ Difficile de diriger sa spécificité 	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i> par SELEX ○ Les contre-sélections durant le SELEX permettent de diriger sa spécificité
Cible	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cibles immunogéniques uniquement ○ Affinité du pM au nM 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Tous type de cible ○ Affinité de l'ordre du nM
Production	<ul style="list-style-type: none"> ○ Culture : Complexe et onéreuse ○ Variabilité d'un lot à l'autre 	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>In vitro</i>: Facile, rapide et peu coûteux ○ Peu de variabilité entre les lots
Stabilité lors du stockage	<ul style="list-style-type: none"> ○ Stockage : plusieurs années 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Stockage : dizaines d'années
Modification chimique	<ul style="list-style-type: none"> ○ Difficile à réaliser de manière précise. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Modification facile à une position voulue

Tableau 3 - Comparaison des aptamères et des anticorps

Cependant, malgré leurs capacités prometteuses, le succès commercial des aptamères n'est pas celui escompté. La faible nombre d'aptamères commercialisés pourrait être attribué à un certain nombre de facteurs (Rothlisberger and Hollenstein, 2018).

Une des raisons souvent évoquées est le fait que la méthode du SELEX a longtemps été protégée par des titres de propriété intellectuelle, limitant considérablement l'exploitation commerciale des aptamères. En effet, le brevet de la méthode SELEX n'a expiré que depuis 2011 (Gold and Tuerk, 1993, 1995).

D'autres facteurs sont de type contingent. Ainsi, les anticorps dominent fortement dans les domaines thérapeutiques, de détection et de diagnostic, en termes d'infrastructure industrielle, de connaissance de leurs propriétés et formulation pharmacocinétiques, et

d'investissement. L'insertion d'un anticorps nouvellement développé sur le marché de la communauté scientifique se fait donc plus aisément que celui d'un aptamère car les techniques sont déjà au point et les expérimentateurs déjà formés à l'utilisation de ce type de biomolécules.

Une autre limitation importante des aptamères est qu'il est parfois compliqué d'isoler des aptamères ayant une forte affinité pour certaines cibles. En effet, les aptamères sont chargés négativement et il leur est difficile de se lier au niveau des poches hydrophobes des cibles protéiques (Gelinas et al., 2014; Hirao et al., 2018). D'autres composés tels que les sucres sont également connus pour être difficile à cibler pour les aptamères (Li et al., 2008b). Ces limitations peuvent être surmontées par l'utilisation de bases modifiées, mais celles-ci restent une technologie novatrice, encore peu répandue dans le domaine des aptamères.

VI. Aptamères précédemment obtenus contre la protéine α -synucléine

La plupart des aptamères publiés jusqu'à présent ont été sélectionnés dans le domaine de la cancérologie, que ce soit en tant que molécule thérapeutique ou bien en vue de guider un module contenant des molécules thérapeutiques. Peu d'aptamères ont donc été sélectionnés sur des cibles moléculaire impliquées dans les MNs, néanmoins leur nombre augmente d'année en année. J'ai d'ailleurs participé à l'écriture d'une review à propos des aptamères sélectionnés pour les MNs (Bouvier-Muller and Duconge, 2018a). Cette revue est fournie en Annexe B.

Je vais ici présenter plus en détail les aptamères ayant été sélectionnés contre la protéine α -syn et un de ceux ayant été sélectionné contre la protéine $A\beta_{40}$. Certains de ces aptamères ont été utilisés au cours de cette thèse comme comparatifs avec nos candidats aptamères.

A. M5-15, le premier aptamère dirigé contre α -synucléine

En 2010, Tsukakoshi et ses collaborateurs effectuèrent un SELEX dans le but de sélectionner des aptamères contre la protéine α -syn monomérique (Tsukakoshi et al., 2010). La banque initiale utilisée était une banque ADN, avec un fluorophore en 5' : l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, fluorescein isothiocyanate en anglais). Quatre tours de SELEX furent effectués en utilisant comme technique de séparation l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE, acronyme de l'anglais polyacrylamide gel electrophoresis). A la fin du quatrième tour, les oligonucléotides de la banque ont ensuite été clonés et séquencés. Quatorze séquences différentes ont été obtenues, et l'affinité de sept d'entre elles pour l' α -syn a été évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cette technique évalue l'affinité d'une séquence pour une molécule en fonction du retard lors de sa migration (son « shift » en anglais) dû à son association avec la molécule. Parmi les séquences testées, le M5-15 semblait être celle avec l'affinité la plus forte pour les monomères d' α -syn, et les auteurs se concentrèrent donc sur cette séquence en particulier.

Des tests de « dot blot » ont été réalisés pour caractériser la spécificité du M5-15. Dans cette technique, les protéines sont immobilisées en un point d'une membrane nitrocellulose, le M5-15 a ensuite été incubé en cet endroit. A la fin de l'incubation et après des étapes de lavage, la quantité de M5-15 restée liée aux protéines a été évaluée à l'aide d'un anticorps anti-FITC conjugué à l'enzyme HR : l'intensité du signal étant proportionnelle à la quantité de M5-15 resté sur la membrane. Ces expériences ont montré que le M5-15 ne reconnaissait ni la protéine A β_{42} , ni la BSA (Bovine serum albumin). Il a aussi été observé que le M5-15 se liait aussi à la forme oligomérique de l' α -syn avec plus d'affinité qu'avec la forme monomérique (Figure 24-B). Il a également été observé que la quantité de M5-15 liée aux protéines augmente avec la quantité de protéine α -syn monomérique déposée sur la membrane (Figure 24-A).

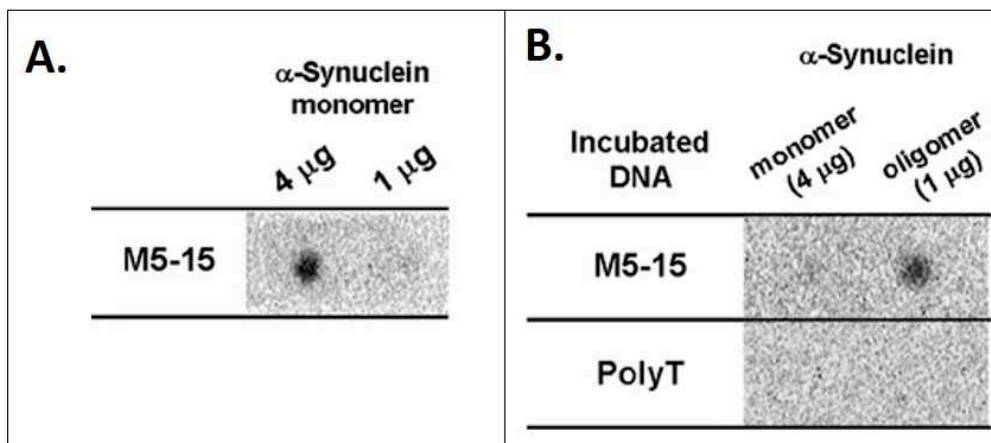


Figure 24 - Détermination de la spécificité de l'aptamère M5-15 par dot blot. A - Comparaison par dot blot de l'affinité du M5-15 pour les formes monomérique et oligomérique d' α -synucléine. Respectivement 4 et 1 μ g d' α -syn ont été immobilisés sur la membrane et incubés avec 5 μ M de M5-15 marqué avec le fluorophore FITC. B - Comparaison dans les mêmes conditions de l'affinité du M5-15 et d'une séquence-contrôle poly-Thymine pour les formes monomérique et oligomérique d' α -synucléine. Adapté de (Tsukakoshi et al., 2010).

Ces résultats doivent néanmoins être regardés avec un œil critique : Les résultats entre deux expériences de dot blot ne sont pas reproductibles : Le M5-15 se fixe sur 4 μ g d' α -syn monomérique dans la Figure 24-A, mais pas dans la Figure 24-B. De plus, un oligonucléotide composé uniquement de thymine ne peut être un bon témoin négatif pour un aptamère. Enfin, à la fin de 4 tours de SELEX, 15 séquences différentes ont été obtenues après séquençage de clones, à priori aucune séquence ne s'est suffisamment enrichie lors des tours de SELEX, des tours supplémentaires de SELEX auraient dû être réalisés afin de garantir un bon enrichissement de certaines séquences.

B. T-SO508, un aptamère spécifique de la forme oligomère d' α -synucléine

En 2012, la même équipe a effectué une autre sélection en vue d'isoler des aptamères pouvant permettre de discriminer spécifiquement les formes oligomériques d' α -syn, des formes monomériques et fibrillaires (Tsukakoshi et al., 2012). La même banque a été utilisée, et les oligomères d' α -syn ont été produits avec les mêmes techniques. Le SELEX a été composé

de 5 tours de sélection. Les deux premiers tours de sélection ont été réalisés contre les oligomères d' α -syn, en utilisant comme technique séparative la migration sur gel d'agarose. Pour les tours 3 à 5 de sélection, une autre technique de séparation, de type compétitif, a été utilisée (Figure 25 – A). A chaque tour, la banque était incubée sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle a été immobilisés à des endroits différents des monomères, des oligomères et des fibres d' α -syn. A la fin de l'incubation, les oligonucléotides s'étant fixés sur l'endroit où ont été immobilisés les oligomères étaient extraits et amplifiés en vue du tour suivant de sélection. A la fin de ces tours de sélection, une analyse par séquençages des banques du 5^{ème} et du 6^{ème} tours a permis d'identifier 67 séquences dont l'affinité pour les oligomères d' α -syn a été ensuite testée par dot blot.

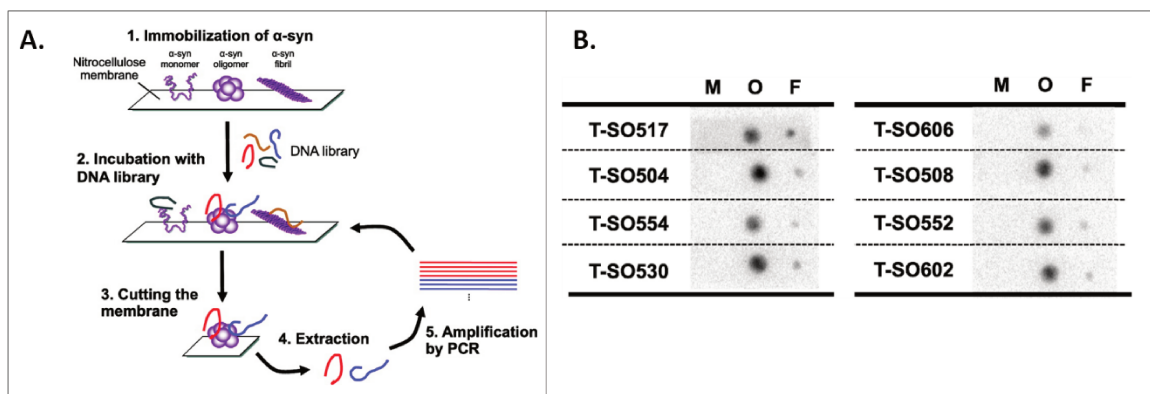


Figure 25 – Sélection et caractérisation des T-SO508 et T-SO530. A- Méthode de sélection compétitive utilisée pour les tours 3 à 5 du SELEX. La banque est présentée à une membrane de nitrocellulose sur laquelle sont fixés des formes monomériques, oligomériques et fibrillaires d' α -syn. Les séquences s'étant fixées sur les formes oligomériques et non monomériques et fibrillaires sont extraites et amplifiées par PCR pour le tour de sélection suivant. B – Evaluation de l'affinité par dot blot des 8 séquences les plus prometteuses pour les formes monomériques (M) oligomériques (O) et fibrillaires (F) d' α -syn. Adapté de (Tsukakoshi et al., 2012).

Cette étape de screening a permis d'identifier 8 séquences se fixant aux oligomères et reconnaissant avec une affinité moindre les monomères et les fibres d' α -syn (Figure 25-B). Pour deux d'entre elles, les T-SO508 et T-SO530, des mesures d'affinité précises ont été réalisées à l'aide d'une méthode de type ELISA, appelée ELONA (enzyme-linked oligonucleotide assay), utilisant une nouvelle fois un anticorps anti-FITC conjugué à une enzyme HRP. Les K_d des T-SO508 et T-SO530 pour les oligomères d' α -syn ont été évalués à 68 et 63 nM, respectivement.

Les auteurs ont aussi souhaité vérifier si les aptamères obtenus étaient spécifiques de l' α -syn. Des tests d'affinités par ELONA sur des oligomères d' $A\beta_{40}$, ont montré que ces aptamères reconnaissent aussi ces oligomères. Le K_d du T-SO508, qui semble avoir l'affinité la plus forte, a été évalué à 25 nM pour les oligomères d' $A\beta_{40}$. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les aptamères sélectionnés pourraient reconnaître les feuillets β , qui sont les structures communes aux oligomères amyloïdes. Cette étude met en évidence la difficulté à sélectionner des aptamères reconnaissant des fibres d' α -syn n'ayant pas d'affinité secondaire pour d'autres fibres d'amyloïdes.

Deux points manquent néanmoins dans cette étude. Aucune séquence aléatoire (« scramble » en anglais) n'a été utilisée comme témoin négatif pour comparer les capacités des aptamères obtenus. De plus, aucune étude n'a permis de mettre en évidence les différences structurales entre les oligomères et les fibres d' α -syn. Une partie de la communauté scientifique pense que ces différences sont faibles et que d'un point de vue structural les oligomères sont simplement des fibres plus courtes : sélectionner des aptamères distinguant ces deux structures serait donc difficile.

C. F5R1 et F5R2, deux aptamères visant à bloquer l'oligomérisation d' α -synucléine

En 2018, Zheng et son équipe publièrent les résultats d'un projet dans lequel ils sélectionnèrent des aptamères capables d'inhiber l'agrégation de l' α -syn *in vitro* (Zheng et al., 2018). Ce projet avait pour objectif de proposer une alternative aux immunothérapies développées pour la maladie de Parkinson (MP). Les auteurs ont choisi pour ce SELEX une banque de chimie ADN. Neuf tours de sélection ont été réalisés contre des protéines d' α -syn monomériques fusionnées à la glutathion-S-transférase. Ceci permettait à l' α -syn de se lier à des billes de glutathion-sépharose (GST). Lors des tours deux et cinq du SELEX, des contre-sélections furent réalisées contre des billes de sépharose-glutathion sans α -syn-GST. A la fin du 9^{ème} tour, la banque fut séquencée par « deep sequencing ». Les deux séquences les plus amplifiées dans la banque, appelées F5R1 et F5R2 furent sélectionnées pour être caractérisées plus en détail.

Des tests préliminaires sur dot-blot permirent de montrer que les deux séquences se liaient seulement à l' α -syn, et n'avaient pas d'affinité pour les protéines BSA ou A β ₄₂. L'affinité précise du F5R1 et du F5R2 pour l' α -syn fut ensuite mesurée : les F5R1 et F5R2 se liaient à l' α -syn avec des K_d de 2.4 et 3.07 nM respectivement. D'autres mesures ont montré que F5R1 montrait une légère affinité pour les formes monomériques de l' α -syn, tandis que le F5R2 n'en n'avait aucune.

Afin de déterminer si les aptamères avaient la capacité d'inhiber l'agrégation de l' α -syn, des tests d'agrégation *in vitro* furent réalisés, avec pour rapporteur la ThT. Ces tests montrèrent qu'en présence des aptamères le signal de la ThT ne croissait pas : les aptamères avaient donc la capacité d'inhiber la formation de fibres d' α -syn par rapport à une séquence contrôle aléatoire (Figure 26-A). Néanmoins, ces aptamères devaient être présents en quantité importante : ratio de 1:10 entre l' α -syn et les aptamères. Des tests ont ensuite été réalisés sur des cellules, démontrant que ces aptamères étaient aussi capables d'inhiber l'agrégation de l' α -syn *in cellulo*.

D'autres études ont été réalisées sur des cellules de cultures neuronales. Ces cellules étaient incubées en présence d'aptamères 2h avant leur infection par des vecteurs lentiviraux exprimant la protéine α -syn. Il a été observé que les aptamères étaient capables de réduire la décroissance du potentiel membranaire mitochondrial et la mort des neurones due à la surexpression de l' α -syn (Figure 26-B).

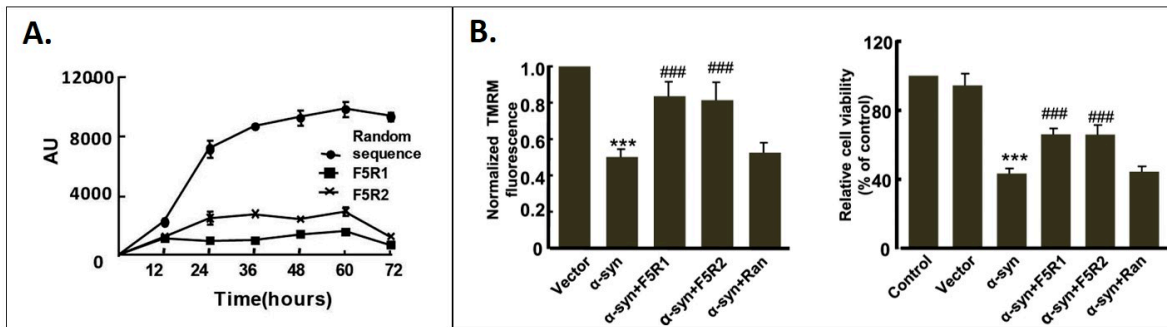


Figure 26 - Caractérisation des capacités des aptamères F5R1 et F5R2. A - Analyse cinétique de l'agrégation d'a-syn en présence des aptamères F5R1 et F5R2 à l'aide de ThT (le rapport molaire entre l'a-syn et les aptamères est de 1:10). B - Mesure du potentiel transmembranaire mitochondrial et de la survie des cellules primaires de neurones 8 jours après injection de vecteurs lentiviraux exprimant la protéine a-syn. Les cellules ont été au préalable traitées avec les aptamères F5R1 ou F5R2 ou bien avec une séquence contrôle aléatoire. Adapté de (Zheng et al., 2018)

La même équipe a utilisé l'aptamère le plus prometteur, le F5R2 dans une autre étude publiée en 2019 afin d'évaluer son potentiel thérapeutique *in vivo* (Ren et al., 2019). Ces souris ont reçu une injection de fibres d' α -syn dans le striatum. Elles ont ensuite été traitées par des injections quotidiennes d'exosomes contenant des aptamères et ayant une surface modifiée sur laquelle avait été fixé des glycoprotéines virales spécifique des neurones afin de favoriser l'entrée des aptamères à l'intérieur des neurones. 30 jours après l'injection de fibres, il a été observé que le traitement quotidien des souris a permis de réduire le nombre d'agrégats pathologiques d' α -syn et a empêché l'apparition de déficiences motrices 30 jours après l'injection. De manière très intéressante, les séquences-contrôles « scramble » n'avaient, elles aucun effet bénéfique chez les souris. Cette étude met en évidence le potentiel thérapeutique de l'aptamère F5R2 dans le cadre des synucléinopathies.

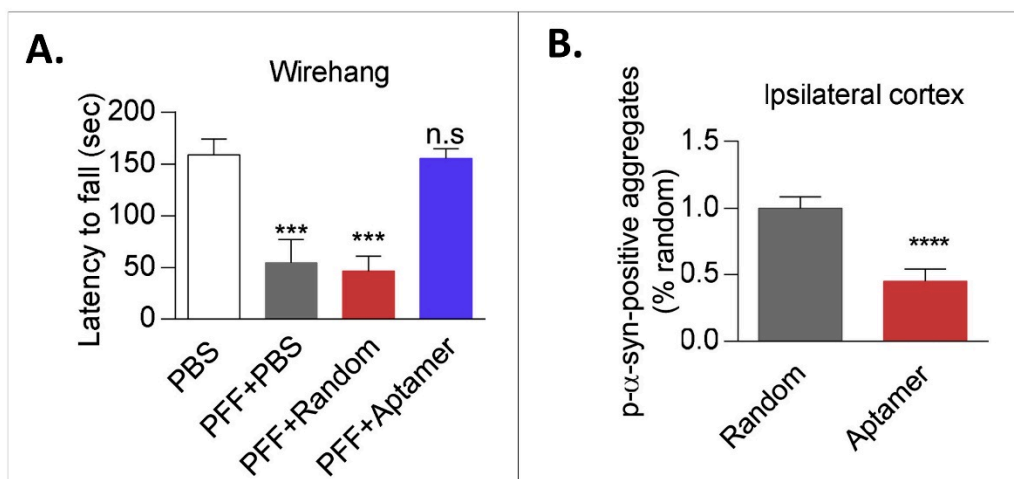


Figure 27 - Les effets protecteurs de l'aptamère F5R2 chez des souris ayant subies une injection de fibre d' α -syn. A - Résultats des tests de motricité chez les souris 30 jours après l'injection des fibres. Le groupe de souris ayant reçu une injection quotidienne d'exosomes chargés en aptamères F5R2 a les mêmes résultats que le groupe n'ayant pas eu d'injection de fibre. Une séquence ADN aléatoire a été utilisée comme témoin : le groupe de souris ayant été injectées avec cet aptamère montre une déficience motrice comparable au groupe

de souris n'ayant pas eu de traitement. B- Le groupe de souris ayant reçu en traitement l'aptamère F5R2 a environ 50% de moins d'agrégats de la protéine α -syn que le groupe ayant été traité avec une séquence aléatoire contrôle. Adapté de (Ren et al., 2019).

L'aptamère F5R2 montre donc un potentiel thérapeutique intéressant. En termes de détection, les aptamères F5R1 et F5R2 semblent être de bons ligands pour les fibres d' α -syn, ayant des K_d de l'ordre du nanomolaire. Néanmoins, leur affinité pour les autres types de fibres amyloïdes devrait être caractérisée avant de statuer sur leur spécificité.

D. Essai de sélection pour isoler un aptamère reconnaissant la forme oligomérique d'Amyloïde- β

En 2009, Rahimi et son équipe publièrent une étude dans laquelle ils avaient essayé de sélectionner des aptamères d'ARN reconnaissant de manière spécifique des oligomères trimériques d' $A\beta_{40}$ (Rahimi et al., 2009). Les aptamères obtenus se liaient toujours aux fibrilles d' $A\beta_{40}$ avec une affinité bien plus grande que pour les oligomères, quelle que soit la méthode de sélection utilisée.

Un SELEX classique de 12 tours avait été premièrement réalisé, ce qui leur avait permis de sélectionner plusieurs séquences (dont les séquences appelées KM33 et KM41). Néanmoins, des tests d'affinité sur dot blot montraient que ces candidats avaient de l'affinité pour différentes fibres amyloïdes, dont les fibres de protéines $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ et de prion, mais pas pour les oligomères trimériques d' $A\beta_{40}$. Afin d'obtenir des aptamères reconnaissant les oligomères et non les fibres d' $A\beta_{40}$, les auteurs décidèrent de recommencer la sélection en incluant dans le processus de SELEX deux contre-sélections contre les fibres d' $A\beta_{40}$ à la fin des 5^{ème} et 6^{ème} tours de sélection. Néanmoins, ce processus ne fonctionna pas : les banques issues de ces SELEX avaient toujours de l'affinité pour les fibres $A\beta_{40}$. Une dernière stratégie fut tentée : ils réalisèrent un « SELEX négatif » composé de 5 tours de sélection négative contre les fibres d' $A\beta_{40}$. Malheureusement, même cette stratégie permit d'amplifier des séquences ayant une bonne affinité pour les fibres d' $A\beta_{40}$. Des derniers tests par dot blot sur les banques initiales « naïves » montrèrent que celles-ci avaient intrinsèquement une bonne affinité pour les fibres amyloïdes, comme les fibres de protéines $A\beta_{40}$, $A\beta_{42}$ et de prion.

Les auteurs finirent par conclure que les oligonucléotides d'ARN avaient intrinsèquement une bonne affinité pour les fibres d'amyloïdes et leur conformation en feuillet β , indépendamment de la séquence, rendant la sélection d'aptamères spécifique ardue (Rahimi, 2018). Ces résultats rappellent ceux obtenus par Tsukakoshi. Il sera donc important au cours de notre projet de faire attention à l'affinité secondaire des aptamères que nous obtiendrons pour les autres fibres d'amyloïdes.

VII. Objectifs de la thèse

Les MNs restent à ce jour toujours principalement dépourvues de solutions thérapeutiques. Cette situation peut en partie être expliquée par le fait que la communauté scientifique peine à identifier avec certitude les causes à l'origine de ces pathologies. De nombreuses études à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire ont été réalisées afin de caractériser en détail les mécanismes et dysfonctionnements associés à la mort neuronale. Un phénomène d'importance a été mis en évidence : les MNs ont pour point commun d'être caractérisées par l'accumulation de dépôts de formes agrégées fibrillaires de protéines. De nombreuses protéines sont sujettes à cette anomalie : les protéines Tau, A β , α -syn... Une protéine peut s'agréger et s'accumuler dans plusieurs MNs distinctes et au sein de certaines MNs, plusieurs protéines différentes peuvent s'agréger et s'accumuler. L'hypothèse selon laquelle le phénomène d'apparition anormale de dépôts protéiques pouvait être la cause de la mort des neurones a été très largement étudié depuis une quarantaine d'année.

Afin de pouvoir étudier au mieux ce phénomène, des équipes ont réussi à reproduire *in vitro* les conditions par lesquels les protéines s'agrègent sous forme de fibres. Lorsque ces fibres sont injectées dans le cerveau d'animaux, il a été observé qu'elles avaient la capacité de recruter des protéines natives pour former de nouvelles fibres. Ce phénomène se propageant peu à peu dans le cerveau, on observe alors l'apparition de dépôts protéiques mais aussi du phénomène de neurodégénération. Ces fibres sont donc capables de déclencher des MNs.

L'équipe de Ronald Melki qui travaille sur la protéine α -syn et les pathologies associées, appelées synucléinopathies (MP, AMS, DCL, etc.), a mis en évidence un phénomène important : en faisant varier les conditions d'assemblages des fibres d' α -syn, les fibres obtenues avaient des propriétés structurales et mécaniques distinctes. Ces fibres avaient aussi la capacité de transmettre leur conformation propre aux protéines natives qu'elles recrutaient aux extrémités pour s'allonger. Or, des études ont montré que les différentes fibres produites par le laboratoire de Ronald Melki se propageaient différemment chez les animaux, chacune selon un « motif » différent. De plus, les animaux déclenchaient des symptômes différents, faisant penser à des pathologies distinctes. Ces résultats suggéraient que les différentes conformations de fibres semblaient être alors des « souches » distinctes, déclenchant des synucléinopathies différentes.

L'ensemble de ces résultats a conduit l'équipe de Ronald Melki et d'autres groupes à proposer une hypothèse : l'existence des différentes synucléinopathies (MP, AMS, DCL) pourrait être expliquée par le fait que ces pathologies sont dû à des « souches » différentes de fibres. Ces différentes souches auraient des capacités de propagation distinctes dans le cerveau, liées à leurs différences structurales. Cette hypothèse est supportée par de nouveaux résultats récents. En utilisant une technique d'amplification progressive des formes agrégées de protéine appelée PMCA, il a été observé que des fibres aux conformations différentes étaient amplifiées à partir d'échantillon de patients souffrant de synucléinopathies distinctes.

Néanmoins, pour pouvoir étudier cette hypothèse il est nécessaire d'avoir des sondes moléculaires reconnaissant de manière spécifique chacune des différentes conformations de fibre. Or, il n'existe actuellement aucun ligand permettant de réaliser cette distinction. En effet, la thioflavine T, qui reconnaît spécifiquement les structures en feuillets β des fibres, reconnaît de manière non spécifique toutes les fibres amyloïdes. Concernant les anticorps, certains récemment développés sont capables de reconnaître spécifiquement les fibres d' α -syn, en les distinguant à la fois des autres fibres amyloïdes mais aussi des protéines α -syn de forme monomérique native. Néanmoins ces anticorps sont à ce jour peu utilisés par la communauté scientifique. Seul un travail reporte la mise au point de deux anticorps reconnaissant spécifiquement deux souches de fibres différentes d' α -syn.

Cette thèse a pour but de sélectionner plusieurs aptamères reconnaissant de manière spécifique plusieurs conformations de fibres d' α -syn. Une fois ces sondes mises au point, nous souhaitons aussi mettre en place des méthodes de détection simples des fibres d' α -syn, potentiellement utilisables par un grand nombre de laboratoire.

Le choix des aptamères pour développer de telles sondes semble judicieux. En effet, les aptamères sont comme les anticorps des sondes à haute affinité. De plus, l'usage des contre-sélections permettra d'orienter la spécificité lors des sélections afin d'obtenir des aptamères réalisant une discrimination élevée entre les structures. Les aptamères sont des sondes peu onéreuses, très stables et donc facilement utilisables en laboratoire. De plus, ces biomolécules sont facilement conjugables avec d'autres particules, ce qui permet d'envisager de mettre au point un grand nombre de stratégies pour la détection des différentes conformations dans des échantillons biologiques (plasma, liquide céphalo-rachidien, coupes histologiques).

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Ronald Melki qui présente une expertise dans l'élaboration de ces fibres *in vitro*, et les fibres F, R, 65 et 91 sont des fibres très bien caractérisées au niveau de leur structure. Ce projet est donc idéal comme preuve de concept, pour démontrer qu'il est bien possible de sélectionner des aptamères distinguant des conformations différentes de fibres. Ce projet est néanmoins un vrai challenge car ces fibres étant composées des mêmes protéines, l'aptamère devra être capable de reconnaître des différences structurales minimales. Cependant, nous avons émis l'hypothèse que ce projet était réalisable car le processus darwinien du SELEX permet de sélectionner des aptamères avec des spécificités excellentes. Ainsi, il a été isolé un aptamère reconnaissant avec une affinité 10 000 fois meilleure la molécule de théophylline, de la caféine alors que ces deux molécules ne diffèrent que d'un groupement méthyle.

Notre équipe possède une expertise forte dans le domaine des aptamères, mais aussi dans celui du séquençage haut débit. Le logiciel Patternity-seq récemment développé permet en effet une analyse très fine de l'évolution des séquences lors de la sélection et permettra de détecter les aptamères ayant un comportement de type spécifique, même présents à de faibles pourcentages dans la banque d'oligonucléotides.

Etant donné que les aptamères précédemment développés ont tendance à reconnaître indistinctement les différentes fibres d'amyloïdes, il sera essentiel de non seulement mesurer précisément l'affinité des aptamères pour les différentes fibres d' α -syn (K_d et B_{max}), mais aussi

pour les autres types de fibres amyloïdes. Ces derniers points seront facilement envisageables car l'équipe de Ronald Melki a aussi une bonne expertise dans la conception in vitro des fibres Tau et A β .

La première partie de cette thèse présente les premiers SELEX qui ont été réalisés. Ils visaient à sélectionner des aptamères reconnaissant spécifiquement certaines des conformations F et R des fibres. Après 10 tours de SELEX, nous avons pu analyser l'évolution des séquences au sein des banques à l'aide du logiciel Patterntity-seq et choisir dix candidats aptamères que nous souhaitions caractériser. Des problèmes de reproductibilité lors des tests d'affinité ont permis de mettre en évidence des problèmes d'adhésion non spécifique des fibres sur les tubes plastiques. Nous avons supposé que ces problèmes, avaient pu compromettre les sélections. Nous avons donc choisi de recommencer les SELEX avec des conditions réduisant cette adhésion non spécifique.

La deuxième partie de cette thèse présente deux nouveaux SELEX réalisés en parallèle. Ceux-ci avaient tous deux pour objectif de sélectionner des aptamères reconnaissant la conformation F des fibres, mais pour l'un d'entre eux nous avons rajouté une étape de contre-sélection contre la fibre R, afin de sélectionner des aptamères distinguant les fibres F des fibres R. Dans le cas où cette contre-sélection serait trop dure, l'autre SELEX nous permettait d'obtenir le cas échéant des aptamères reconnaissant la fibre F, sans être complètement spécifique. Au bout de 15 tours de sélection pour chacun des SELEX, nous avons pu de nouveau analyser l'évolution des séquences au sein des banques à l'aide du logiciel Patterntity-seq et choisir quinze candidats aptamères que nous souhaitions caractériser.

Nous avons ensuite mesuré l'affinité des candidats aptamères pour les fibres d' α -syn F et R, afin de déterminer si nous avons bien obtenu les aptamères aux propriétés désirées à l'issue du SELEX. Certains candidats présentaient une affinité avec des K_d de l'ordre de la dizaine de nanomolaire, et reconnaissaient spécifiquement la fibre F et pas la fibre R. Nous avons donc décidé de caractériser nos candidats de manière plus complète en mesurant leur affinité (K_d et B_{max}) pour les fibres 65 et 91, les formes monomériques d' α -syn, ainsi que pour les fibres Tau et A β . Lors de cette étape nous avons aussi comparé nos candidats à des aptamères précédemment sélectionnés contre α -syn par d'autres équipes. Enfin, nous avons commencé à mettre au point une méthode de détection en utilisant des aptamères sur des échantillons de patients.

RESULTATS

I. Premier essai de sélection d'aptamères contre les fibres d' α -synucléine

Durant cette première partie de thèse, nous avons mis en œuvre plusieurs SELEX afin de sélectionner des aptamères reconnaissant de manière spécifique différentes conformations de fibres d' α -syn présentées dans l'introduction.

A. Conception et mise en œuvre des sélections

1) Choix des stratégies de sélection mise en œuvre

Nous avons dû réfléchir à plusieurs paramètres afin d'orienter la sélection et d'obtenir les aptamères aux propriétés désirées.

a) Objectif : Deux SELEX « R » et « 4F » visant à développer des aptamères aux spécificités différentes

Dans un premier temps, nous avons souhaité sélectionner plusieurs aptamères reconnaissant de manière spécifique les quatre conformations F, R, 65 et 91 des fibres d' α -syn. Nous souhaitons ainsi que les aptamères reconnaissant la fibre F n'aient pas (ou peu) d'affinité pour les fibres R, 65 et 91, et vice-versa pour les quatre formes de fibres. Nous souhaitons aussi que les aptamères n'aient pas d'affinité pour les formes monomériques de la protéine α -syn.

L'usage de contre-sélections était donc parfaitement indiqué pour parvenir à notre objectif. Nous avons donc décidé de procéder à quatre SELEX en parallèle nommés « F », « R », « 65 » et « 91 », de manière à obtenir les aptamères spécifiques pour chaque type de fibre. Ainsi, pour obtenir des aptamères reconnaissant la fibre R, nous avons, pour chaque tour de SELEX, en plus de l'étape de sélection contre la fibre R, réalisé une étape de contre-sélection contre les fibres F, 65 et 91 et aussi contre les monomères d' α -syn. Il aurait été simple lors de l'étape de contre-sélection de mettre dans le même mix d'incubation les monomères et les trois types de fibres. Néanmoins, étant donné la capacité des fibres à recruter les monomères d' α -syn pour s'allonger nous avons décidé par précaution de réaliser deux étapes de contre-sélection consécutives à chaque tour de sélection : d'abord une contre-sélection contre les monomères puis une 2^{ème} contre-sélection contre les trois types de fibres en mélange. Ces deux contre-sélections étaient donc ensuite suivies d'une sélection contre la conformation de fibre ciblée.

Nous avons également décidé de réaliser en parallèle un SELEX nommé « 4F » ayant pour but de sélectionner des aptamères reconnaissant les quatre formes de fibres, mais pas les monomères d' α -syn. Pour sélectionner des aptamères ne reconnaissant pas les monomères d' α -syn, mettre en place des contre-sélections à chaque tour de SELEX est une stratégie qui convient. Néanmoins comment faire pour obtenir des aptamères reconnaissant bien les quatre formes de fibres (F, R, 65 et 91) ? Mettre ensemble dans le même mix d'incubation les quatre formes de fibres favoriserait simplement la sélection d'aptamères reconnaissant au moins une des conformations de fibres. Afin d'être certain de sélectionner des oligonucléotides

reconnaissant les quatre formes de fibres, nous avons décidé d'utiliser une stratégie employée en immunologie, dans le cadre de la recherche de vaccin contre des souches de virus mutant rapidement (VIH, influenza, malaria) : l'immunisation séquentielle (Wang et al., 2004, 2010, 2015). Cette stratégie permet d'obtenir à l'issue du procédé de maturation d'affinité des anticorps dirigés contre les épitopes communs d'un groupe de différentes souches. Cette méthode consiste à présenter d'abord la souche A, puis la souche B, puis la souche C etc., plutôt que de présenter simultanément toutes les souches à chaque étape de sélection. Cette stratégie permet ainsi de sélectionner seulement les anticorps reconnaissant les souches A, B et C, et donc ceux dirigés contre l'épitope commun de ces souches. Nous avons donc décidé pour notre SELEX « 4F » de présenter séquentiellement les conformations de fibres, et donc de ne présenter à chaque tour lors de l'étape de sélection qu'une seule sorte de fibre, et en changeant celle-ci au fur et à mesure des tours. Cette étape de sélection était précédée à chaque tour de deux étapes de contre-sélections successives contre les monomères d' α -syn. Une étape de contre-sélection aurait suffi, néanmoins, ceci permettait de respecter le même rythme que les autres SELEX à chaque tour de sélection (deux contre-sélections puis une sélection), et aussi de renforcer la contre-sélection contre les formes monomériques d' α -syn.

Cependant, nous pensons que commencer directement nos cinq SELEX avec deux contre-sélections serait imposer une pression de sélection trop forte à la banque d'oligonucléotides au début du SELEX. Nous avons donc décidé de commencer nos SELEX par un tour commun sans contre-sélection. Au premier tour de SELEX la banque d'oligonucléotide a donc été présentée à un mélange des quatre fibres (F, R, 65 et 91). Les oligonucléotides ont ensuite été amplifiés puis la nouvelle banque obtenue a été divisée en cinq, pour chacun des SELEX. La Figure 28 présente le schéma des processus de sélection choisis pour les SELEX "R" et "4F" qui ont été réalisés.

Nous souhaitions mener ces quatre sélections en parallèle, malheureusement le dispositif expérimental s'est finalement révélé assez lourd. Tout d'abord pour chaque SELEX, à chaque tour de sélection nous devons procéder à deux contre-sélections consécutives suivies de l'étape de sélection. De plus, ces fibres pouvant être toxiques chez l'homme, j'ai été obligée de travailler dans un laboratoire de haute sécurité (niveau P3), et ceci a retardé la réalisation de mes expériences par rapport à un travail dans un laboratoire classique. Nous avons donc décidé à partir du tour n°4 de ne poursuivre que deux des cinq SELEX. Nous avons conservé les SELEX « 4F » et le SELEX « R ».

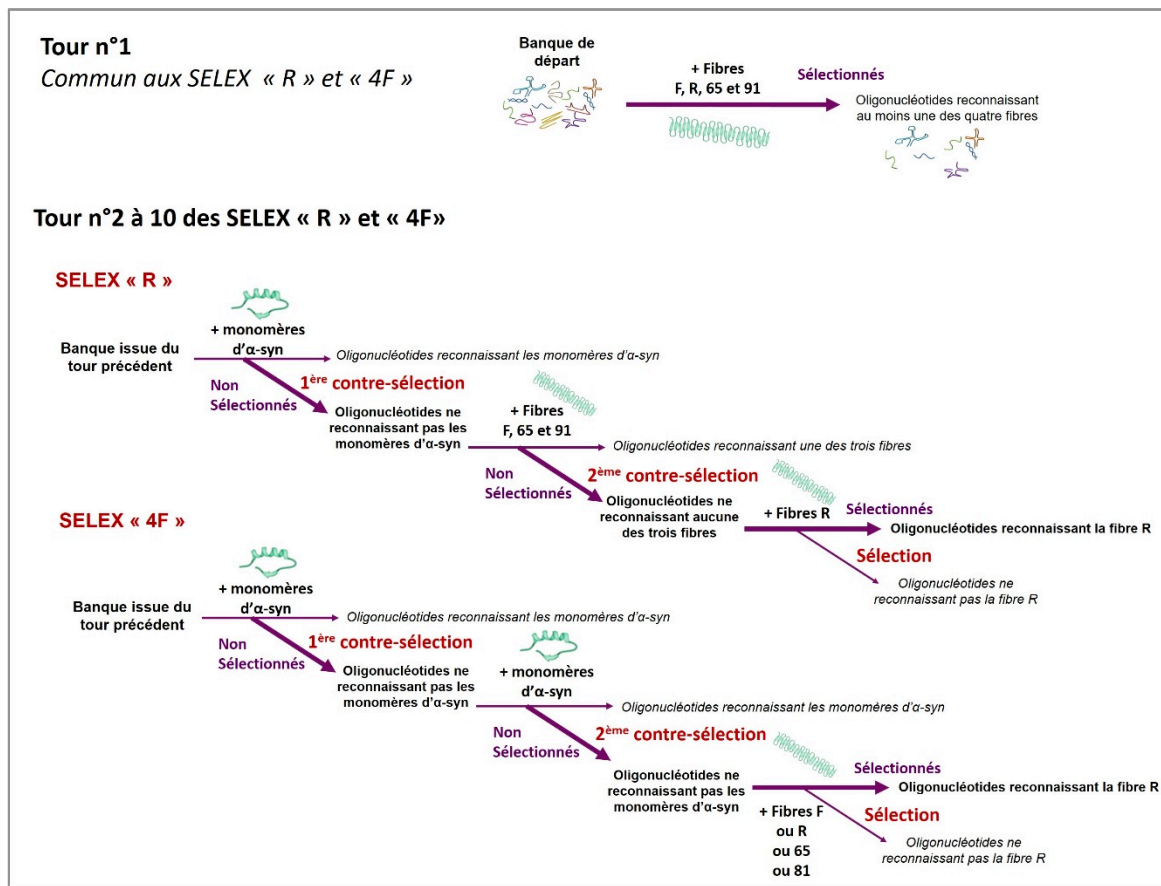


Figure 28 - Schéma des processus de sélection choisis pour les SELEX "R" et " 4F" qui ont été réalisés. Nous avons tout d'abord réalisé un tour de SELEX en commun, à faible pression de sélection, afin de réaliser parmi la banque une première sélection des séquences se liant à au moins une des quatre fibres. Le SELEX R vise à sélectionner des aptamères reconnaissant la conformation R de fibre. Le SELEX est composé d'une première contre-sélection contre les monomères d'α-syn, d'une deuxième contre-sélection contre les fibres de conformation F, 65 et 91, et enfin d'une sélection contre la fibre R. Le SELEX « 4F » vise à sélectionner des aptamères reconnaissant les quatre conformations de fibres (F, R, 65 et 91), mais pas la forme monomérique d'α-syn. Ce SELEX est composé de deux contre-sélections successives contre les formes monomériques, puis d'une sélection contre l'une des quatre conformations de fibres (F, R, 65 91). A chaque tour de SELEX, une conformation de fibre seulement était présentée lors de la sélection, et cette conformation changeait à chacun des tours de SELEX. Présenter ainsi successivement les conformations de fibres permettait d'orienter la sélection pour sélectionner les séquences reconnaissant un épitope commun entre les conformations de fibre.

b) Conception de la banque de départ utilisée

Nous devons aussi choisir la chimie de la banque utilisée pour les SELEX, sachant que celle-ci conditionne la chimie des futures aptamères. Nous avons choisi d'utiliser la chimie ARN 2'Fluoro-pyrimidine. En effet, nous souhaitons utiliser nos aptamères pour constituer un biocapteur capable de détecter les différentes conformations de fibre d'α-syn dans des échantillons de patients. Les aptamères seront donc amenés à être au contact de nucléases.

Ceci excluait la chimie ARN, trop vulnérable à ces enzymes. Nous avons donc le choix entre la chimie ADN et les chimies ARN modifiées. Nous avons finalement choisi d'utiliser une chimie ARN-2'fluoro-pyrimidine. Bien qu'onéreuse, cette chimie offrait une protection plus importante contre les nucléases. Le fait que cette chimie soit aussi bien connue et bien maîtrisée par l'équipe a aussi orienté notre choix. De plus, les aptamères ayant été publiés contre α -syn avant le début de cette thèse (M5-15, T-SO508 et T-SO530) ont une chimie ADN. Sachant que les aptamères T-SO508 et T-SO530 avaient de problèmes d'affinité secondaire contre les protéines $A\beta$, choisir un autre type de chimie nous paraissait judicieux. Nous avons utilisé une T7 ARN polymérase mutée en position 639, où une tyrosine est remplacée par une phénylalanine (Y639F) (Padilla and Sousa, 1999). Cette mutation permet l'incorporation de bases 2'Fluoro-Pyrimidine.

Nous devons aussi choisir la taille de la fenêtre aléatoire de la banque. Sachant que les banques avec des tailles de fenêtres aléatoires grandes permettent plus de possibilité en terme de structure pour les oligonucléotides, elles donnent plus de chance de réussite, c'est-à-dire plus de chance d'obtenir des aptamères ayant une bonne affinité pour la molécule-cible. Nous avons donc choisi une taille de fenêtre aléatoire de 50 nucléotides. Cette fenêtre aléatoire est encadrée par deux parties constantes de 23 nucléotides correspondant aux amorces utilisées pour l'étape de PCR lors du SELEX. L'organisation de la banque d'oligonucléotide ARN2'F utilisée au départ des SELEX est présentée en détail Figure 29.

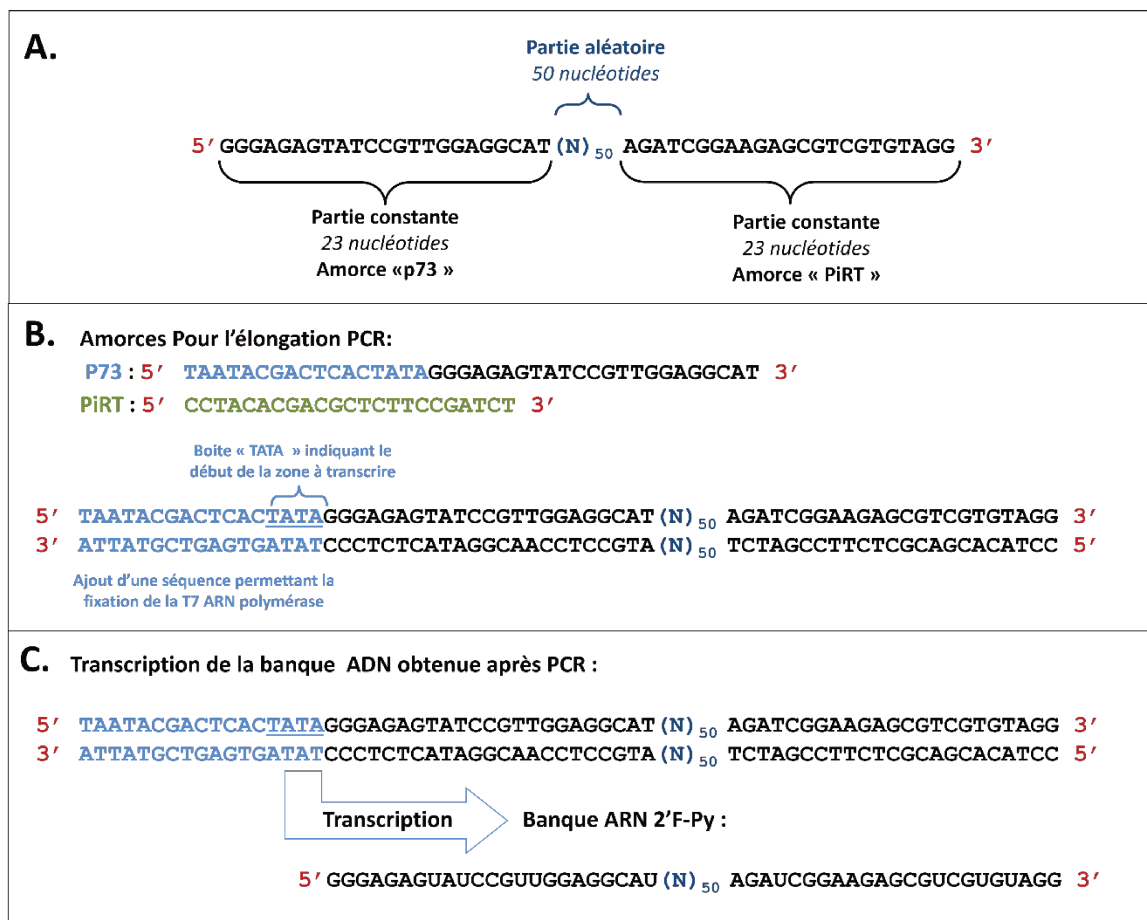


Figure 29 – Organisation de la banque d'oligonucléotide ARN2'F utilisée au départ des SELEX. A – Organisation de la banque d'oligonucléotide sous forme ADN utilisée au départ du SELEX. La banque a une longueur totale de 96 bases, pour une séquence aléatoire de 50 nucléotides. B – L'étape de PCR avec les amorces p73 et PiRT permet d'allonger la banque côté 5' et d'ajouter un promoteur pour l'ARN polymérase du Phage T7. La banque ADN obtenue après PCR, est allongée du côté 5' de 17 bases, sa longueur totale est donc de 113 bases. C – L'utilisation de l'ARN polymérase du Phage T7 (Y639F) permet de transcrire la banque ADN en incorporant des bases 2'Fluoro-pyrimidine au lieu des bases naturelles. On obtient donc ainsi une banque de chimie 2'F-Py, et de longueur de 96 bases.

c) Choix de la méthode de séparation par filtration sur nitrocellulose

Pour nos SELEX, nous avons choisi la méthode de filtration sur membrane de nitrocellulose. Cette méthode est une des premières techniques de séparation à avoir été utilisée : en 1990 Tuerk et Gold s'en sont servi pour identifier un aptamère contre l'ADN polymérase T4 (Tuerk and Gold, 1990). Le principe est le suivant : les protéines sont retenues sur la membrane de nitrocellulose par interaction hydrophobe non spécifique tandis que les acides nucléiques ne sont pas retenus et passent au travers. Ainsi, seuls les oligonucléotides s'étant fixés sur la protéine sont retenus sur la membrane. Cette technique a l'avantage de permettre la récupération des oligonucléotides ne s'étant pas fixés sur la cible lors des contre-sélections.

d) Choix du tampon de sélection

Nous n'avions pas beaucoup de contraintes concernant le choix de la composition du tampon que nous utiliserions pour nos SELEX. Néanmoins, dans le cas où ces aptamères puissent potentiellement être utilisés comme agent thérapeutique permettant de ralentir la formation de fibre d' α -syn, nous avons fait en sorte que le tampon (appelé Ts1X) se rapproche des conditions ioniques extracellulaires usuelles et nous avons choisi de réaliser le SELEX à 37°C. L'utilisation de l'hepes permettait de conserver un pH de l'ordre de 7-7.5.

Composant	Concentration
NaCl	150 mM
KCl	5,0 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgCl ₂	1,0 mM
HEPES (pH 7-7.6)	10,0 mM

Tableau 4 - Composition du tampon de sélection Ts1X utilisé lors des SELEX durant ces travaux de thèse

2) Mise en œuvre des sélections en parallèle

a) Premier tour de sélection à faible pression de sélection commun pour les différents SELEX

Nous avons commencé nos SELEX par un tour de sélection en commun. Ce premier tour de sélection avait pour but de sélectionner les oligonucléotides capables de se lier à l'une des quatre fibres.

Nous avons incubé pour ce tour la banque ARN 2'F-Py avec un mélange de fibre F, R, 65 et 91, dans le tampon Ts1X. Le passage sur une membrane de nitrocellulose a permis de séparer les oligonucléotides s'étant liés à l'une des fibres, de ceux n'ayant pas d'interaction. Les oligonucléotides retenus ont ensuite été extraits et amplifiés par RT-PCR et transcription *in vitro*.

L'ARN 2'F-Py obtenu a ensuite été divisé en cinq quantités égales, afin de commencer nos 5 SELEX en parallèle (F, R, 65, 91 et 4F).

b) Tours 2 à 10 de sélection pour les deux SELEX « R » et « 4F » en parallèle

Pour la suite de nos SELEX, nous avons fait 3 tours de sélection pour les 5 SELEX. A la fin du 3^{ème} tour, constatant que ces 5 SELEX en parallèle étaient très lourds en termes de manipulation, nous avons continué uniquement les SELEX « R » et « 4F ».

La méthode utilisée était la même que celle décrite précédemment, mais nous avons ajouté les étapes de contre-sélection comme indiqué Figure 28. Ainsi, pour chaque tour de SELEX, l'ARN 2'F-Py résultant du tour de sélection précédent est tout d'abord incubé avec les monomères d' α -syn. Ce mélange est ensuite filtré sur membrane nitrocellulose, ce qui permet de récupérer les oligonucléotides ne s'étant pas liés aux monomères. Ceux-ci, après cette première contre-sélection, sont alors mélangés avec : des monomères pour le SELEX 4F, et un mélange de fibre F, 65 et 91 pour le SELEX R. Après un deuxième temps d'incubation les solutions sont de nouveau filtrées sur la membrane de nitrocellulose, ce qui permet de récupérer de nouveau les oligonucléotides ne s'étant pas liés aux monomère (pour le SELEX 4F), et les oligonucléotides ne s'étant pas liés aux fibres F,65 et 91 (SELEX R). Ceux-ci, après cette 2^{ème} contre-sélection, sont alors mélangés avec les protéines contre lesquels les sélections sont réalisées : la fibre R, pour le SELEX « R » et l'une des quatre fibres (F, R, 65 ou 91) pour le SELEX « 4F ».

Nous avons lors du tour n°9, utilisé une technique de séparation différente : l'ultracentrifugation. Cette technique utilisait la différence de poids moléculaire entre les ARN 2'F-Py de la banque et les fibres d' α -syn. Lors d'une centrifugation à grande vitesse (100 000g), les fibres, de haut poids moléculaire, forment un culot tandis que les ARN 2'F-Py restent en solution. Cette technique nous a ainsi permis de d'isoler les ARN 2'F-Py se liant aux fibres et restant accrochés à elles lors de l'ultracentrifugation, de ceux ne se liant pas aux fibres ou bien se décrochant lors de cette centrifugation.

Lors des SELEX, après chaque tour de sélection nous avons tenté de quantifier la quantité d'ARN 2'F-Py retenue par spectrophotométrie. Néanmoins, ces quantités étaient très faibles (en dessous d'une pmole), et difficilement quantifiables. Nous n'avons pas observé d'augmentation significative au cours du SELEX de la quantité d'ARN 2'F-Py retenue après les tours de sélection. Cependant, à chaque tour de SELEX nous avons pu vérifier par migration sur gel d'agarose, l'amplification des oligonucléotides après RT-PCR.

Nous avons aussi mesuré la quantité d'ARN 2'F-Py obtenue après la RT-PCR-Transcription : nous obtenions entre 0.25 et 5.06 nmol d'ARN 2'F-Py (Tableau 5). Pour certains tours, nous obtenions des quantités inférieures à 2 nmol, ce qui est assez faible pour des SELEX mettant en jeu des séquences de chimie ARN 2'F-Py. Ceci suggère qu'une faible quantité d'ARN 2'F-Py devait être retenue lors de ces tours.

Ainsi, pour le SELEX R, nous pouvons voir dans le Tableau 5, que nous avons obtenu moins de 2 nmol d'ARN 2'F-Py après RT-PCR-transcription dans 2 tours seulement (Tableau 5). Tandis que pour le SELEX 4F nous avons obtenu moins de 2 nmol après RT-PCR-transcription dans 4 tours. Ainsi, en moyenne plus d'ARN 2'F-Py était retenu à chaque tour du SELEX R, ceci suggère qu'un plus grand nombre de séquence de forte affinité s'enrichissaient dans la banque pour ce SELEX.

		T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9 <i>Ultracentrifugation</i>	T10
SELEX R	ARN2'F utilisé au début du tour (nmol)	1.23	2.47	1.4	0.98	1.6	0.85	1.13	2.11	2.53
	ARN2'F obtenu après RT-PCR et transcription (nmol)	2.47	2.8	1.96	3.2	0.85	2.27	2.11	5.06	-
SELEX 4F	Cible de sélection	F	R	65	91	F	R	65	R	91
	ARN2'F utilisé au début du tour (nmol)	1.23	0.93	1.12	0.25	1.46	1.17	1.19	2.89	1.54
	ARN2'F obtenu après RT-PCR et transcription (nmol)	0.93	2.23	0.25	2.92	2.34	1.19	2.89	1.54	-

Tableau 5 - Résumé des quantités d'ARN 2'F-Py utilisées et obtenues pour les 10 tours de sélections SELEX "R" et "4F". Les tours où l'on a obtenu moins de 2 nmol d'ARN2'F après RT-PCR et transcription sont indiqués en orange.

Afin d'augmenter très légèrement la pression de sélection, à partir du tour 3, dès que nous obtenions plus de 2 nmol d'ARN 2'F-Py après la RT-PCR-transcription, nous utilisons seulement la moitié pour le tour suivant : 1 nmol d'ARN 2'F-Py étant suffisante pour commencer un tour de SELEX (Tableau 5).

Après 10 tours de sélection, nous avons décidé de procéder à l'analyse des banques des SELEX par séquençage haut débit.

Bilan : Nous avons réalisé 10 tours de sélection pour les SELEX « 4F » et « R ». Bien que nous n'ayons pas pu détecter d'augmentation de la quantité d'ARN 2'F-Py retenue à l'issue de chaque tour de sélection, nous avons décidé de séquencer les banques des SELEX au tour

n°10. Cette analyse devait nous permettre d'évaluer si certaines séquences avaient pu s'enrichir malgré tout ou si des tours de SELEX supplémentaires devaient être réalisés.

B. Analyse de l'évolution des SELEX par séquençage haut débit à l'aide de l'outil PATTERNITY-seq®

Des échantillons des banques correspondant aux tours 3 à 10 et 4 à 10 pour respectivement les SELEX « R » et « 4F » ont été analysés par séquençage à haut-débit. Le logiciel PATTERNITY-seq nous a permis d'analyser en détail l'évolution des banques au cours des SELEX et d'identifier des séquences candidates à tester.

Nous avons choisi de ne pas séquencer les tours précoces car ceux-ci sont généralement très peu évolués, et ne sont généralement pas très utiles.

1) Choix de la taille de la fenêtre aléatoire des séquences à inclure dans l'analyse.

La taille de fenêtre aléatoire de la banque d'origine est de 50 nucléotides. Néanmoins, il est usuel de tolérer des ajouts ou des délétions de quelques bases : certains aptamères identifiés par SELEX ont en effet perdu ou gagné, au cours de la sélection, quelques bases. Nous avons choisi de conserver pour l'analyse toutes les séquences ayant une fenêtre aléatoire de taille allant de 47 à 52 nucléotides. La perte d'une ou de quelques bases lors des étapes d'amplification d'un SELEX est un évènement arrivant plus fréquemment que l'ajout de bases. C'est pourquoi nous avons toléré 3 délétions de bases, contre deux ajouts seulement.

Nombre de nucléotides								
	4F-T4	4F-T5	4F-T6	4F-T7	4F-T8	4F-T9	4F-T10	
47	0,71	1,13	1,14	1,28	1,42	1,70	1,17	
48	1,21	1,71	1,72	2,00	2,27	2,56	2,35	
49	4,51	5,30	5,31	5,82	5,87	6,07	4,03	
50	89,56	87,19	87,40	85,82	86,49	83,25	88,81	
51	0,45	0,32	0,43	0,72	0,45	0,46	0,23	
52	0,09	0,06	0,10	0,19	0,09	0,11	0,05	
Nombre de nucléotides								
	R-T3	R-T4	R-T5	R-T6	R-T7	R-T8	R-T9	R-T10
47	0,61	0,69	0,91	1,24	1,30	0,95	0,85	0,25
48	1,09	1,22	1,49	1,83	1,97	1,53	1,22	0,37
49	4,31	4,59	5,15	5,64	6,04	5,60	4,89	1,63
50	90,48	90,03	88,99	86,97	86,37	89,22	89,99	97,15
51	0,37	0,44	0,36	0,41	0,28	0,32	0,15	0,06
52	0,05	0,09	0,06	0,09	0,06	0,08	0,02	0,01

Figure 30 - Distribution de la taille de la fenêtre aléatoire. Distribution, en pourcentage de présence dans la banque, des longueurs des fenêtres aléatoires, c'est-à-dire des séquences situées entre les parties constantes des oligonucléotides de la banque.

Pour chaque tour des deux SELEX entre 3 et 13 millions de séquences lues avaient une fenêtre aléatoire comprise entre 47 et 52 nucléotides, et ont donc été comprises dans l'analyse qui a suivi. Nous pouvons observer Figure 30, que la taille de la fenêtre aléatoire des séquences a été assez bien conservée au cours des deux SELEX. A chaque tour, au moins 80% des

séquences ont une taille de 50 nucléotides. Comme attendu, il existe une proportion plus grande (ici 8 à 20 fois plus) de séquences ayant perdu des bases dans leur fenêtre aléatoire que de séquences en ayant gagnées.

2) Analyse de l'évolution globale des SELEX

Sachant que nos deux SELEX ont utilisé la même banque de départ, nous avons choisi d'analyser ces 2 SELEX comme deux « branches » d'un même SELEX.

Tout d'abord la fréquence de chaque séquence dans la banque a été calculé pour chacun des tours de SELEX. Ces séquences ont ensuite été rassemblées en famille selon leur similitude. Chaque famille est composée de séquences ayant au maximum 10 mutations par rapport à la séquence majoritaire au sein de la famille qui est alors qualifiée de « seed ». Sachant que cette analyse vise à détecter les familles et séquences bien enrichies au cours du SELEX, nous avons choisi de retenir uniquement les séquences qui dépassaient une fréquence à 0.001% dans la banque à au moins un tour de sélection.

PATERNITY-seq nous donne accès à un grand nombre d'outil d'analyse (cf. Introduction, partie V.C.3) ci-dessus) : table et graphique d'évolution des séquences, arbre des familles etc. J'ai choisi de présenter ici uniquement les analyses ayant permis une compréhension globale de l'évolution ayant eu lieu au cours des SELEX, et celles ayant été utilisées dans le choix des séquences à tester en affinité dans la suite du projet.

Nous avons pu observer pour les SELEX « 4F » et « R », que le pourcentage de la banque contenant des séquences dépassant le seuil de 0.001% augmentait au fur et à mesure du SELEX : arrivant au dernier tour jusqu'à 60 % pour le SELEX « 4F » et presque 80% pour le SELEX « R » (Figure 31-A). Ces observations signifient que des séquences s'étaient bien enrichies de manière significative dans la banque. Nous avons aussi constaté pour chacun des deux SELEX que le nombre de séquences dépassant le seuil croissait dans un premier temps, puis atteignait un pic avant de diminuer. Ce pic était atteint au tour 9 (plus de 3500 séquences dépassant le seuil) pour le SELEX « 4F » et au tour 8 pour le SELEX « R » (plus de 2000 séquences dépassant le seuil). Ce phénomène était aussi observable à l'échelle des familles (Figure 31 –B) : le SELEX « 4F » atteint un pic de nombre de famille au tour 9 (presque 3500 familles) et le SELEX « R » atteint ce pic au tour 8 (1700 familles environ). Nous avons aussi constaté que les familles les plus abondantes s'enrichissaient de manière très forte entre le tour 9 et le tour 10 pour le SELEX « 4F » (Figure 31 –C) et à partir du tour 7 pour le SELEX « R ». Les 20 premières familles composent 50% de la banque au tour 10 du SELEX « 4F » et presque 90% au tour 10 du SELEX « R ».

Les deux SELEX semblaient avoir suivi le même type d'évolution de manière différée : dans la première partie de la sélection un grand nombre de séquences s'enrichissent progressivement, puis à partir d'un certain point, certaines séquences s'enrichissent plus que les autres, et prennent toute la place dans la banque. Ce résultat était surprenant puisque nous nous attendions, au vu de la quantité très faible d'ARN2'F-Py retenu à la fin de chaque tour de SELEX, à un enrichissement plutôt faible au cours du SELEX des séquences dans les banques.

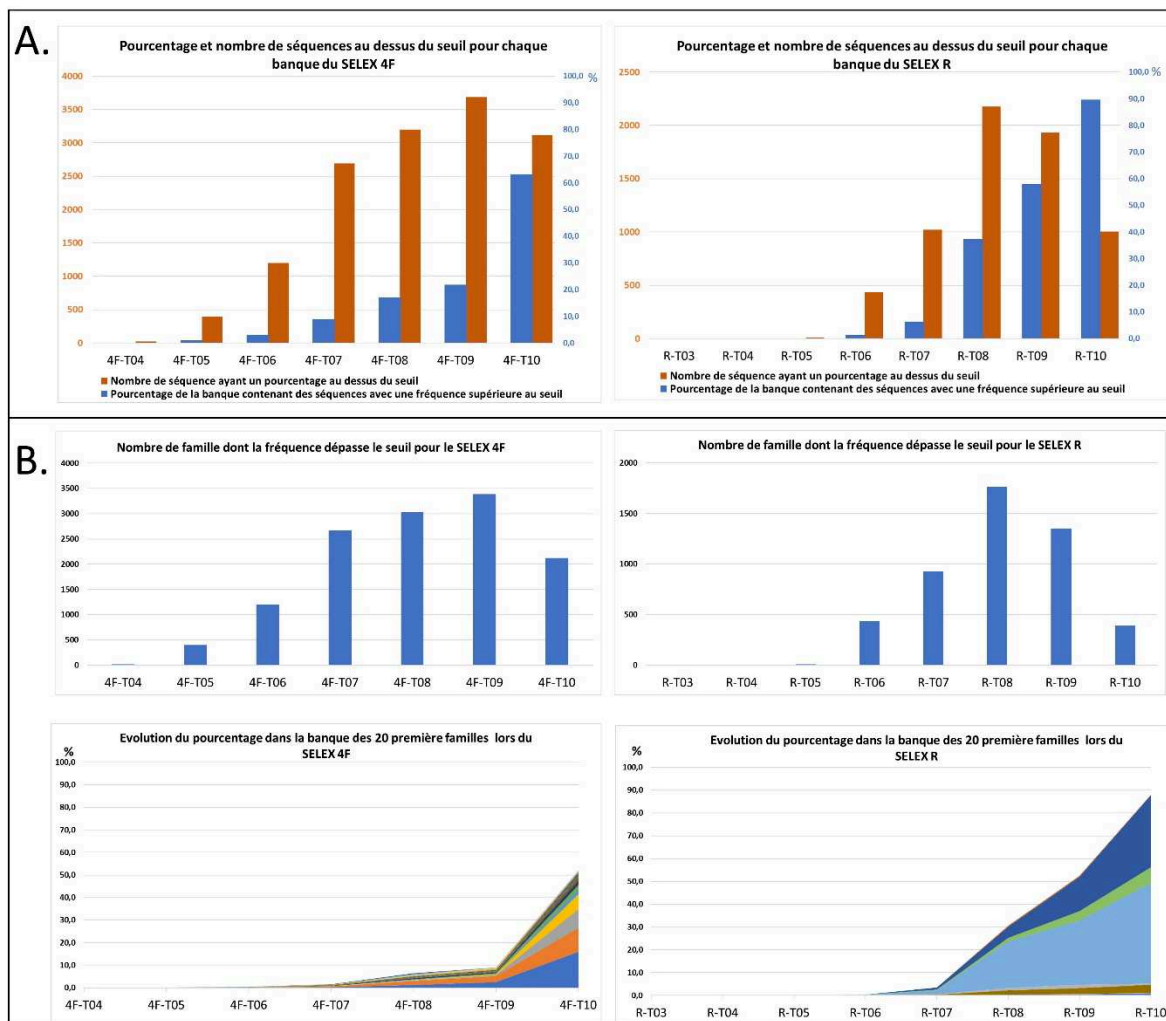


Figure 31 - Analyse de l'évolution des globale des banques lors des SELEX "4F" et "R" à l'aide de PATTERNITY-seq®. A - Evolution du nombre de séquences au-dessus du seuil et de leur pourcentage au sein de la banque lors des SELEX 4F (droite) et R (gauche). B - Evolution du nombre de famille au-dessus du seuil lors des SELEX 4F (droite) et R (gauche). C - Evolution du pourcentage des 20 premières familles lors des SELEX 4F (droite) et R (gauche).

3) Analyse de l'évolution des familles au sein des SELEX

Nous avons ensuite analysé plus en détail l'évolution des 5954 familles de séquences. La Figure 32 présente l'évolution des 40 premières familles au cours des deux SELEX. Comme l'étude de l'évolution globale du SELEX nous le laissait penser, certaines familles se font très fortement enrichies au sein des banques : la famille 0 est présente à hauteur de 44 % au tour 10 du SELEX « R » et la famille 2 à hauteur de 15.9 % au tour 10 du SELEX « 4F ». Nous avons remarqué que les séquences enrichies dans l'un des SELEX sont aussi présentes dans l'autre SELEX mais avec des fréquences relativement différentes. Ainsi la famille 0, présente à 44 % au tour 10 dans le SELEX « R » est également présente à 0.07% au tour 10 dans le SELEX « 4F », ce qui n'est pas négligeable. De même, la famille 2, présente à 15.9 % au tour 10 dans le SELEX « 4F » et présente à 0.93 % au tour 10 dans le SELEX « R ». Ce constat est assez étonnant, les conditions de sélection étant très différentes pendant les 9 derniers tours des deux SELEX.

Famille	SELEX 4F							SELEX R							Facteur d'évolution		
	4F-T04	4F-T05	4F-T06	4F-T07	4F-T08	4F-T09	4F-T10	R-T03	R-T04	R-T05	R-T06	R-T07	R-T08	R-T09	R-T10	SELEX "4F"	SELEX "R"
0	0,0135	0,0020	0,0016	0,0146	0,3859	0,0918	0,0726	0,0010	0,0004	0,0021	0,0808	1,6918	20,4048	28,1688	44,0583	0,03	1,84
1	0,0083	0,0015	0,0009	0,0073	0,2020	0,0611	0,0109	0,0010	0,0003	0,0024	0,0649	0,9301	4,8908	15,0609	31,6506	-0,88	2,30
2	0,0031	0,0167	0,0461	0,2870	1,2610	2,5037	15,9833	0,0009	0,0004	0,0006	0,0417	0,0624	0,3381	0,5728	0,9358	2,18	1,32
3	0,0035	0,0314	0,0935	0,3061	1,6846	2,6206	10,5500	0,0011	0,0001	0,0002	0,0012	0,0007	0,0146	0,0166	0,0580	1,98	0,40
4	0,0010	0,0131	0,0257	0,0481	0,2974	0,4596	8,1624	0,0001	0,0000	0,0000	0,0008	0,0002	0,0031	0,0054	0,0420	1,88	1,08
5	0,0018	0,0016	0,0024	0,0141	0,0686	0,0358	0,0707	0,0002	0,0001	0,0011	0,0580	0,2763	1,5395	4,0558	6,9139	0,97	2,10
6	0,0004	0,0036	0,0046	0,0421	0,2372	0,3175	6,7107	0,0001	0,0000	0,0002	0,0022	0,0148	0,0224	0,0292	0,0406	1,91	1,18
7	0,0025	0,0108	0,0168	0,0970	0,2455	0,2667	0,7405	0,0004	0,0005	0,0062	0,0577	0,2610	1,6843	2,4413	3,5183	1,52	1,75
8	0,0001	0,0021	0,0022	0,0135	0,0665	0,1009	2,1967	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0066	0,0292	0,0425	0,0216	1,89	0,68
9	0,0010	0,0101	0,0370	0,0904	0,2431	0,3558	1,9362	0,0001	0,0001	0,0000	0,0004	0,0001	0,0025	0,0026	0,0103	1,75	0,70
10	0,0018	0,0153	0,0230	0,0566	0,3822	0,5118	1,8123	0,0002	0,0001	0,0004	0,0014	0,0028	0,0082	0,0059	0,0127	1,76	0,91
11	0,0004	0,0009	0,0008	0,0080	0,0395	0,0285	0,2521	0,0001	0,0001	0,0003	0,0223	0,1491	1,0078	1,4315	0,5360	1,02	0,63
12	0,0021	0,0176	0,0374	0,0746	0,1832	0,2039	0,9327	0,0000	0,0001	0,0002	0,0040	0,0041	0,0086	0,0048	0,0064	1,57	0,23
13	0,0006	0,0069	0,0199	0,0406	0,0833	0,1223	0,8096	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0005	0,0017	0,0019	0,0045	1,65	0,59
14	0,0001	0,0013	0,0026	0,0259	0,1271	0,1530	0,5072	0,0001	0,0000	0,0003	0,0015	0,0106	0,0495	0,0475	0,0142	1,70	0,28
15	0,0017	0,0042	0,0139	0,0745	0,1833	0,2288	0,4943	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0015	0,0016	0,0029	1,57	0,46
16	0,0019	0,0073	0,0291	0,1372	0,3323	0,4918	0,1328	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0027	0,0027	0,0015	0,60	-0,42
17	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0055	0,0005	0,0000	0,0001	0,0000	0,0004	0,0194	0,0795	0,3777	0,4169	0,1810	-0,64	0,45
18	0,0020	0,0149	0,0236	0,0635	0,1678	0,1866	0,3834	0,0001	0,0002	0,0014	0,0232	0,0395	0,1164	0,0865	0,0288	1,37	0,20
19	0,0018	0,0075	0,0171	0,0521	0,1701	0,3011	0,3148	0,0001	0,0001	0,0002	0,0013	0,0009	0,0043	0,0037	0,0027	1,30	-0,49
20	0,0005	0,0033	0,0051	0,0120	0,0448	0,0447	0,3087	0,0000	0,0000	0,0000	0,0004	0,0001	0,0006	0,0004	0,0017	1,50	0,00
21	0,0002	0,0027	0,0074	0,0743	0,1583	0,1965	0,2915	0,0001	0,0000	0,0003	0,0016	0,0025	0,0144	0,0167	0,0044	1,29	0,15
22	0,0003	0,0045	0,0104	0,0206	0,0509	0,0599	0,2824	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0001	0,0006	0,0006	0,0017	1,50	0,00
23	0,0003	0,0040	0,0089	0,0151	0,0634	0,0752	0,2645	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,0007	0,0007	0,0017	1,50	0,00
24	0,0004	0,0021	0,0023	0,0091	0,0188	0,0100	0,0226	0,0000	0,0001	0,0004	0,0184	0,0667	0,2495	0,1566	0,0593	0,78	0,00
25	0,0006	0,0040	0,0066	0,0141	0,0800	0,1103	0,2010	0,0001	0,0000	0,0001	0,0002	0,0003	0,0002	0,0009	0,0013	1,39	0,00
26	0,0002	0,0013	0,0026	0,0161	0,0164	0,0116	0,0076	0,0000	0,0000	0,0003	0,0190	0,0292	0,1979	0,1950	0,1130	0,01	0,33
27	0,0010	0,0031	0,0093	0,0187	0,0718	0,1100	0,1904	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0005	0,0005	0,0009	1,44	0,00
28	0,0006	0,0039	0,0051	0,0181	0,1263	0,1904	0,1053	0,0001	0,0000	0,0001	0,0002	0,0003	0,0015	0,0009	0,0012	0,72	-0,30
29	0,0000	0,0000	0,0000	0,0002	0,0028	0,0001	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0138	0,0440	0,1096	0,1841	0,0343	-0,68	0,31
30	0,0000	0,0002	0,0001	0,0007	0,0015	0,0007	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0045	0,0085	0,0504	0,0767	0,1753	-0,39	1,50
31	0,0010	0,0152	0,0462	0,0902	0,1339	0,1484	0,1357	0,0000	0,0001	0,0000	0,0007	0,0005	0,0020	0,0016	0,0012	0,58	-0,36
32	0,0001	0,0000	0,0000	0,0001	0,0018	0,0003	0,0003	0,0000	0,0001	0,0004	0,0124	0,0724	0,1344	0,1215	0,0415	-0,61	0,05
33	0,0003	0,0040	0,0080	0,0181	0,0427	0,0526	0,1294	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,0007	0,0005	0,0008	1,35	0,00
34	0,0010	0,0068	0,0217	0,0554	0,0838	0,1445	0,0694	0,0000	0,0001	0,0001	0,0017	0,0020	0,0097	0,0103	0,0044	0,63	0,12
35	0,0002	0,0012	0,0025	0,0080	0,0229	0,0258	0,1275	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0003	0,0002	0,0007	1,58	0,00
36	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0019	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0110	0,0319	0,0814	0,1240	0,0204	-0,68	0,23
37	0,0005	0,0033	0,0102	0,0221	0,0393	0,0482	0,1221	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0004	0,0004	0,0008	1,32	0,00
38	0,0000	0,0007	0,0008	0,0066	0,0254	0,0241	0,1193	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0005	0,0015	0,0013	0,0009	1,07	-0,38
39	0,0006	0,0044	0,0122	0,0477	0,0794	0,1203	0,0298	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0007	0,0007	0,0004	0,33	0,00

Figure 32 - Evolution des 40 premières familles au cours des SELEX "R" et « 4F ». On peut observer dans ce tableau le pourcentage dans la banque des familles 0 à 39 (en ligne) au fur et à mesure des tours de SELEX (en colonne) dans les SELEX « 4F » et « R ». Plus le pourcentage de présence d'une famille dans la banque à un tour est important, plus la couleur de la cellule tend vers le rouge. Dans le cas contraire, plus le pourcentage de présence d'une famille dans la banque à un tour est faible, plus la couleur de la case tend vers le vert. Patternity-seq donne aussi les valeurs des facteurs d'évolution liés à chaque séquence pour les SELEX « 4F » et « R ». Ce facteur d'évolution correspond à la capacité d'une séquence à bien s'amplifier au sein de la banque au fur et à mesure des tours. Les familles dont la couleur du numéro est rouge sont celles ayant été identifiées comme celles ayant eu l'enrichissement le plus important lors du SELEX 4F, celles en bleu sont celles dont l'enrichissement est le plus fort dans le SELEX R. Ces séquences ont donc été choisies pour être testées.

Le logiciel Patternity-seq calcule aussi un facteur d'évolution pour chaque séquence : ce facteur d'évolution correspond à la capacité d'une séquence à bien s'amplifier au sein de la banque au fur et à mesure des tours. Ce facteur prend en compte les différents enrichissements d'une séquence à chaque tour, en pondérant par l'ordre des tours : les derniers tours ont plus d'importance que les premiers tours pour le calcul du facteur.

Nous avons pu observer pour le SELEX « 4F » que, bien que l'ordre des séquences ne soit pas exactement similaire entre les séquences les plus représentées dans la banque et les séquences ayant le meilleur facteur d'évolution, le classement restait néanmoins à peu près le même : les séquences les plus enrichies au tour n°10 étaient aussi celles ayant le meilleur facteur d'évolution (Figure 33). Le constat était à peu près le même pour le SELEX « R », mais

dans une ampleur moindre : il existait une différence plus importante pour chaque séquence entre leur rang d'enrichissement et celui de leur facteur d'évolution.

A.		SELEX 4F						SELEX R						Facteur d'évolution				
		4F-T04	4F-T05	4F-T06	4F-T07	4F-T08	4F-T09	4F-T10	R-T03	R-T04	R-T05	R-T06	R-T07	R-T08	R-T09	R-T10	SELEX "4F"	SELEX "R"
Famille	2	0,0031	0,0167	0,0461	0,2870	1,2610	2,5037	15,9833	0,0009	0,0004	0,0006	0,0417	0,0624	0,3381	0,5728	0,9358	2,18	1,32
	3	0,0035	0,0314	0,0935	0,3061	1,6846	2,6206	10,5500	0,0011	0,0001	0,0002	0,0012	0,0007	0,0146	0,0166	0,0580	1,98	0,40
	6	0,0004	0,0036	0,0046	0,0421	0,2372	0,3175	6,7107	0,0001	0,0000	0,0002	0,0022	0,0048	0,0224	0,0292	0,0406	1,91	1,18
	8	0,0001	0,0021	0,0022	0,0135	0,0665	0,1009	2,1967	0,0000	0,0000	0,0000	0,0015	0,0066	0,0292	0,0425	0,0216	1,89	0,68
	4	0,0010	0,0131	0,0257	0,0481	0,2974	0,4596	8,1624	0,0001	0,0000	0,0000	0,0008	0,0002	0,0031	0,0054	0,0420	1,88	1,08
	10	0,0018	0,0153	0,0230	0,0566	0,3822	0,5118	1,8123	0,0002	0,0001	0,0004	0,0014	0,0028	0,0082	0,0059	0,0127	1,76	0,91
	9	0,0010	0,0101	0,0370	0,0904	0,2431	0,3558	1,9362	0,0001	0,0001	0,0000	0,0004	0,0001	0,0025	0,0026	0,0103	1,75	0,70
	14	0,0001	0,0013	0,0026	0,0259	0,1271	0,1530	0,5072	0,0001	0,0000	0,0003	0,0015	0,0106	0,0495	0,0475	0,0142	1,70	0,28
	13	0,0006	0,0069	0,0199	0,0406	0,0833	0,1223	0,8096	0,0000	0,0000	0,0000	0,0009	0,0005	0,0017	0,0019	0,0045	1,65	0,59
	35	0,0002	0,0012	0,0025	0,0080	0,0229	0,0258	0,1275	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0003	0,0002	0,0007	1,58	0,00
	15	0,0017	0,0042	0,0139	0,0745	0,1833	0,2288	0,4943	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0000	0,0015	0,0016	0,0029	1,57	0,46
	12	0,0021	0,0176	0,0374	0,0746	0,1832	0,2039	0,9327	0,0000	0,0001	0,0002	0,0040	0,0041	0,0086	0,0048	0,0064	1,57	0,23

B.		SELEX 4F						SELEX R						Facteur d'évolution				
		4F-T04	4F-T05	4F-T06	4F-T07	4F-T08	4F-T09	4F-T10	R-T03	R-T04	R-T05	R-T06	R-T07	R-T08	R-T09	R-T10	SELEX "4F"	SELEX "R"
Famille	1	0,0083	0,0015	0,0009	0,0073	0,2020	0,0611	0,0109	0,0010	0,0003	0,0024	0,0649	0,9301	4,8908	15,0609	31,6506	-0,88	2,30
	5	0,0018	0,0016	0,0024	0,0141	0,0686	0,0358	0,0707	0,0002	0,0001	0,0011	0,0580	0,2763	1,5395	4,0558	6,9139	0,97	2,10
	0	0,0135	0,0020	0,0016	0,0146	0,3859	0,0918	0,0726	0,0019	0,0004	0,0027	0,0808	1,6918	20,4048	28,1688	44,0583	0,03	1,84
	7	0,0025	0,0108	0,0168	0,0970	0,2455	0,2667	0,7405	0,0004	0,0005	0,0062	0,0577	0,2610	1,6843	2,4413	3,5183	1,52	1,75
	30	0,0000	0,0002	0,0001	0,0007	0,0015	0,0007	0,0010	0,0000	0,0000	0,0000	0,0045	0,0085	0,0504	0,0767	0,1753	-0,39	1,50
	2	0,0031	0,0167	0,0461	0,2870	1,2610	2,5037	15,9833	0,0009	0,0004	0,0006	0,0417	0,0624	0,3381	0,5728	0,9358	2,18	1,32
	6	0,0004	0,0036	0,0046	0,0421	0,2372	0,3175	6,7107	0,0001	0,0000	0,0002	0,0022	0,0048	0,0224	0,0292	0,0406	1,91	1,18
	136	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0001	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0023	0,0072	0,0098	0,0186	0,0266	0,00	1,12
	4	0,0010	0,0131	0,0257	0,0481	0,2974	0,4596	8,1624	0,0001	0,0000	0,0000	0,0008	0,0002	0,0031	0,0054	0,0420	1,88	1,08
	10	0,0018	0,0153	0,0230	0,0566	0,3822	0,5118	1,8123	0,0002	0,0001	0,0004	0,0014	0,0028	0,0082	0,0059	0,0127	1,76	0,91
	53	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0010	0,0002	0,0000	0,0000	0,0001	0,0002	0,0029	0,0113	0,0568	0,0756	0,0494	-0,61	0,75
	9	0,0010	0,0101	0,0370	0,0904	0,2431	0,3558	1,9362	0,0001	0,0001	0,0000	0,0004	0,0001	0,0025	0,0026	0,0103	1,75	0,70

Figure 33 – Ordre des familles en fonction des facteurs d'évolution des SELEX « 4F » et « R ». A - Evolution des 12 premières familles ayant les facteurs d'évolution les plus fort pour le SELEX « 4F ». B - Evolution des 12 premières familles ayant les facteurs d'évolution les plus fort pour le SELEX « R ».

Nous avons pu aussi observer que parmi ces premières familles, aucune ne décroissait entre les tours 8 et 9 (Figure 32). Ce dernier résultat est très intéressant, car nous avons utilisé une technique de séparation différente au tour n°9 : l'ultracentrifugation. Ceci suggère que les séquences enrichies n'ont pas d'affinité pour la membrane de nitrocellulose.

4) Recherche des motifs communs aux séquences s'étant enrichies au sein des banques durant les SELEX

En réalisant l'alignement de la séquence majoritaire des 40 premières familles grâce au logiciel Clustal, nous avons pu constater qu'aucune séquence consensus ne se dégageait (Figure 34). Or, lorsque l'on obtient plusieurs aptamères après un SELEX, ceux-ci ont assez fréquemment des motifs en commun : les séquences impliquées dans la liaison à la cible. Ceci suggérerait que nous avons parmi les 40 premières familles, des séquences parasites et potentiellement quelques aptamères très différents.



Figure 34 - Alignement Clustal de la séquence « seed » des 40 premières familles.

5) Choix des candidats à tester

Suite à ces analyses, nous avons choisi cinq séquences à tester pour chacun des SELEX. Certaines séquences s'étant fortement enrichies, des tours supplémentaires de SELEX ne nous paraissaient pas nécessaires.

Nous avons utilisé comme critère principal le facteur d'évolution des familles : pour chaque SELEX, nous avons choisi les 5 familles ayant les meilleurs facteurs d'évolution (cf. Figure 33). Ceci correspond aux familles 2, 3, 6, 8 et 4 pour le SELEX « 4F » et aux familles 1, 5, 0, 7 et 30 pour le SELEX « R ».

Nous avons choisi pour chaque famille la séquence « seed », majoritaire dans la famille. En plus d'être les plus représentées dans la famille, elles étaient aussi celles ayant le meilleur facteur d'évolution par rapport aux autres séquences de leur famille.

Pour plus de clarté, nous avons renommé les séquences en fonction du SELEX qui a orienté notre choix. Ainsi, les séquences provenant des familles 2, 3, 4, 6 et 8 choisies pour leur bonne évolution dans le SELEX « 4F » ont été renommées respectivement 4F01, 4F02, 4F03, 4F04, 4F05. De même, les séquences provenant des familles 0, 1, 5, 7 et 30 choisies pour leur bonne évolution dans le SELEX « R » ont été renommées respectivement R01, R02, R03, R04, R05.

Pour les tests d'affinités que nous avons réalisés par la suite, nous avons utilisé comme témoin négatif une séquence contrôle, ayant les mêmes encadrants et de même taille que les

autres, mais avec une séquence générée aléatoirement pour la fenêtre aléatoire de 50 nucléotides. Nous avons fait attention à avoir 4 bases en proportion équivalente au sein de la séquence : 12 « A », 12 « C », 13 « G » et 13 « T ». Cette séquence a été nommée « Scr-1 » (cf. Tableau 6).

4F01	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATAGCAGCACACGACCAGTGTGCCCCACACCAGTGGTGGTCTGTGGTGTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
4F02	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGCTGGCAGCACGCACCGCTGACCGCTGGCTGCACATATGCGTGTGGAGTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
4F03	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGCAACAGACGCACCGTACACACATCTTGCCCGTTGGCTGCCCGACCAGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
4F04	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATCCGTCCACCAGACCAACGTACAAACTCCGCTGGTGGTCGCCTACCCCTGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
4F05	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGCCCGCAGGCTACACCACAGCTTCCOCTTCAGCGTGTGGTGGATACTCGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R01	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGGCCGCACTACAGCTTGGTCTGCATATCCTCTGCCGACAGCTCCATGTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R02	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGCACGATGTCCATGACCAACTCCAGTACAGGCCCTGCAGCGTTAGGCTGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R03	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATCCAGCATCACAGCGGCACGACGTCGGACGGCTGGCTGGTCCGTACCGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R04	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATGCAGAGCTACACGGTGCAAGTAGCACGTCCTGCCATGCATGCAGTCTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R05	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATCGGGAAGCAGCACGACGGCCTCAATGCACTTGCCGGTTGGTTTCGGCTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
Scr-1	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATATCGTTCAGCGTGGGATCTGCTACAACCTCTGAGTGTACATGTACGAGAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG

Tableau 6 - Séquences des candidats aptamères choisis après analyse de SELEX "R" et "4F". Les parties aléatoires des séquences sont indiquées en bleues, et les parties constantes correspondant aux sites des amorces en noires.

Bilan : Nous avons réalisé par séquençage à haut-débit l'analyse des banques issues des tours 4 à 10 du SELEX « 4F » et 3 à 10 du SELEX « R ». Les deux SELEX présentaient des séquences suffisamment enrichies. Ceci nous a permis de choisir plusieurs candidats pour lesquels l'affinité contre les fibres d'α-syn sera évaluée. De manière surprenante, bien que les deux SELEX n'aient que le premier tour de sélection en commun, les mêmes séquences se sont amplifiées au cours des deux SELEX, mais à des degrés très différents.

C. Première évaluation de l'affinité des candidats aptamères pour les différentes conformations de fibres d'α-synucléine

Nous avons cherché à évaluer l'affinité des candidats pour les fibres et les formes monomériques d'α-syn. Nous espérons obtenir des aptamères ayant les spécificités pour lesquels ils avaient été sélectionnés : les candidats issus du SELEX « 4F » reconnaissant les 4 conformations de fibres, les candidats issus du SELEX « R » reconnaissant la fibre R mais pas les trois autres fibres, et les candidats des deux SELEX ne reconnaissant pas les formes monomériques d'α-syn.

1) Conception de ce premier test d'affinité des séquences candidates

Nous avons réalisé un premier test d'affinité par filtration. Chaque candidat aptamère et le Scr-1, radioactivement marqué au phosphore 32 (P³²), ont été incubés avec une conformation de fibre. Le mélange a ensuite été filtré sur membrane nitrocellulose. La quantité d'aptamère retenu sur la membrane, et donc s'étant lié à la fibre, a été quantifié par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Ce test a été réalisé contre les quatre conformations de fibres (F, R, 65 et 91), mais aussi contre les monomères d'α-syn afin d'évaluer l'efficacité des contres-sélections.

De plus, nous avons testé l'utilisation de compétiteurs pour diminuer la potentielle fixation non-spécifique des fibres avec des oligonucléotides. Nous avons testé trois compétiteurs différents : l'ADNss (en anglais single stranded DNA), l'ARNt et le polyInosine. Ces trois molécules sont à base d'acides nucléiques et peuvent donc diminuer la liaison non spécifique des oligonucléotides sur la cible. Afin de pouvoir avoir un aperçu global des capacités des trois compétiteurs, nous avons testé l'ARNt seul (le compétiteur avec la chimie la plus proche de nos candidats), et les trois compétiteurs en mélange.

Pour ce premier test, nous avons décidé de tester l'effet de ces compétiteurs uniquement sur la liaison de nos candidats sur la fibre R. En effet, cette fibre est celle que tous nos candidats doivent reconnaître, si les sélections « 4F » et « R » se sont déroulées dans le sens que nous pensions.

2) Analyse des résultats du premier test d'affinité

Nous avons pu faire plusieurs observations d'importance lors de ce premier test (Figure 35 – A et B).

Tout d'abord, aucun de nos candidats ne se liaient à la nitrocellulose : les contresélections réalisées lors du SELEX avaient donc été à priori efficaces sur ce point. Nous avons aussi pu observer que nos dix candidats se fixaient en moyenne de manière très faible sur les monomères d' α -syn, ce qui est positif puisque c'était l'une des caractéristiques désirées pour nos aptamères (Figure 35- A et B).

Nous avons aussi constaté que nos dix candidats aptamères se liaient tous aux quatre conformations de fibres. Ceci était inattendu pour les cinq candidats issus du SELEX R. Cependant, nous avons pu observer que les candidats aptamères se liaient avec des affinités différentes sur les quatre conformations de fibres (Figure 35- B). Nous avons aussi remarqué des similitudes entre les « préférences » des aptamères pour les conformations de fibres. Ainsi, pour 8 candidats sur 10, l'affinité est la plus élevée pour la fibre 65. De même, pour 8 candidats sur 10, l'affinité est la moins élevée pour la fibre R.

De manière surprenante, nous avons aussi pu remarquer que la séquence Scr-1 servant de témoin négatif a le même comportement que nos candidats aptamères : l'affinité est la plus élevée pour la conformation 65, et la plus faible pour la conformation R. Néanmoins, lorsque l'on normalise les valeurs des candidats aptamères par celles du Scr-1 (Figure 35-C), nous avons constaté qu'en moyenne les candidats aptamères se lient environ deux fois plus que le Scr-1 aux quatre conformations de fibre. Ceci est un point positif car cela montre que la sélection a permis d'amplifier des séquences avec de l'affinité pour les fibres α -syn.

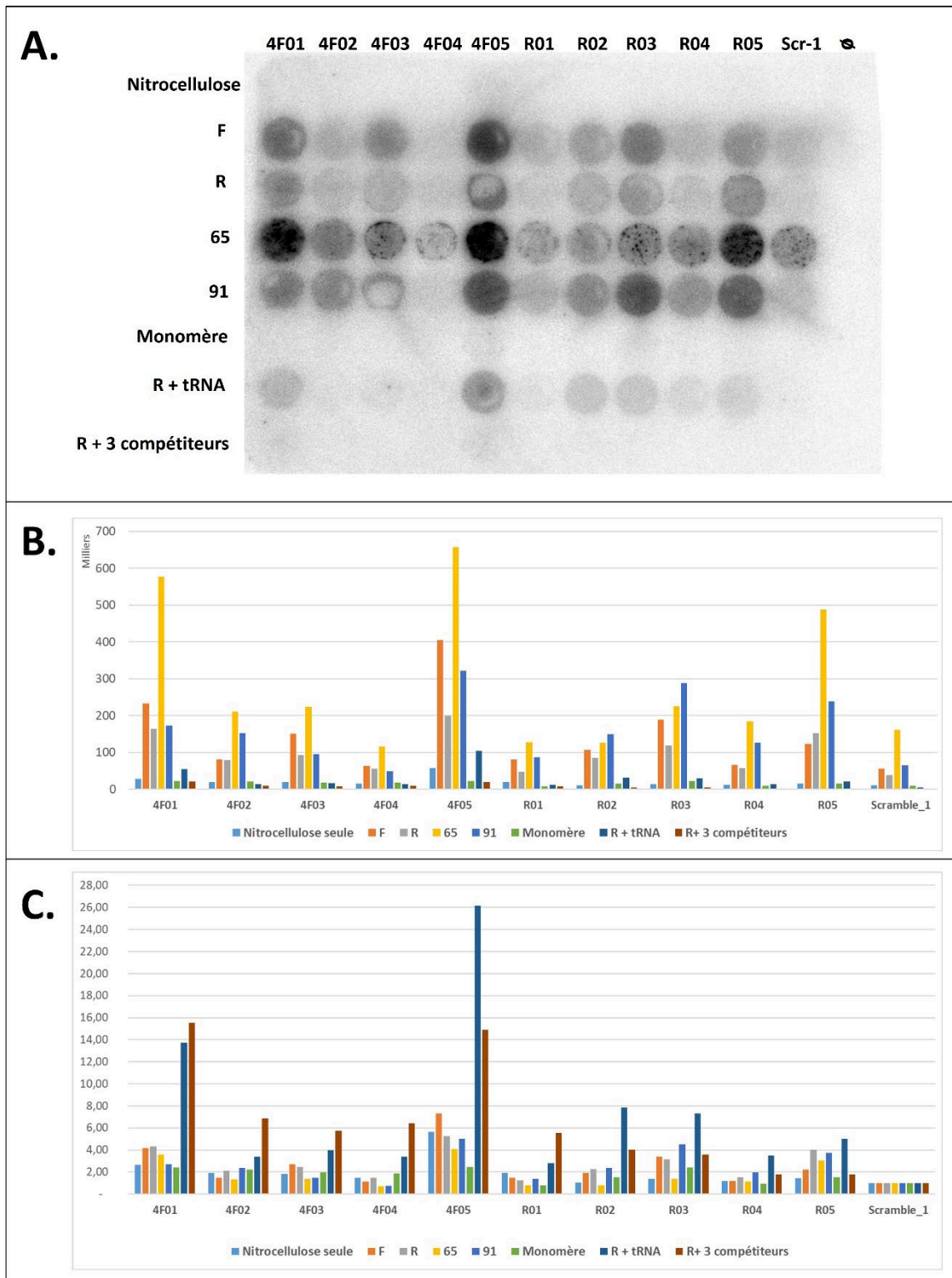


Figure 35 - Membrane du premier criblage de 10 candidats aptamères choisis à 10 nM contre les 4 types de fibre et la forme monomérique d' α -synucléine. A – Image obtenue après exposition d'un écran au phosphore photostimulable sur la membrane nitrocellulose. Sur chacun des 96 puits de l'appareil à filtration 20 μ L du mix oligonucléotide-protéine a été filtré sur membrane nitrocellulose, après incubation à 37°C. Les oligonucléotides marqués radioactivement au P³² (candidats aptamères ou séquence aléatoire Scr-1) sont à 20 nM et les protéines α -syn (fibres ou monomère) à 400 nM (pour les fibres : cette concentration correspond à celle des monomères les constituant). L'ARNT, testé seul en solution est à 0.05

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$, et pour les conditions où les trois compétiteurs ont été testés ensemble, chacun était à $0.05 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Plus le point est foncé, plus la quantité d'oligonucléotide restée liée aux protéines retenues sur la membrane est importante. B – Graphique présentant la quantité d'oligonucléotide restée liée sur la membrane pour chacune des conditions testées. C – Graphique présentant le ratio entre la quantité de candidat aptamère restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de scramble resté liée sur la membrane pour la même condition.

Enfin, nous avons pu observer que pour tous les candidats aptamères et le Scr-1, l'ajout de compétiteur diminuait la liaison de ces oligonucléotides à la fibre R (Figure 35-B). Ce résultat suggère que les fibres ont une affinité non-spécifique élevée pour les oligonucléotides. Cependant, nous avons également observé que pour certains candidats aptamères cette addition accroissait le ratio de la quantité de candidat retenu par rapport au Scr-1 (Figure 35-C). Ainsi, le ratio de quantité de 4F01 retenu par rapport au Scr-1 est égal à 4 en présence de fibre R, mais passe à 13.5 lorsque la fibre R a été incubée avec de l'ARNt, et même à 15.5 lorsque le mélange des trois compétiteurs a été utilisé. Ainsi, les compétiteurs, en saturant les sites où se fixent les oligonucléotides (et donc le Scr-1) par interaction non spécifique, permettent de mettre en avant les candidats aptamères se liant à la fibre R de manière spécifique.

Bilan : Ce premier test de liaison nous a permis de nous assurer que les dix candidats aptamères ne se liaient pas à la nitrocellulose. Nous avons aussi pu vérifier que ces candidats se liaient aussi très faiblement aux monomères par rapport aux fibres d' α -syn. Nous avons observé que tous les candidats se liaient aux quatre conformations de fibres d' α -syn, mais avec des affinités différentes. Les candidats ont montré plus d'affinité pour la fibre 65 que pour la fibre R. Ce résultat était inattendu pour les candidats venant du SELEX R, qui avaient été sélectionnés pour reconnaître spécifiquement la fibre R. Nous avons observé le même phénomène pour le Scr-1, cependant les candidats aptamères avaient tous une affinité plus forte pour les fibres. L'ajout de compétiteur a permis d'augmenter très fortement pour la fibre R, le ratio de candidat retenu par rapport au Scr-1.

D. Essais de sélections branchées multiples

1) Nouvelle stratégie pour isoler des aptamères plus spécifiques au sein des banques partiellement évoluées : la sélection branchée multiple

Suite aux premiers résultats de mesure d'affinité, nous avons décidé de mener une autre expérience visant à identifier des candidats hautement spécifiques pour une conformation de fibre en utilisant la technique de sélection branchée et le séquençage à haut débit.

En effet, même si les candidats aptamères semblent tous se fixer sur les quatre conformations de fibres, ils ont montré des affinités plus ou moins fortes en fonction des fibres. Par exemple, le 4F05 se lie aux quatre conformations de fibres plus de quatre fois mieux que le Scr-1, et même plus de six fois mieux à la fibre F. Le candidat 4F01, quant à lui, reconnaît les

fibres F et R quatre fois mieux que le Scr-1 mais semble avoir moins d'affinité pour les fibres 65 et 91. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une sélection branchée couplée au séquençage à haut débit pourrait nous permettre de cribler plus rapidement la spécificité d'un grand nombre de candidats.

La sélection branchée consiste, après quelques tours de SELEX « classique », à diviser la banque pour réaliser plusieurs tours de sélection en parallèle, généralement pour comparer des conditions de sélection différentes. L'utilisation du séquençage haut débit pour la détection de séquence ayant un comportement spécifique lors d'un SELEX branché est cruciale car elle permet de comparer de manière précise les enrichissements des séquences entre les différentes branches. Cette technique a été notamment utilisée par Dupont et son équipe, pour caractériser les sites de liaison d'aptamères et déterminer leurs préférences pour certaines des différentes conformations de la cible (Dupont et al., 2015). PATTERNITY-seq a été conçu pour réaliser automatiquement des analyses sur des SELEX « branchés » permettant de faire des analyses sur plusieurs conditions de SELEX en parallèle.

Nous avons décidé de commencer les sélections branchées à partir d'une banque contenant des séquences suffisamment enrichies pour être quantifiables par séquençage à haut-débit mais sans être trop abondantes. Pour cela, nous avons choisi la banque obtenue à la fin du tour 7 pour le SELEX « R » (Figure 32), car cette banque contenait 1068 séquences avec une fréquence comprise entre 1.5 et 0.001%.

L'ensemble du processus de réalisation et d'analyse de la sélection branchée multiple a été schématisé dans la Figure 36.

2) Réalisations des sélections branchées multiples et séquençage Haut débit des banques en résultantes

La banque du tour 7 du SELEX R a donc été divisée en huit quantités égales, et avons réalisé pour chacune d'elle un tour sélection avec des conditions différentes. La banque a été sélectionnée contre les fibres F, R, 65 et 91, dans deux conditions différentes : avec et sans ARNt. L'ARNt, en saturant les sites où se fixe les oligonucléotides par interaction non spécifique, semblait pouvoir permettre de faire ressortir les candidats aptamères se liant à la fibre R de manière spécifique (Figure 35-C). Il nous a donc semblé intéressant de comparer les conditions avec et sans ARNt pour distinguer les séquences se liant aux fibres par interaction spécifique, de celles se liant par interaction non spécifique.

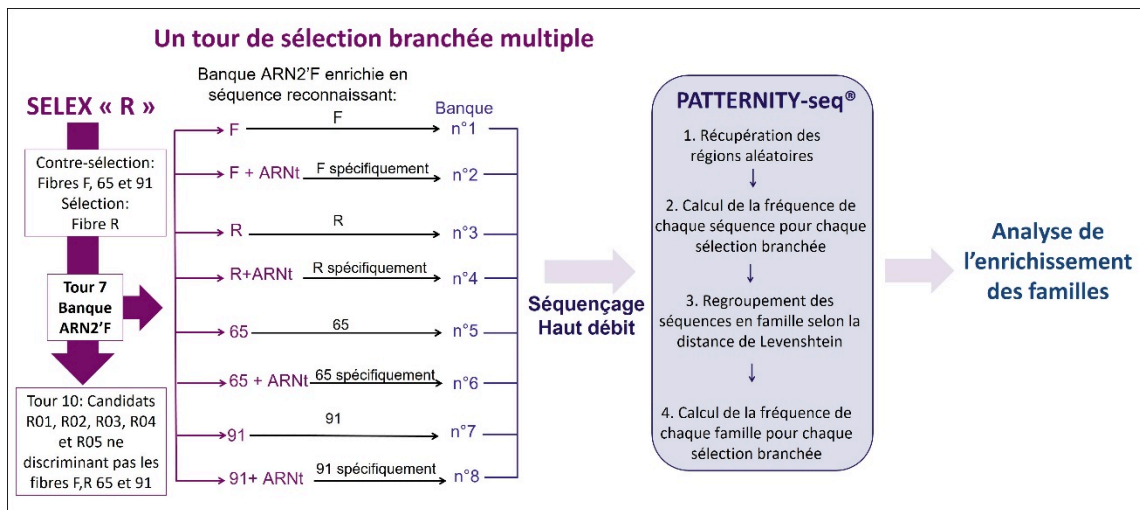


Figure 36 - Schéma de la sélection branchée multiple réalisée et du séquençage haut débit réalisé

Lorsque nous avons séquençé les huit banques issues de la sélection branchée multiple, nous avons pu obtenir au moins 5 millions de séquences par banques. Le logiciel Patterinity-seq, en analysant l'ensemble de ces banques, a organisé ces séquences en 12 306 familles.

3) Analyse des données de séquençage haut débit obtenues

La première étape de l'analyse réalisée nous avons exclu les séquences au-dessous du seuil choisi. Seules 1028 des 12 306 familles avaient un pourcentage de présence dans la banque supérieure à 0.001%, et ont été conservées pour la suite de l'analyse.

Nous avons ensuite recherché et classé entre elles, selon la méthode expliquée ci-dessus, les familles reconnaissant les fibres de manière spécifique (Figure 37).

La deuxième étape de l'analyse a consisté à réaliser des listes de séquences reconnaissant chacune des fibres. Une séquence est considérée comme étant capable de reconnaître une fibre si : elle s'enrichit dans la banque lors de la sélection contre cette fibre, et si elle s'enrichit mieux dans la condition comptant de l'ARNt comme compétiteur que dans celle n'en n'ayant pas. On obtient ainsi quatre listes de séquences étant capables de reconnaître une fibre.

Lors de la troisième étape, nous avons isolé au sein des listes les séquences ayant un comportement spécifique pour les différentes formes de fibres. De manière plus précise, nous avons exclu de chaque liste les séquences se trouvant aussi dans les autres. Ainsi, une séquence semble pouvoir se lier spécifiquement à la fibre R lorsqu'elle appartient à la liste des séquences reconnaissant R, mais qu'elle n'est pas présente dans les listes des séquences reconnaissant F, 65 et 91.

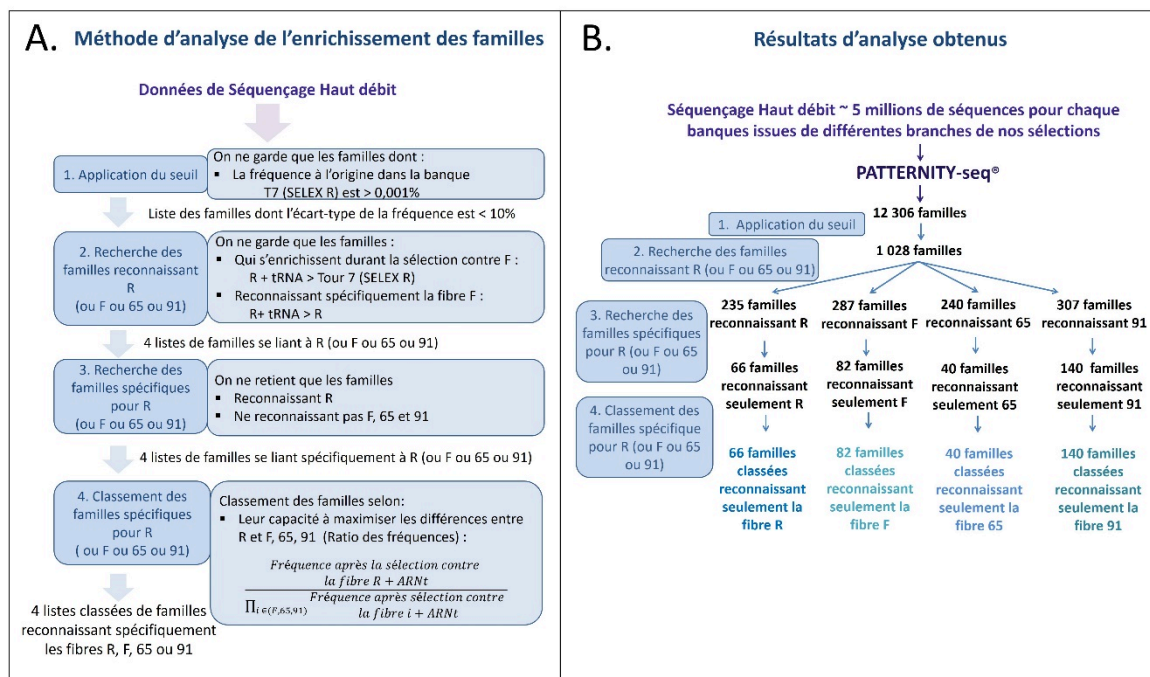


Figure 37 – Analyse de l'enrichissement des familles lors de la sélection branchée multiple, en vue d'identifier des familles reconnaissant les différents types de fibre de manière spécifique. A – Schéma de la méthode d'analyse de l'enrichissement des familles. B - Arbre représentant le suivi des différentes étapes permettant d'obtenir les quatre listes de familles classées liant à un enrichissement spécifique pour une des quatre fibres

Enfin, les séquences des listes ont ensuite été classées en fonction de leur capacité à maximiser les différences entre la conformation de fibre qu'elles reconnaissent et les autres. Pour cela, nous avons proposé une formule que nous avons appelé « Ratio des fréquences ». Pour chaque séquence on réalise le ratio de la fréquence de la séquence en présence de la conformation de fibre qu'elle reconnaît bien (en présence l'ARNt), et du produit des fréquences de cette séquence, lorsqu'elle est confrontée aux trois autres conformations de fibres (en présence d'ARNt). Ce ratio, bien que capable de détecter des candidats prometteurs, comportait néanmoins des biais. Ceux-ci ont malheureusement été détectés après le choix des candidats. Les limites de ce ratio sont exposées dans la partie « Discussion » de ce manuscrit.

4) Choix des candidats aptamères intéressants

a) Comparaison des enrichissements de différentes séquences lors de la sélection branchée multiple

Le Tableau 7, présente pour les quatre listes de candidats potentiellement spécifiques, les quatre candidats ayant eu les valeurs du ratio des fréquences les plus élevées. Nous pouvons observer que, pour chaque liste, les candidats n'ont un enrichissement supérieur à un, que pour une seule conformation de fibre.

	Cible	Famille ou séquence	Tour 7 du SELEX "R"	Enrichissement pour chaque conformation de fibre après un tour de sélection branchée multiple				Ratio des fréquences
				R + ARNt	F + ARNt	65 sans ARNt	91 + ARNt	
Candidats issus du SELEX 4F	Fibres F, R, 65 et 91	4F01	0,0537	0,2849	0,5975	0,5767	0,7800	
		4F02	0,0005	0,0000	0,0000	2,4847	2,0223	
		4F03	0,0002	0,1559	0,0000	4,7529	3,5108	
		4F04	0,0043	3,5527	5,9751	1,7352	0,5676	
		4F05	0,0060	9,3279	13,3677	3,2735	0,8744	
Candidats issus du SELEX R	Fibre R	R01	1,6924	5,1245	3,2179	1,8324	0,8354	
		R02	0,9271	2,7619	1,5134	0,7164	1,0404	
		R03	0,2536	4,5997	2,1172	9,4088	0,7630	
		R04	0,2443	0,6197	0,6905	0,5986	0,9757	
		R05	0,0082	2,5268	0,0000	0,6099	1,0115	
							$\frac{R}{F \times 65 \times 91}$	
Candidats issus des sélections branchées multiples	Fibre R	84	0,0075	2,4720	0,8520	0,5213	0,8667	114,16
		49	0,0100	3,1675	0,6409	0,7051	0,7442	94,74
		68	0,0084	2,5610	0,7644	0,7739	0,8349	74,19
		211	0,0083	1,4934	0,7708	0,6695	0,9916	42,47
								$\frac{F}{R \times 65 \times 91}$
	Fibre F	124	0,0012	0,2906	10,9231	0,3675	0,9487	78 751,80
		6006	0,0011	0,2566	5,6549	0,4779	0,9204	39 235,19
		4414	0,0011	0,3796	11,8333	0,7963	0,9722	34 519,08
		2786	0,0011	0,3009	5,6549	0,6460	0,6549	34 791,04
								$\frac{65}{F \times R \times 91}$
	Fibre 65	10854	0,0012	0,2414	0,0000	1,1034	0,9138	4,31
		11305	0,0011	0,2920	0,0000	1,1239	0,8053	4,23
		11166	0,0011	0,3519	0,0000	1,0926	0,9907	2,90
		10797	0,0014	0,2657	0,0000	1,0350	0,9650	2,82
								$\frac{91}{F \times R \times 65}$
	Fibre 91	289	0,0067	0,4807	0,9481	0,7522	1,0223	65,64
		214	0,0101	0,6028	0,6314	0,9407	1,0504	28,65
		70	0,0201	0,3041	0,6371	0,5095	1,0409	26,21
		11629	0,0012	0,1849	0,0000	0,3866	1,0168	11,96

Tableau 7 - Tableau comparant les dix candidats issus des SELEX « R » et « 4F » et les quatre meilleurs candidats de chaque liste de candidats ayant un enrichissement spécifique pour une des quatre fibres. Le tableau présente la fréquence du candidat dans la banque du tour 7 du SELEX « R », au début de la sélection branchée multiple, l'enrichissement des candidats dans chacune des branches où la banque a été sélectionnée contre une fibre en présence d'ARNt. L'échantillon de la banque dans la branche où la banque a été sélectionnée contre la fibre 65 avec ARNt a malheureusement été perdu. Nous avons donc réalisé l'analyse en utilisant simplement les données de la branche où la banque a été sélectionnée contre la fibre 65 sans ARNt. Dans le tableau est aussi présenté le ratio des fréquences pour chacune des séquences. Pour des raisons de lisibilité, le ratio des fréquences a été divisé par 1000 à chaque fois car les chiffres étaient très élevés. Cette opération ne changeant pas l'ordre des ratios entre les fréquences, cela n'a pas changé notre choix de séquence.

b) Les enrichissements mesurés lors de la sélection branchée multiple sont-ils corrélés aux mesures d'affinité?

Nous avons aussi comparé les résultats des séquences candidates que nous avons choisies à l'issue des SELEX R et 4F. Ces séquences étaient déjà présentes de manière très significative dans la banque au tour 7 du SELEX R, et nous avons pu analyser leur réponse à la sélection branchée multiple.

Nous avons plus particulièrement comparé les enrichissements des dix candidats issus des SELEX R et 4F dans les branches R avec et sans ARNt. Les candidats ayant les ratios oligonucléotides sur Scr-1 les plus élevés étaient 4F01 et 4F05 (ratios respectivement d'environ 14 et 24 en condition R+ ARNt, voir Figure 35-C). 4F05 a effectivement l'enrichissement le plus

fort des dix candidats (enrichissement dans la branche R + ARNt de 9.3279, (cf. Tableau 7), mais 4F01 au contraire diminue (enrichissement dans la branche R + ARNt de 0.2849. Il n'y a donc pas une corrélation parfaite entre ce que nous mesurons par séquençage à haut-débit et une mesure d'affinité où les candidats sont testés seuls. Ces observations nous indiquaient malheureusement que les enrichissements observés lors la sélection branchée multiple n'étaient pas forcément capables de prédire les capacités de liaison des séquences.

c) Choix de séquences candidates à tester en affinité

Nous avons tout de même souhaité tester quelques candidats. Nous avons choisi un candidat pour chaque cible (fibre F, R, 65 et 91), en choisissant ceux qui avaient le meilleur ratio d'enrichissement, ce qui permettait de choisir ceux maximisant à priori le mieux la différence entre les différentes fibres.

Le Tableau 7 nous permettait de sélectionner la famille que nous souhaitions tester. Chacune de ces familles n'étaient composée que d'une seule séquence, nous n'avons donc pas eu à choisir quelle séquence tester au sein de la famille. Nous avons cependant choisi pour la branche fibre 91, la famille 70 et non pas la 289 qui avait pourtant un meilleur ratio de fréquence. Les familles 289 et 214 ont été écartées de notre sélection car leur enrichissement contre les fibres F et 65 (respectivement 0.9481 et 0.9407) étaient trop proches de l'enrichissement contre la fibre 91 (respectivement 1.0223 et 1.0504). Nous avons donc choisi le 3ème candidat, la famille 70, qui avait des différences plus significatives entre les enrichissements contre la fibre F et les trois autres fibres.

F_124	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATC ACGGACACCTACCCGACGGCATGTCAGGACACATGTTGTGCTCCGTTGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
R_84	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCATC TGCGAAGTGCCCAAGACCATATCCACTGCACACGACAGCTGATGGTGGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
P65_10854	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCAT CGCACAGTGTACACCTACACACAGCATACCTGTTGGCATCCAGGTTGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
P91_70	GGGAGAGTATCCGTTGGAGGCAT GCTACACACACATCGCACGTCACCCACTATGGGGACATCTTGCGGCGTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG

Tableau 8 - Séquences des candidats aptamères choisis après analyse des sélections branchées. Les parties aléatoires des séquences sont indiquées en bleu, et les parties constantes correspondant aux sites des amorces en noir.

Bilan : Nous avons mis en œuvre une méthode pour identifier par séquençage à haut-débit les séquences ayant un enrichissement spécifique pour un type de fibre par rapport à un autre.

Les dix candidats issus du SELEX étaient déjà fortement enrichis dans la banque au tour 7 du SELEX R, et nous avons pu analyser leur réponse à la sélection branchée. Malheureusement, l'enrichissement dans la branche R + ARNt et les résultats de criblage pour la condition R + ARNt ne sont pas corrélés. Ce résultat suggère que les enrichissements observés lors la sélection branchée multiple ne sont pas forcément capables de prédire les capacités de liaison des séquences.

Nous avons tout de même souhaité tester quatre candidats, à priori spécifiques de chaque type de fibre, afin d'avoir une conclusion certaine à notre méthode.

E. Découverte et résolution d'un problème de reproductibilité majeur

J'ai ensuite réalisé plusieurs expériences par filtration sur nitrocellulose pour déterminer précisément l'affinité (K_d et B_{max}) des quatorze candidats aptamères (les dix issus de l'analyse des deux SELEX et les quatre issus de l'analyse de la sélection branchée multiple) pour les différentes conformations de fibres et les monomères d' α -syn. Néanmoins, j'ai fait le choix de ne pas présenter l'ensemble de ces résultats car nous nous sommes continuellement heurtés à des problèmes de reproductibilité.

1) Mise en évidence d'un problème de reproductibilité

La Figure 38 présente deux exemples représentatifs des problèmes de reproductibilité que nous avons rencontrés. Ces graphiques représentent les courbes d'affinités de deux candidats 4F02 et R05 pour les fibres 65 et 91 réalisées le même jour. Ainsi que nous pouvons l'observer, sur les graphiques de droite que les candidats se lient aux fibres de manière significativement supérieure par rapport au témoin négatif, la séquence aléatoire Scr-1. Le logiciel Prism calcule pour ces candidats des K_d de l'ordre de 50 nM, et des B_{max} de 200 fmol. Cependant, sur les graphiques de gauche nous n'observons aucune différence significative par rapport au scr-1 pour la même expérience réalisée le même jour. Ce manque de reproductibilité ne nous a pas permis de conclure sur l'affinité de nos candidats.

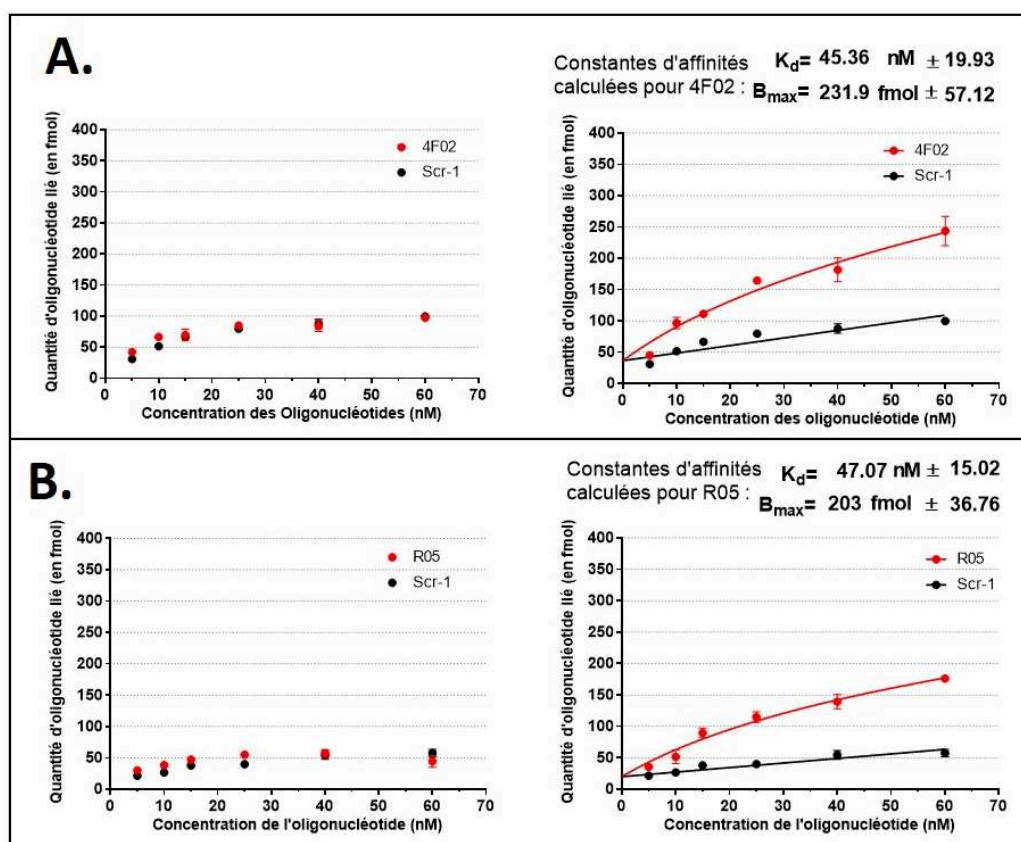


Figure 38 - Exemple de deux mesures d'affinité non reproductibles. Il est présenté ici les mesures d'affinité des candidats 4F02 (A) et R05 (B) contre respectivement les fibres 65 (A) et 91 (B). Les oligonucléotides marqués radioactivement au P^{32} sont mélangés aux fibres (400

nM) sans ARNt, à différentes concentrations allant de 5 à 60 nM. Après 1H d'incubation à 37°C, 20 µL de chaque point est déposé puis filtré sur la membrane nitrocellulose. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose après un lavage, sont quantifiées par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Les calculs des K_d et B_{max} sont réalisés à l'aide du logiciel Prism en utilisant un modèle de régression non linéaire analysant l'affinité totale (spécifique et non spécifique) d'un candidat pour la cible, en faisant l'hypothèse qu'il n'existe qu'un seul site de liaison sur la cible pour le candidat.

2) Découverte de problèmes d'adsorption et test de tubes à faible adsorption

Nous avons réalisé une série d'expérience pour comprendre ce qui pourrait expliquer notre problème de reproductibilité. Il est apparu qu'à des concentrations de l'ordre micro-molaire ou inférieures, les fibres d' α -syn se fixaient fortement par interaction non-spécifique à la paroi des tubes en plastique de marque Eppendorf que nous utilisons.

Pour mettre en évidence ce phénomène, nous avons déposé une solution de 4 µM en fibre R dans des tubes ayant des propriétés différentes : les tubes Eppendorf que nous utilisons habituellement, et deux références différentes de tubes conçus de manière à réduire l'adsorption des molécules sur les surfaces plastiques. Après incubation, les solutions sont intégralement retirées des tubes puis dosées par BCA (de l'anglais BiCinchoninic acid Assay). Nous avons utilisé comme référence la quantité de protéine mesurée lorsque la solution de 4 µM a été directement pipetée dans la plaque dans laquelle la quantification BCA a été réalisée. Nous avons ainsi pu calculer pour chaque condition, le pourcentage de protéine récupéré par rapport à ce point de référence (correspondant au 100%) (Figure 39).

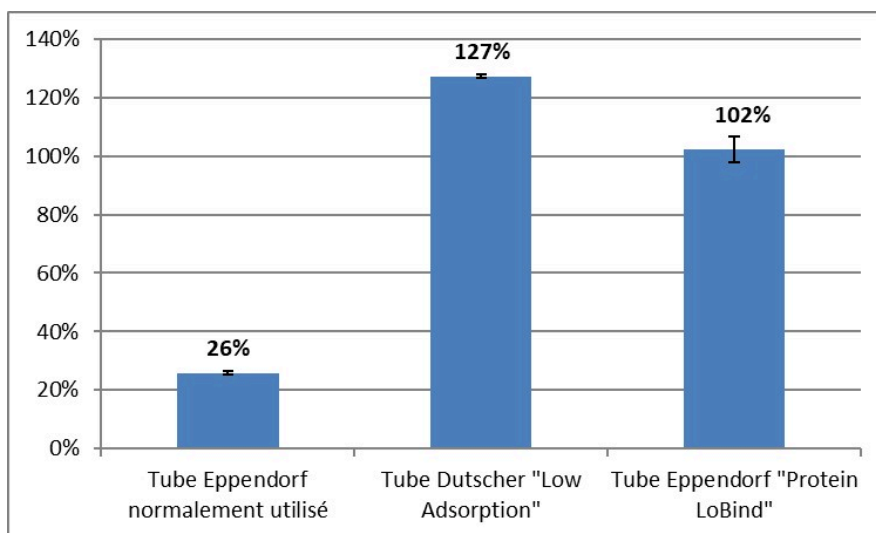


Figure 39 – Exemple de mise en évidence du phénomène d'absorption des fibres d' α -syn sur la paroi des tubes en plastique utilisés jusqu'à présent. Une solution à 4 µM (100 pmol) en fibre R d' α -syn a été déposée en duplicat dans trois types de tubes de 1,5 ml. Après une incubation de 1H à température ambiante, les solutions sont ensuite entièrement retirées puis quantifiées par BCA. Il est ainsi possible de calculer le pourcentage exact de protéine ayant été effectivement récupéré.

Nous avons observé que nous récupérons la totalité de la quantité de fibre R lorsque nous utilisons les tubes réduisant l'adsorption des molécules sur la paroi plastique : les tubes Dutscher « Low adsorption » et les tubes Eppendorf « Protein LoBind ». Cependant, dans le cas des tubes Eppendorf habituellement utilisés, nous perdions jusqu'à 80 % de la quantité de fibre R déposée, ce qui est extrêmement important. Dans cette expérience, nous avons calculé que la quantité récupérée en fibre R à partir des tubes Dutscher est de 120%. Cette mesure peut s'expliquer par de la variabilité lors du pipetage des solutions, ou une homogénéisation imparfaite de la solution en fibre R de départ.

Nous avons réalisé cette expérience à une concentration de 4 μM , afin d'avoir une concentration en protéine quantifiable par BCA (4 μM correspond à 58 $\mu\text{g/ml}$, la limite de quantification de la méthode BCA étant de 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dans les conditions et le tampon que nous avons utilisé). Sachant que nos expériences de test de liaison entre les protéines d' α -syn ont été réalisées à des concentrations dix fois inférieures à 4 μM (400 nM), la fixation de la protéine sur le tube pouvait être encore plus importante. Bien que nous n'ayons pas testé ce phénomène pour les trois autres types de fibres (F, 65 et 91), et la forme monomérique d' α -syn, nous avons émis l'hypothèse qu'elles pouvaient avoir le même problème vu le manque de reproductibilité de nos expériences de mesure d'affinité.

Ce phénomène d'adsorption des protéines sur la surface des tubes plastique peut donc expliquer le manque de reproductibilité observé lors de nos tests de liaison entre nos candidats et les fibres d' α -syn. En effet, sachant que les solutions de protéines étaient d'abord confectionnées dans un tube-mère puis distribuées dans différents puits, chaque interaction avec une nouvelle surface plastique engendrait probablement une nouvelle perte de la quantité de protéine. Les quantités de protéines finalement filtrées après incubation devaient donc être très faibles, et sujettes à beaucoup de variabilité, ce qui explique les différences que nous avons observées entre les résultats. Ce phénomène de fixation non-spécifique pourrait aussi expliquer le manque de corrélation entre les enrichissements des séquences lors de la sélection branchée multiple et leur capacité de liaison aux différentes fibres d' α -syn.

Bilan : En cherchant à mesurer précisément l'affinité de nos candidats aptamères, nous avons été confrontés à des problèmes de reproductibilité majeurs.

Nous avons réalisé une série d'expérience pour comprendre ce qui pourrait expliquer ce problème. Il est apparu qu'à des concentrations de l'ordre micro-molaire ou inférieures, les fibres d' α -syn se fixaient fortement (à presque 80%) par interaction non-spécifique à la paroi des tubes en plastique de marque Eppendorf que nous utilisons.

Ce phénomène d'adsorption des protéines sur la surface des tubes plastique pouvait donc expliquer le manque de reproductibilité observé lors de nos tests de liaison, mais aussi expliquer le manque de corrélation entre les enrichissements des séquences lors la sélection branchée multiple et leur capacité de liaison aux différentes fibres d' α -syn.

Nous avons pensé que ce phénomène de fixation non-spécifique avait pu affecter considérablement nos SELEX. Nous avons donc pris la décision de recommencer nos sélections, avec des tubes conçus spécialement pour réduire l'adsorption des molécules sur la paroi plastique et permettant de résoudre ce problème d'adsorption, afin d'obtenir les meilleurs aptamères possibles en termes d'affinité et de sélectivité.

II. Deuxième essai de sélection d'aptamères contre les fibres d' α -synucléine

Dans cette deuxième partie de thèse, nous avons mis œuvre deux SELEX avec des stratégies légèrement différentes. Dans le premier SELEX, nous avons réalisé une sélection simple contre la conformation F de fibre d' α -syn. Pour le 2^{ème} SELEX, nous avons réalisé la même sélection mais en ajoutant des contre-sélections contre la conformation R de fibre d' α -syn et la forme monomérique. Ce 2^{ème} SELEX visait à sélectionner des aptamères reconnaissant la fibre F de manière plus spécifique.

A. Conception et mise en œuvre des sélections

1) Choix des stratégies de sélection mises en œuvre

- a) Objectif : Deux SELEX « F » et « F spécifique » visant à développer des aptamères aux spécificités différentes

Sachant que les conformations d' α -syn représentent des cibles assez semblables, ces fibres étant composées des mêmes protéines, il y avait un risque qu'il soit très difficile d'isoler des aptamères spécifiques d'un type de cible. C'est pourquoi nous avons souhaité réaliser un SELEX moins stringent pour sélectionner des aptamères contre une seule conformation (F) mais sans contre-sélection. Le 2^{ème} SELEX a été réalisé dans les mêmes conditions mais avec des étapes de contre-sélection contre la forme monomérique et contre la fibre R. Ces deux SELEX ont été appelés : SELEX « F » et SELEX « F-spécifique » (Figure 40). Comme pour les SELEX précédents, nous avons décidé de réaliser le premier tour de sélection en commun, avec une pression de sélection très faible.

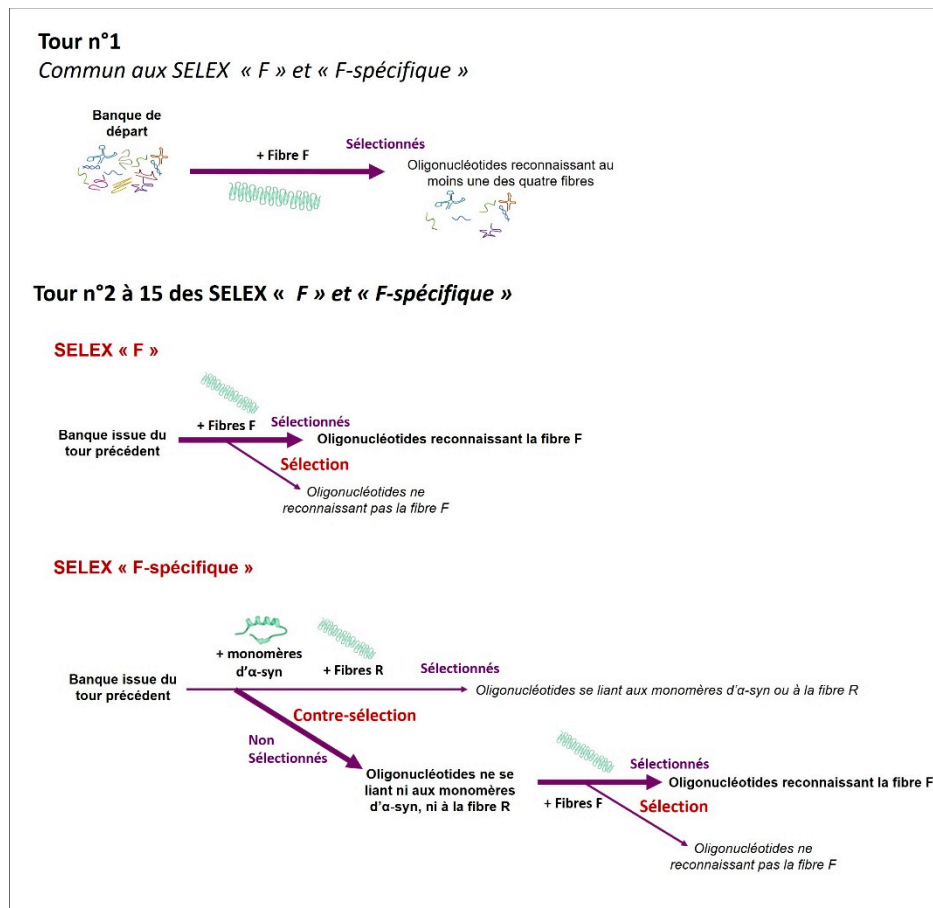


Figure 40 – Schéma de l’organisation du processus de sélection des SELEX "F" et "F spécifique" réalisés. Nous avons tout d’abord réalisé un tour de SELEX « F » en commun, avant séparer le SELEX en deux branches. La première branche continuait le SELEX F visant à sélectionner des aptamères reconnaissant la conformation F de fibre. Ce SELEX était simplement composé d’une étape de sélection contre la fibre F. La deuxième branche du SELEX était le SELEX « F-spécifique » visant à sélectionner des aptamères reconnaissant la conformation de fibres F mais pas la conformation R ni la forme monomérique d’α-syn. Ce SELEX était composé d’une contre-sélection contre la fibre R et contre les formes monomériques d’α-syn, puis d’une sélection contre la conformation F de fibre d’α-syn.

b) Mise au point d’une méthode de sélection par colonne d’exclusion stérique

Nous avons souhaité mettre au point une nouvelle méthode de séparation pour ces nouveaux SELEX. Le fait que les résultats de nos premiers SELEX n’avaient pas été ceux attendus, pouvait être imputé au problème de rétention des protéines dans les tubes. Néanmoins, nous avons estimé que l’échec du SELEX pouvait être aussi dû au fait que la méthode de séparation par filtration sur membrane nitrocellulose pouvait ne pas être adaptée. Nous avons donc cherché à mettre au point une nouvelle méthode de séparation.

Après plusieurs essais de mise en place de différentes techniques, nous avons finalement réussi à mettre au point une méthode de séparation par colonne d’exclusion stérique en utilisant des colonnes microbiospin Biorad Sp6. Cette colonne contient un gel

constitué de billes de polyacrylamide qui retient les molécules d'un poids moléculaire inférieur à 6kDa et laisse passer les autres (comme les oligonucléotides issus d'une banque utilisée pour un SELEX) lors d'une centrifugation. Cette méthode avait déjà été utilisée dans certains SELEX (Yang et al., 2016).

Nous avons d'abord testé si les fibres et les monomères d' α -syn étaient retenus dans la bio-spin 6 (Sp6). Etant donné le poids moléculaire d'une protéine d' α -syn (14.5 kDa), les monomères et les fibres ne devraient pas être retenus sur la colonne lors d'une centrifugation. Néanmoins, étant donné la longueur importante des fibres d' α -syn, nous nous sommes demandés si elles ne pourraient tout de même pas être retenues par le gel. Pour vérifier cela, nous avons déposé sur plusieurs colonnes Sp6 des solutions comportant des fibres F, R ou des monomères d' α -syn. Après une première centrifugation, visant à vérifier si les protéines étaient retenues dans la colonne, nous avons évalué si les protéines pouvaient être éluées par une solution dénaturante. Nous avons testé comme solution dénaturante une solution de 7M urée, qui est un dénaturant couramment utilisé en biologie moléculaire, et une solution de SDS à 2% (dodécylsulfate de sodium) qui a la propriété de dépolymériser les fibres d' α -syn (Fenyi et al., 2018). Chaque fraction sortante des colonnes était ensuite quantifiée par dosage BCA. Cette méthode de quantification ayant une limite de détection de 20 μ g/ μ l, nous avons estimé qu'elle ne permettrait pas de quantifier la présence de protéines dans les fractions ayant moins de 30% de la quantité initialement déposée de protéine sur la colonne Sp6. Néanmoins, cette méthode nous a permis d'analyser dans quelle(s) fraction(s) se trouvent principalement les protéines.

Nous avons ainsi pu observer qu'aucune des formes de protéine (fibres ou monomères) ne se retrouvaient en grande quantité dans la fraction issue de la 1ère centrifugation (Figure 41-A). Ceci signifie que les fibres F et R et les monomères d' α -syn restaient dans la colonne après une centrifugation. Cette observation ne concorde pas du tout avec le mode de fonctionnement usuel de la colonne Sp6, où les protéines de poids moléculaires supérieurs à 6 kDa doivent être éluées de la colonne en même temps que la phase liquide lors d'une centrifugation. Néanmoins, comme nous en avons fait l'hypothèse, il semblerait que les fibres d' α -syn soient retenues dans la colonne du fait de leur grande longueur. Cependant, nous ne nous attendions pas à ce que des monomères d' α -syn soit retenus par cette colonne. Nous supposons que les monomères plutôt que de rester isolés, peuvent s'associer les uns aux autres pour former des structures, d'une autre nature que fibrillaire, mais suffisamment imposante pour être retenues dans la colonne Sp6. Une autre explication pourrait être que les monomères interagissent de manière non-spécifique avec le gel. En effet, il a été mis en lumière dans certains travaux que les sels (notamment le NaCl) pouvaient favoriser la liaison des protéines aux résines des colonnes d'exclusion stérique par interaction hydrophobe (Tsumoto et al., 2007). Or, notre tampon de sélection dans lequel est réalisée toutes nos expériences contient 150 mM de NaCl (cf. RESULTATS, partie I.A.1)d ci-dessus). Les monomères d' α -syn pourraient-être donc retenus dans les Sp6 par interaction hydrophobe. Concernant les éluions, nous avons pu constater que la solution de 7M urée ne permettait pas d'éluier les protéines de la colonne, que ce soit les fibres ou les monomères d' α -syn. Le SDS 2% semble au contraire capable de décrocher une grande part des protéines : 78.7 % des monomères, 58.2% des fibre R et 112.1%

des fibres F. Le chiffre de 112.1% pour les protéines F est aberrant mais peut simplement s'expliquer par des écarts dans la mesure et l'estimation. Les mesures pour les 2^{èmes} lavages des colonnes avec le SDS 2% sont inférieures à 20 µg/µl et ne peuvent donc être estimées, on peut néanmoins faire assez logiquement l'hypothèse que ce 2^{ème} lavage décroche une part des protéines restantes, notamment pour les fibres R pour lesquelles seules 58.2 % des fibres ont été décrochées au 1^{er} lavage.

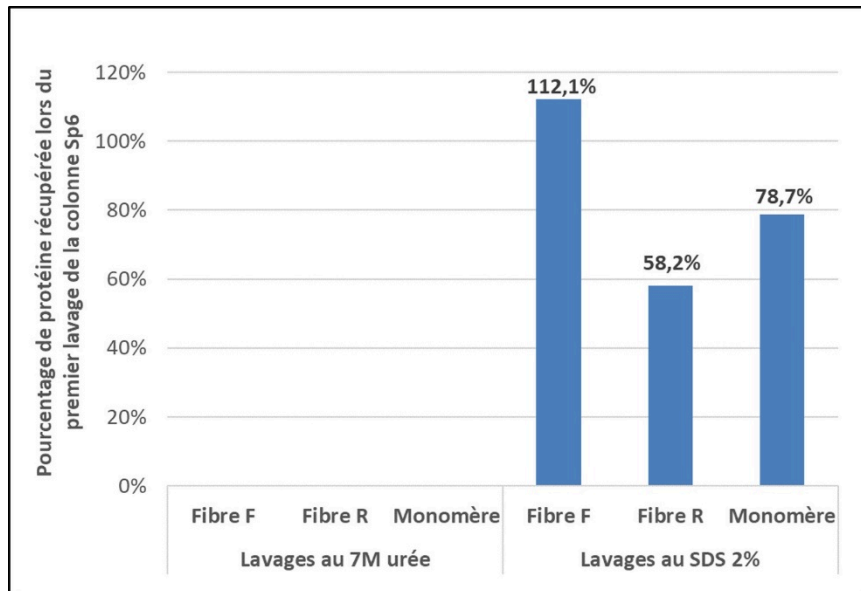


Figure 41 - Mise en évidence de la rétention des fibres F, R et des monomères d'α-syn sur la colonne Sp6. Différentes formes de protéines ont été déposées à 8 µM en Ts1X sur des colonnes Sp6 dont le tampon « SSC » a été au préalable changé en Ts1X. Les colonnes ont été centrifugées 4 min à 1000 g et les éluats récupérés dans des tube Dustcher « Low adsorption ». Deux lavages ont été réalisés successivement. Pour cela, du 7M urée ou du SDS2 % ont été déposés sur les colonnes et celles-ci ont été de nouveau centrifugées 4 min à 1000 g. Les quantification BCA ont été réalisées pour les éluats des 1^{ères} centrifugations à partir d'une gamme de protéine BSA réalisée en Ts1X, et pour les éluats issus des lavages par des gammes de BSA réalisées en 7M urée ou en SDS 2%. Les fractions éluées lors des premières centrifugations et des 2^{èmes} lavages avaient des signaux en dessous de la limite de détection. Seules les fractions issues des premiers lavages ont donc été représentées sur le graphique.

Cette expérience nous a permis de conclure que les colonnes Sp6 pouvaient être utilisées comme méthode de séparation pour nos SELEX. Dans le cas où les oligonucléotides se lient aux protéines α-syn (fibres et monomères) restent retenus dans la colonne, il serait possible de les séparer des oligonucléotides ne se liant pas aux protéines α-syn (fibres et monomères) élués, eux, de la colonne lors de la centrifugation. Récupérer les oligonucléotides restés liés aux protéines serait ensuite possible par lavage de la colonne au SDS 2%. Cependant, nous avons réalisé des tests complémentaires avant de valider définitivement cette méthode de séparation.

Nous avons d'abord vérifié que le gel de la colonne Sp6 ne dépolymérisait pas les fibres d'α-syn. Pour cela nous avons utilisé la molécule de ThT qui devient fluorescente lorsqu'elle est

en contact avec des fibres amyloïdes comme les fibres d' α -syn (cf. Introduction, partie IV.A.1) ci-dessus). Nous avons pu observer que le signal de fluorescence de la ThT est presque nul (<1) lorsque celle-ci est seule ou en contact avec des monomères d' α -syn, alors qu'il atteignait une valeur 42.3 en présence de fibre F (Figure 42-A). Nous avons ensuite incubé des fibres F avec du gel de colonne Sp6 pendant plusieurs minutes. Lorsque nous avons ensuite ajouté la ThT, nous avons pu observer que le signal de ThT restait élevé (37.7), et comparable à celui de la ThT en présence de fibre F seule. Ceci démontre que le gel de la colonne de Sp6 ne dépolymérisait pas les fibres d' α -syn.

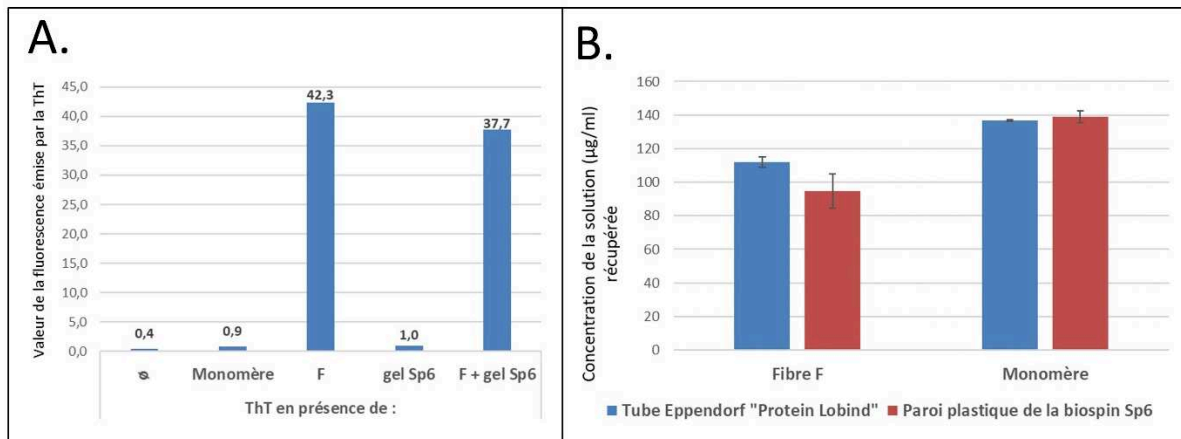


Figure 42 – Tests complémentaires pour valider la mise au point de la méthode de séparation par colonne Sp6. A – Mise en évidence de la conservation de la forme fibrillaire des fibres d' α -syn au contact du gel des colonnes Sp6. 100 pmol de protéine (fibre F ou monomère), préalablement incubés ou non avec du gel de colonne Sp6, ont été quantifiés par une solution de 10 μ M en ThT. B – Vérification de l'absence de rétention des fibres F et des monomères sur la paroi plastique des colonnes Sp6. Des gouttes de solution de 6 μ M en protéines ont été incubées 5 min sur les paroi plastiques puis intégralement retirées et quantifiées par BCA.

Nous avons ensuite essayé de caractériser au mieux la façon dont les protéines étaient retenues dans les colonnes Sp6. Nous avons dans un premier temps, vérifié que les protéines n'étaient pas retenues sur la grille qui fermait la base de la colonne. Pour cela, nous avons utilisé un protocole similaire à la première expérience en déposant des solutions de fibres ou de monomères sur des colonnes Sp6 dont nous avons retiré le gel : seule la grille retenait alors les solutions. Après une première centrifugation suivie de deux lavages au SDS 2%, nous avons de nouveau quantifié les fractions. Nous avons pu observer (données non présentées) que 93.8% des fibres F et 86 % des monomères étaient récupérés dès la 1^{ère} centrifugation. Le gel des colonnes Sp6 est donc indispensable pour la rétention des protéines. Dans un deuxième temps, nous avons vérifié si les protéines n'étaient pas retenues sur la colonne par des interactions non-spécifiques avec le plastique des colonnes Sp6. Pour cela, nous avons déposé des gouttes de solution de protéine (fibre F ou monomère) dans des tubes Eppendorf « LoBind » et sur la surface plastique des colonnes Sp6. Après une courte incubation les solutions ont été entièrement récupérées puis dosées par BCA. Nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence dans la quantité de protéines récupérées après le contact avec le plastique du tube Eppendorf « LoBind » et du plastique de la colonne Sp6 (Figure 42-B). Les

protéines ne sont donc pas retenues sur la colonne Sp6 par interactions non spécifiques avec le plastique.

Bilan : Nous avons mis au point une méthode de séparation par colonne d'exclusion stérique pour nos SELEX à venir. Nous avons constaté que, bien que les fibres et les monomères d' α -syn aient des poids moléculaires supérieurs à 6 kDa, ils étaient retenus dans la colonne lors de la séparation. Ces observations peuvent s'expliquer pour les fibres dont la longueur importante doit empêcher leur passage dans le gel Sp6. Nous n'avons néanmoins pas d'explication certaine pour comprendre la rétention des monomères d' α -syn. Des lavages de la colonne au SDS 2% permettait d'éluer les protéines de la colonne. Afin de caractériser pleinement la méthode de séparation, nous avons vérifié qu'en présence du gel des colonnes Sp6, les fibres d' α -syn conservaient leur forme fibrillaire. Nous avons aussi vérifié que les protéines ne restaient pas liées au plastique des colonnes Sp6 par interaction non spécifique. Cette méthode de séparation nous permettra ainsi de réaliser les contres-sélections prévues, en récupérant l'éluat issu de la centrifugation d'une colonne Sp6 sur laquelle un mélange d'incubation a été déposé. Les étapes de sélection seront aussi réalisables en lavant les colonnes avec une solution de SDS 2%, qui nous permettra de récupérer les oligonucléotides restés accrochés aux protéines retenues dans la colonne Sp6.

c) Conception de la banque de départ utilisée

Nous avons utilisé pour ce nouveau SELEX une banque légèrement différente de la précédente (Figure 43). La fenêtre aléatoire était de 35 nucléotides et non plus 50. La séquence constante de la banque en 3' était exactement la même, et nous avons donc utilisé de nouveau l'amorce PiRT. Il y avait des différences de quelques bases dans la séquence constante de la banque en 5', nous avons donc utilisé une nouvelle amorce nommée p72, très similaire à l'amorce p73.

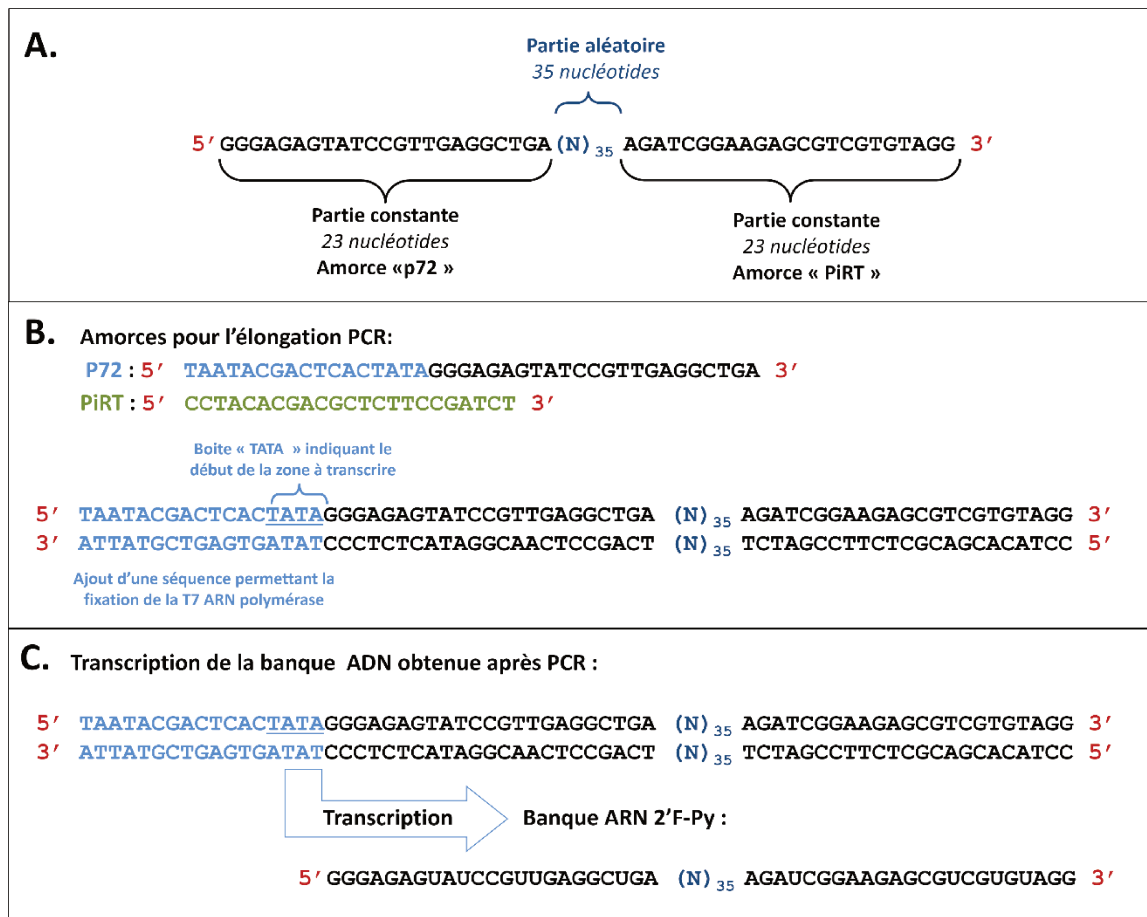


Figure 43 - Organisation de la banque d'oligonucléotide ARN2'F utilisée au départ des SELEX « F » et « F spécifique ». A – Organisation de la banque d'oligonucléotide sous forme ADN utilisée au départ des SELEX. La banque a une longueur totale de 81 bases, pour une séquence aléatoire de 35 nucléotides. B – L'étape de PCR avec les amorces p72 et PiRT permet d'allonger la banque coté 5' et d'ajouter une séquence permettant la fixation de la T7 ARN polymérase, pourvue d'une boite TATA indiquant le site de début de la transcription. La banque ADN obtenue après PCR, est allongée du côté 5' de 17 bases, sa longueur totale est donc de 98 bases. C – L'utilisation de la T7 ARN polymérase (Y639F) permet d'incorporer des bases 2'Fluoro-pyrimidine au lieu des bases naturelles. On obtient donc ainsi une banque de chimie 2'F-Py, et de longueur de 81 bases.

2) Mise en œuvre des SELEX « F » et « F spécifique »

a) Principe des sélections et contre-sélections

Nous avons réalisé deux nouveaux SELEX en utilisant une méthode de séparation par colonne Sp6.

Concernant les étapes de contre-sélections, pour le SELEX « F spécifique », la banque était incubée à 37°C avec un mélange de fibre R et de monomère et ensuite déposée sur colonne. Pour le SELEX « F », aucune contre-sélection contre des protéines n'était prévue, nous avons néanmoins réalisé à chaque tour de SELEX une contre-sélection contre le support, la colonne Sp6, en déposant la banque seule sur la colonne.

Les éluats récupérés en sortie, contenant les oligonucléotides ne s'étant pas fixés à la colonne Sp6, ni aux protéines présentées pour le SELEX « F spécifique », ont ensuite été utilisés comme point de départ pour les étapes de sélections. Les protéines F étaient simplement rajoutées dans les éluats et les mélanges incubés à 37°C. Les volumes récupérés en sortie des colonnes Sp6 étaient assez aléatoires dans une certaine mesure : les volumes étaient supérieurs ou égaux à ceux déposés sur les colonnes avant la centrifugation. Nous pouvions donc contrôler les concentrations précises de banque et de protéines au moment des contre-sélection, mais pas lors des sélections, où seule la quantité (et non la concentration) de protéine était contrôlable.

Pour les sélections, le mélange incubé était ensuite déposé sur colonne Sp6 et celle-ci centrifugée. La colonne était ensuite lavée plusieurs fois avec un dépôt de Ts1X suivi d'une centrifugation. Le nombre de lavage permettait de réguler la pression de sélection. Enfin, deux étapes successives d'élution avec le passage d'une solution de SDS 2% nous permettait de récupérer les oligonucléotides restés accrochés aux protéines retenues dans la colonne Sp6. Les oligonucléotides pouvaient ensuite être extraits puis amplifiés.

L'un des avantages de l'utilisation des colonnes Sp6 comme méthode de séparation était de pouvoir récupérer chaque fraction issue des différentes étapes de la sélection (éluat de la 1^{ère} centrifugation, lavage, élution). Nous pouvions ainsi quantifier par spectrophotométrie la quantité d'oligonucléotide présente dans chaque fraction, et suivre l'évolution de la sélection.

b) Mise en œuvre des SELEX

Nous avons commencé les SELEX « F » et « F spécifique » par un tour commun à faible pression de sélection. Nous avons simplement réalisé une contre-sélection contre la colonne Sp6, suivi d'une sélection sur les fibres F.

Nous avons ensuite réalisé en parallèle 14 tours de sélection pour les SELEX « F » et « F spécifique », en augmentant au fur et à mesure la pression de sélection. Nous avons fait varier différents paramètres (Tableau 9) :

- La quantité et la concentration de la banque d'ARN2'F présentée aux cibles au début de chaque tour. Au tour n°2 nous avons présenté aux cibles 2 nmol de banque à une concentration de 10 µM, mais seulement 100 pmol à 1µM au tour n°15.
- La quantité de Fibre F présentée à la banque lors des étapes de sélection. Au tour 2, nous avons présenté à la banque 2 nmol de fibre F, et seulement 100 pmol au tour 15.
- Le temps d'incubation des sélections et contre-sélections. De 60 min au tour 2, était de 10 min au tour 15.
- Le nombre de lavages lors de la sélection. Augmenté progressivement de 2 à 7 des tours 3 à 11. Ils sont passé à 4 lors du tour 12.

Nous n'avons pas changé la concentration des monomères et des fibres R lors des étapes de contre-sélections (10 µM), et avons donc décidé de conserver une pression de sélection constante pour ce paramètre-ci.

		Tour commun	Mêmes conditions pour les SELEX "F" et "F-spécifique" à chacun des tours															
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15		
Quantité de Banque en input (en nmol)		1,85	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,10	0,10	0,10	
	Concentration (µM)	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	1,00	1,00	1,00	
15 µM pour le SELEX "F"																		
Contre-Sélection du SELEX "F-spécifique"	Quantité de monomère (nmol)	pas ici	2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	
	Concentration (µM)		10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	
	Quantité de fibre R (nmol)		2,00	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	Concentration (µM)		10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Sélection	Quantité de fibre F (nmol)	1,85	2,00	2,00	2,00	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,10	0,10	0,10	
Temps d'incubation (en minutes)		60	60	60	30	30	30	30	30	30	15	15	10	10	10	10	10	
Nombre de lavage	pour la Contre-sélection	2	2	2	4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
	pour la Sélection	2	2	2	4	6	6	6	6	6	6	7	4	4	4	4	4	

Tableau 9 - Résumé des conditions de sélection pour les tours 2 à 15 des SELEX "F" et "F spécifique"

Au fur et à mesure des tours de SELEX, nous avons quantifié chacune des fractions issues des étapes de sélection et de contre-sélection (éluat de la 1^{ère} centrifugation, lavages, éluations en SDS 2%). La Figure 44 présente la quantification des fractions éluées en SDS 2% après l'étape de sélection pour chacun des tours. Nous avons donc pu observer l'évolution de la quantité d'ARN2'F retenue à la fin de chaque tour de sélection pour chacun des SELEX. 19,2 pmoles ont été retenues à la fin du tour 1 de SELEX. Cette quantité a augmenté rapidement lors des tours 2 et 3 des deux SELEX (90 et 55 pmoles retenues au tours 3 pour les SELEX « F » et « F spécifique » respectivement), raison pour laquelle la pression de sélection a été augmentée aux tours 4 et 5. Les quantités retenues sont aux alentours de 5 à 10 pmol pour les tours 5 à 10 des SELEX « F » et « F-spécifique », et de 1 à 5 pmol pour les tours 11 à 15. Entre des tours de même pression de sélection (par exemple entre les tours 5 à 8, entre les tours 9 et 10 et entre les tours 13 à 15 des deux SELEX), nous n'avons pas pu observer d'augmentation significative de la quantité d'ARN2'F retenu. Nous avons néanmoins continué à augmenter progressivement la pression de sélection au cours du SELEX.

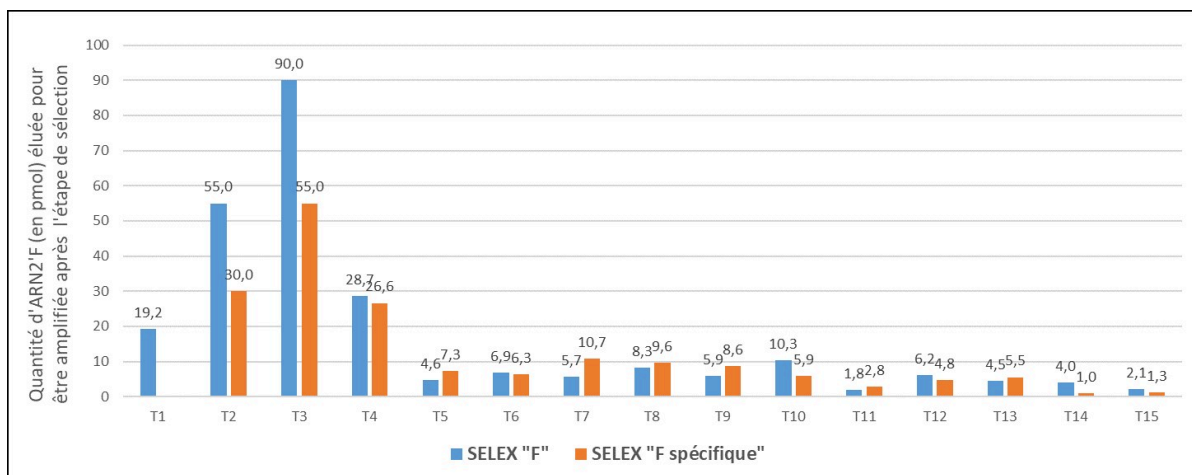


Figure 44 - Quantification pour chaque tour de SELEX de la fraction éluée

Après 15 tours de sélection, nous avons décidé de procéder à l'analyse des banques des SELEX par séquençage haut débit.

Bilan : Nous avons réalisé 15 tours de sélection pour les SELEX « F » et « F-spécifique ». Bien que nous n'ayons pas pu observer d'augmentation significative de la quantité d'ARN2'F retenue à la fin des tours de sélection, nous avons continué à augmenter de manière croissante la pression de sélection.

B. Analyse de l'évolution des SELEX par séquençage haut débit

Des échantillons des banques correspondant au tours 1 à 15 pour respectivement les SELEX « F » et « F-spécifique » ont été séquencés. Le logiciel PATTERNITY-seq nous a ensuite permis d'analyser en détail l'évolution des banques au cours des SELEX et d'identifier des séquences candidates à tester.

1) Analyse de l'évolution globale des SELEX

a) Choix de la taille de la fenêtre aléatoire des séquences à inclure dans l'analyse.

Nous avons choisi de retenir pour l'analyse seulement les tours 9 à 15 des SELEX « F » et « F-spécifique ». Les tours plus précoces de ces SELEX ne présentaient pas de séquences ayant un enrichissement important, ces données n'étaient donc pas très utiles pour notre analyse. Nous avons analysé ces SELEX en tant que deux branches d'un même SELEX.

La taille de fenêtre aléatoire de la banque d'origine est de 35 nucléotides. Néanmoins, il est usuel de tolérer des ajouts ou des délétions de quelques bases (cf.I.B.1) ci-dessus). Nous avons choisi de conserver pour l'analyse toutes les séquences ayant une fenêtre aléatoire de taille allant de 33 à 37 nucléotides.

b) Evolution du nombre de séquences et de familles au cours des SELEX

Tout d'abord la fréquence de chaque séquence dans la banque a été calculée pour chacun des tours de SELEX. Ces séquences ont ensuite été rassemblées en famille selon leur similitude. Chaque famille est composée de séquences ayant au maximum 7 mutations par rapport à la séquence majoritaire au sein de la famille qui est alors qualifiée de « seed ». Sachant que cette analyse vise à détecter les familles et séquences bien enrichies au cours du SELEX, nous avons choisi de retenir uniquement les séquences dépassant une fréquence à 0.001% dans la banque à au moins un tour de sélection.

Nous avons pu observer pour les SELEX « F » et « F-spécifique », que le pourcentage de la banque contenant des séquences dépassant le seuil de 0.001% augmentait au fur et à mesure du SELEX : arrivant au dernier tour jusqu'à 75 % pour le SELEX « F » et presque 80%

pour le SELEX « F-spécifique » (Figure 45-A). Ces observations signifient que des séquences s'étaient bien enrichies de manière significatives dans la banque.

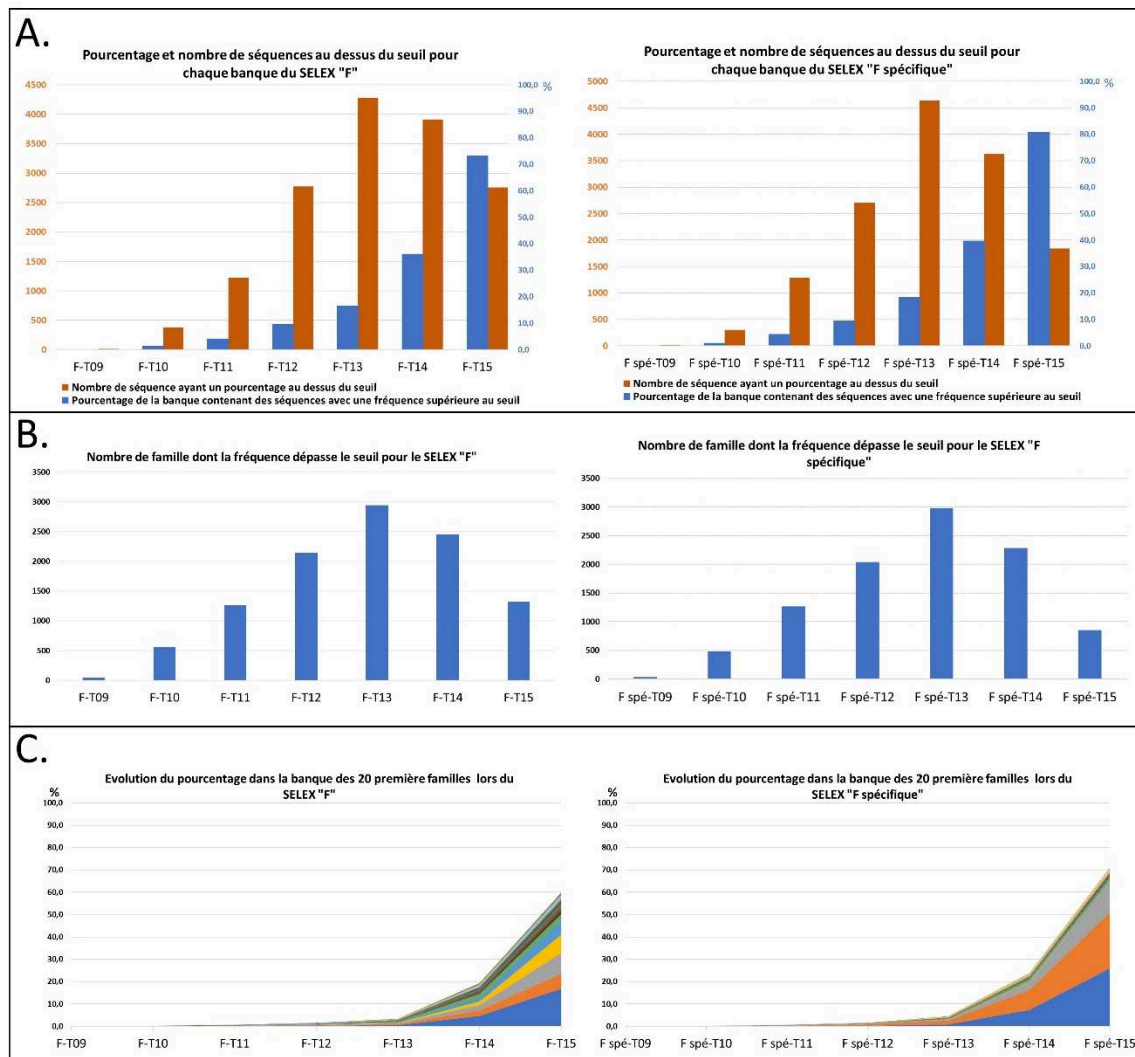


Figure 45 - Analyse de l'évolution globale des banques lors des SELEX "F" et "F spécifique" à l'aide de PATTERNITY-seq®. A - Evolution du nombre de séquences au-dessus du seuil et de leur pourcentage au sein de la banque lors des SELEX F (droite) et F spécifique (gauche). B - Evolution du nombre de famille au-dessus du seuil lors des SELEX F (droite) et F spécifique (gauche). C - Evolution du pourcentage des 20 premières familles lors des SELEX F (droite) et F spécifique (gauche).

Nous avons aussi constaté pour chacun des deux SELEX que le nombre de séquences dépassant le seuil croissait dans un premier temps, puis atteignait un pic avant de diminuer. Ce pic était atteint au tour 13 pour les deux SELEX : plus de 4000 séquences dépassant le seuil pour le SELEX « F » et plus de 4500 séquences dépassant le seuil pour le SELEX « F-spécifique ». Ce phénomène était aussi observable à l'échelle des familles (Figure 45-B) : les SELEX atteignent un pic du nombre de famille au tour 13 : presque 3000 familles pour chacun des deux SELEX.

Nous avons aussi constaté que les familles les plus abondantes s'enrichissaient de manière très forte à partir du tour 13 des SELEX (Figure 45-C). Les 20 premières familles

composent 60% de la banque au tour 15 du SELEX « F » et 70% au tour 15 du SELEX « F-spécifique ».

Les deux SELEX semblaient avoir suivi le même type d'évolution : dans la première partie de la sélection un grand nombre de séquences s'enrichissent progressivement, puis à partir du tour 13, certaines séquences s'enrichissent plus que les autres, et prennent toute la place dans la banque. Ce résultat était surprenant puisque nous nous attendions, au vu de la quantité très faible d'ARN2'F-Py retenu à la fin de chaque tour de SELEX, à un enrichissement plutôt faible au cours du SELEX des séquences dans les banques.

2) Analyse de l'évolution des familles

Nous avons ensuite analysé plus en détail l'évolution des 4653 familles de séquences. La Figure 46 présente l'évolution des 40 premières familles au cours des deux SELEX.

Comme l'étude de l'évolution globale du SELEX nous le laissait penser, certaines familles se sont très fortement enrichies au sein des banques : la famille 0 est présente à hauteur de 16.8 % dans la banque au tour 15 du SELEX « F », et à 26.0% au tour du SELEX « F spécifique ».

Nous avons également remarqué que de nombreuses séquences enrichies dans l'un des SELEX sont aussi présentes dans l'autre SELEX. Certaines séquences sont présentes dans les deux SELEX parfois à des fréquences du même ordre de grandeur : la famille 2 est présente dans la banque du 15^{ème} tour à 9.2% pour le SELEX « F » et à 13.7% pour le SELEX « F spécifique ». D'autres, sont présentes à des fréquences relativement différentes : ainsi la famille 3, présente à 8.2 % au tour 15 dans le SELEX « F » est seulement présente à 0.2% au tour 15 dans le SELEX « F-spécifique », ce qui n'est pas négligeable néanmoins. Ce constat ne nous a pas paru étonnant : les SELEX étant assez similaires. En effet, les séquences reconnaissant la fibre F de manière spécifique en la distinguant de la fibre R et des monomères d' α -syn peuvent en effet s'amplifier dans les deux SELEX. Une comparaison du niveau d'enrichissement des séquences entre les deux SELEX peut permettre de réaliser des pronostics de leur comportement spécifique, ou non spécifique.

Le logiciel Patternity-seq calcule aussi un facteur d'évolution pour chaque séquence : ce facteur d'évolution correspond à la capacité d'une séquence à bien s'amplifier au sein de la banque au fur et à mesure des tours (cf. I.B.3) ci-dessus pour une description complète du facteur d'évolution).

Nombre de séquences lues : Famille	SELEX "F"							SELEX F "spécifique"							Facteur d'évolution	
	F-T09	F-T10	F-T11	F-T12	F-T13	F-T14	F-T15	Spé-T09	Spé-T10	Spé-T11	Spé-T12	Spé-T13	Spé-T14	Spé-T15	SELEX "F"	SELEX "Spé"
	8,9 millions	8,6 millions	7,3 millions	8,9 millions	9,0 millions	8,1 millions	6,0 millions	9,8 millions	10,3 millions	13,6 millions	14,9 millions	15,2 millions	11,6 millions	12,2 millions		
0	0,0049	0,0343	0,1117	0,3006	0,5597	4,6006	16,8026	0,0052	0,0327	0,1225	0,3082	0,8959	7,3224	26,0898	2,10	2,21
1	0,0044	0,0313	0,0995	0,2836	0,4578	2,5902	6,7475	0,0060	0,0388	0,1738	0,5133	1,6534	8,9688	24,9138	1,93	2,15
2	0,0026	0,0157	0,0405	0,0858	0,2876	2,3155	9,2285	0,0035	0,0208	0,0708	0,1477	0,4958	3,5291	13,7523	2,19	2,20
3	0,0007	0,0062	0,0185	0,0401	0,1945	1,6152	8,2059	0,0011	0,0035	0,0123	0,0247	0,0517	0,1198	0,5245	2,19	1,59
4	0,0015	0,0134	0,0450	0,1295	0,2767	1,9711	6,5919	0,0011	0,0034	0,0157	0,0417	0,0824	0,3451	0,7580	2,13	1,88
5	0,0047	0,0224	0,0727	0,1761	0,3595	1,4855	2,6348	0,0032	0,0156	0,0584	0,1414	0,2768	0,7733	0,9698	1,77	1,49
6	0,0005	0,0040	0,0126	0,0303	0,1010	0,5483	1,3955	0,0003	0,0011	0,0045	0,0098	0,0206	0,0343	0,0281	1,95	0,88
7	0,0011	0,0071	0,0202	0,0539	0,1184	0,5317	1,1990	0,0009	0,0050	0,0186	0,0448	0,0785	0,2380	0,3773	1,92	1,50
8	0,0012	0,0069	0,0169	0,0393	0,1262	0,5346	1,0620	0,0009	0,0061	0,0181	0,0365	0,0963	0,2973	0,5245	1,90	1,61
9	0,0007	0,0035	0,0100	0,0259	0,0774	0,3605	0,9512	0,0005	0,0024	0,0087	0,0196	0,0445	0,0984	0,0995	1,92	1,16
10	0,0005	0,0030	0,0092	0,0234	0,0541	0,2717	0,8372	0,0005	0,0021	0,0082	0,0195	0,0418	0,1714	0,4516	1,93	1,84
11	0,0016	0,0098	0,0237	0,0499	0,1262	0,4927	0,8093	0,0016	0,0087	0,0253	0,0524	0,1021	0,3362	0,4592	1,72	1,53
12	0,0015	0,0083	0,0236	0,0664	0,1196	0,4649	0,7937	0,0005	0,0029	0,0098	0,0228	0,0353	0,0592	0,0409	1,72	0,67
13	0,0009	0,0048	0,0108	0,0219	0,0473	0,1314	0,1624	0,0013	0,0088	0,0258	0,0506	0,1302	0,4697	0,8136	1,30	1,75
14	0,0004	0,0029	0,0097	0,0290	0,0582	0,2622	0,6083	0,0002	0,0025	0,0102	0,0298	0,0556	0,1988	0,3945	1,82	1,70
15	0,0013	0,0098	0,0260	0,0601	0,0491	0,1174	0,1017	0,0017	0,0105	0,0343	0,0770	0,1198	0,4029	0,5597	0,74	1,50
16	0,0021	0,0115	0,0323	0,1027	0,0967	0,3181	0,5772	0,0018	0,0078	0,0234	0,0518	0,0873	0,1254	0,0709	1,44	0,61
17	0,0016	0,0124	0,0363	0,0901	0,1304	0,3714	0,4782	0,0008	0,0082	0,0270	0,0641	0,1349	0,3024	0,3445	1,40	1,25
18	0,0003	0,0012	0,0031	0,0091	0,0366	0,1532	0,3777	0,0002	0,0005	0,0021	0,0051	0,0140	0,0312	0,0284	1,94	0,93
19	0,0005	0,0030	0,0085	0,0184	0,0581	0,2251	0,3833	0,0003	0,0017	0,0051	0,0120	0,0199	0,0364	0,0238	1,69	0,69
20	0,0003	0,0016	0,0043	0,0110	0,0164	0,0339	0,0297	0,0005	0,0032	0,0105	0,0244	0,0514	0,1733	0,3384	0,89	1,66
21	0,0009	0,0046	0,0126	0,0275	0,0885	0,2617	0,3635	0,0007	0,0044	0,0131	0,0288	0,0562	0,1354	0,1562	1,52	1,23
22	0,0003	0,0016	0,0041	0,0119	0,0299	0,1333	0,3242	0,0002	0,0007	0,0029	0,0068	0,0145	0,0455	0,0708	1,86	1,34
23	0,0006	0,0034	0,0109	0,0217	0,0688	0,2279	0,3180	0,0006	0,0037	0,0086	0,0158	0,0309	0,0589	0,0486	1,54	0,86
24	0,0016	0,0096	0,0319	0,0920	0,0919	0,2559	0,3248	0,0011	0,0073	0,0271	0,0674	0,1200	0,2675	0,3226	1,24	1,38
25	0,0005	0,0033	0,0070	0,0183	0,0262	0,0433	0,0313	0,0008	0,0062	0,0192	0,0464	0,1011	0,2606	0,3116	0,63	1,33
26	0,0015	0,0099	0,0248	0,0684	0,0655	0,2266	0,2882	0,0013	0,0090	0,0266	0,0599	0,1036	0,2867	0,3421	1,23	1,39
27	0,0011	0,0072	0,0164	0,0322	0,0673	0,1843	0,3711	0,0010	0,0061	0,0181	0,0338	0,0627	0,1220	0,1876	1,67	1,42
28	0,0003	0,0018	0,0042	0,0070	0,0403	0,1457	0,2680	0,0003	0,0012	0,0035	0,0058	0,0152	0,0271	0,0225	1,72	0,88
29	0,0011	0,0049	0,0123	0,0266	0,0634	0,1910	0,3007	0,0006	0,0036	0,0092	0,0183	0,0419	0,0771	0,0788	1,63	1,05
30	0,0004	0,0018	0,0065	0,0179	0,0426	0,1587	0,2792	0,0001	0,0002	0,0011	0,0022	0,0042	0,0082	0,0020	1,70	0,09
31	0,0020	0,0100	0,0209	0,0417	0,0547	0,0719	0,0390	0,0017	0,0101	0,0286	0,0533	0,1270	0,2558	0,2640	0,39	1,22
32	0,0009	0,0054	0,0190	0,0596	0,0554	0,1159	0,0885	0,0007	0,0042	0,0191	0,0551	0,0967	0,2270	0,2597	0,63	1,27
33	0,0004	0,0023	0,0052	0,0112	0,0434	0,1348	0,2188	0,0002	0,0013	0,0044	0,0080	0,0170	0,0307	0,0228	1,62	0,79
34	0,0006	0,0040	0,0100	0,0226	0,0403	0,0722	0,0572	0,0008	0,0066	0,0225	0,0483	0,0925	0,1923	0,2269	0,80	1,21
35	0,0004	0,0023	0,0055	0,0139	0,0263	0,0610	0,0575	0,0004	0,0023	0,0080	0,0209	0,0517	0,1579	0,2046	1,05	1,49
36	0,0009	0,0071	0,0180	0,0382	0,0601	0,1668	0,1984	0,0006	0,0038	0,0142	0,0281	0,0600	0,1236	0,1129	1,20	1,02
37	0,0005	0,0025	0,0053	0,0095	0,0129	0,0181	0,0103	0,0005	0,0045	0,0118	0,0216	0,0483	0,1194	0,2015	0,33	1,46
38	0,0004	0,0027	0,0074	0,0172	0,0213	0,0555	0,0654	0,0003	0,0026	0,0081	0,0187	0,0438	0,1230	0,1895	1,11	1,52
39	0,0012	0,0056	0,0148	0,0314	0,0369	0,0664	0,0554	0,0015	0,0066	0,0187	0,0392	0,0687	0,1418	0,1944	0,78	1,36

Figure 46 - Evolution des 40 premières familles au cours des SELEX "F" et « F spécifique ». On peut observer dans ce tableau le pourcentage dans la banque des familles 0 à 39 (en ligne) au fur et à mesure des tours de SELEX (en colonne) dans les SELEX « F » et « F spécifique ». Plus le pourcentage de présence d'une famille dans la banque à un tour est important, plus la couleur de la cellule tend vers le rouge. Dans le cas contraire, plus le pourcentage de présence d'une famille dans la banque à un tour est faible, plus la couleur de la case tend vers le vert. Patternity-seq donne aussi les valeurs des facteurs d'évolution liés à chaque séquence pour les SELEX « F » et « F spécifique ». Ce facteur d'évolution correspond à la capacité d'une séquence à bien s'amplifier au sein de la banque au fur et à mesure des tours. Il est également indiqué pour chaque tour de SELEX le nombre total de séquences qui ont été lues. De ce nombre dépend la robustesse du calcul du pourcentage de présence de chacune des séquences.

Nous avons pu observer pour les deux SELEX que, bien que l'ordre des séquences ne soit pas exactement similaire entre les séquences les plus représentées dans la banque et les séquences ayant le meilleur facteur d'évolution, le classement restait néanmoins à peu près le même : les séquences les plus enrichies au tour n°15 étaient aussi celles ayant le meilleur facteur d'évolution (Figure 47). Nous avons pu aussi observer que les séquences ayant les facteurs d'évolution les plus élevés dans un des SELEX avaient souvent aussi un bon facteur d'évolution dans l'autre SELEX.

A.								SELEX "F"								SELEX F "spécifique"								Facteur d'évolution	
Famille	F-T09	F-T10	F-T11	F-T12	F-T13	F-T14	F-T15	Spé-T09	Spé-T10	Spé-T11	Spé-T12	Spé-T13	Spé-T14	Spé-T15	SELEX "F"	SELEX "Spé"									
3	0,0007	0,0052	0,0185	0,0401	0,1945	1,6152	8,2059	0,0011	0,0035	0,0123	0,0247	0,0517	0,1198	0,2092	2,19	1,59									
2	0,0026	0,0157	0,0405	0,0858	0,2876	2,3155	9,2285	0,0035	0,0208	0,0708	0,1477	0,4958	3,5291	13,7523	2,19	2,20									
4	0,0015	0,0134	0,0450	0,1295	0,2767	1,9711	6,5919	0,0011	0,0034	0,0157	0,0417	0,0824	0,3451	0,7580	2,13	1,88									
0	0,0049	0,0343	0,1117	0,3006	0,5597	4,6006	16,8026	0,0052	0,0327	0,1225	0,3082	0,8959	7,3224	26,0898	2,10	2,21									
6	0,0005	0,0040	0,0126	0,0303	0,1010	0,5483	1,3955	0,0003	0,0011	0,0045	0,0098	0,0206	0,0343	0,0281	1,95	0,88									
18	0,0003	0,0012	0,0031	0,0091	0,0366	0,1532	0,3777	0,0002	0,0005	0,0021	0,0051	0,0140	0,0312	0,0284	1,94	0,93									
1	0,0044	0,0313	0,0995	0,2836	0,4578	2,5902	6,7475	0,0060	0,0388	0,1738	0,5133	1,6534	8,9688	24,9138	1,93	2,15									
10	0,0005	0,0030	0,0092	0,0234	0,0541	0,2717	0,8372	0,0005	0,0021	0,0082	0,0195	0,0418	0,1714	0,4516	1,93	1,84									
9	0,0007	0,0035	0,0100	0,0259	0,0774	0,3605	0,9512	0,0005	0,0024	0,0087	0,0196	0,0445	0,0984	0,0995	1,92	1,16									
7	0,0011	0,0071	0,0202	0,0539	0,1184	0,5317	1,1990	0,0009	0,0050	0,0186	0,0448	0,0785	0,2380	0,3773	1,92	1,50									
8	0,0012	0,0069	0,0169	0,0393	0,1262	0,5346	1,0620	0,0009	0,0061	0,0181	0,0365	0,0963	0,2973	0,5245	1,90	1,61									
22	0,0003	0,0016	0,0041	0,0118	0,0299	0,1333	0,3242	0,0002	0,0007	0,0029	0,0068	0,0145	0,0455	0,0708	1,86	1,34									

B.								SELEX "F"								SELEX F "spécifique"								Facteur d'évolution	
Famille	F-T09	F-T10	F-T11	F-T12	F-T13	F-T14	F-T15	Spé-T09	Spé-T10	Spé-T11	Spé-T12	Spé-T13	Spé-T14	Spé-T15	SELEX "F"	SELEX "Spé"									
0	0,0049	0,0343	0,1117	0,3006	0,5597	4,6006	16,8026	0,0052	0,0327	0,1225	0,3082	0,8959	7,3224	26,0898	2,10	2,21									
2	0,0026	0,0157	0,0405	0,0858	0,2876	2,3155	9,2285	0,0035	0,0208	0,0708	0,1477	0,4958	3,5291	13,7523	2,19	2,20									
1	0,0044	0,0313	0,0995	0,2836	0,4578	2,5902	6,7475	0,0060	0,0388	0,1738	0,5133	1,6534	8,9688	24,9138	1,93	2,15									
4	0,0015	0,0134	0,0450	0,1295	0,2767	1,9711	6,5919	0,0011	0,0034	0,0157	0,0417	0,0824	0,3451	0,7580	2,13	1,88									
10	0,0005	0,0030	0,0092	0,0234	0,0541	0,2717	0,8372	0,0005	0,0021	0,0082	0,0195	0,0418	0,1714	0,4516	1,93	1,84									
13	0,0009	0,0048	0,0108	0,0219	0,0473	0,1314	0,1624	0,0013	0,0088	0,0258	0,0506	0,1302	0,4697	0,8136	1,30	1,75									
91	0,0005	0,0026	0,0078	0,0181	0,0230	0,0944	0,1918	0,0003	0,0023	0,0079	0,0206	0,0463	0,1980	0,3856	1,53	1,75									
14	0,0004	0,0029	0,0097	0,0290	0,0582	0,2622	0,6083	0,0002	0,0025	0,0102	0,0298	0,0556	0,1988	0,3945	1,82	1,70									
20	0,0003	0,0016	0,0043	0,0110	0,0164	0,0339	0,0297	0,0005	0,0032	0,0105	0,0244	0,0514	0,1733	0,3384	0,89	1,66									
8	0,0012	0,0069	0,0169	0,0393	0,1262	0,5346	1,0620	0,0009	0,0061	0,0181	0,0365	0,0963	0,2973	0,5245	1,90	1,61									
3	0,0007	0,0062	0,0185	0,0401	0,1945	1,6152	8,2059	0,0011	0,0035	0,0123	0,0247	0,0517	0,1198	0,2092	2,19	1,59									
11	0,0016	0,0098	0,0237	0,0499	0,1262	0,4927	0,8093	0,0016	0,0087	0,0253	0,0524	0,1021	0,3362	0,4592	1,72	1,53									

Figure 47 - Ordre des familles en fonction des facteurs d'évolution des SELEX « F » et « F-spécifique ». A - Evolution des 12 premières familles ayant les facteurs d'évolution les plus fort pour le SELEX « F ». B - Evolution des 12 premières familles ayant les facteurs d'évolution les plus fort pour le SELEX « F-spécifique ».

3) Recherche des motifs communs aux séquences s'étant enrichies au sein des banques durant les SELEX

Des essais d'alignement multiples des séquences les mieux enrichies dans les banques et les outils mis à disposition par Patternity-seq pour la recherche de structure au sein des différentes familles nous ont permis d'identifier trois motifs retrouvés très fréquemment dans la partie aléatoire des séquences des 4653 familles de l'analyses des deux SELEX (Figure 48-A).

Ces motifs sont CGCGUUUAC, AACUUAUA et CAACUUUGAAA sont présents dans respectivement 43.80%, 4.79% et 2.97% des familles. 48.4% des familles n'ont aucun de ces trois motifs. Nous n'avons identifié aucune famille n'ayant dans sa séquence plus d'un motif : les motifs n'étaient jamais présents ensembles dans la séquence d'une famille. Nous avons pu aussi remarquer que dans une certaine mesure, les séquences les mieux enrichies avaient une probabilité plus forte d'avoir un des trois motifs dans leur séquence, tandis que les séquences les moins enrichies avaient plus fréquemment aucun des trois motifs.

Nous avons aussi constaté qu'il n'existait aucune famille ayant dans sa séquence un des trois motifs mutés (Figure 48-A). Cette observation suggère que ces trois motifs sont hautement conservés.

Nous avons aussi réalisé à l'aide du logiciel Clustal, pour chaque motif, l'alignement des cent premières familles (les cent familles les plus enrichies) ayant le motif (Figure 48-B). Nous pouvons observer que ces trois motifs sont bien l'élément commun le plus important entre ces séquences, et que les parties des séquences n'appartenant pas au motif sont très différentes. Nous avons pu aussi remarquer pour le motif 1 que celui-ci était retrouvé à deux endroits différents : parfois au début de la séquence aléatoire ou parfois à la fin de celle-ci.

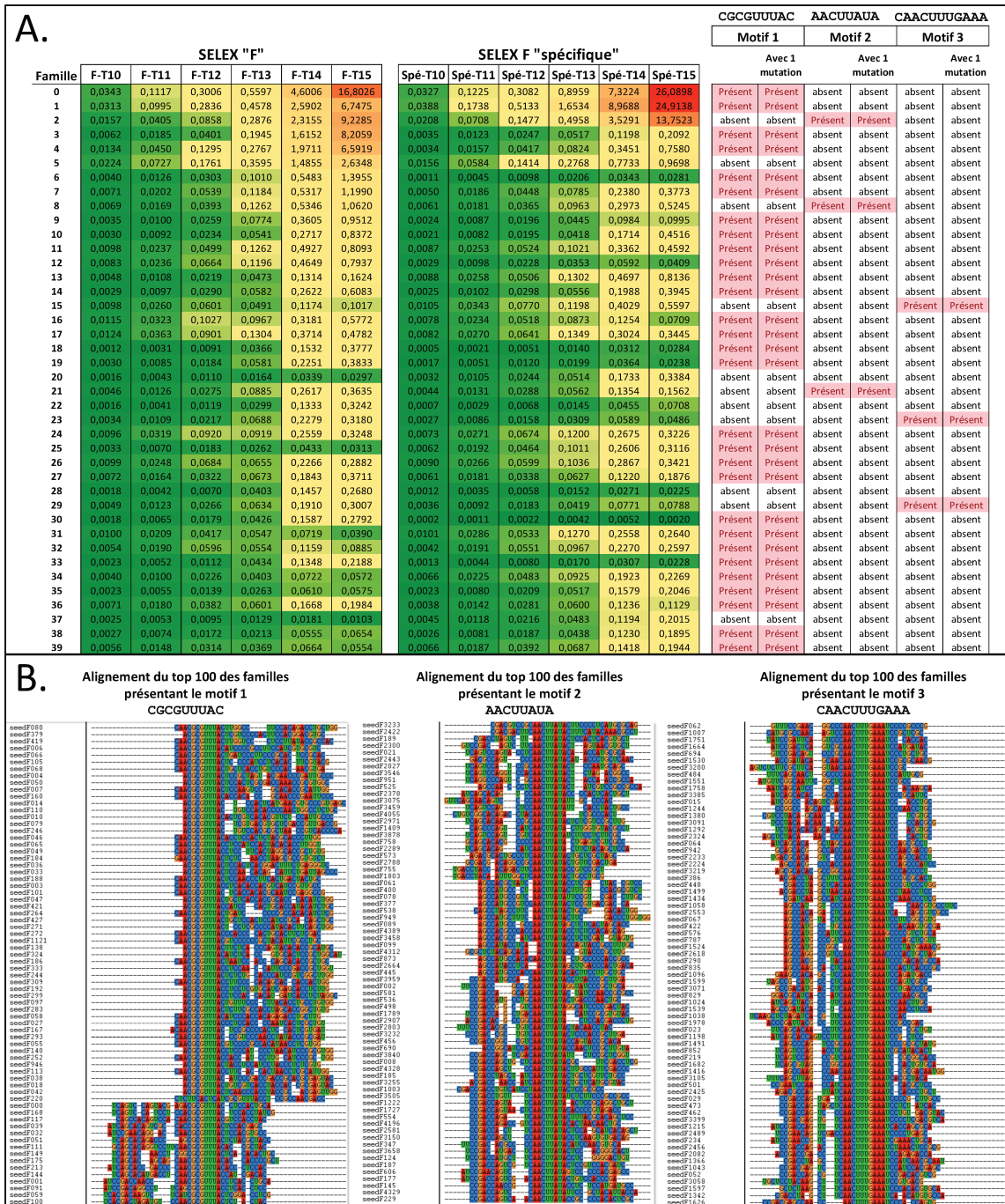


Figure 48 - Analyse de la présence des trois motifs dans la séquence des familles. A – Tableau présentant la présence des motifs pour les quarante premières familles. Dans ce tableau, nous pouvons observer pour les quarante premières familles (en ligne), leur pourcentage au sein de la banque lors des tours 10 à 15 des deux SELEX et la présence ou l’absence des motifs (avec une mutation ou non mutés) dans la séquence de la partie aléatoire des familles. B – Alignements multiples à l’aide du logiciel Clustal pour chaque motif des cent premières familles ayant ce motif.

Cependant, nous n’avons pas pu établir une corrélation entre la présence d’un motif dans une séquence et l’enrichissement de cette séquence dans l’une ou l’autre des branches. Ainsi, le motif 1 est présent à la fois dans la famille 0 et la famille 6. La famille 0 s’est très bien enrichie dans les deux SELEX : elle est présente dans les banques à 16.80% au tour 15 du SELEX

« F » et à 26.09% au tour 15 du SELEX « F-spécifique », ce qui sont des enrichissements relativement comparables. Au contraire, la famille 6 s'est enrichie préférentiellement dans le SELEX « F » : elle est présente à 1.39% au tour 15 du SELEX « F » et à 0.0281 % au tour 15 du SELEX « F-spécifique », ce qui représente une différence d'un facteur 20 assez importante.

4) Choix des candidats à tester en binding

Nous avons choisi les candidats à tester selon deux stratégies différentes, en prenant soin de choisir des représentants de chacun des trois motifs ainsi que des candidats sans motifs (Tableau 10).

La première stratégie consistait à choisir des candidats en fonction de leur enrichissement, nous avons recherché des familles étant présentes à un pourcentage important, et ayant un facteur d'évolution parmi les plus élevés soit dans un SELEX soit dans les deux. Nous avons retenu selon ce critère les familles 0, 1, 2, 3, 4, 5, 15 et 20. Tous ces candidats sont parmi les plus enrichis au sein des SELEX et ont des facteurs d'évolution parmi les plus élevés. Les familles 0, 1, 3 et 4 ont le motif 1 dans leur séquence, la famille 2 le motif 2 et la famille 15 le motif 3. Les familles 5 et 20 n'ont aucun des trois motifs.

Famille	Pourcentage au 15ème tour		Facteur d'évolution		Motif 1 CGCGUUUAC	Motif 2 AACUUUAU	Motif 3 CAACUUUGAAA	Sans Motif	
	Pour le SELEX "F"	Pour le SELEX "F spécifique"	Pour le SELEX "F"	Pour le SELEX "F spécifique"					
0	16,803%	26,090%	2,104	2,206	Présent	absent	absent	absent	Séquences choisies en fonction de leur enrichissement
1	6,748%	24,914%	1,931	2,151	Présent	absent	absent	absent	
2	9,228%	13,752%	2,189	2,196	absent	Présent	absent	absent	
3	8,206%	0,209%	2,192	1,589	Présent	absent	absent	absent	
4	6,592%	0,758%	2,126	1,881	Présent	absent	absent	absent	
5	2,635%	0,970%	1,772	1,486	absent	absent	absent	Présent	
15	0,102%	0,560%	0,742	1,502	absent	absent	Présent	absent	
20	0,030%	0,338%	0,889	1,664	absent	absent	absent	Présent	
30	0,279%	0,002%	1,702	0,086	Présent	absent	absent	absent	Séquences choisies en fonction de leur enrichissement spécifique
37	0,010%	0,202%	0,327	1,462	absent	absent	absent	Présent	
62	0,014%	0,081%	0,371	1,072	absent	absent	Présent	absent	
73	0,061%	0,001%	1,216	-0,269	absent	absent	absent	Présent	
124	0,036%	0,000%	1,104	0,000	absent	Présent	absent	absent	
164	0,002%	0,024%	-0,196	1,050	absent	absent	absent	Présent	

Tableau 10 - Tableau récapitulatif des choix des 14 familles candidates choisies. Ce tableau présente les familles candidates choisies. Pour chacun d'elle est indiqué leur pourcentage au 15^{ème} tour des SELEX « F » et « F-spécifique », leur facteur d'évolution pour chacun des SELEX et la présence ou non de chacun des motifs. Ces familles ont été choisies en fonction de deux objectifs différents : identifier les séquences les mieux enrichies ou celles ayant le meilleur enrichissement spécifique dans l'un ou l'autre des SELEX.

La deuxième stratégie consistait à choisir des candidats en fonction de leur enrichissement spécifique, nous avons recherché des familles étant enrichies de manière importante et ayant un facteur d'évolution élevé dans l'un des deux SELEX mais pas dans l'autre. Nous avons retenu selon ce critère les familles 30, 37, 62, 73, 124 et 164. Les candidats 30, 73 et 124 étaient les familles les plus enrichies ayant un facteur d'évolution élevé dans le SELEX « F » et un facteur d'évolution faible (proche de 0 ou négatif) dans le SELEX « F spécifique ». Ces résultats suggéraient que ces candidats n'étaient pas spécifiques des fibres F, mais pourraient avoir une affinité élevée pour les fibres d' α -syn. Les candidats 37, 62 et 164 au

contraire étaient les familles les plus enrichies ayant un facteur d'évolution élevé dans le SELEX « F spécifique » et un facteur d'évolution faible (proche de 0 ou négatif) dans le SELEX « F ». Ces résultats suggéraient que ces candidats pourraient reconnaître de manière très spécifique la fibre F par apport à la fibre R, mais avec une affinité a priori moins forte que les séquences non-spécifique. La famille 30 a le motif 1 dans sa séquence, la famille 124 le motif 2 et la famille 62 le motif 3. Les familles 37, 73 et 164 n'ont aucun des trois motifs.

Pour chacune des familles nous avons décidé de choisir de tester la séquence « seed ». Le Tableau 11 présente les séquences des candidats retenus.

N0	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATCAGTCCAGTACGAGACGCGTTTACCTCCACTGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N1	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAATCCGACCAACCCAACGCGTTTACCTCACCTGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N2	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATTCGGACCCGCCAACTTATAGGTATCCCGCTGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N3	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGACAACGCGTTTACCTCACACCACGTCATCCGTTGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N4	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAACGCGTTTACTCCGCTAGTACGAACCCGATTGCCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N5	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAAGCCATGCTGTCAACTTTTTAACTCGTCACCGCTCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N15	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAATCGGCCACAGTCGACAACTTTGAATCCACCTGCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N20	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAGCAGCACATGACCTCACCTTTTACTCTGCGCTGCAAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N30	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATCGATCCACGTCGGACAACGCGTTTACTCGCCATCAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N37	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATCAGTCCAGCACCAACGCGCTTTGCTCTCGACTACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N62	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAGTTTCCGAACGGCCCAACTTTGAAATCCCCGCCGAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N73	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGACAACCTTGAATCCCAACCTGCAGCCGTGTCTGGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N124	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATCCGACCATGCTTCAACTTATACCTCGGGGACTGTAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
N164	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGAGTTTCCGACCACGACCCAACGTTACTGCCACCACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG
Scr-2	GGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGATTCAACACCGTTTGACGTTCTTGGTATCGGAAGACAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGG

Tableau 11 -Séquences des candidats aptamères choisis après analyse de SELEX "F" et "F-spécifique". Les parties aléatoires des séquences sont indiquées en bleues, et les parties constantes correspondant aux sites des amorces, en noires.

Bilan : Nous avons réalisé l'analyse des tours 9 à 15 des SELEX « F » et « F spécifique ». Les deux SELEX présentaient des séquences suffisamment enrichies. Ceci nous a permis de choisir plusieurs candidats pour lesquels l'affinité contre les fibres d' α -syn sera évalué.

Bien que les deux SELEX n'aient que le premier tour de sélection en commun, les mêmes séquences se sont amplifiées au cours des deux SELEX, mais à des degrés différents. Cette observation nous a paru logique puisque les deux SELEX avaient des cibles de sélection relativement similaires.

Nous avons pu observer qu'au sein de ces familles trois motifs étaient retrouvés de manière très fréquente dans les séquences (dans environ 50% des familles). Cependant nous n'avons pas trouvé de lien entre la présence d'un motif dans la séquence d'une des familles et l'enrichissement de la famille dans l'un ou l'autre des SELEX.

Nous avons pu choisir 14 candidats pour lesquels nous souhaitons évaluer l'affinité pour les différentes fibres et les monomères d' α -syn. Nous avons choisi les candidats de manière à avoir des séquences s'étant bien enrichies dans les deux SELEX ou dans l'un des SELEX. Nous avons aussi fait attention à avoir chacun des trois motifs dans les séquences des familles testées.

C. Criblage des candidats aptamères radiomarqués

1) Mise au point d'une nouvelle méthode de marquage des oligonucléotides ARN2'F : Hybridation avec un oligonucléotide ADN marqué.

a) Conception de la nouvelle méthode de marquage par hybridation

Habituellement nous marquons radioactivement l'extrémité 5' des oligonucléotides avec du P³², à l'aide d'une kinase. Néanmoins, bien que les mêmes conditions soient utilisées pour chacun des oligonucléotides, l'incorporation de P³² était plus ou moins efficace. Ceci nous obligeait à ajouter une correction lors de l'analyse des résultats pour tenir compte du niveau de radioactivité de chaque oligonucléotide.

Nous avons conçu et validé une nouvelle méthode de marquage des oligonucléotides permettant de résoudre ce problème. Dans cette nouvelle méthode nous avons produit nos candidats allongés de 24 bases à leur extrémité 3' en utilisant une amorce PiRT modifiée, appelée PiRT-G (Figure 49-A et B). Lorsque les candidats sont ainsi allongés, nous les appelons alors oligo-G. Ce fragment supplémentaire peut être hybridé à une séquence ADN appelée Spacer-G (Figure 49-C).

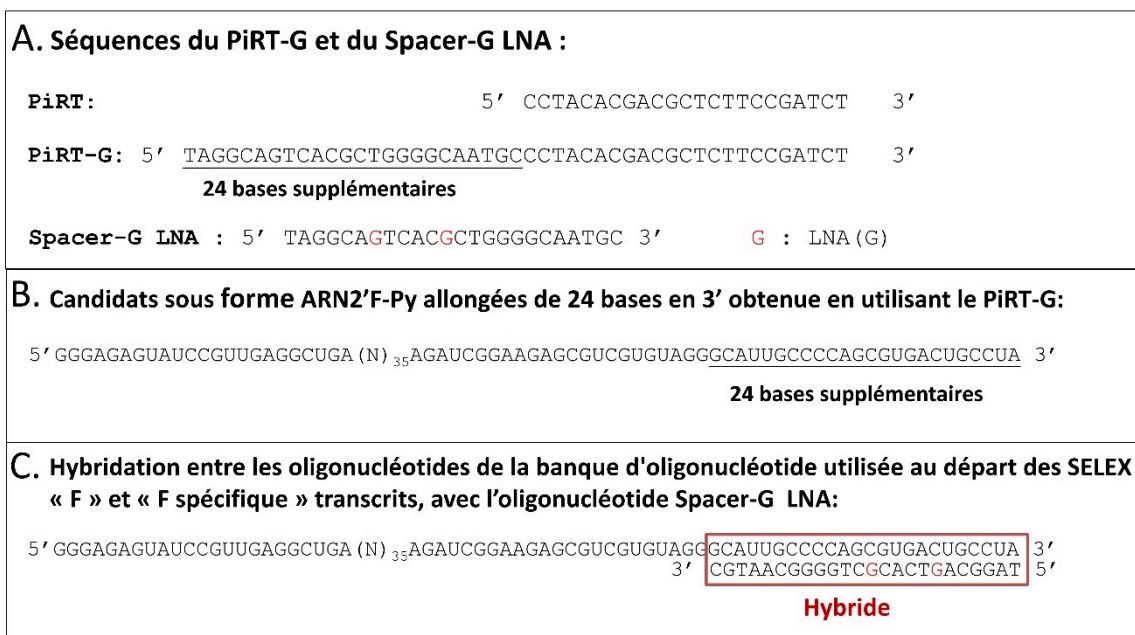


Figure 49 – Nouvelle méthode de marquage des séquences issues de la banque utilisée pour les SELEX par hybridation. A – Séquences du PiRT-G et du Spacer-G LNA. B – Séquences obtenues en utilisant le PiRT-G pour la production des séquences sous forme ARN2'F. les oligonucléotides ont alors une longueur totale de 105 bases. C – Schéma de l'hybridation entre les oligonucléotides de la banque d'oligonucléotide utilisée au départ des SELEX « F » et « F spécifique » transcrite avec l'oligonucléotide Spacer-G.

Notre nouvelle méthode consistait à marquer radioactivement un lot de Spacer-G avant de le mélanger aux différentes séquences candidates afin que les deux séquences s'associent

par hybridation. Ainsi, la même quantité de Spacer-G marqué étant associé aux oligonucléotides, l'intensité du signal radioactif émis est alors le même pour toutes les séquences. Pour renforcer l'hybridation entre le Spacer-G et les oligonucléotides, nous avons introduit dans la séquence du Spacer-G des acides nucléiques dit « bloqués » appelés LNA (de l'anglais locked nucleic acid). Ce Spacer-G modifié a été utilisé sous le nom de Spacer-G LNA (SpG-LNA) (Figure 49-A). L'allongement de la séquence en 3' et l'hybridation au SpG-LNA a peu de risque de perturber la structure des candidats aptamères, et donc ne porterait pas à priori préjudice à leur liaison aux fibres d' α -syn.

b) Validation de la solidité des hybrides

Nous avons ensuite validé la formation des hybrides par migration sur gel d'agarose non dénaturant. Pour cela nous avons produit par PCR en utilisant le PiRT-G, les 14 séquences candidates issues des SELEX « F » et « F spécifique ». Nous avons aussi produit de la même manière les 10 séquences candidates issues des SELEX « R » et « 4F », ainsi que les 4 séquences issues des essais de sélection branchées multiples. Ceci nous permettrait de comparer les affinités et les spécificités de nos nouveaux candidats avec les anciens. Les différentes séquences ont ensuite été mélangées au SpG-LNA non marqué radioactivement, et un choc thermique a été réalisé afin de garantir une hybridation optimale entre les séquences. Afin d'être certain de ne pas avoir de SpG-LNA non associé à une séquence, celui-ci a été mélangé en quantité molaire légèrement inférieure aux séquences (de l'ordre du 0.8 pour 1).

Les résultats de migration des différents hybrides sont présentés Figure 50. Certains des puits nous permettent d'observer les résultats des migrations du SpG-LNA seul (comme le 4^{ème} puit du 1^{er} gel), ou des séquences candidates seules (comme le 5^{ème} puit du 1^{er} gel). Nous avons pu observer que la bande du SpG-LNA est plus fine et bien plus basse que celle des oligo-G, car il est de plus petite taille. Lorsque les candidats ont été hybridés avec un SpG-LNA, une bande légèrement plus haute que celle des candidats seuls peut-être observée, et qui correspond à l'hybride formé entre les oligonucléotides et les candidats. Le fait que la bande correspondante à l'hybride soit légèrement plus haute est logique puisque le poids moléculaire de l'hybride est supérieur aux candidats seuls. Nous avons aussi pu remarquer que la bande correspondante aux hybrides est plus brillante que celle correspondante à la séquence seule : ceci s'explique par le fait que les fluorophores utilisés pour révéler les bandes d'oligonucléotides s'intercalent mieux au niveau des doubles hélices formées au niveau de la zone d'hybridation, et génèrent donc un signal plus fort. On peut aussi observer que la bande à la hauteur du SpG LNA est absente, ce qui signifie que l'intégralité du SpG LNA est hybridé, ce qui était ce que nous souhaitions. De la même manière, nous pouvons voir qu'il reste une bande très légère à la même hauteur que les séquences non hybridées, ce qui signifie que certains oligonucléotides ne sont pas hybridés à un SpG LNA. Ceci n'est pas gênant pour les futures mesures d'affinité des séquences : même si certains candidats ne sont pas associés à un SpG LNA marqué radioactivement, on mesure l'affinité globale du groupe de séquence.

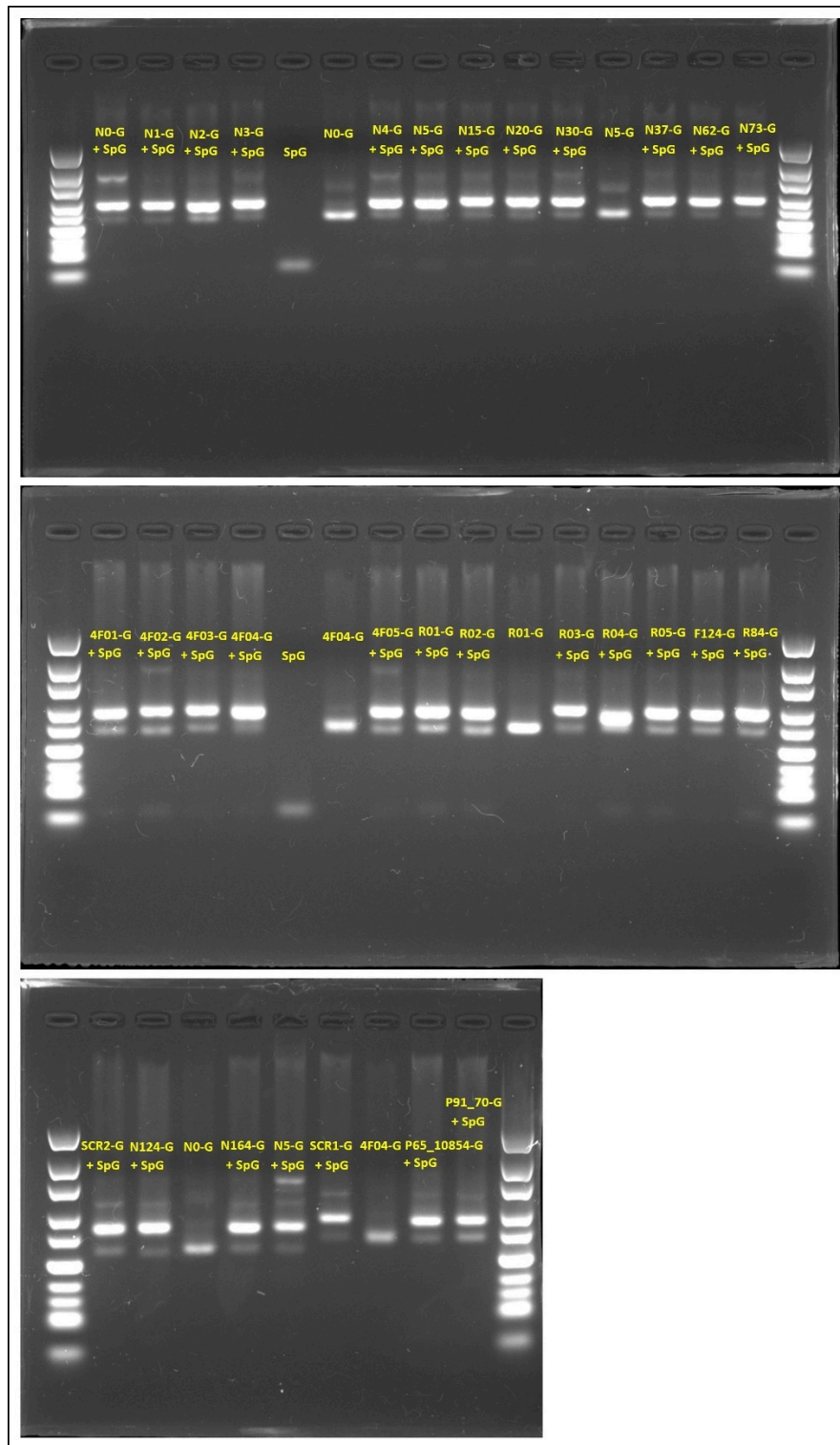


Figure 50 – Vérification de l’hybridation du SpG – LNA avec les candidats aptamères. Chacun des candidats est mélangé à 1 μ M avec le SpG-LNA (nommé SpG sur la figure) à 0.8 μ M. Le mélange est alors soumis à un choc thermique (3 min à 85°C, 3 min dans la glace, 3 min à 37°C) favorisant l’hybridation. Le mélange est alors déposé sur gel d’agarose 3% non dénaturant pour une migration. Certains des puits des gels ont été chargés seulement avec le SpG-LNA ou bien avec l’un des candidats afin de servir de témoin négatif. Les puits aux extrémités du gel d’agarose ont été chargés avec un ladder (SM 1213) afin de pouvoir évaluer le poids moléculaire des oligonucléotides.

2) Premier criblage de l'affinité des candidats sur colonne d'exclusion stérique

Suite à l'optimisation de notre marquage radioactif, nous avons réalisé un premier criblage de l'affinité des candidats pour la fibre F d' α -syn en utilisant, comme pour les SELEX, les colonnes Sp6 comme outil de séparation. Les candidats aptamères issus des SELEX « F » et « F-spécifique », ainsi qu'un oligonucléotide aléatoire (scramble Scr2-G) servant de contrôle négatif ont été hybridés avec un SpG-LNA préalablement radiomarqué avec du P³². Après incubation avec les fibres d' α -syn F, les mélanges ont été déposés dans les colonnes Sp6. La radioactivité des différentes éluions de la colonnes a ensuite été mesurée : 1-la première éluion de la colonne après le dépôt du mélange oligonucléotide/Fibre F, 2- l'éluion de deux lavages successifs au Ts1X de la colonne et enfin l'éluion de la colonne par du SDS 2% qui permet, en dépolymérisant les fibres F de récupérer les oligonucléotides étant resté liés aux fibres F.

Nous avons pu observer pour ce premier test que tous les oligonucléotides (candidats aptamères et scr-2) avaient un comportement similaire. Entre 50 et 60% des oligonucléotides déposés sur chacune des colonnes étaient élués lors de la première éluion, 5 à 10% lors des lavages au Ts1X et enfin 20 à 40 % étaient élués lors du lavage au SDS 2% de la colonne (Figure 51). Nous avons observé que les mesures obtenues avec les candidats aptamères étaient similaires à celles obtenues avec le témoin négatif (Scr2-G). Cela suggère que la liaison des oligonucléotide observée est majoritairement de type non-spécifique. On a pu cependant constater que certains candidats étaient plus retenus dans la colonne que d'autres. Ainsi, 38.1% et 41.7% de respectivement N3-G de N124-G ont été élués de la colonne lors l'éluion en SDS 2%, contre 30.7% de Scr2-G. Ces résultats suggèrent que potentiellement certains candidats pourraient avoir une affinité pour les fibres F d' α -syn supérieure aux autres.

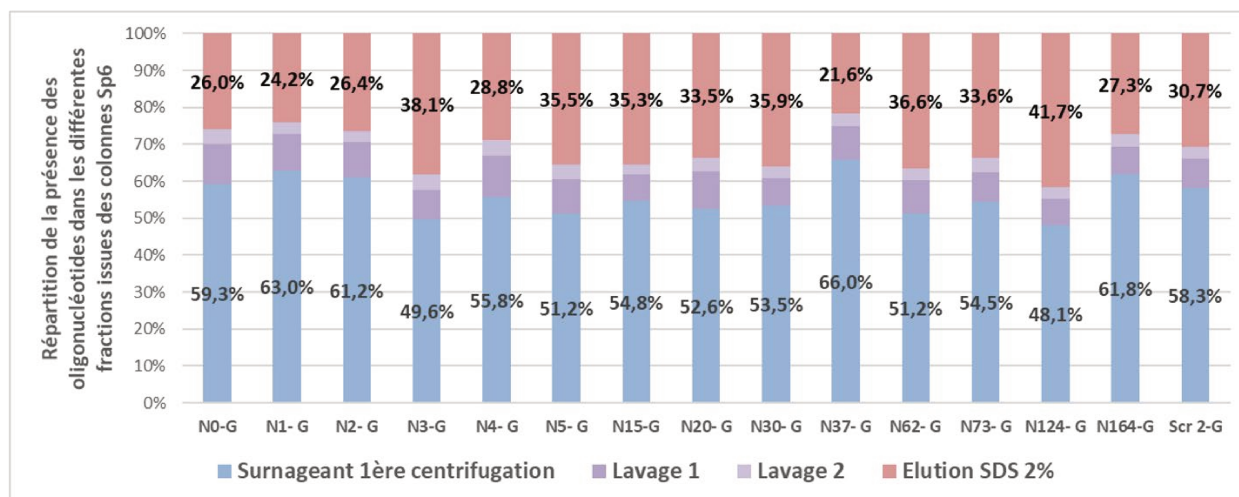


Figure 51- Test d'affinité par filtration sur colonne Sp6 des 14 candidats aptamères et de leur scramble associé contre la fibre F d' α -syn. Ce graphique présente pour chaque candidat leur répartition dans les différentes fractions issues des colonnes Sp6. Les différents candidats allongés côté 3' ont été hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P³². Ils ont été incubés à 10 nM à 37°C en Ts1X avec des fibres F à 1 μ M. Les mélanges ont été ensuite déposés sur colonne Sp6. Les différentes éluions successives ont été récupérées, et la radioactivité présente dans ces différentes fractions a été comptée.

3) Mise au point d'une méthode de mesure d'affinité sur nitrocellulose

Les mesures d'affinité sur colonne Sp6 ne permettent la mesure que d'un seul point par colonne. Ce dispositif est donc peu économe et trop lourd, sachant que nous souhaitons mesurer l'affinité d'une trentaine de candidats (14 candidats issus des SELEX « F » et « F spécifique », 10 candidats issus des SELEX « R » et « 4F » et 4 candidats issus des essais de sélection branchée multiple) contre les différentes conformations de fibre d' α -syn. Nous avons donc décidé de mettre au point une mesure de l'affinité des séquences par filtration sur nitrocellulose.

a) Mise au point des compétiteurs

Nous avons, dans un premier temps, mis au point les conditions dans lesquels les tests de liaison allaient être réalisés. Les premiers résultats des tests nous ont montré (Figure 51) qu'il y avait une forte interaction de type non-spécifique entre les fibres et la séquence contrôle Scr2-G. Par conséquent, nous avons testé l'utilisation de compétiteurs pour essayer de diminuer cette interaction non-spécifique. Trois compétiteurs ont été évalués : l'ADNss (en anglais single stranded DNA), l'ARNt et le polyInosine.

Nous avons comparé par filtration sur nitrocellulose, l'affinité du N3-G et du Scr2-G pour la fibre F à 1 μ M en présence de différents compétiteurs (Figure 52). Nous avons choisi ce candidat car il présentait une affinité légèrement supérieure au Scr-2-G pour les fibres F (cf. Figure 51) Nous avons observé Figure 52-A que la différence entre la quantité retenue de N3-G et de séquence aléatoire est très faible en l'absence de compétiteur. Nous avons pu observer que l'ajout d'ARNt diminue un peu la quantité des deux oligonucléotides retenue sur la membrane. Dans le cas de l'ajout d'ADNss ou de PolyInosine la quantité de deux oligonucléotides retenus sur la membrane est très fortement diminuée, d'un facteur allant de 4 à 6 pour l'ADNss et 6 à 10 pour le PolyInosine. La liaison du N3-G aux fibres semble donc faire majoritairement intervenir des liaisons de type non-spécifique que les compétiteurs arrivaient à éliminer à différents degrés. Nous avons pu néanmoins observer Figure 52-B que l'ajout d'ADNss et de PolyInosine permet d'augmenter le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de scramble Scr2-G resté liée sur la membrane. Ainsi le N3-G, qui se fixait de la même manière que le Scr2-G sans compétiteur, se fixe respectivement 1.7 et 1.8 fois plus que le Scr-2-G lorsque de l'ADNss ou du PolyInosine est ajouté.

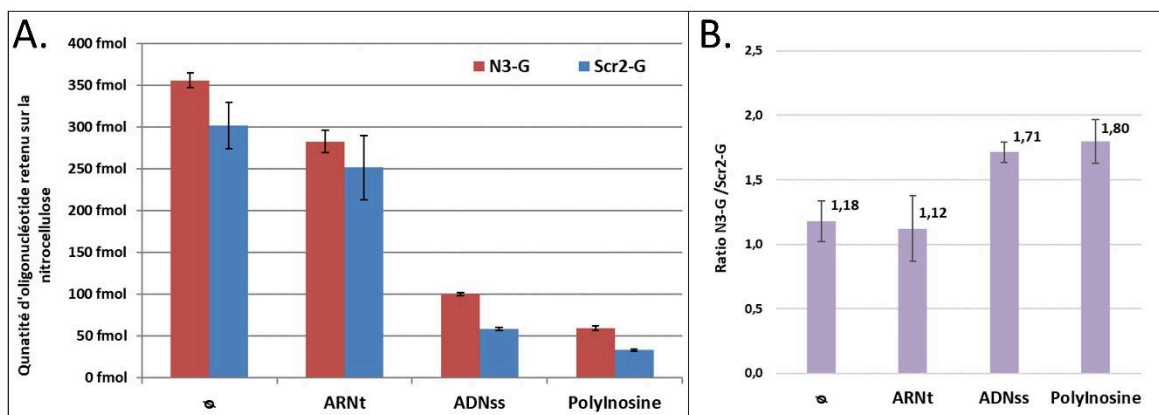


Figure 52 – Test de différents compétiteurs pour la mesure d'affinité sur nitrocellulose.

Le N3-G et le Scr2-G à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P³²) ont été présentés aux fibres F d'α-syn à 1 μM en Ts1X. Dans certains des mélanges des compétiteurs non spécifiques ont été ajoutés en proportion 10-1 par rapport aux oligonucléotides, c'est-à-dire à hauteur de 3.5 μg/ml. Après 30 min d'incubation à 37°C, 50 μL de chaque mélange est déposé en duplicat sur la membrane nitrocellulose puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite effectués. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose après un lavage, sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. A – Comparaison des quantités restantes sur la nitrocellulose du candidat N3-G et de la séquence aléatoire Scr2-G. B - Graphique présentant le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de scramble Scr2-G restée liée sur la membrane pour la même condition.

Nous avons choisi pour la suite des tests d'affinités d'ajouter de l'ADNss comme compétiteur non spécifique. Ce compétiteur était entre les deux compétiteurs (ADNss et Polyinosine) ayant permis d'accroître le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de scramble Scr2-G, celui qui diminuait le moins la quantité de N3-G sur la membrane.

b) Mise au point des détergents

Pour continuer la suite des tests d'affinités des candidats, nous avons changé de support pour l'incubation des mélanges oligonucléotides/protéine. Nous avons réalisé jusqu'à présent l'incubation des mélanges dans des tubes « protein LoBind » de marque Eppendorf. Nos nouveaux tests ont été réalisés en incubant les mélanges dans des plaques PCR de 96 puits de marque Eppendorf (Eppendorf twin.tec PCR plate 96 – Référence 0030133382) ce qui nous permettait d'utiliser une pipette multi-canaux et d'aller plus vite. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus étaient très différents, les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose étant beaucoup plus faibles (données non montrées). Nous avons fait l'hypothèse que ces résultats pouvaient être dus une fois de plus à une fixation non-spécifique des protéines sur le plastique des plaques PCR. Une solution communément utilisée pour résoudre ce type de problème est l'addition de détergent dans les solutions (comme le Tween 20, Igepal CA-630, le TritonX-100 etc.), qui permettent de réduire les interactions non-spécifiques et de bloquer les surfaces plastiques (Hakami et al., 2015).

Nous avons testé deux détergents, le Tween 20 et l'Igepal CA-630 (moléculairement indistinguable du Nonidet 40), afin de voir si leur addition dans le mélange oligonucléotide/Fibre d' α -syn lors de l'incubation dans la plaque 96 puits permettrait de retrouver les résultats d'affinité que nous avons pu observer lorsque les incubations étaient faites dans des tubes LoBind eppendorf (cf. Figure 52). Nous avons testé différentes concentrations d'Igepal dans le mélange d'incubation : 0.2, 0.1 et 0.05%. Nous avons aussi testé de nouveau l'addition d'ADNss, afin d'observer si la présence des détergents permettait toujours aux compétiteurs d'accroître la différence de quantité d'oligonucléotide retenue entre le N3-G et le Scr2-G.

Nous avons pu observer qu'environ 5 fois plus d'oligonucléotide étaient quantifiés sur la nitrocellulose lorsque le mélange candidat-fibre était réalisé dans un tube « protein LoBind » Eppendorf par rapport à une incubation en plaque PCR (Figure 53-A). Ainsi, respectivement 7 et 4 fmoles de N3-G et de Scr2-G étaient retenues sur la nitrocellulose lorsque l'incubation était réalisée en plaque PCR et sans compétiteur, contre 30 et 20 fmoles lorsque l'incubation était réalisée en tube « protein LoBind ».

Nous avons pu observer que l'ajout de Tween 20 ou d'Igepal, quelle que soit la concentration testée, permet une augmentation très significative (d'un facteur de presque 10) de la quantité d'oligonucléotide retenue sur la membrane (Figure 53-A). Ainsi, en présence de détergent mais sans addition d'ADNss, entre 50 et 60 fmoles de N3-G et entre 20 et 30 fmoles de Scr2-G sont retenues sur la nitrocellulose. Il a été étonnant d'observer que la quantité d'oligonucléotide retenue sur la nitrocellulose était supérieure lorsque l'incubation était réalisée en présence de détergent en plaque PCR, par rapport à l'incubation réalisée en tube protein LoBind. Cette différence pouvait être d'un facteur presque 2 lorsque le N3-G est incubé avec la fibre F sans compétiteur, ou plutôt proche de 1.5 pour le Scr2-G.

Ainsi que précédemment observée (cf. Figure 52), l'addition de compétiteur ADNss baisse la quantité d'oligonucléotide retenu sur la nitrocellulose, (Figure 53-A). Lorsqu'un détergent est présent, cette baisse est d'un facteur presque 2 : on passe de 60 à 30 fmoles d'oligonucléotide retenues sur la nitrocellulose pour le N3-G et de 30 à 10 pour le Scr2-G. De nouveau comme précédemment observé, l'ajout de compétiteur permet d'augmenter le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de Scr2-G restée liée pour la même condition (Figure 53-B). Le ratio était proche de deux lorsque les oligonucléotides étaient incubés sans compétiteur quelle que soit les conditions, il passe entre 3 et 4 selon les conditions lorsque l'ADNss est ajoutée dans le mélange d'incubation.

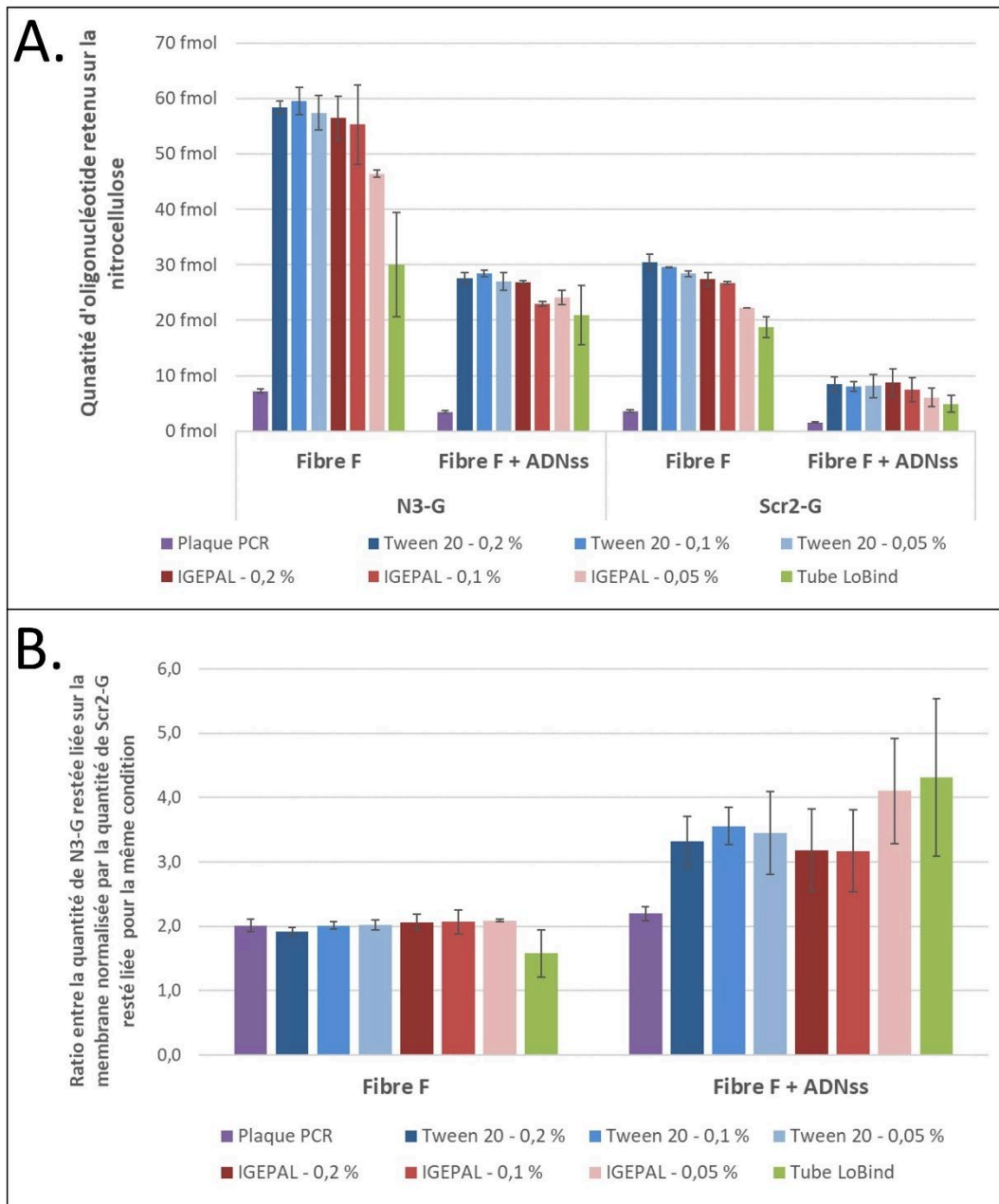


Figure 53 - Test de différents détergents à différentes concentrations pour éliminer l'adsorption non spécifique dans les plaques 96 puits utilisées lors de l'incubation pour les tests d'affinité sur nitrocellulose. Le N3-G et le Scr2-G à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P³²) ont été présentés aux fibres F d' α -syn à 1 μ M en Ts1X. Dans certains des mélanges des compétiteurs non spécifiques ont été ajoutés en proportion 10-3 par rapport aux oligonucléotides, c'est-à-dire à hauteur de 1.15 μ g/ml. Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange sont déposés en duplicat sur la membrane nitrocellulose puis filtrés. Deux lavages au Ts1X sont ensuite effectués. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. A – Comparaison des quantités restantes sur la nitrocellulose du candidat N3-G et de la séquence aléatoire Scr2-G, selon les conditions. B - Graphique présentant le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de scramble Scr2-G resté liée sur la membrane pour la même condition.

Nous avons donc choisi pour la suite des tests d'affinité d'ajouter dans le mélange oligonucléotide/protéine lors de l'incubation 0.1% d'Igepal et du ssDNA. La présence de l'igepal permet de réduire l'adsorption non spécifique des molécules sur le plastique de la plaque PCR utilisée pour l'incubation et l'ADNss permet de réduire les liaisons de type non-spécifique entre les oligonucléotides et les fibres d' α -syn.

c) Vérification de la liaison des protéines sur la nitrocellulose par Western Blot

En ajoutant au mélange oligonucléotide/protéine le détergeant Igepal CA-630 à 0.1%, nous nous trouvons à une concentration de 1.7 mM, c'est-à-dire au-dessus de sa CMC (concentration micellaire critique) qui est de 0.08 mM. La CMC correspond à la concentration au-dessus de laquelle un tensioactif commence à former des micelles sphériques au sein de la solution dans laquelle il se trouve. Il est usuellement recommandé d'utiliser les détergents en dessous de leur CMC et à une concentration maximale de 0.05% (Hildebrandt et al., 2014). Lorsque ces détergents sont utilisés à de trop forte concentration, ils peuvent inhiber la liaison des protéines à la membrane nitrocellulose.

Nous avons donc souhaité vérifier la présence des protéines sur la membrane nitrocellulose. Pour cela nous avons réalisé une révélation au western blot des protéines restées fixées sur une membrane nitrocellulose sur laquelle avait été déposée des monomères et des fibres F et R d' α -syn. Certains points ont été déposés directement, sans filtration, afin de pouvoir évaluer par comparaison le degré de perte des protéines α -syn lors de la filtration de la nitrocellulose.

Nous avons pu observer, Figure 54, que les signaux émis par les différentes conformations étaient inégaux : lorsqu'est réalisé un dépôt direct des protéines non mélangées avec l'Igepal et l'ADNss sur la nitrocellulose, le signal observé pour les monomères est de l'ordre de 100 000 u.a (unités arbitraire), tandis qu'il est aux alentours de 50 000 u.a pour la fibre R et de 30 000 u.a pour la fibre F. Ceci peut être dû à des différences de sensibilité dans la reconnaissance des différentes conformations de la protéine α -syn par l'anticorps Syn-1 utilisé lors du Western blot, ou bien à des différences de concentration des solutions de protéine déposées sur la nitrocellulose. Cette deuxième possibilité peut être envisagée seulement si les solutions initiales ont des concentrations différentes de celles indiquées, puisque toutes les solutions de protéine ont été diluées à partir des solutions initiales de la même manière. Il nous est néanmoins apparu que ces différences ne sont pas importantes pour la suite de l'analyse, car nous cherchons à analyser le ratio de fixation des candidats aux protéines par rapport à celui des séquences aléatoires.

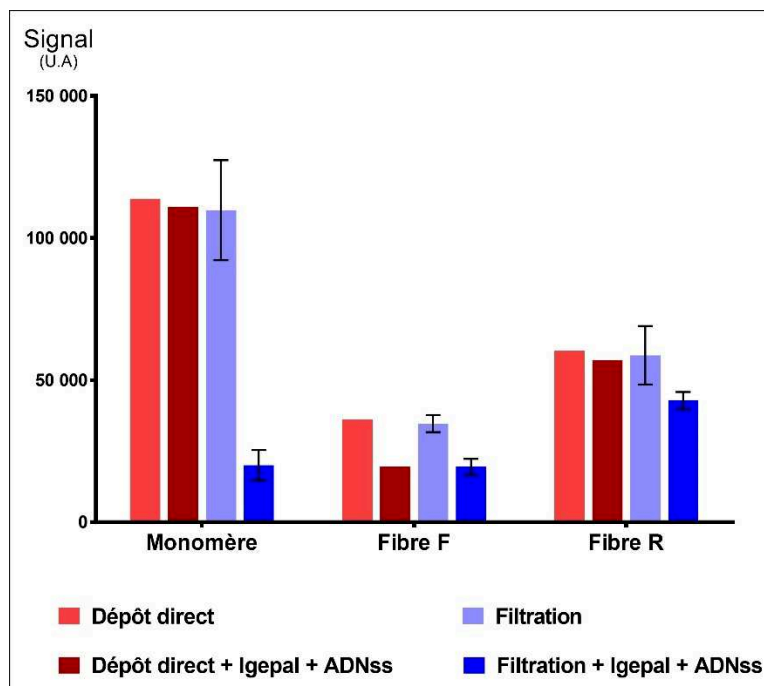


Figure 54 – Comparaison des signaux détectant la présence des protéines sur la membrane nitrocellulose par western blot. A chaque point 25 pmoles de protéine α -syn en Ts1X (sous différente conformation) a été déposé. Pour certains d’entre eux 0.1% d’Igepal ainsi que de l’ADNss à 3.5 μ g/ml ont été ajoutés. Certains points ont été déposés directement sur la membrane nitrocellulose. D’autres ont été déposés puis ont subi une filtration suivie de 2 lavages au Ts1X (ces points ont été réalisés en triplicat). L’anticorps Syn-1 a ensuite été utilisé pour une révélation par Western blot des protéines α -syn retenues sur la nitrocellulose.

Nous avons pu observer que les signaux des dépôts directs avec et sans ajout d’Igepal et d’ADNss étaient équivalents pour les monomères et des fibres R. Néanmoins, dans le cas de la fibre F, le signal du dépôt direct en présence d’Igepal et d’ADNss était plus faible que celui du dépôt direct simple. Ceci peut être dû à des erreurs de pipetage lors de la préparation des solutions déposées, ou bien dû à un décrochage des protéines F dû à la présence de l’Igepal et de l’ADNss lors des bains réalisés lors du Western Blot. Cette deuxième hypothèse étant moins probable puisque cela signifierait que seules les fibres F, et pas les fibres R ni les monomères se décrocheraient de la nitrocellulose lors des bains de Western blot lorsqu’elles ont été déposées avec de l’Igepal et de l’ADNss.

Pour les trois conformations de protéine α -syn testées, lorsque les protéines étaient déposées sans ajout d’Igepal ni d’ADNss, nous n’avons pas pu observer de différence entre les signaux des dépôts directs et ceux des dépôts ayant été filtrés. Ceci signifie donc que sans ajout d’Igepal et d’ADNss dans le mélange des protéines, les protéines restent très bien fixées sur la membrane lors de la filtration.

Cependant, lorsque les protéines déposées avec de l’Igepal et de l’ADNss sont filtrées les résultats sont différents.

- Pour la fibre F, il n'y a pas de différence entre le signal du dépôt direct et ceux des dépôts ayant été filtrés. Ceci signifie donc que la présence de l'Igepal et de l'ADNss ne change pas l'accroche des protéines à la nitrocellulose lors de la filtration.
- Pour la fibre R, on peut observer une baisse légère, de l'ordre de 20% entre les signaux des dépôts ayant été filtrés par rapport à ceux ne l'ayant pas été. La présence de l'igepal et de l'ADNss diminue donc légèrement l'accroche des fibres R à la nitrocellulose lors de la filtration. Ceci n'est cependant pas très préjudiciable pour la suite des mesures d'affinités car cette diminution est légère et nous permettra donc de mesurer l'affinité des candidats pour la fibre R, mêmes si les mesures des K_d et B_{max} seront alors faussées de 20%.
- Concernant les monomères, nous avons pu observer qu'il y avait une perte de 80% lors de la filtration lorsque les monomères d' α -syn étaient mélangés à l'Igepal et l'ADNss. Les monomères resteront donc après la filtration en quantité très faible sur la nitrocellulose, faussant grandement les résultats d'affinité mesurés. Il est probable que l'Igepal doit porter préjudice à la liaison des monomères sur la nitrocellulose, et qu'ils ne sont alors plus retenus lors de la filtration.

En conclusion, nous pouvons dire que la présence d'Igepal et d'ADNss permet la mesure de l'affinité des candidats aptamères par filtration sur nitrocellulose pour les fibres F et R d' α -syn. Cette méthode sera néanmoins moins favorable pour la mesure d'affinité des oligonucléotides pour les monomères d' α -syn.

Bilan :

Nous avons mis au point une nouvelle méthode de marquage radioactif des oligonucléotides permettant d'homogénéiser l'intensité des signaux émis par les oligonucléotides. Cette méthode nécessitait néanmoins un allongement de 24 bases en 3' des séquences, ce qui ne devrait à priori pas gêner la liaison des séquences aux fibres d' α -syn.

Des premiers essais de mesure d'affinité des candidats aptamères marqués radioactivement contre des fibres F d' α -syn ont été réalisés en utilisant les colonnes Sp6 comme outil de séparation. Pour tous les candidats, comme la séquence aléatoire Scr2-G, nous avons pu observer qu'environ 30% des oligonucléotides restaient liés aux fibres F et n'étaient élués de la colonne que lors de l'élution au SDS 2%. Certains candidats comme le N3-G ou le N124-G restaient en quantité légèrement plus importante par rapport à une séquence contrôle (Scr2-G).

L'utilisation des colonnes Sp6 étant peu économe et difficilement multiplexable, nous avons mis au point une méthode de test d'affinité par filtration sur nitrocellulose, permettant de faire 96 mesures simultanées. Des mises au point ont révélées que l'ajout d'Igepal 0.1% dans les mélanges protéine/oligonucléotide lors de l'incubation était essentiel pour réduire l'adsorption non spécifique des molécules au plastique des plaques 96 puits. Des tests de compétiteurs ont révélé qu'ils permettaient de réduire fortement les liaisons non spécifiques mises en jeu lors de l'interaction entre les oligonucléotides et les fibres F d' α -syn. Ces compétiteurs permettaient ainsi d'augmenter le ratio entre la quantité de N3-G restée liée sur la membrane par rapport à la quantité de Scr2-G resté lié pour la même condition. Nous

avons choisi d'ajouter de l'ADNss comme compétiteur non spécifique à 1.73 µg/ml (en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides) pour la suite des tests d'affinité. Enfin, nous avons utilisé la technique de Western Blot afin de vérifier si l'ajout d'Igepal ne portait pas préjudice à la rétention de l' α -syn sur la nitrocellulose, puisque nous nous trouvions au-dessus de la CMC de l'Igepal. Les résultats montrent que la présence d'Igepal ne compromet pas la liaison des fibres F et R sur la nitrocellulose lors de la filtration. Ceci n'était malheureusement pas le cas pour les monomères, qui étaient à 80% décrochés de la nitrocellulose lors de la filtration.

4) Criblage des candidats des nouveaux SELEX « F », « F spécifique », des anciens SELEX « R » et « 4F » et de la sélection branchée multiple

Nous avons ensuite décidé de cribler par filtration sur nitrocellulose l'affinité des 14 candidats issus des SELEX « F » et « F spécifique », des 10 candidats issus des SELEX « R » et « 4F », ainsi que des 4 séquences issues des essais de sélection branchées multiples contre les quatre conformations de fibres d' α -syn (F, R, 65 et 91). Le but de ce criblage n'était pas de calculer précisément les constantes d'affinités des candidats (K_d et B_{max}), mais d'avoir une première approche de l'affinité des séquences et de leurs éventuelles spécificités. Pour cela nous avons utilisé une seule concentration d'oligonucléotide à 10 nM.

a) Présentation des résultats de criblages des 28 candidats aptamères contre les fibres F, R, 65 et 91

Le premier point important que nous avons pu observer à partir de nos résultats de criblage est la bonne reproductibilité des résultats (Figure 55). Au moins deux tests ont été réalisés à des jours différents et ont donné des résultats similaires. Pour les tests contre les fibres F et R, nous avons même utilisé deux lots distincts de fibres (l'un conservé à -80°C, l'autre à 37°C). Les résultats sont donc très robustes.

Bien qu'il puisse y avoir des variations entre les oligonucléotides, nous pouvons observer une tendance générale : certaines fibres retiennent en moyenne de plus grande quantité d'oligonucléotide que les autres. A quelques exceptions près, les oligonucléotides sont retenus en plus grande quantité sur la nitrocellulose par la fibre R et la fibre 65 par rapport aux fibres F et 91. Ainsi la séquence candidate N0-G est ainsi retenue à plus de 30 % sur la fibre R (80 fmoles), 25% sur la fibre 65 (60 fmoles), 10% sur la fibre F (20 fmoles) et 5% sur la fibre 91 (10 fmoles).

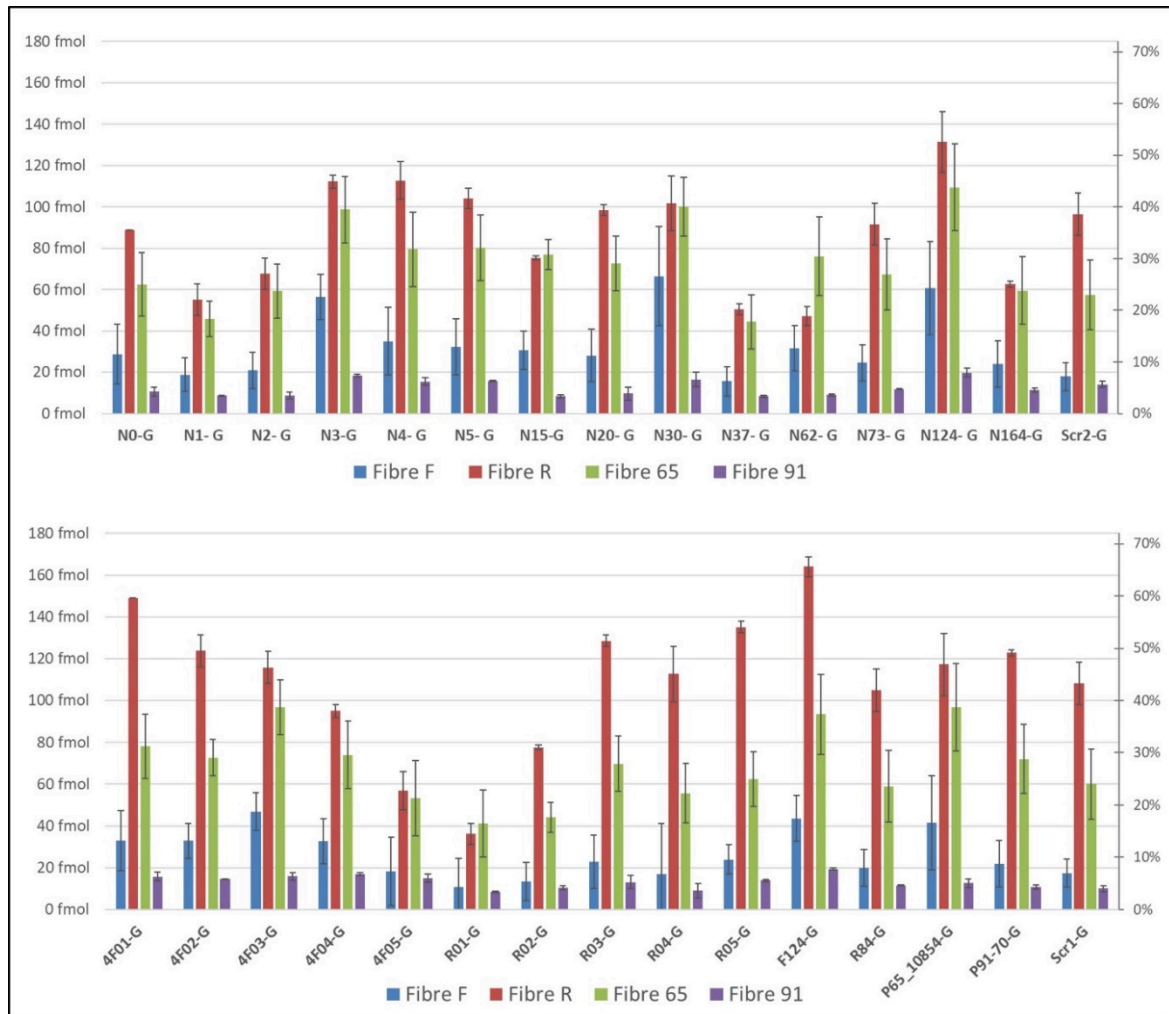


Figure 55 - Résultats du criblage des 28 candidats aptamères et de leurs séquences aléatoires associées contre les fibres F, R, 65 et 91 d' α -syn : Quantité retenue sur la nitrocellulose pour chaque oligonucléotide à chaque condition. Ces graphiques présentent la quantité (en fmol) d'oligonucléotide retenue sur la membrane pour chaque test d'affinité. L'axe des ordonnées de droite présente le pourcentage d'oligonucléotide retenu sur la membrane par rapport à la quantité initialement déposée (250 fmol). Les oligonucléotides à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P32) ont été présentés aux fibres F, R, 65 ou 91 d' α -syn à 1 μ M dans une solution de Ts1X contenant de l'Igepal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire à hauteur de 1.7 μ g/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé en triplicat sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Chaque point correspond au minimum à un duplicat de tests ayant été réalisés à des jours différents.

b) Analyse des différences entre les candidats aptamères et les séquences aléatoires témoins négatifs

Nous avons pu observer Figure 56 que certaines séquences restent liées aux fibres d' α -syn F en quantité bien plus importante que les séquences aléatoires. Ainsi, les candidats N3-G, N30-G et N124-G restent en moyenne 3.5 fois plus liés aux fibres F que le Scr2-G. Ces observations rappellent celles qui avaient été faites lors des premiers criblages de l'affinité des candidats pour les fibres F par filtration sur colonne Sp6 : les N3-G et N124-G étaient déjà les candidats les plus intéressants (cf. Figure 51). La cohérence entre ces observations, réalisées avec des méthodes de mesures d'affinités différentes, suggère que nos résultats sont très robustes. Il est à noter que les séquences 4F03-G, F124-G et P65-10854-G restent également 2.5 fois plus liées aux fibres F que le Scr1-G à 10nM.

Nous avons pu aussi observer qu'il y a peu de différences entre les quantités de candidats et de séquences aléatoires restant liées aux fibres R, 65 et 91 : Les ratios sont généralement inférieurs à 1.5, et atteignent rarement 2. Seul le candidat N124-G se lie deux fois plus que sa séquence aléatoire (le Scr2-G) aux fibres 65. De même, seul le candidat F124-G se lie deux fois plus que sa séquence aléatoire (le Scr1-G) aux fibres 91. Ainsi, bien que les oligonucléotides se lient en grande quantité aux fibres R et 65 (cf. Figure 55), ces interactions semblent être non-spécifiques.

Nous avons aussi pu remarquer certains candidats se lient aux fibres moins bien que les séquences aléatoires qui leur sont associées. Ainsi le N37-G et le R01-G se lient respectivement en moyenne deux fois moins bien que le Scr2-G et le Scr1-G.

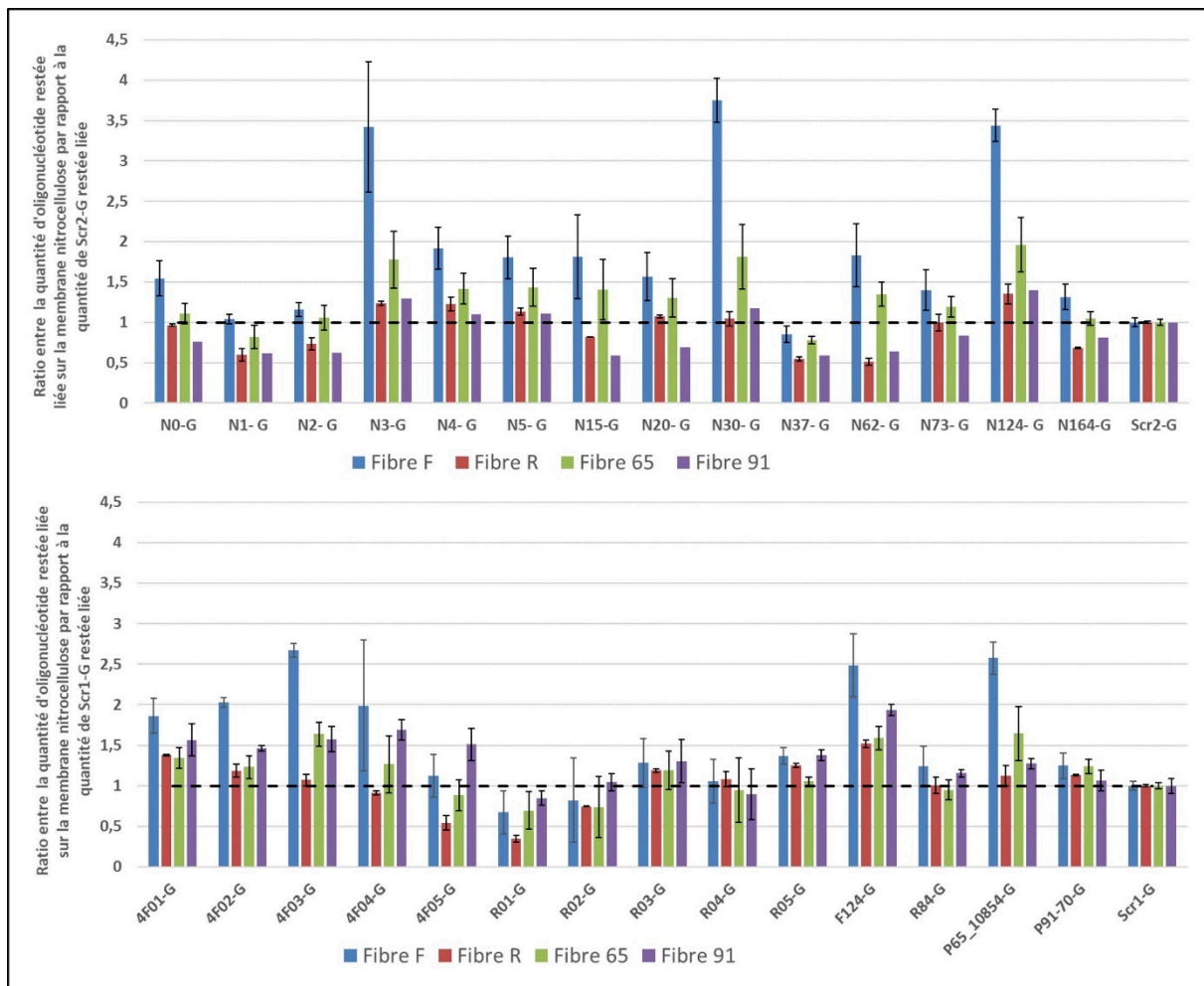


Figure 56- Résultats du criblage des 28 candidats aptamères et de leurs séquences aléatoires associées contre les fibres F, R, 65 et 91 d' α -syn : Ratio entre la quantité d'oligonucléotide restée liée sur la membrane nitrocellulose par rapport à la quantité de leur séquence aléatoire associée (Scr1-G ou Scr2-G) restée liée. Ces graphiques présentent le ratio entre la quantité d'oligonucléotide restée liée sur la membrane nitrocellulose par rapport à la quantité de séquence aléatoire associée (Scr1-G ou Scr2-G) restée liée. Les oligonucléotides à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P32) ont été présentés aux fibres F d' α -syn à 1 μ M dans une solution de Ts1X contenant de l'Igéal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire à hauteur de 1.7 μ g/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé en triplicat sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenus sur la membrane nitrocellulose sont quantifiés par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Chaque point correspond au minimum à un duplicat de tests ayant été réalisés à des jours différents.

Bilan :

Cette étape de criblage nous a tout d'abord permis d'observer que bien qu'il y ait des variations entre les oligonucléotides, nous pouvons observer une tendance générale : certaines fibres retiennent en moyenne de plus grande quantité d'oligonucléotide que les autres. A quelques exceptions près les oligonucléotides sont retenus en plus grande quantité sur la nitrocellulose par la fibre R. La fibre 65 est celle retenant le plus les oligonucléotides après elle, puis la fibre F et enfin la fibre 91.

Nous avons aussi pu examiner le ratio entre les quantités de candidat retenues par rapport aux quantités de séquences aléatoires retenues. Ce ratio est un marqueur de la spécificité de la liaison de l'oligonucléotide à sa cible. De manière générale, nous avons pu constater que les ratios pour les fibres R, 65 et 91 étaient faibles (n'excédant pas 2).

Concernant la fibre F, certains candidats au contraire se liaient deux à trois fois mieux par rapport à la séquence aléatoire qui leur était associée, ce qui semble très prometteur.

Afin de déterminer si nous sommes réellement en présence d'aptamères nous devons maintenant réaliser des mesures précises des constantes d'affinité des candidats les plus prometteurs (k_d et B_{max}).

III. Caractérisation de l'affinité pour les aptamères les plus prometteurs et comparaison avec les aptamères précédemment développés

Nous avons décidé de mieux caractériser l'affinités des candidats aptamères les plus prometteurs.

A. Mesure de l'affinité pour différentes fibres de protéines retrouvées dans les maladies neurodégénératives, par filtration sur nitrocellulose

Pour certifier qu'un oligonucléotide candidat est bien un aptamère et qu'il se lie à sa cible de manière spécifique, il faut mesurer précisément son affinité pour cette cible (cf. Introduction, Figure 20). Nous avons donc cherché à mesurer les constantes d'affinité des candidats pour leurs différentes cibles : la concentration maximale de ligand lié à la cible (B_{max}) et sa constante d'équilibre de dissociation (K_d) (Figure 20).

1) Premières mesures de l'affinité de certains candidats aptamères contre les fibres F et R d' α -synucléine

a) Choix de la méthode de mesure et des candidats à tester

Nous avons choisi une méthode couramment utilisée qui consiste à mesurer la quantité de complexe formée en faisant varier la concentration de l'aptamère, et en laissant celle de la cible constante. Lors de ces mesures, on se place de manière que la concentration en cible soit tellement grande comparée à la concentration en aptamère qu'on peut négliger la quantité de cible liée à l'aptamère comparée à la quantité de cible libre. Lorsque l'interaction est de type

« spécifique » entre un candidat et sa cible, la courbe de la quantité de complexe formée en fonction de la concentration en candidat initialement présente doit être hyperbolique et montrer une saturation. On peut alors calculer les constantes d'affinité de l'aptamère pour sa cible, le B_{max} et le K_d .

Nous avons choisi de réaliser une première mesure de l'affinité de certains candidats aptamères par filtration sur nitrocellulose contre les fibres d' α -syn F et R. Pour cela, nous avons réalisé des gammes de candidats radiomarqués allant de 0.78 à 100 nM en mélange avec des fibres, et nous avons mesuré la quantité d'oligonucléotide retenue (et donc de complexes formés) sur la nitrocellulose. Nous avons mis les fibres d' α -syn à 250 nM au lieu de 1 μ M afin d'économiser le stock de fibre, étant donné que nous envisagions beaucoup de mesures. Nous avons ajouté le compétiteur non-spécifique (ADNss) de manière à conserver un ratio 5-1 par rapport au candidats radiomarqués, ce qui signifiait que la quantité d'ADNss était croissante au fur et à mesure de la gamme de candidat.

Nous avons choisi de tester les candidats les plus prometteurs contre les fibre F et R: N3-G, N30-G, N124-G, mais également les 4F01-G, 4F02-G, 4F03-G et 4F04-G, F124-G et P65_10854-G. Nous avons aussi souhaité tester le R01-G afin de vérifier s'il a en effet une affinité inférieure à celle du Scr1-G.

b) Première mesure de l'affinité des candidats pour les fibres F et R d' α -syn

Nous avons donc réalisé une première expérience pour laquelle nous avons mesuré pour les 10 candidats choisis, la quantité (en fmol) d'oligonucléotide retenue sur la nitrocellulose par les fibres F et R en fonction de la concentration en candidat aptamère présente dans le mélange oligonucléotide / fibre. Nous avons présenté les données Figure 57 sur des graphiques séparés pour que chaque candidat puisse être comparé à la séquence aléatoire qui lui est associée.

Nous avons pu observer que pour certains candidats (comme par exemple le N3-G contre la fibre F, Figure 57-A) la courbe de la quantité de complexe candidat/protéine formée en fonction de la concentration en candidat initialement présente, est hyperbolique et montre une saturation. Ceci suggère que l'interaction entre le candidat et sa cible est de type « spécifique ». D'autres candidats ont au contraire un comportement ne se différenciant pas de la séquence aléatoire qui leur est associée, ceci suggère que cette interaction est de type « non-spécifique ».

Nous avons également pu réaliser des observations d'importances à propos des séquences aléatoires. Ainsi, de manière étonnante, les courbes des séquences aléatoires Scr1-G et Scr2-G ont des formes rappelant celle d'une liaison de type spécifique entre un ligand et sa cible : de forme hyperbolique et montrant une saturation. Nous pouvons aussi observer que les deux séquences aléatoires ont des comportements très similaires. La différence de longueur de 15 nucléotides ne semble donc pas affecter grandement l'intensité de l'affinité pour les fibres F et R.

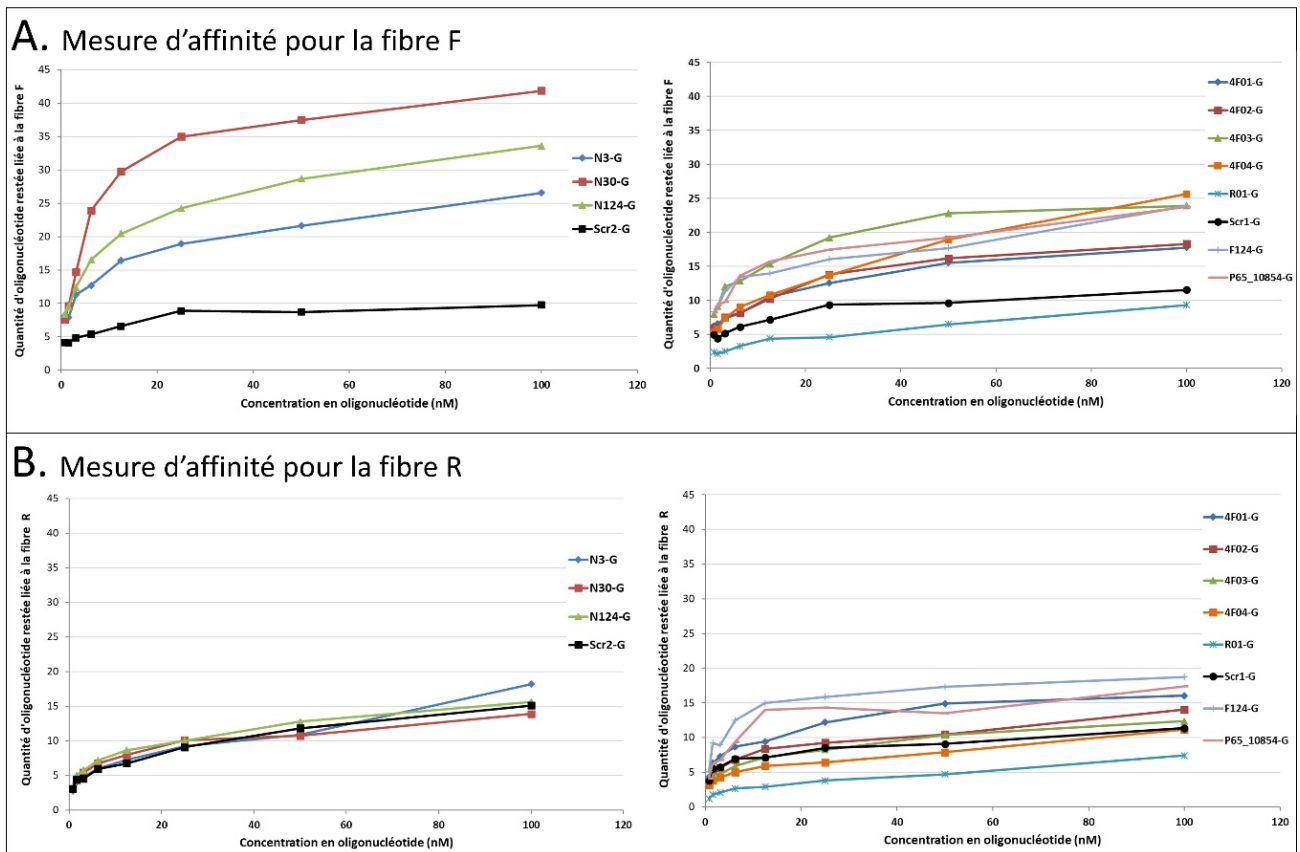


Figure 57 – Première mesure de l'affinité des candidats aptamères contre les fibres F et R d'α-synucléine. Ces graphiques présentent la quantité (en fmol) d'oligonucléotide retenue sur la nitrocellulose en fonction de la concentration en candidat aptamère présent dans le mélange oligonucléotide / fibre F (en A) et R (B). Les graphiques de gauche présentent les candidats testés ayant pour séquences aléatoire associée le Scr2-G (courbe noire), et les graphiques de droite ceux associés au Scr1-G (courbe noire aussi). Pour chaque point, les oligonucléotides à 10 nM (hybridés au SpG-LNA marqué radioactivement au P³²) ont été présentés aux fibres F ou R d'α-syn à 250 nM dans une solution de Ts1X contenant de l'Igepal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire entre 0.135µg/ml et 17.325 µg/ml). Après 30 min d'incubation à 37°C, 25 µL de chaque mélange est déposé sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenues sur la membrane nitrocellulose sont quantifiées par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable.

Nous avons noté une différence entre les quantités d'oligonucléotides retenus sur la nitrocellulose par rapport aux résultats obtenus lors du criblage (Figure 55). Ainsi, la quantité d'oligonucléotide retenue sur la nitrocellulose lors du criblage était plus élevée pour la fibre R que pour la fibre F, tandis que cela est visiblement le contraire pour les résultats de mesures d'affinités (Figure 57). Par exemple, le N30-G est retenu aux alentours de 100 fmoles pour la fibre R, et de 60 fmoles pour la fibre F. Sachant que la quantité de fibres d'α-syn présentée aux candidats a été diminuée par 4 (en passant de 1µM à 250 nM en concentration), nous nous attendions à une quantité de candidat retenue pour le N30-G à 10 nM aux alentours de 25 fmoles, et 15 fmoles pour la fibre F. Or, nous pouvons observer Figure 57 que nous retenons pour le N30-G à 10 nM aux alentours de 8 fmoles contre la fibre R et de 30 fmoles pour la fibre

F. Les différences entre les valeurs attendues et observées sont assez importantes : pour la fibre F, un facteur deux, et dans le cas de la fibre R un facteur 3. Nous nous n'avons à ce jour pas d'hypothèse pour expliquer ces différences.

Le Tableau 12 présente les calculs des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) qui ont été réalisées par le logiciel Prism en utilisant un modèle de régression non linéaire analysant l'affinité totale (spécifique et non spécifique) d'un candidat pour la cible, en faisant l'hypothèse qu'il n'existe qu'un seul site de liaison sur la cible pour le candidat.

	Fibre F			Fibre R	
	K_d	B_{max}		K_d	B_{max}
N3-G	6,40 nM ± 1,87	15,79 fmol ± 1,26	N3-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
N30-G	6,56 nM ± 1,21	34,76 fmol ± 1,76	N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
N124-G	7,51 nM ± 1,40	23,72 fmol ± 1,26	N124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
4F01-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	4F01-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
4F02-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	4F02-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
4F03-G	5,06 nM ± 1,69	13,63 fmol ± 1,17	4F03-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
4F04-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	4F04-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
R01-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	R01-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>
F124-G	2,33 nM ± 0,88	9,80 fmol ± 0,82	F124-G	4,08 nM ± 2,17	9,50 fmol ± 1,244
P65_10854-G	3,89 nM ± 1,26	11,59 fmol ± 0,91	P65_10854-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>

Tableau 12 - Constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides. Ces données ont été calculées avec l'aide du logiciel Prism en utilisant un modèle de régression non linéaire analysant l'affinité totale (spécifique et non spécifique) d'un candidat pour la cible, en faisant l'hypothèse qu'il n'existe qu'un seul site de liaison sur la cible pour le candidat. Néanmoins, le logiciel calculait les constantes d'affinités pour toutes les séquences quelle que soient leurs courbes : il calculait donc pour certains oligonucléotides ne se liant pas aux fibres mieux que leur séquences aléatoire associée, des K_d très faibles (et donc une affinité forte) associés à des B_{max} très faibles également. Nous avons donc décidé de ne compter comme ligand réel que les candidats étant retenus sur la membrane nitrocellulose, pour au moins 4 de leur 8 concentrations testées, en quantité 1 fois et demie supérieure à leur séquence aléatoire. Pour les séquences ne remplissant pas ces critères nous avons noté dans le tableau « pas de liaison ».

Pour la fibre F, nous pouvons constater que nous avons plusieurs candidats ayant un K_d de l'ordre de 5 nM capable de se lier à la fibre F de manière très discriminante par rapport aux Scr1-G ou Scr2-G. Nous sommes donc à priori en présence de molécules qui peuvent-être réellement appelées « aptamères ». Ces résultats nous ont aussi permis de vérifier que l'étape de criblage (réalisée à 10 nM de candidat aptamère) était donc très adaptée à nos candidats.

De manière étonnante néanmoins, le B_{max} des aptamères varie entre 10 et 35 fmoles. Ceci est surprenant car les aptamères peuvent se fixer sur les fibres à seulement deux sites de liaison distincts : soit les extrémités, ou bien à un motif structural qu'ils reconnaissent sur le long de la fibre. Or, les fibres sont composées d'une succession de protéines d' α -syn assemblées de manière répétitive. Deux sites de liaisons différents de deux aptamères sont donc présents sur la fibre d' α -syn avec le même nombre : les aptamères doivent donc à priori se lier sur les fibres avec des B_{max} semblables même s'ils ont des sites de liaison différents.

Le candidat le plus intéressant semble être néanmoins le N30-G, qui a le B_{\max} le plus élevé et un k_d de 5 nM. Le deuxième candidat de grand intérêt est le N124-G et enfin le N3-G. Les candidats issus des SELEX « 4F » « R » et de la sélection branchée multiple semblent avoir des affinités plus faibles pour la fibre F. Pour certains comme le 4F01-G nous avons considéré que leur différence par rapport au Scr1-G était trop faible pour qu'ils soient considérés comme de vrais « aptamères ». Les autres, comme le 4F03-G, ont certes des k_d très faible, mais leur B_{\max} est assez faible aussi, entre 10 et 14 fmoles.

Concernant les mesures d'affinités contre les fibres R, nous avons pu observer Figure 57 que les différences par rapport aux Scr1-G et Scr2-G étaient globalement assez faibles pour l'ensemble des candidats. Tous, à l'exception du F124-G ne peuvent être considérés comme se liant aux fibres R de manière spécifique, en tant qu'aptamère (Tableau 12). Le candidat F124-G semble être capable de se lier de manière spécifique aux fibres R, il faudra néanmoins vérifier cette affinité par des duplicats d'expériences.

Les candidats issus des SELEX « F » et « F-spécifique » semblent donc être ceux se liant avec l'affinité la meilleure sur les fibres F d' α -syn. Les SELEX « F » et « F-spécifique », réalisés avec les tubes à faible d'adsorption ont donc été finalement essentiels à la réussite du projet. De plus, les résultats suggèrent que nous sommes en présence d'aptamères capables de différencier les fibres F des fibres R, ce qui était l'un des objectifs majeurs de notre projet.

Bilan :

Ces premiers tests d'affinités ont permis de mettre en évidence que certains candidats reconnaissent les fibres F de manière spécifique : la courbe correspondant à la quantité de complexe candidat/fibre formée en fonction de la concentration de candidat dans le mélange était de type hyperbolique et saturable. Ceci montrait que nous étions bien en présence d'aptamère contre la fibre F pour ces candidats-ci. Concernant la fibre R, aucun candidat ne se démarquait de manière visible par rapport aux séquences aléatoires, à l'exception du F124-G. D'autres expériences seront néanmoins nécessaires afin de confirmer cette observation. Les meilleurs candidats (N30-G et N124-G) semblaient donc être capables de distinguer les fibres F et R.

Un des aspects étonnants néanmoins était que les séquences aléatoires avaient des courbes d'affinités de type « spécifique » mais avec un B_{\max} bien moindre par rapport aux aptamères. Nous avons aussi été surpris que les B_{\max} des candidats varient entre 10 et 35 fmoles, alors qu'ils devraient être logiquement similaires. Enfin, nous avons aussi remarqué un manque de cohérence, que nous n'arrivons pas à expliquer, entre les quantités retenues d'oligonucléotides lors du criblage et les mesures de courbes d'affinités : lors du criblage, de plus grandes quantités d'oligonucléotide étaient retenues sur la fibre R que sur la fibre F, alors que nous avons observé l'inverse lors des mesures des courbes d'affinités.

Néanmoins tous ces résultats doivent être reconfirmés en réitérant les expériences. Nous avons choisi les candidats N30-G, N124-G pour continuer car ce sont les candidats les plus prometteurs (k_d de 5 nM environ, et B_{\max} entre 20 et 35 fmol). Nous avons également souhaité tester aussi le candidats F124-G, puisqu'il est le seul à potentiellement avoir une affinité spécifique pour la fibre R.

2) Mesures d'affinités des aptamères les plus prometteurs et des aptamères déjà publiés contre différents types de protéines

a) Présentation des candidats déjà publiés utilisés dans nos mesures

Nous avons souhaité comparer nos aptamères N30-G, N124-G et F124-G à d'autres aptamères décrits dans la littérature comme ayant été sélectionnés contre α -syn.

Nous avons choisi les aptamères M5-15 et T-SO508, sélectionnés par Tsukakoshi et ses collaborateurs respectivement en 2010 et 2012 (Tsukakoshi et al., 2010, 2012). Ces aptamères de chimie ADN ont été sélectionnés pour reconnaître respectivement les formes monomériques et oligomériques d' α -syn. Il a été démontré que le T-SO508, qui reconnaissait les oligomères d' α -syn avec un k_d de 68 nM, avait aussi une affinité pour les oligomères d'A β_{40} (k_d de 25nM (cf. informations présentes dans l'introduction, paragraphes VI.A et VI.B ci-dessus)

Nous avons aussi choisi les aptamères F5R1 et F5R2 qui sont également en chimie ADN et ont été sélectionnés en 2019 par Zheng et ses collaborateurs (Zheng et al., 2018; Ren et al., 2019). Ils reconnaissent l' α -syn avec des k_d respectivement de 2.4 et 3.07 nM, mais leur affinité pour l'A β_{40} n'a pas été évaluée. (cf. informations présentes dans l'introduction, paragraphes VI.C).

Enfin, nous avons souhaité tester l'aptamère Tau 3146 de chimie ADN. Cet aptamère a été isolé par un procédé rapide appelé « Non-SELEX », durant lequel trois tours de sélection successifs sans amplification entre les sélections ont été réalisés contre l'isoforme monomérique Tau 441 (Lisi et al., 2018). L'aptamère Tau 3146 est capable de se lier aux isoformes Tau 441, Tau 381, Tau 352 et Tau 383 avec des k_d respectivement de 13 ± 3 nM, 116 ± 6 nM, 84 ± 6 nM et 49 ± 4 nM.

Tous ces aptamères étant de chimie ADN, il est nécessaire de les comparer à une séquence aléatoire de la même chimie et de longueur comparable. Nous avons choisi comme contrôle une séquence d'ADN que nous utilisons au laboratoire comme amorce pour des PCR. Cette amorce, que nous nommerons pour la suite de notre étude « Scr_ADN » a une taille de 87 nucléotides qui est comparable aux séquences des aptamères ADN que nous avons sélectionnés à partir de la littérature (cf. Tableau 13).

Nom	Séquence (sens 5'-3')	Longueur (nucléotide)
M5-15	ATAGTCCCATCATTCATTGTATGGTACGGCGCGGTGGCGGGTGCCTGGAGATATTAGCAAGTGTC	66
T-SO508	ATACTGCCATTCATTTTCATTTGCCTGTGGTGTGGGGCGGGTGCCTTAGATATCAGCATGTGTCA	66
F5R1	ATCGAGTGTGTACGGGGTCCGGTAGGGTGGCGAGGTCTTCCTGTCGTAGCAGGATCCA	58
F5R2	ATCGAGTGGACGAGTGCCCTCCGGTACGAGCTGTCTGATGGGTTGCGCGCAGGATCCA	58
Tau 3146	GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAACCTTTGGGGTGGCTTGACGAAGAAAGTAGTTGAGCGTTTATTCTTGTCTCCC	76
Scr_ADN	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCT	58

Tableau 13 – Séquences des aptamères précédemment publiés utilisés comme comparatifs pour les tests d'affinités de nos aptamères et de leur séquence aléatoire associée.

b) Choix des mesures d'affinité effectuées

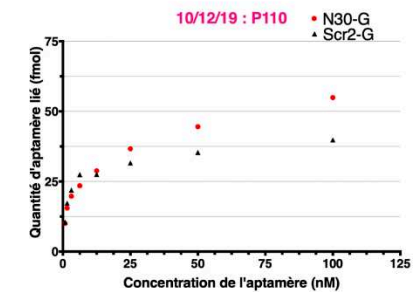
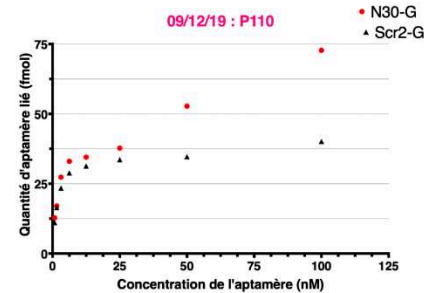
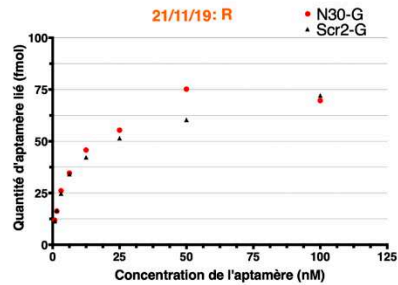
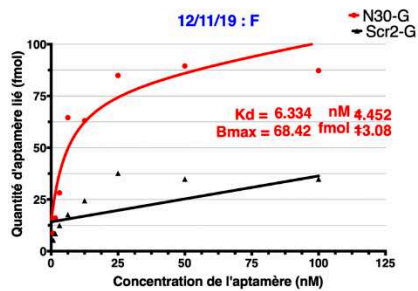
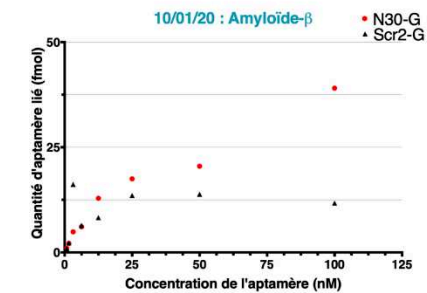
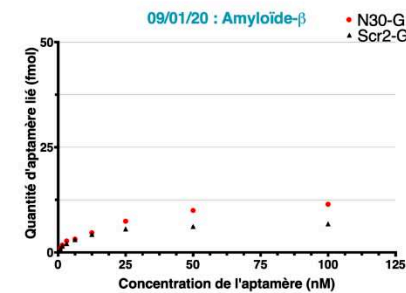
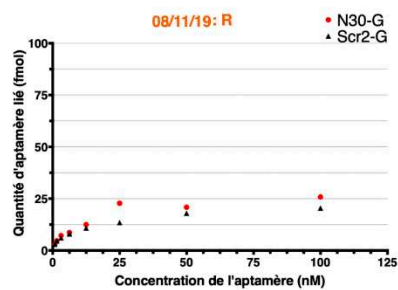
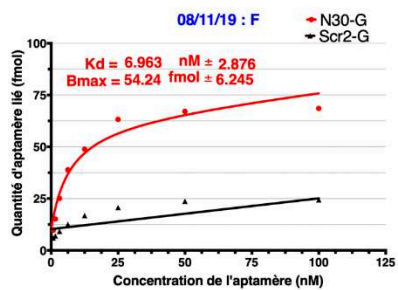
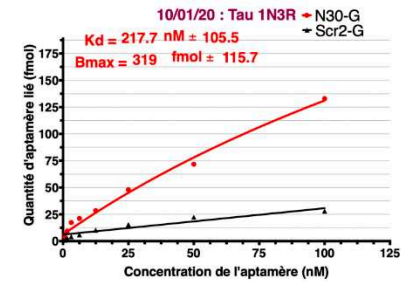
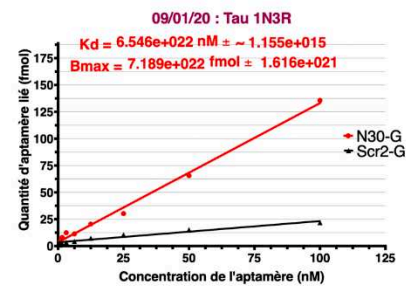
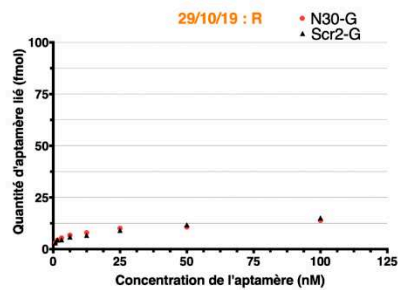
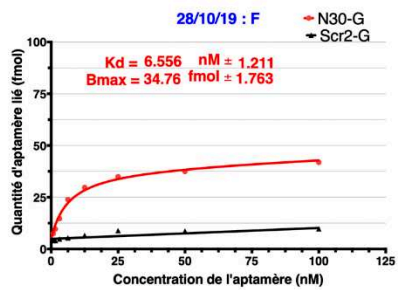
Dans un premier temps, nous avons souhaité mesurer l'affinité de nos aptamères et des aptamères issus de la littérature contre différentes fibres de types « amyloïdes » en plus des fibres F et R d' α -syn. En effet, les aptamères produits contre des fibres de type « amyloïdes » présentent souvent une affinité secondaire pour d'autres fibres amyloïdes. Il nous est donc paru important d'étudier l'affinité de nos aptamères contre différents types de fibres amyloïde. Pour cette raison, nous avons choisi de mesurer aussi l'affinité des aptamères contre les fibres Tau1N3R et les fibres A β ₄₀.

Nous avons aussi mesuré l'affinité de nos aptamères contre la fibre d' α -syn « P110 ». Cette fibre a été réalisée à partir de protéine α -syn tronquée à partir de l'acide aminé n°110. Il manque ainsi les 30 acides aminés du domaine C-terminal (cf. Introduction, Figure 4). La mesure de l'affinité des molécules pour la fibre P110 permettra d'avoir une première approche de la localisation du site de liaison des aptamères sur la fibre d' α -syn : si l'aptamère a la même affinité pour la fibre d' α -syn non tronquée que pour la fibre P110, cela signifie que le site de liaison de l'aptamère est situé sur la partie N-terminale d' α -syn, allant jusqu'à l'acide aminé n°110. Toutes ces fibres ont été fournies par l'équipe de Ronald Melki.

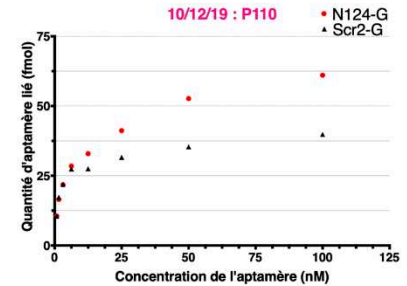
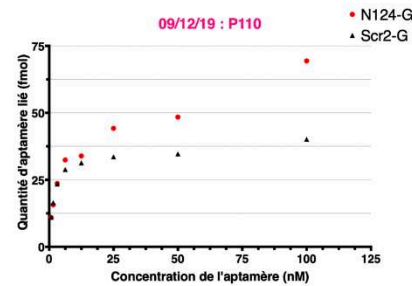
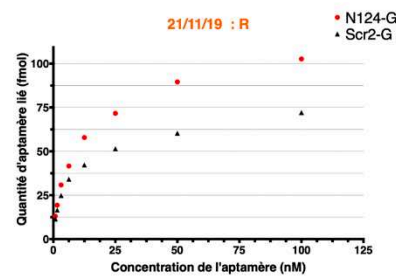
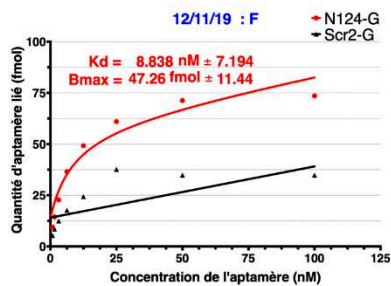
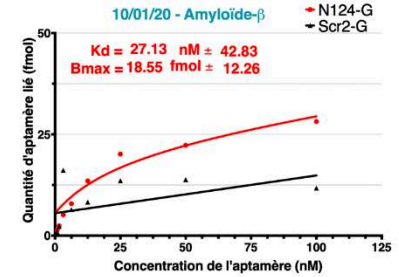
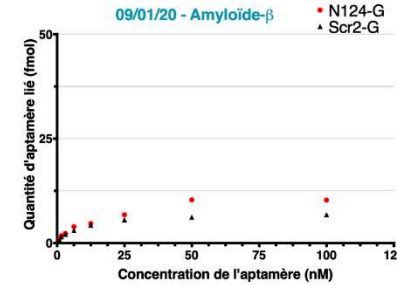
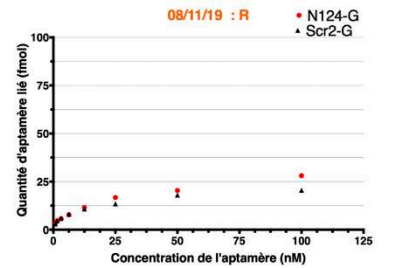
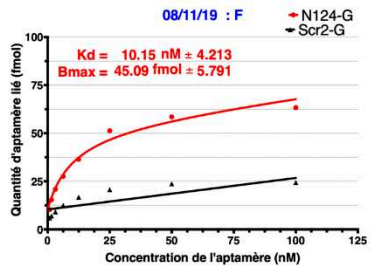
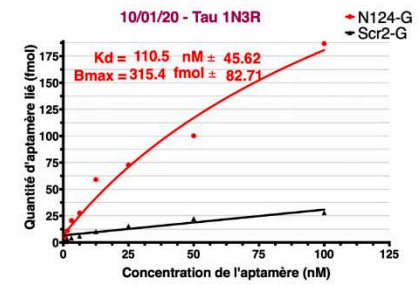
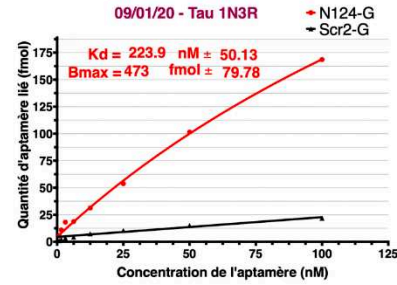
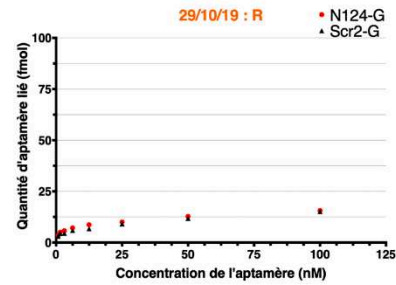
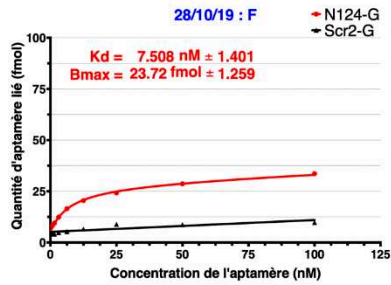
Nous avons réalisé les mesures en triplicat (trois expériences indépendantes à des jours différents) pour les fibres F et R, et en duplicat pour les autres fibres (Tau1N3R et les fibres A β ₄₀, et P110) ainsi que pour les monomères d' α -syn. Les expériences ont été menées dans les mêmes conditions que pour les tests préliminaires d'affinité pour la fibre F et les calculs des K_d et B_{max} ont été réalisés aussi de la même manière (cf. paragraphe Résultats III.A.1) ci-dessus).

Les résultats de chaque test d'affinité sont représentés pour chaque aptamère Figure 58. Les calculs des K_d et B_{max} calculés par Prism sont indiqués sur les graphiques, lorsque nous avons déterminé que l'aptamère se liait significativement à la protéine par rapport à sa séquence aléatoire associée. Une moyenne des K_d et B_{max} calculés pour chaque aptamère pour chaque protéine est présentée Tableau 14.

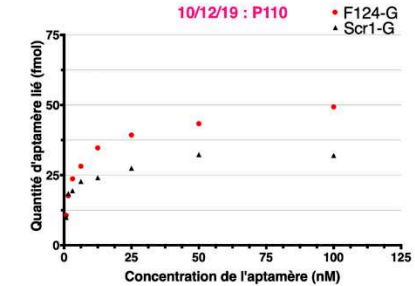
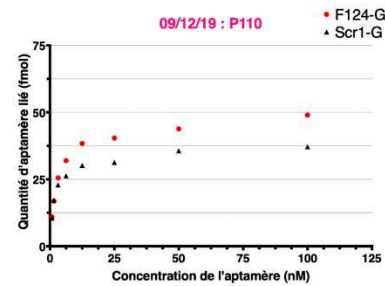
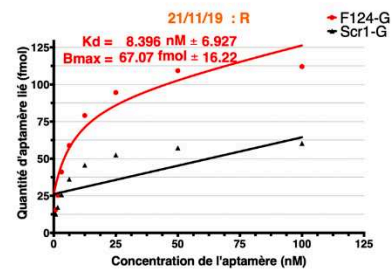
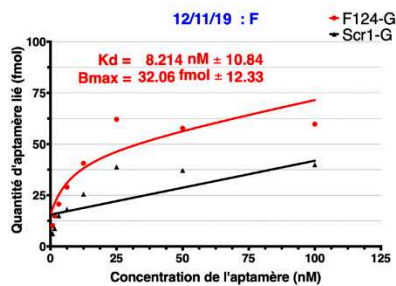
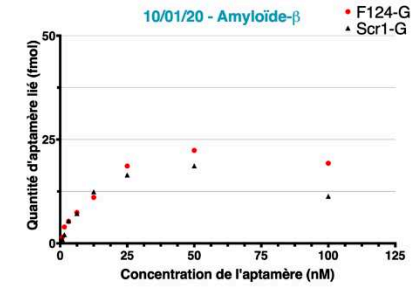
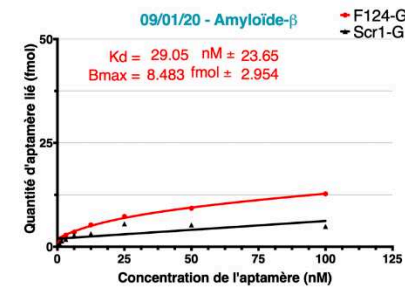
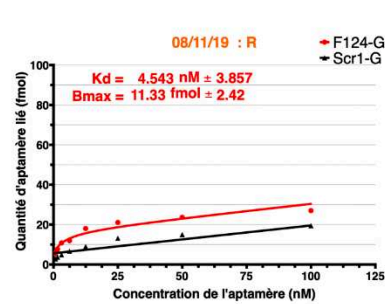
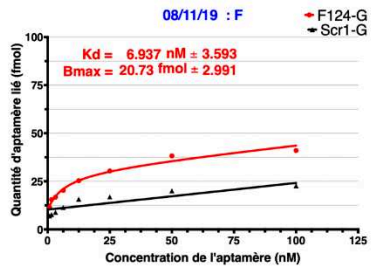
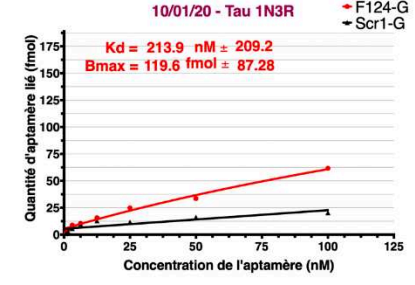
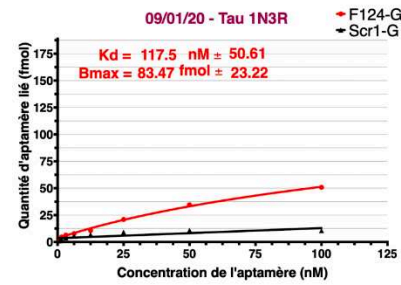
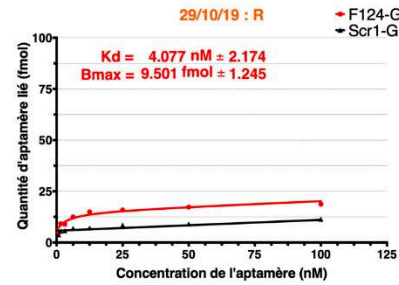
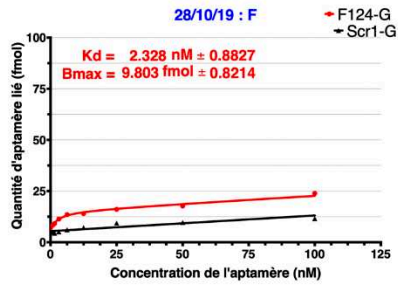
A - Résultats des tests d'affinités pour le N30-G



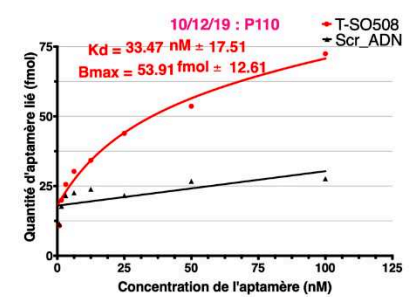
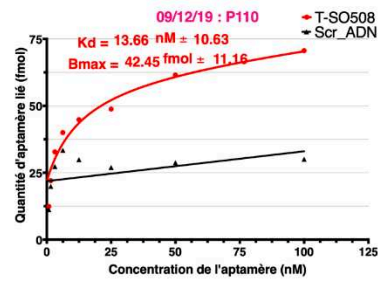
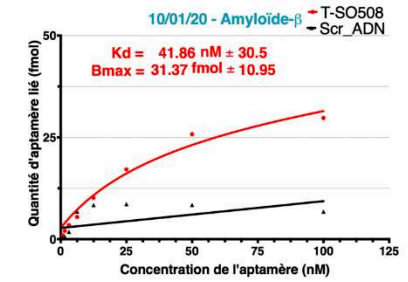
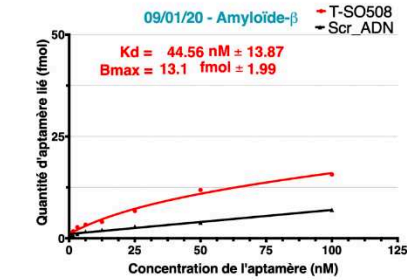
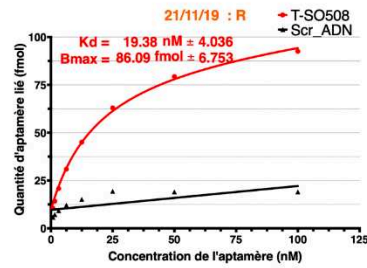
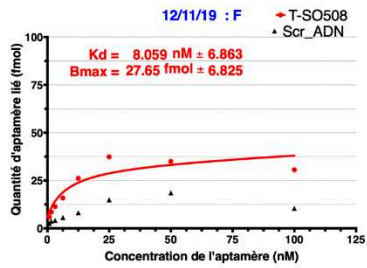
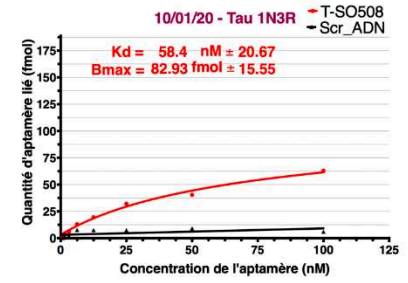
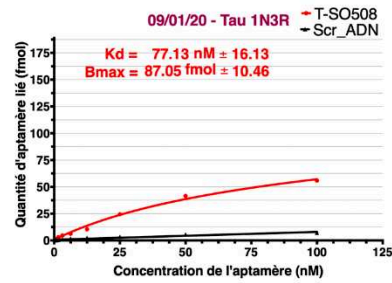
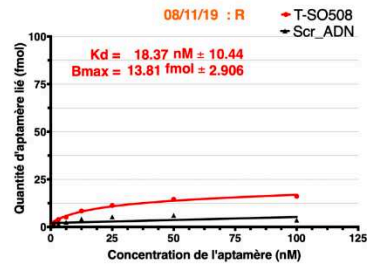
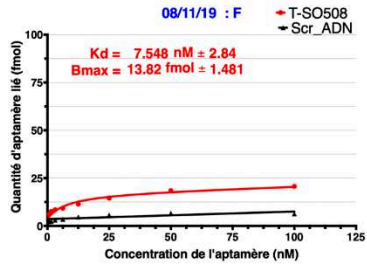
B - Résultats des tests d'affinités pour le N124-G



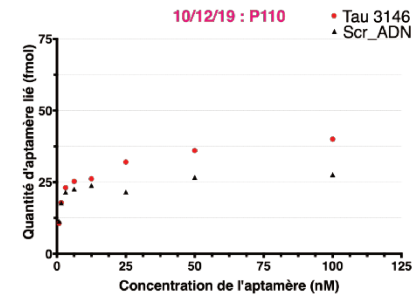
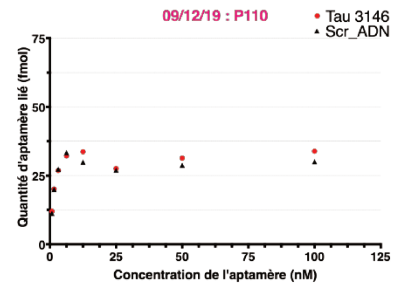
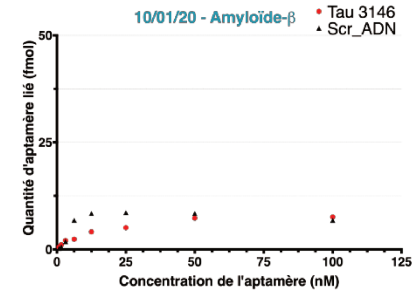
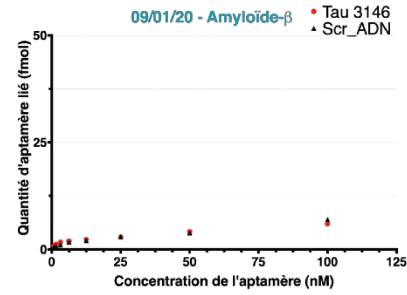
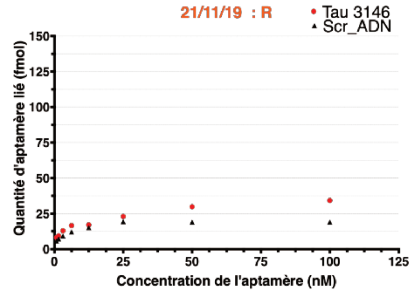
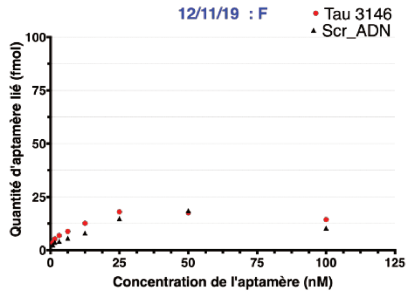
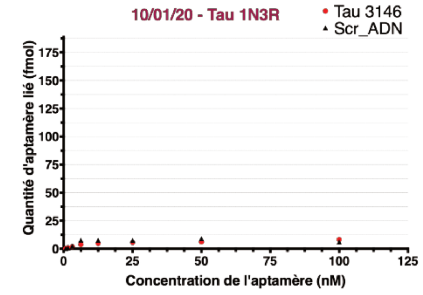
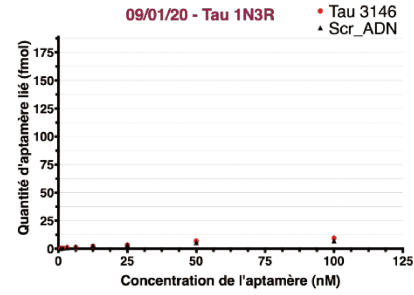
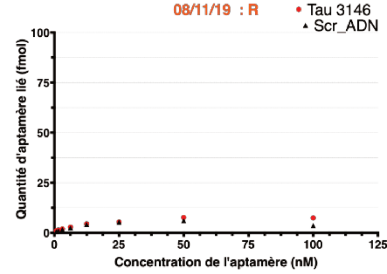
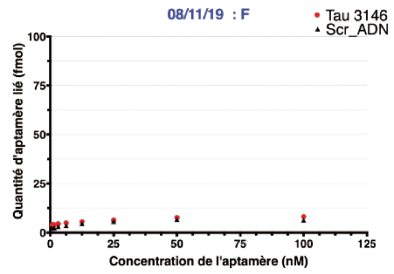
C - Résultats des tests d'affinités pour le F124-G



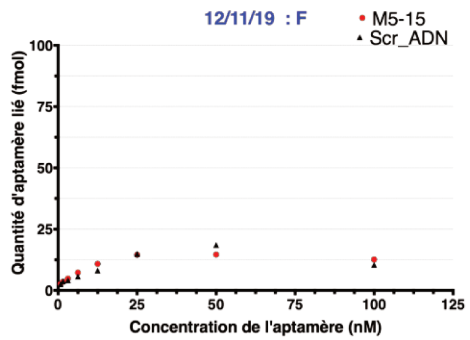
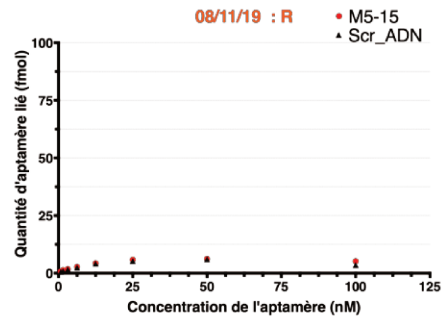
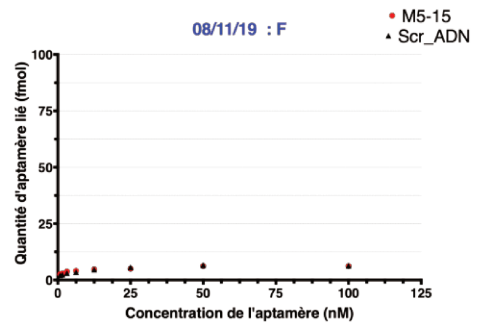
D - Résultats des tests d'affinités pour le T-SO508



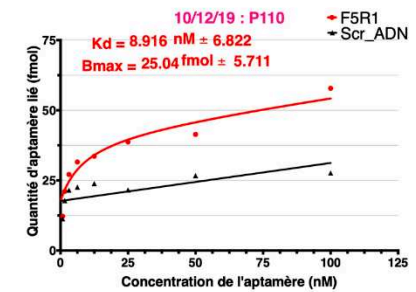
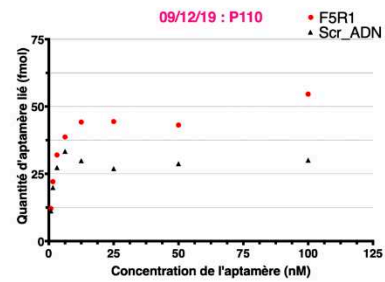
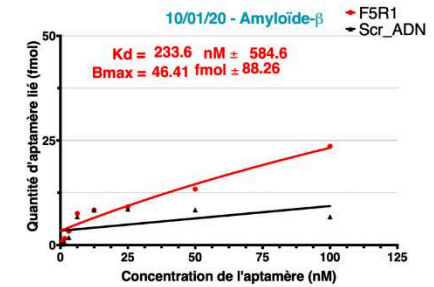
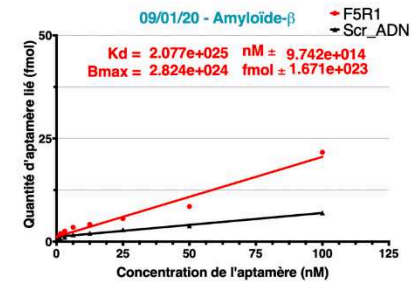
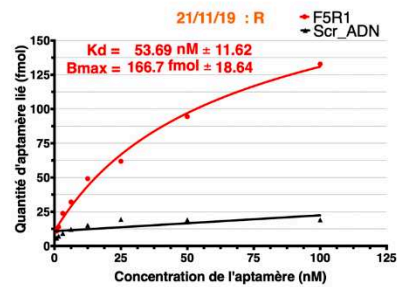
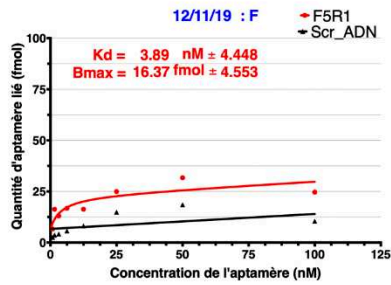
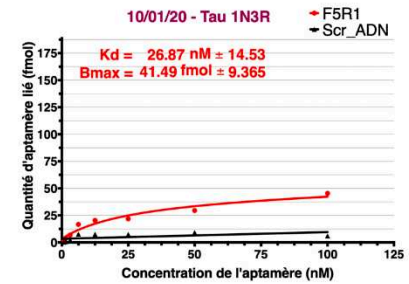
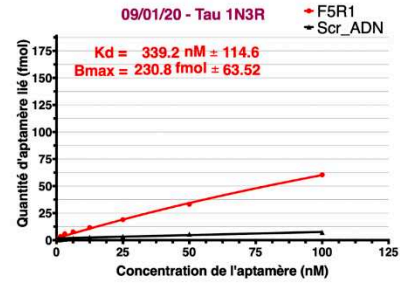
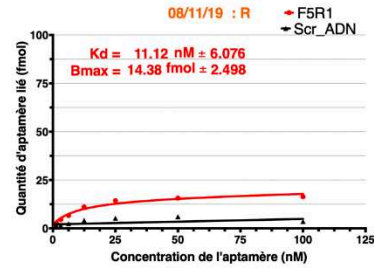
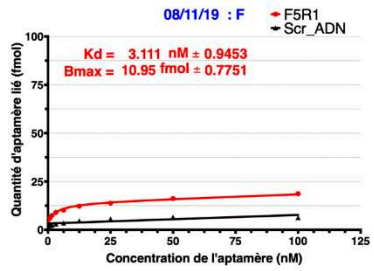
E - Résultats des tests d'affinités pour le Tau 3146



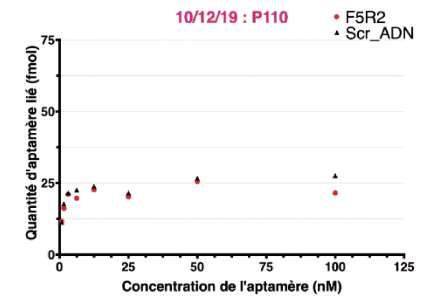
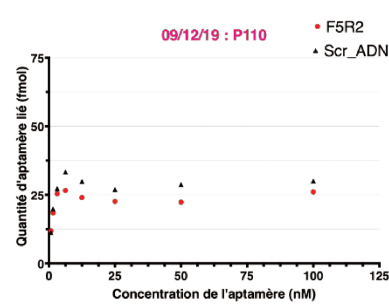
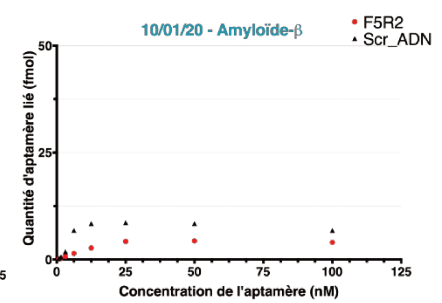
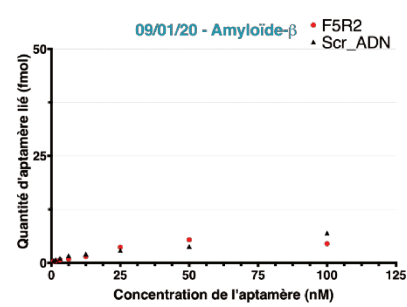
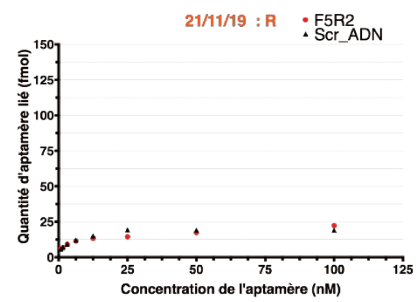
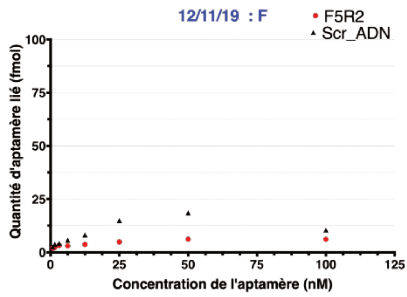
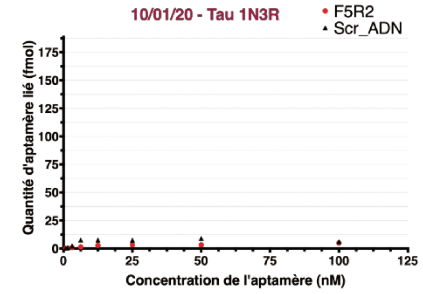
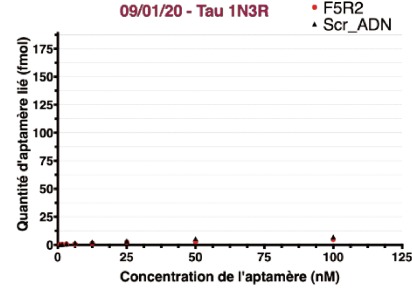
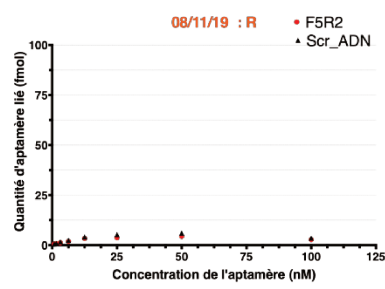
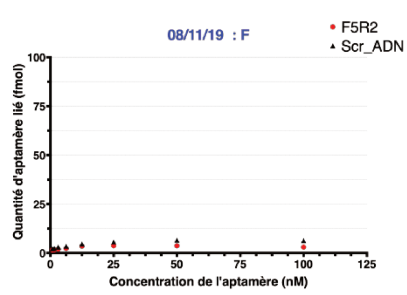
F - Résultats des tests d'affinités pour le M5-15



G - Résultats des tests d'affinités pour le F5R1



H - Résultats des tests d'affinités pour le F5R2



I - Résultats des tests d'affinités des candidats pour les monomères d' α -synucléine

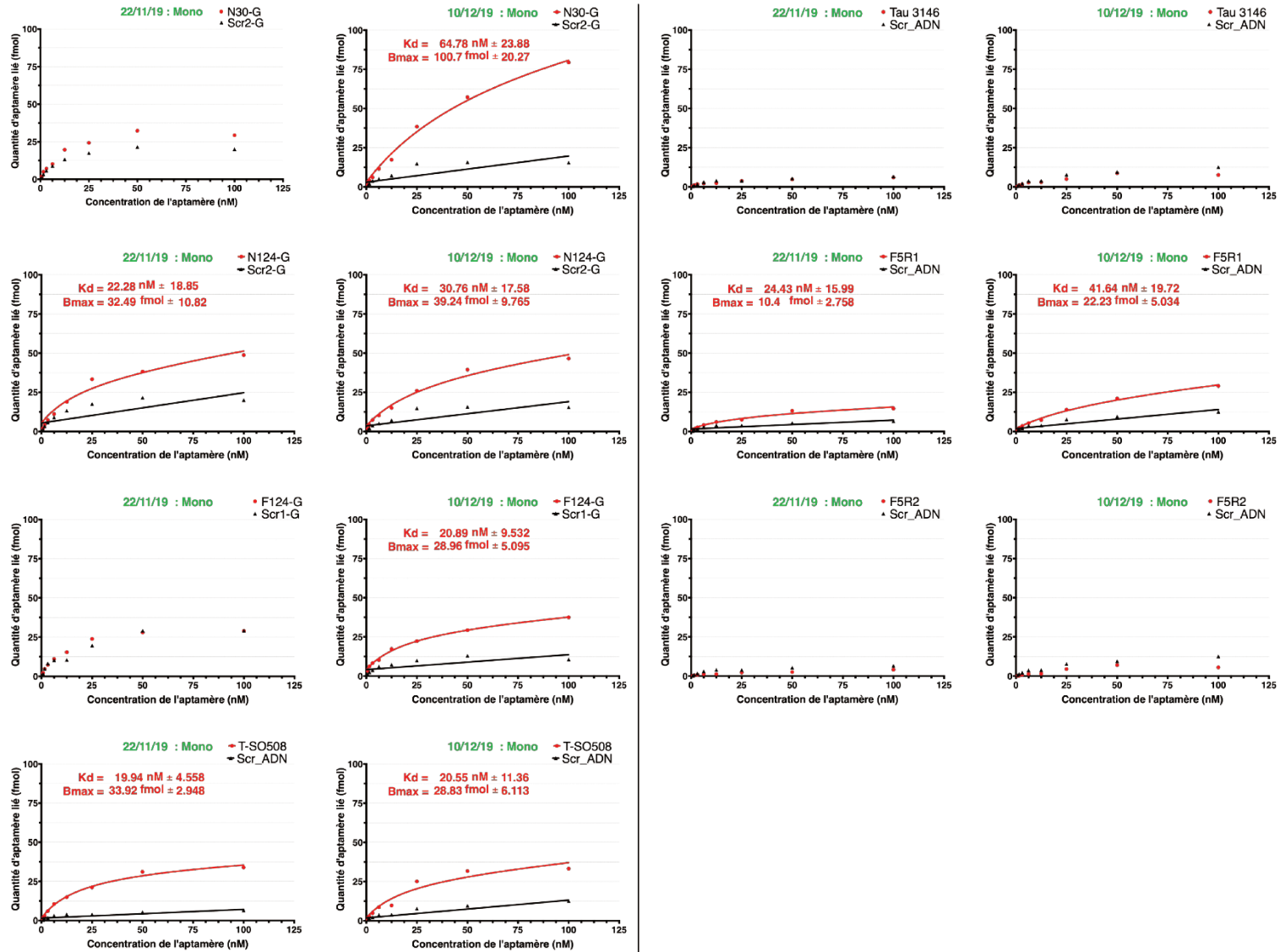


Figure 58 – Mesure de l’affinité des aptamères contre différentes fibres de type « amyloïdes ». Les résultats des mesures sont présentés pour les aptamères N30-G (A), N124-G (B), F124-G (C), T-SO508 (D), M5-15 (E), Tau 3146(F), F5R1(G) et F5R2(H). La figure I présente les résultats des mesures d’affinités des aptamères contre les monomères d’ α -syn. Pour chaque point, les oligonucléotides à 10 nM (hybridés par choc thermique au SpG-LNA marqué radioactivement au P^{32} pour les oligonucléotides de chimie ARN2’F, ou bien directement marqués au P^{32} pour les oligonucléotides ADN) ont été présentés aux protéines à 250 nM dans une solution de Ts1X contenant de l’Igepal à 0.1% et de l’ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c’est-à-dire entre 0.135 μ g/ml et 17.325 μ g/ml). Après 30 min d’incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d’oligonucléotides retenues sur la membrane nitrocellulose sont quantifiées par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Les K_d et B_{max} ont été calculés avec l’aide du logiciel Prism en utilisant un modèle de régression non linéaire analysant l’affinité totale (spécifique et non spécifique) d’un candidat pour la cible, en faisant l’hypothèse qu’il n’existe qu’un seul site de liaison sur la cible pour le candidat. Néanmoins, le logiciel calculait les constantes d’affinités pour toutes les séquences quelle que soient leur courbe : il calculait donc pour certains oligonucléotides ne se liant pas aux fibres mieux que leur séquences aléatoire associée, des k_d très faibles (et donc une affinité forte) associés à des B_{max} très faibles également. Nous avons donc décidé de ne compter comme ligand réel que les candidats étant retenus sur la nitrocellulose, pour au moins 4 de leur 8 concentrations testées, en quantité 1 fois et demie supérieure à leur séquence aléatoire. Pour les séquences ne remplissant par ces critères nous n’avons indiqué ni les calculs de K_d et B_{max} réalisés par Prism ni les courbes des modèles associés à ces calculs.

Fibre d' α -synucléine F				Fibre d' α -synucléine R				Monomère d' α -synucléine			
	K_d	B_{max}	Reproductibilité		K_d	B_{max}	Reproductibilité		K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	6,62 nM \pm 4,8%	52,48 fmol \pm 32,2%	3/3	N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		N30-G	64,78 nM	100,70 fmol	1/2
N124-G	8,83 nM \pm 14,9%	38,69 fmol \pm 33,6%	3/3	N124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		N124-G	26,52 nM \pm 22,6%	35,87 fmol \pm 13,3%	2/2
F124-G	5,83 nM \pm 53,1%	20,86 fmol \pm 53,3%	3/3	F124-G	5,67 nM \pm 41,8%	29,30 fmol \pm 111,7%	3/3	F124-G	20,89 nM	28,96 nM	1/2
T-SO508	7,80 nM \pm 4,6%	20,74 fmol \pm 47,2%	2/2	T-SO508	18,88 nM \pm 3,8%	49,95 fmol \pm 102,3%	2/2	T-SO508	20,24 nM \pm 2,2%	31,38 fmol \pm 11,5%	2/2
Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
M5-15	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		M5-15	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		M5-15	-	-	
F5R1	3,50 nM \pm 15,8%	13,66 fmol \pm 28,1%	2/2	F5R1	32,41 nM \pm 92,9%	90,54 fmol \pm 119,0%	2/2	F5R1	33,03 nM \pm 36,9%	16,32 fmol \pm 51,2%	2/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
Fibre d' α -synucléine P110				Fibre d'Amyloïde- β				Fibre de Tau 1N3R			
	K_d	B_{max}	Reproductibilité		K_d	B_{max}	Reproductibilité		K_d	B_{max}	Reproductibilité
N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		N30-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		N30-G	2,94E+30 nM \pm 141,4%	3,23E+30 nM \pm 141,4%	2/2
N124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		N124-G	27,13 nM	18,55 fmol	1/2	N124-G	167,20 nM \pm 48,0%	394,20 fmol \pm 28,3%	2/2
F124-G	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		F124-G	29,05 nM	8,48 fmol	1/2	F124-G	165,70 nM \pm 24,6%	101,54 fmol \pm 25,2%	2/2
T-SO508	23,57 nM \pm 59,4%	48,18 fmol \pm 16,8%	2/2	T-SO508	43,21 nM \pm 4,4%	22,24 fmol \pm 58,1%	2/2	T-SO508	67,77 nM \pm 19,5%	84,99 fmol \pm 3,4%	2/2
Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		Tau 3146	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	
M5-15	-	-		M5-15	-	-		M5-15	-	-	
F5R1	8,92 nM	25,04 fmol	1/2	F5R1	2,54E+25 nM \pm 141,4%	3,46E+24 nM \pm 141,4%	2/2	F5R1	183,04 nM \pm 120,7%	136,15 fmol \pm 98,3%	2/2
F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>		F5R2	<i>Pas de liaison</i>	<i>Pas de liaison</i>	

Tableau 14 – Moyenne des constantes d'affinités (K_d et B_{max}) calculées pour les candidats oligonucléotides. Pour chaque test ce tableau présente la moyenne des K_d et B_{max} qui ont été calculés à partir de l'ensemble des duplicats ou triplicats d'expériences réalisées. En pourcentage est exprimé le coefficient de variation, le ratio entre l'écart type des valeurs et leur moyenne. La colonne « reproductibilité » donne le nombre d'expériences pour lesquelles on mesure une liaison entre l'aptamère et la cible. Le symbole « - » signifie qu'aucune expérience n'a été réalisée. « Pas de liaison » est indiqué dans le tableau lorsque la liaison de l'aptamère testé n'est pas significativement supérieure à celle de la séquence aléatoire qui lui est associée.

c) Analyse des mesures d'affinités réalisées pour les fibres F et R

Nous avons réalisé des duplicats supplémentaires d'expériences par rapport à nos premières mesures. Nous avons donc des triplicats pour les aptamères de chimie ARN2'F et des duplicats pour ceux de chimie ADN.

Nous avons pu réaliser une première observation d'importance : les quantités moyennes de séquences aléatoires (Scr1-G, Scr2-G et Scr_ADN) retenues sur les fibres varient selon les expériences. Par exemple, le 28/10/19, lorsque les oligonucléotides sont à la concentration de 50 nM, environ 9 fmoles de Scr2-G et 10 fmoles de Scr1-G sont retenues par la fibre F lors de la filtration sur nitrocellulose (cf. Figure 58-A et C). Le 08/11/19 nous avons pu observer que 23 fmoles et 20 fmoles de Scr2-G et de Scr1-G étaient retenues par la fibre F, ainsi que 7 fmoles de Scr ADN. Le 12/11/19 respectivement 34, 37 et 18 fmoles de Scr2-G, Scr1-G et Scr ADN ont été retenues sur par la fibre F lors de la filtration sur nitrocellulose. Ces variations peuvent être expliquées par des variations des quantités de protéines retenues sur la nitrocellulose à chaque expérience. On peut observer que les quantités de Scr1-G et de Scr2-G retenues sont presque similaires à chaque expérience, tandis que celle du Scr ADN est trois fois plus basse en moyenne. Par exemple, le 08/11/19 à 50 nM les Scr1-G et Scr2-G sont retenus par la fibre R à 18 et 15 fmol respectivement tandis que le Scr ADN l'est à 6 fmoles. De même, le 21/11/19 à 50 nM les Scr1-G et Scr2-G sont retenus par la fibre R à 60 et 57 fmoles respectivement tandis que le Scr ADN est retenu à 19 fmoles. Ainsi, les oligonucléotides de chimie ARN2'F-Py semblent avoir une affinité « non-spécifique » pour les fibres F et R trois fois supérieure en moyenne à ceux de chimie ADN.

Ainsi que nous l'avons déjà remarqué dans les premiers tests d'affinités, de manière étonnante, les séquences aléatoires ne paraissent pas se lier aux fibres F selon des liaisons de type « non-spécifiques ». En effet, les quantités de séquences aléatoires liées aux fibres F ne varient pas de manière linéaire et non saturable en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante (cf. Introduction, Figure 20). Nous avons observé que les quantités de séquences aléatoires liées aux fibres augmentent de manière hyperbolique en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante, et présentent une saturation.

Les résultats moyens pour chacun des aptamères, sont présentés dans le Tableau 14.

Nous pouvons observer que pour la fibre F les mesures des affinités sont très reproductibles : les aptamères N30-G, N124-G, F124-G, T-SO508 et F5R1 se lient aux fibres F avec des K_d inférieurs à 10 nM à chaque expérience, tandis que les aptamères M5-15, Tau 3146 et F5R2 n'ont pas de fixation significativement supérieure à leur séquences aléatoires associées. Les B_{max} des aptamères se liant aux fibres F varient cependant de manière importante à chaque expérience : de 30 à 50% selon les aptamères. Néanmoins, ces variations sont corrélées aux variations observées pour les séquences aléatoires Scr1-G et Scr2-G. Par exemple, les B_{max} calculés pour le N30-G sont respectivement de 34.76, 54.24 et 68.42 fmoles les 28/10, 09/11 et 12/11. Ce qui est en effet corrélé aux variations de 10 à 15 fmoles observées entre ces dates pour les séquences aléatoires ARN2'F. Pour le T-SO508 et le F5R1, de chimie ADN, les variations

dans les B_{\max} calculés sont aussi corrélées à la variation de 10 fmoles observées entre les 08/11 et 12/11 2019. L'aptamère F5R1 a le k_d le plus petit pour la fibre F (3.5 nM), mais son B_{\max} est très faible (13.66 fmoles). L'aptamère le plus prometteur pour la fibre F est donc le N30-G, qui a un k_d moyen de 6.62 nM et un B_{\max} de 52 fmol \pm 30%.

Nous avons trouvé surprenant que les B_{\max} soient si petits (de l'ordre du fmol). En effet, le B_{\max} le plus grand est celui de l'aptamère N30-G qui est de 52.48 fmol \pm 32.2%. Or, pour chaque point de gamme, la concentration en fibre totale est de 250 nM pour 25 μ L : il y a donc en solution 6250 fmoles de fibre F. Cependant, la quantité molaire de fibre F, correspond en réalité à la quantité molaire de monomères d' α -syn composant les fibres présentes. Le B_{\max} de 50 fmoles semble signifier que l'aptamère N30-G se lie à 50/6250 monomères, soit un monomère sur 125. Or, les rubans et les fibres sont composés respectivement de 800 et 7000 monomères (cf. bousset et al. 2013). Le N30-G semble donc reconnaître un site présent environ 56 fois sur la fibre F.

Nous pouvons observer que les aptamères F124-G, T-SO508 et F5R1 se lient aux fibres R à chaque expérience, tandis que les aptamères N30-G, N124-G, M5-15, Tau 3146 et F5R2 ne se lient pas aux fibres R de manière significativement supérieure par rapport à leur séquences aléatoires associées. Néanmoins, les expériences de liaison aux fibres R sont moins reproductibles et les mesures des k_d et B_{\max} moins précises que pour les fibres F. Nous pouvons ainsi observer que tous les B_{\max} ont des variations de l'ordre de 100%. Ceci est principalement dû au fait que lors de l'expérience du 21/11/19, les quantités moyennes d'oligonucléotide retenues sur la membrane sont plus importantes. Sachant que ce phénomène s'observe aussi pour les séquences aléatoires, cela signifie probablement que la quantité de fibre R retenue sur la nitrocellulose était plus importante pour cette expérience-ci. Les résultats des mesures de k_d pour le F124-G et le T-SO508 sont très reproductibles : k_d de 5.67 nM \pm 41.8% et 18.88 nM \pm 3.8 % respectivement. Pour le F5R1 les résultats des deux expériences sont très différents et le k_d présente une variation de 92.9%.

Ainsi, les aptamères N30-G et N124-G sont donc capables de discriminer la fibre F de la fibre R. Les aptamères F124-G, T-SO508 et F5R1 reconnaissent, eux, les deux fibres. Le F124-G reconnaît les deux fibres de manière similaire (même k_d et B_{\max} de même ordre de grandeur), tandis que les T-SO508 et F5R1 ont des k_d plus faibles pour la fibre F et des B_{\max} plus importants pour la fibre R

d) Analyses des mesures d'affinités pour les fibres P110 d' α -syn

Pour tous les aptamères nous avons réalisé des duplicats de mesures d'affinités contre la fibre 110.

Comme pour les tests de liaisons contre les fibres F et R, les séquences aléatoires semblent se lier aux fibres P110 de manière « spécifique » : les quantités de séquences aléatoires liées aux fibres augmentent de manière hyperbolique en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante et présentent une saturation. La forme de la

saturation de l'hyperbole est même beaucoup plus accentuée pour la fibre P110 que pour les fibres F et R.

Seuls les aptamères T-SO508 et F5R1 se lient aux fibres P110. Néanmoins, les expériences ne sont pas très reproductibles, ainsi le F5R1 ne se lie de manière significativement supérieure par rapport au Scr_ADN que dans l'expérience du 10/12/19. Pour le T-SO508, le B_{\max} calculé est fiable : $48.18 \text{ fmoles} \pm 16.8\%$. Le k_d lui est plus variable : il est calculé à $23.57 \text{ fmoles} \pm 59.4\%$.

Ainsi, l'aptamère T-SO508 semble capable de reconnaître les conformations F, R et P110 de fibres d' α -syn.

e) Analyses des mesures d'affinités pour les monomères d' α -syn

Nous avons réalisé deux tests d'affinités des aptamères contre les monomères. Nos précédentes mises au point nous ont permis de mettre en évidence que 80% des monomères ne restaient pas fixés sur la membrane en présence d'igepal 0.1% lors de la filtration (cf. Résultats II.C.3)c) ci-dessus). Néanmoins, seuls les B_{\max} seront en théorie diminués lors de nos tests d'affinités, et les k_d devraient rester constants et être mesurables lors de nos expériences.

Nous pouvons observer dans la Figure 58-I et le Tableau 14 que les mesures d'affinités pour les monomères sont très peu reproductibles pour certains des aptamères ARN2'F-Py. Ainsi, les aptamères N30-G et F124-G se lient de manière significativement supérieure par rapport au Scr1-G et Scr2-G uniquement lors du test du 10/12/19. Nous ne pouvons donc pas faire de réelles conclusions pour ces aptamères, et d'autres méthodes seront nécessaires pour déterminer l'affinité de ces aptamères pour les monomères d' α -syn. Seul l'aptamère N124-G se lie aux monomères d' α -syn lors des deux tests d'affinités que nous avons réalisés, avec un k_d de $26,52 \text{ nM} \pm 22,6\%$ et un B_{\max} de $35,87 \text{ fmoles} \pm 13,3\%$.

Pour les aptamères ADN, les résultats sont très reproductibles entre les deux tests réalisés. Les aptamères Tau 3146 et F5R2 ne se lient pas de manière significativement supérieure par rapport au Scr_ADN lors deux expériences, tandis que les T-SO508 et F5R1 se lient de manière significative aux monomères d' α -syn. Les mesures de k_d et B_{\max} obtenues sont très reproductibles pour le T-SO508 : K_d de $20.24 \text{ nM} \pm 2.2\%$ et B_{\max} de $31.38 \text{ fmoles} \pm 11.5\%$. Les résultats sont moins reproductibles pour le F5R1 : K_d de $33.03 \text{ nM} \pm 36.9\%$ et B_{\max} de $16.32 \text{ fmoles} \pm 51.2\%$.

f) Analyses des tests d'affinités pour les fibres Amyloïde- β et Tau 1N3R

Nous avons réalisé deux tests d'affinités des aptamères contre les fibres A β et Tau 1N3R.

Les quantités de séquences aléatoires retenues dans la cadre de ces expériences, contrairement aux mesures réalisées pour les fibres F et R, ne variaient pas entre les deux expériences pour Tau 1N3R : à 50 nM d'oligonucléotide, entre 10 et 15 fmoles de Scr1-G et de Scr2-G sont retenus par les fibres Tau 1N3R et entre 5 et 10 fmoles de Scr ADN. Pour A β , nous

avons pu observer qu'en moyenne deux fois plus de séquences aléatoires étaient retenues lors de l'expérience du 10/01/20 par rapport à celle du 09/01/20 : à 50 nM environ 6 fmoles de Scr1-G et de Scr2-G et 4 fmoles de Scr_ADN sont retenues par les fibres A β , tandis que le 10/01/20 15 fmoles de Scr1-G et de Scr2-G et 9 fmoles de Scr_ADN sont retenus. Nous avons aussi pu observer qu'en moyenne deux fois moins de Scr_ADN était retenus sur les fibres Tau 1N3R ou A β que de Scr1-G et Scr2-G.

Les résultats des tests d'affinités des aptamères pour Tau1N3R sont très reproductibles. Les aptamères Tau 3146 et F5R1 n'ont aucune affinité pour les fibres Tau1N3R. Et nous avons pu également observer qu'au contraire les aptamères N30-G, N124-G, F124-G, T-SO508 et F5R1 se liaient fortement aux fibres Tau1N3R par rapport à leurs séquences aléatoires associées. Néanmoins, nous avons pu observer que cette interaction semblait « non spécifique ». En effet, les quantités d'oligonucléotides liées aux fibres Tau1N3R augmentent de manière linéaire et non saturable en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante. Le logiciel Prism a pu calculer des k_d et B_{max} , mais les résultats obtenus sont aberrants car les calculs sont réalisés à partir d'un modèle de liaison de type « spécifique », qui ne décrit pas correctement les données observées. Ainsi, certains k_d calculés dépassent la centaine de nanomolaire. Ces résultats sont étranges et nécessiteraient plus d'investigations pour comprendre ces interactions. Nous ne pouvons en tout cas pas conclure sur l'affinité des aptamères N30-G, N124-G et F124-G pour les fibres Tau 1N3R à ce stade-ci de nos résultats.

L'aptamère ADN T-SO508 semble quant à lui se lier aux fibres Tau1N3R selon un modèle d'interaction de type « spécifique ». Les résultats sont très reproductibles : le k_d calculé est de 67.77 nM \pm 19.5% et B_{max} de 84.99 fmoles \pm 3.4%. Pour l'aptamère F5R1 nous avons été confronté à un problème de reproductibilité. Bien que les résultats entre les deux expériences soient grandement similaires, la première gamme semble alors avoir un comportement de type « non spécifique » sans saturation alors que pour la deuxième au contraire nous pouvons observer une saturation. Ceci explique la différence d'un facteur 10 observée dans les calculs des K_d et B_{max} .

Concernant les tests de liaison aux fibres A β , seuls les aptamères N124-G, F124-G, T-SO508 et F5R1 montrent une liaison aux fibres A β . Néanmoins nous sommes confrontés également à des problèmes de reproductibilité. Ainsi, le T-SO508 se lie aux fibres A β avec un k_d de 43.21 nM \pm 4.4%, et un B_{max} de 22.24 \pm 58.1%. Les variations du B_{max} étant corrélées à celles du Scr_ADN, nous pouvons faire l'hypothèse que ces variations sont liées à une différence de quantité de fibres A β retenue sur la nitrocellulose. Concernant les N124-G et F124-G, on peut observer que pour l'une des expériences celui-ci ne se lie pas aux fibres A β de manière significativement différente du Scr1-G, tandis que pour l'autre cet aptamère se lie de manière « spécifique ». Enfin, le F5R1 semble se lier aux fibres de manière « non spécifique » : les k_d et B_{max} calculés sont donc très grands.

Ces résultats suggèrent que l'aptamère T-SO508 se lie aux fibres Tau1N3R et A β de manière spécifique avec des k_d de l'ordre de 70 et 40 nM. Les aptamères N30-G, N124-G et F124-G interagissent très fortement avec les fibres Tau 1N3R, sans que nous puissions déterminer si cette interaction est de type spécifique ou non. De même, le F5R1 interagit très

fortement avec les fibres A β , sans que nous puissions déterminer si cette interaction est de type spécifique ou non.

Bilan :

Ces tests nous ont permis de mesurer l'affinité des aptamères pour les fibres F et R. Ainsi, les aptamères N30-G et N124-G se lient à la fibre F d' α -syn avec des k_d inférieurs à 10 nM et sont capables de la distinguer de la fibre R pour laquelle ils n'ont pas d'affinité. Les aptamères F124-G, T-SO508 et F5R1 reconnaissent, eux ces deux conformations de fibres, mais avec des affinités différentes pour les T-SO508 et F5R1. Les aptamères Tau3146, M5-15 et F5R2 n'ont d'affinité pour aucune des deux conformations.

Il est plus difficile de statuer définitivement sur les tests d'affinité pour les monomères d' α -syn, les fibres P110 d' α -syn et les fibres Tau1N3R et A β , car les résultats manquent parfois de reproductibilité. Ceci peut s'expliquer par le fait que les conditions de tests ont été optimisées pour les fibres F et R et non pour les autres protéines. Néanmoins, certaines conclusions importantes peuvent être avancées:

- L'aptamère T-SO508 se lie à chacune des conformations de protéines testées, mais avec des affinités différentes (k_d et B_{max} différents).
- L'aptamère N124-G semblerait avoir une affinité pour les monomères d' α -syn, mais il serait plus fiable de confirmer ces résultats avec une autre méthode de mesure.
- Enfin, les aptamères ARN2'F-Py ont une affinité très forte pour les fibres Tau1N3R. Néanmoins, cette affinité est étrange car elle ressemble à une interaction de type « non spécifique ». D'autres méthodes de mesures d'affinités sont donc nécessaires pour étudier cette interaction.

En conclusion, nous pouvons dire que l'aptamère N30-G est très prometteur pour notre objectif, qui était de d'isoler un aptamère permettant de distinguer les fibres F et R. Il n'a en effet aucune affinité pour la fibre R et reconnaît la fibre F avec un k_d moyen de 6.62 nM et un B_{max} de 52 fmol \pm 30%. Il est néanmoins nécessaire de vérifier que le N30-G n'a pas d'affinité pour les monomères d' α -syn.

3) Mesure de l'affinité pour la fibre F et les monomères d' α -synucléine par Thermophorèse à micro-échelle

Suite aux résultats précédents, nous avons souhaité vérifier l'affinité de nos aptamères par une méthode différente de la filtration sur nitrocellulose.

Pour le choix de la 2^{ème} méthode de mesure d'affinité, un critère important a été pris en compte : nous souhaitons mesurer l'affinité de l'aptamère N30-G pour les monomères d' α -syn. En effet, cette affinité n'avait pas pu être mesurée avec fiabilité lors des expériences de filtration sur nitrocellulose. Cette donnée était cependant cruciale car notre objectif final est de pouvoir utiliser le N30-G dans un échantillon, et il sera donc nécessaire que le N30-G puisse distinguer la fibre F des monomères d' α -syn.

Nous avons finalement choisi d'utiliser la méthode de la thermophorèse à micro-échelle (MST, de l'anglais microscale thermophoresis). Ces mesures ont été réalisées à l'institut Pasteur, à la plateforme de biophysique moléculaire.

a) Présentation de la méthode de « thermophorèse à micro-échelle »

La thermophorèse à micro-échelle mesure la force de l'interaction entre une molécule marquée par un fluorophore (dans notre cas, les oligonucléotides) et sa cible (dans notre cas les fibres F et monomères d' α -syn) en analysant le changement de la thermophorèse de ces molécules lors d'une excitation laser de la solution dans laquelle elles sont. Les mesures sont faites en solution dans de fins capillaires de verre (Figure 59-A). Un gradient de température microscopique, induit par un laser proche infrarouge, est appliqué pendant un temps court aux capillaires contenant les solutions (Figure 59-B). Le signal en résultant est détecté et tracé en fonction de la concentration du ligand pour obtenir une courbe dose-réponse, à partir de laquelle l'affinité de liaison est automatiquement calculée (Figure 59- C et D).

Nous avons choisi cette méthode car elle ne nécessitait aucune immobilisation d'un des deux partenaires (protéine ou aptamère), et présentait ainsi une méthode complémentaire à la filtration sur nitrocellulose pour la mesure de l'affinité des aptamères.

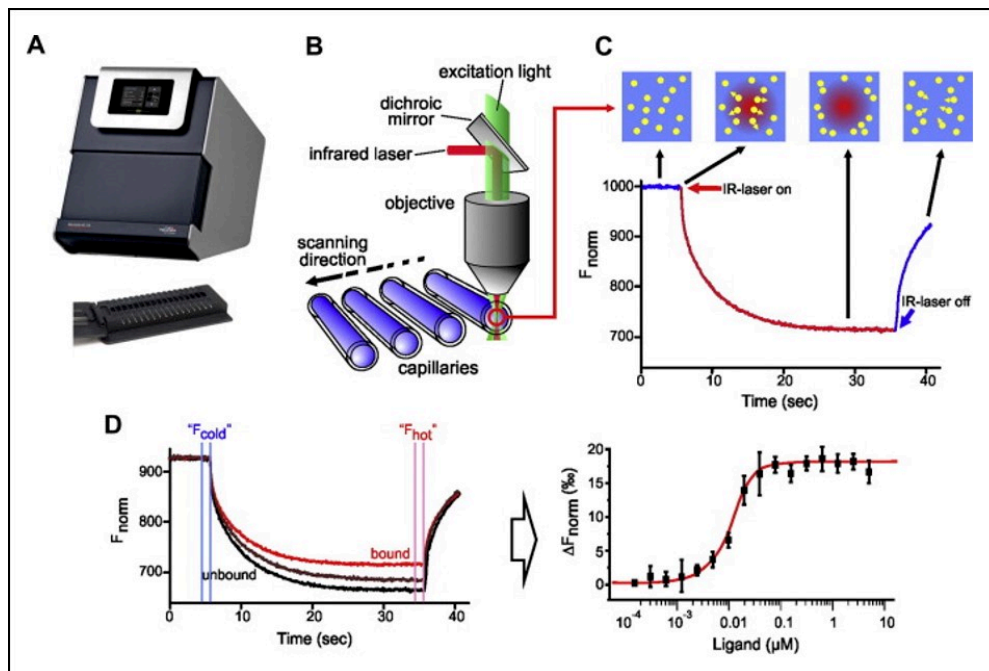


Figure 59 - Fonctionnement des mesures et analyses réalisées avec le MST. A – Présentation de l'appareil « Monolith NT.115 » de NanoTemper Technologies GmbH. L'image ci-dessus montre le plateau capillaire pouvant accueillir jusqu'à 16 capillaires. B - Représentation schématique de l'optique MST. Les mesures de MST sont réalisées dans des capillaires d'un volume total d'environ 4 μ L. La fluorescence à l'intérieur du capillaire est excitée et détectée par le même objectif. Un laser Infrarouge focalisé est utilisé pour chauffer localement un volume d'échantillon défini. La thermophorèse des molécules fluorescentes à travers le gradient de température est détectée. C - Signal typique issu d'une expérience MST. Dans un premier temps, les molécules sont réparties de manière homogène et une « fluorescence initiale » constante est détectée. Dans la première seconde après l'activation du laser, on observe le « T-Jump » (saut de température), ce qui correspond à un changement rapide des propriétés du fluorophore dû au changement rapide de température. Par la suite, un mouvement thermophorétique des molécules marquées par

fluorescence hors du volume d'échantillon chauffé peut être détecté. Après la désactivation du laser, un saut en T inverse se produit, suivi de la « rétrodiffusion » des molécules, qui est uniquement entraînée par la diffusion de masse. D – Signaux typiques issus d'un test d'affinité entre deux molécules. Le mouvement thermophorétique d'une molécule fluorescente (courbe noire, correspondant au « non liée ») change lors de la liaison à un ligand non fluorescent (courbe rouge; « lié »), résultant en des courbes différentes. Pour l'analyse, le changement de thermophorèse est exprimé comme le changement de la fluorescence normalisée (ΔF_{norm}), qui est définie comme F_{hot} / F_{cold} (les valeurs F correspondent aux valeurs de fluorescence moyennes entre les zones définies marquées par les curseurs rouge et bleu, respectivement). Le titrage du ligand non fluorescent entraîne un changement progressif de la thermophorèse, qui est tracé comme ΔF_{norm} pour donner une courbe de liaison, qui peut être ajustée pour dériver des constantes de liaison. Adaptée de (Jerabek-Willemsen et al., 2014).

b) Mesures d'affinité du N30-G pour les fibres F et les monomères d' α -syn

Nous avons marqué de manière fluorescente l'aptamère N30-G et sa séquence aléatoire associée le Scr2-G par hybridation à une amorce ADN « SpG » marquée en 5' avec le fluorophore Cy5 (Figure 60- A et B).

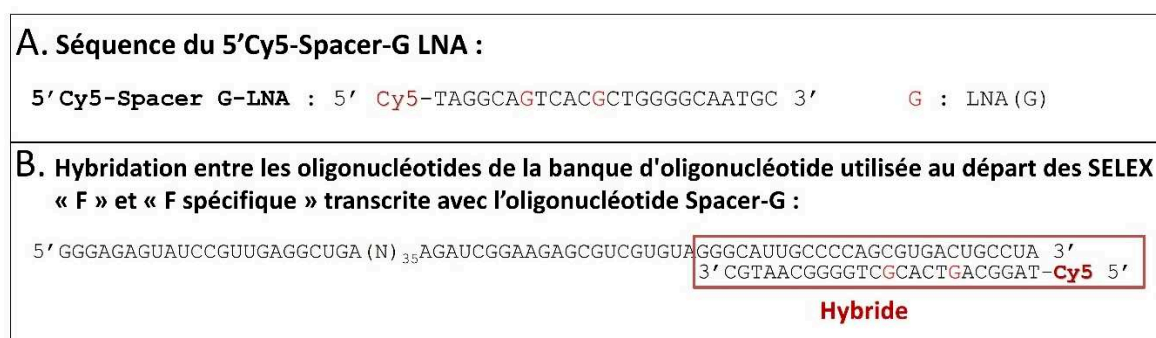


Figure 60 – Marquage fluorescent des oligonucléotides par hybridation avec le 5'-Cy5-Spacer-G-LNA. A – Séquence du 5'Cy5-Spacer-G LNA. B – Schéma de l'hybridation entre le 5'Cy5-SpG-LNA et les oligonucléotides de la banque utilisée au départ des SELEX « F » et « F spécifique » transcrits en ARN2'F-Py.

Lors d'une mesure par MST, la fluorescence doit être constante, nous avons donc réalisé une gamme de concentration en protéine, en gardant la quantité d'oligonucléotide constante, plutôt qu'une gamme de concentration en oligonucléotide comme nous l'avons fait lors des mesures d'affinité par filtration sur nitrocellulose. La concentration en oligonucléotide restait constante à 10 nM, et nous avons réalisé une gamme de concentration en protéine de 16 points (pour les 16 capillaires), diluée de deux en deux allant de 5 μ M à 0.53 nM. Les conditions de mesures ont été les mêmes que celles utilisées lors des tests d'affinité par filtration sur nitrocellulose : Igepal 0.1% et ADNss comme compétiteur non-spécifique en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides.

Nous pouvons observer Figure 61, les signaux obtenus à l'issus des tests d'affinité par MST, ainsi que les courbes dose-réponse qui ont été calculées à partir des données obtenues.

Lors des mesures d'interaction entre le N30-G, le Scr2-G et les monomères d' α -syn, nous avons pu observer qu'il n'y a pas de changement dans l'allure de la variation de la fluorescence au cours du temps, quelle que soit la concentration en protéine. Ces résultats suggèreraient que le N30-G, le Scr2-G n'entrent pas en interaction avec les monomères d' α -syn. Cependant, une limite de la technique du MST est que certaines interactions entre biomolécules ne sont pas détectées, et l'on ne peut pas donc statuer définitivement sur une absence d'interaction entre les N30-G, le Scr2-G et les monomères d' α -syn.

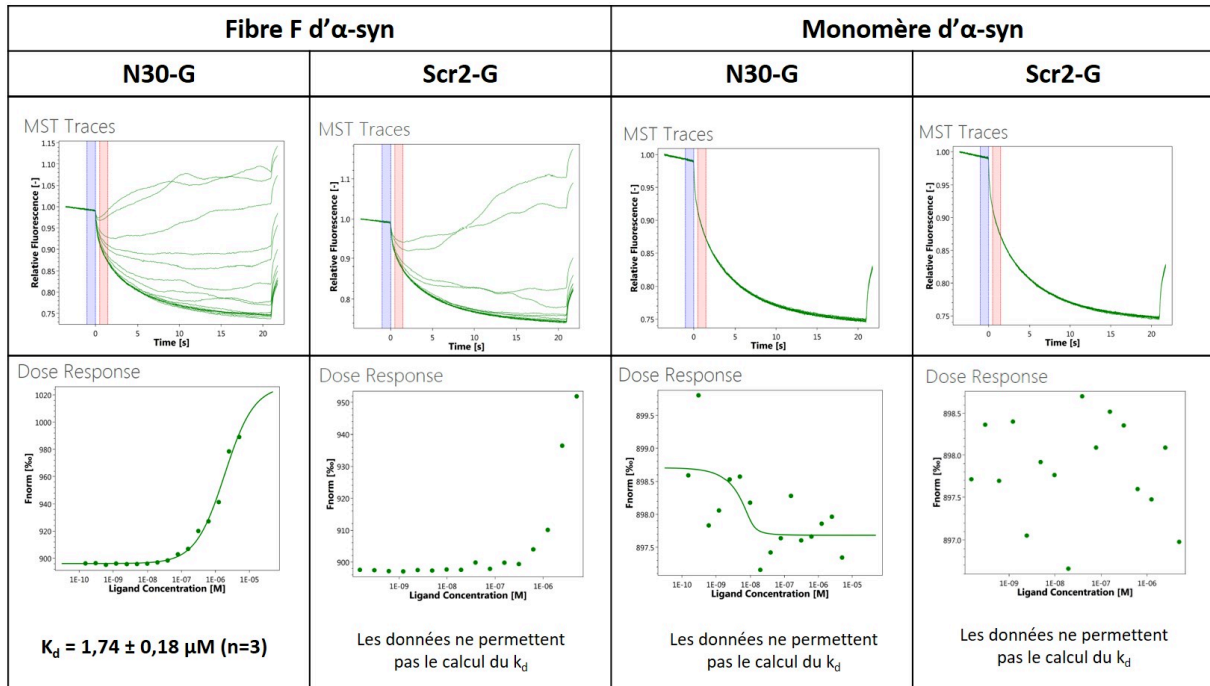


Figure 61 - Mesure de l'affinité du N30-G et du Scr2-G pour la fibre F et les monomères d' α -synucléine par thermophorèse à micro-échelle. Nous avons mesuré à l'aide d'un MST, l'interaction du N30-G et du SCR2-G pour les monomères et les fibres F d' α -syn. Pour cela le MST a mesuré la thermophorèse d'une dilution sériée de protéine (fibres F ou monomères d' α -syn, de 0.153 nM à 5 μ M) en mélange avec 10 nM de N30-G ou de Scr2-G hybridés au 5'Cy5-SpG-LNA fluorescent. Ces solutions étaient en Ts1X, Igepal 0.1% et ssDNA en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (3.465 μ g/ml). Cette figure présente les signaux obtenus à l'issus des tests d'affinité par MST, ainsi que les courbes doses-réponses qui ont été calculées à partir des données obtenues.

Lors des mesures d'interaction entre le N30-G, le Scr2-G et les fibres F d' α -syn, nous avons pu observer des changements dans l'allure de la variation de la fluorescence au cours du temps, pour les concentrations en protéine les plus élevées. Ceci suggère que le N30-G et le Scr2-G entrent bien en interaction avec les fibres F. On observe une modification forte du signal du MST pour : les quatre dernières concentrations pour le Scr2-G (c'est-à-dire à partir de 625 nM de fibre F), et pour les cinq ou six dernières concentrations pour le N30-G (c'est-à-dire à partir de 153 ou 312 nM de fibre F). Les signaux MST pour ces concentrations les plus hautes ont des variations très fortement irrégulières, qui sont caractéristiques de la présence d'agrégats dans les mélanges de mesures d'affinité. Pour tracer les courbes doses-réponses nous avons dû, à cause des variations dues à la présence d'agrégats, sélectionner comme valeur

de signal après excitation (F « hot », cf. Figure 59-D), une zone très près du début de l'excitation (zone surlignée en rouge dans les signaux MST de la Figure 61), alors que habituellement la zone sélectionnée est située à la fin du changement de signal, assez tard après le début de l'excitation laser.

Néanmoins, le logiciel de traitement de signal du MST n'est pas parvenu à calculer un k_d pour l'affinité du Scr2-G aux fibres F. Ceci est dû au fait qu'il aurait été nécessaire d'avoir des mesures pour des concentrations plus élevées de fibre F, afin de pouvoir observer la fin de la stabilisation des signaux vers la forme des signaux correspondant à l'état « liés » des oligonucléotides aux fibres F (cf. courbe « rouge » dans la Figure 61-D).

Le changement des signaux commençant pour des concentrations plus faibles pour le N30-G, les signaux ont atteint la forme correspondante à celle de l'état « lié » pour les deux dernières concentrations, et le logiciel a pu calculer un k_d pour cette interaction. Cette mesure ayant été réalisée en triplicat, nous obtenons la mesure suivante du $k_d = 1.74 \pm 0.18 \mu\text{M}$. Ce k_d est très éloigné de celui précédemment calculé par filtration sur nitrocellulose ($6.62 \text{ nM} \pm 4.8\%$).

Cette différence peut s'expliquer par le fait que le nombre de sites accessibles pour les aptamères n'est pas en réalité égal au nombre de monomère en présence, c'est-à-dire qu'un aptamère ne peut se lier à chaque monomère constituant les fibres. Des investigations sur le B_{max} assez faible du N30-G (environ 50 fmoles), nous ont conduit à formuler l'hypothèse que le N30-G ne reconnaîtrait qu'un monomère d' α -syn sur 125 le long de la fibre F. Ainsi, le k_d de $1.74 \mu\text{M}$ prend en compte l'ensemble des monomères présents, mais si l'on prend en compte le nombre de sites accessibles, on peut recalculer le k_d à 13.92 nM , ce qui est très proche du k_d calculé par filtration sur nitrocellulose ($6.62 \text{ nM} \pm 4.8\%$).

Au-delà de cette hypothèse, une observation est certaine : le N30-G a une affinité pour les fibres F supérieure de 10 à 100 fois au Scr2-G. En effet le changement de signal de fluorescence débute pour le N30-G à une concentration 10 à 100 fois supérieure par rapport à celle pour le Scr2-G.

Bilan :

Ces tests d'affinités par MST nous ont permis d'utiliser une autre méthode que la filtration sur nitrocellulose pour vérifier les affinités du N30-G et du Scr2-G pour les monomères et les fibres F d' α -syn.

La technique de MST ne nous a pas permis de détecter d'interaction entre le N30-G, le Scr2-G et les monomères d' α -syn. Néanmoins, une limite de la technique du MST est que certaines interactions entre biomolécules ne sont pas détectées, et nous ne pouvons donc pas statuer définitivement sur une absence d'interaction entre deux molécules.

Des changements observés dans les signaux du MST nous ont permis de détecter une interaction entre le N30-G, le Scr2-G et les fibres F d' α -syn. Néanmoins, le signal du MST n'est pas parvenu à calculer un k_d pour l'affinité du Scr2-G aux fibres F. Il aurait été nécessaire pour que le calcul puisse aboutir, d'avoir des mesures pour des concentrations plus élevées de fibre F.

Le k_d calculé pour l'interaction N30-G/fibre F est de $k_d = 1.74 \pm 0.18 \mu\text{M}$, ce qui est très éloigné du k_d précédemment calculé par filtration sur nitrocellulose ($6.62 \text{ nM} \pm 4.8\%$). Nous avons avancé une hypothèse pour expliquer cette différence : le B_{max} très faible (50 fmoles) mesuré pour le N30-G par filtration sur nitrocellulose, suggère que le N30-G ne reconnaîtrait qu'un monomère d' α -syn sur 125 le long de la fibre F. Ainsi, le k_d de $1.74 \mu\text{M}$ prend en compte l'ensemble des monomères présents, mais si l'on prend en compte le nombre de sites accessibles, on peut recalculer le k_d à 13.92 nM , ce qui est très proche du k_d calculé par filtration sur nitrocellulose ($6.62 \text{ nM} \pm 4.8\%$). Au-delà de nos hypothèses, une observation est certaine : le N30-G a une affinité pour les fibres F supérieure de 10 à 100 fois au Scr2-G.

B. Test de compétition entre les différents aptamères, et des anticorps anti - α -synucléine pour les fibres F et R d' α -synucléine par filtration sur nitrocellulose

Afin de déterminer si les aptamères ont le même site de liaison sur les fibres F et R, nous avons mené des tests dans lesquels les aptamères ont été mis en compétition les uns par rapport aux autres. Si deux aptamères ont le même site de liaison sur la cible, lorsqu'ils seront mis en présence l'un de l'autre, ils seront alors en « compétition » pour ce site de liaison. La quantité d'aptamère liée diminuera donc comparativement à celle mesurée lorsqu'ils sont seuls, et celui ayant la meilleure affinité sera le moins impacté. Si les aptamères ont au contraire des sites de liaison différents sur la cible, ils ne seront pas en compétition, et la liaison des deux aptamères sera inchangée.

Nous avons réalisé des tests de compétition pour les aptamères présentant une affinité pour les fibres F et R : N30-G, N124-G, F124-G, T-SO508 et F5R1. Nous les avons mis en compétition entre eux et aussi avec les séquences aléatoires (Scr1-G, Scr2-G et le Scr_ADN, qui servent de témoin négatifs). Nous avons aussi mis les aptamères en compétition avec différents anticorps anti- α -syn, ciblant différents sites de liaison sur la protéine α -syn. Les tests de compétitions avec les anticorps pourraient donc permettre d'avoir une idée plus précise du site de liaison des aptamères.

Nous avons réalisé ces tests de compétition par filtration sur nitrocellulose. Chaque aptamère testé (N30-G, N124-G, F124-G, T-SO508 et F5R1), a été marqué radioactivement et mélangé à 10 nM aux compétiteurs (oligonucléotides non marqués ou anticorps), eux-mêmes à 10 nM . Les mélanges ont ensuite été présentés dans les mêmes conditions que les tests d'affinité par nitrocellulose aux fibres F ou R à 250 nM . Après incubation et filtration sur nitrocellulose, nous avons pu analyser les résultats.

Nous avons choisi pour cette expérience 4 anticorps différents, ciblant différents épitopes sur la protéine α -syn : l'anticorps Syn 1 (BD Bioscience: 610786) qui cible les acides aminés 15 à 123, le « 5G4 » qui cible les acides aminés 47 à 52, le « 10C3 » qui cible les acides aminés 98-105, le « 10D2 » qui cible les 119 à 126 (Kovacs et al., 2012). Les anticorps eux-mêmes ont été présentés à 10 nM pour la compétition. La masse moléculaire d'un IgG étant de 150 kg/mol , 10 nM correspond à $1.5 \mu\text{g/ml}$.

1) Résultats des tests de compétitions pour la fibre F

Nous pouvons observer Figure 62 les résultats de tests de compétition des aptamères pour les fibres F. Les graphiques représentent pour chaque aptamère radioactivement marqué (que l'on note alors avec un astérisque *), le pourcentage de la quantité d'aptamère restée liée sur la nitrocellulose en présence de compétiteur par rapport à la quantité d'aptamère restée liée en absence de compétiteur. Ceci correspond à la différence entre la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose en présence de compétiteur, et en absence de compétiteur, par rapport à la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose absence de compétiteur. Lorsque le ratio est égal à 0 cela signifie qu'il n'y a pas de différence entre la quantité d'aptamère restée liée en présence ou en absence de compétiteur. Lorsque le ratio est égal à -0.5, cela signifie que la quantité d'aptamère restée liée à la membrane a diminué de moitié en présence de compétiteur par rapport à la quantité présente en absence de compétiteur.

Nous avons pu observer que malheureusement les résultats de compétition contre la fibre F n'étaient pas toujours très reproductibles.

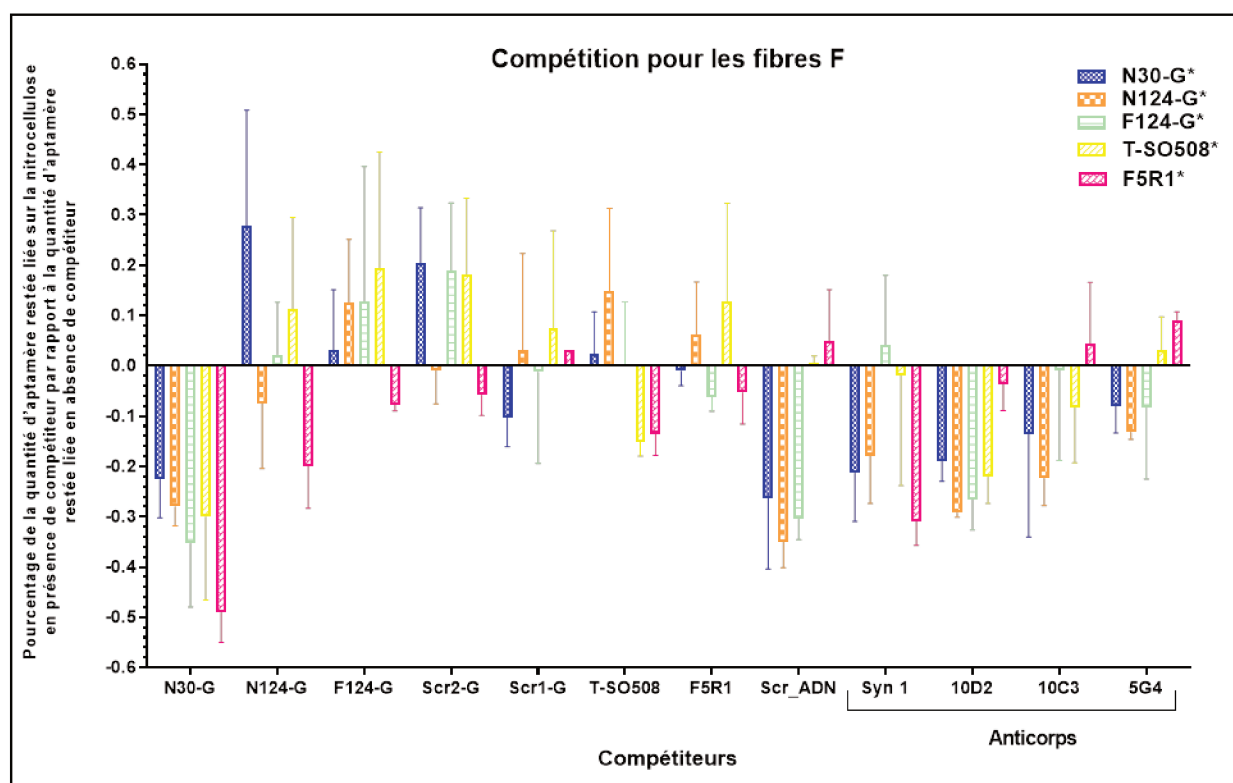


Figure 62 - Test de compétition entre les différents aptamères, et des anticorps anti - α -synucléine pour les fibres F d' α -synucléine. Ce graphique présente les résultats des tests de compétitions des aptamères pour les fibres F. Nous pouvons observer pour chaque aptamère testé, le pourcentage de la quantité d'aptamère restée liée sur la nitrocellulose en présence de compétiteur par rapport à la quantité d'aptamère restée liée en absence de compétiteur. Ceci correspond à la différence entre la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose en présence de compétiteur, et en absence de compétiteur, par rapport à la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose absence de compétiteur. Les aptamères testés (Hybridés comme précédemment pour les aptamères ARN2'F-Py avec un SpG-LNA radiomarqué au P³², ou

marqués directement pour les oligonucléotides ADN) à 10 nM ont été mélangés aux compétiteurs (oligonucléotides ou anticorps) à 10 nM également. Le mélange a été présenté aux fibres F d' α -syn à 250 nM dans une solution de Ts1X contenant de l'Igepal à 0.1% et de l'ADNss ajouté en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (c'est-à-dire à hauteur de 1.7 μ g/ml). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, 25 μ L de chaque mélange est déposé sur la membrane nitrocellulose, puis filtré. Deux lavages au Ts1X sont ensuite réalisés. Les quantités d'oligonucléotides retenues sur la membrane nitrocellulose sont quantifiées par exposition de la membrane à un écran au phosphore photostimulable. Chaque point correspond au minimum à un triplicat de tests ayant été réalisés à des jours différents, à l'exception des tests où les anticorps 10D2 et 10C3 ont été utilisés comme compétiteurs, et qui ont été réalisés en duplicats.

Nous avons réalisé une première observation étonnante : certains compétiteurs augmentent la quantité d'aptamère restée liée à la cible par rapport à la condition sans compétiteur. Ainsi, lorsque le N30-G* est en présence du N124-G, la quantité de N30-G* lié à la cible est de 27.7% \pm 20% supérieur à la quantité liée en absence de compétiteur. Ces résultats peuvent être cependant relativisés : tous les points pour lesquels la présence de compétiteur améliore la liaison ont des écarts-type importants, et ne sont donc pas très fiables.

a) Analyse de tests avec les séquences aléatoires comme compétiteurs

Les séquences aléatoires servent de témoins négatifs pour les compétiteurs. Elles ne peuvent entrer en compétition avec les aptamères que pour les sites de liaison de type « non-spécifique », et ne doivent donc à priori pas beaucoup baisser la quantité d'aptamère liée à la cible lorsqu'ils sont utilisés comme compétiteur.

Nous pouvons observer qu'en effet les Scr1-G et le Scr2-G ne baissent pas de manière très forte les quantités d'aptamères restées liées sur la nitrocellulose. Pour certains aptamères l'ajout l'addition de Scr1-G et Scr2-G semble même augmenter la quantité restée lié sur la nitrocellulose.

Lorsque le Scr_ADN est utilisé comme compétiteur, on peut cependant observer que de manière étonnante les quantités de N30-G*, N124-G* et F124-G* restées liées à la nitrocellulose diminuaient très fortement (de -26% pour le N30-G* à -35% pour le N124-G*). Au contraire les quantités de T-SO508* et de F5R1* restées liées sont, elles, très peu impactées par la présence du Scr_ADN. Cette observation était très étonnante : une séquence aléatoire n'est pas un compétiteur ayant à priori beaucoup d'impact pour des aptamères ayant une bonne affinité pour leur cible. Néanmoins, nous avons pu expliquer cette observation de manière simple. Le SCR_ADN est en réalité le PiRT-HTS, une amorce utilisée pour l'amplification PCR des oligonucléotides en vue du séquençage des banques (cf. Résultats, partie III.A.2)a) ci-dessus). Le SCR_ADN est donc complémentaire de 25 paires de base de la séquence des oligonucléotides, au niveau de la partie constante en 5' de la banque (cf. *Figure 63*). On peut envisager que le PiRT HTS en entrant en interaction avec les oligonucléotides peuvent déstabiliser le SpG-LNA* : la diminution de la quantité d'oligonucléotide ARN2'F-Py restée liée à la nitrocellulose pourrait donc s'expliquer en réalité par la perte du traceur radioactif (le SpG-LNA*). Néanmoins, cette hypothèse est peu probable car le SpG-LNA possède deux « G » LNA

qui garantisse une interaction très forte pour l'oligonucléotide avec lequel il est hybridé. L'hypothèse qui nous a paru la plus probable pour expliquer la diminution de l'accroche des oligonucléotides ARN2'F-Py, est que l'hybridation du PiRT HTS les empêchaient de prendre la structure nécessaire à leur liaison sur la fibre F. Cette hypothèse implique que les oligonucléotides ARN2'F-Py se lient aux fibres F par interaction spécifique liée à une structure particulière, et non par interaction non-spécifique, qui ne nécessite pas de structure particulière de la part des oligonucléotides.

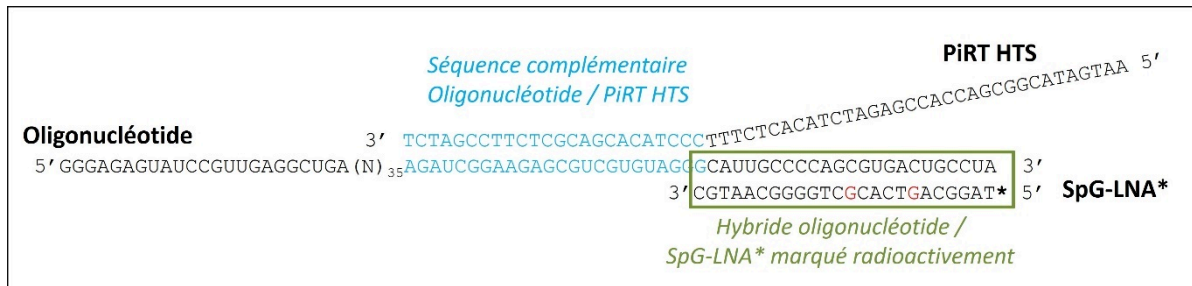


Figure 63 – Hybridation des oligonucléotides ARN2'F-Py avec le Scr_ADN (i.e l'amorce PiRT HTS). Les oligonucléotides ARN2'F-Py sont hybridés lors des tests de compétition au SpG-LNA qui est lui-même marqué radioactivement. L'amorce PiRT HTS (le Scr_ADN) est complémentaire des oligonucléotides au niveau de la partie constante en 5' des oligonucléotides

b) Analyse de tests avec les aptamères comme compétiteurs

Parmi les oligonucléotides utilisés comme compétiteurs, nous avons pu observer que le N30-G était celui ayant le plus d'efficacité pour diminuer la quantité d'oligonucléotides* liés à la nitrocellulose : sa présence baisse de 28% le N124-G*, de 35% le F124-G*, de 30% le T-SO508*, de 49% celle du F5R1* et baisse lui-même de 23%. Ceci suggère que les aptamères ont à priori le même site de liaison sur la fibre F. Nous pouvons aussi observer que la quantité de N30-G* liée à la nitrocellulose est en moyenne très faiblement diminuée par la présence de d'autres oligonucléotides compétiteurs. Ces résultats suggèrent que le N30-G a une affinité supérieure pour les fibres F par rapport aux autres oligonucléotides.

Néanmoins, ces résultats sont étonnants car ces aptamères ont des spécificités différentes. En effet les N30-G et N124-G sont capables de reconnaître la fibre F, le F124-G est capable de reconnaître les fibres F et R pour le F124-G, et les T-SO508 et le F5R1 sont capables de reconnaître les fibres F, R et P110 (cf. Tableau 14). Ainsi, il était plus logique de penser que les aptamères reconnaissaient des sites de liaisons différents sur les fibres d' α -syn, et que la spécificité des aptamères s'expliquait par la présence ou non des sites de liaison reconnus sur les différentes conformations de fibres d' α -syn.

c) Analyse de tests avec les anticorps comme compétiteurs

Parmi les anticorps utilisés comme compétiteurs, le « 5G4 » semble être celui le moins capable de diminuer la quantité d'oligonucléotide* restée liée à la membrane. On pourrait donc

potentiellement envisager d'utiliser l'anticorps « 5G4 » en « sandwich » avec les aptamères pour réaliser un test de détection des fibres F d' α -syn (cf. partie V.E.1) ci-dessus). L'anticorps « 10C3 » semble avoir un impact surtout sur les N30-G* et N124-G* : il diminue leur liaison de 13 et 22%. L'anticorps « Syn1 » n'a pas d'impact important sur le F124-G* et le T-SO508*, mais sa présence diminue de 17%, 21% et 30% les liaisons des N124-G*, N30-G* et F5R1*. L'anticorps « 10D2 » n'a pas d'impact sur la F5R1*, mais diminue entre 20% et 30% la liaison des N30-G*, N124-G*, F124-G*, T-SO508*.

Ainsi, le N30-G* et le N124-G* sont impactés par les anticorps « Syn1 », « 10D2 » et « 10C3 ». Les anticorps « 10D2 » et « 10C3 », reconnaissant respectivement les acides aminés 98 à 105 et 119 à 126, n'ont pas d'épitope en commun, ce qui ne nous permet pas de statuer définitivement sur le site de liaison des N30-G et N124-G. Néanmoins, les résultats suggèrent que le site de liaison de ces aptamères est plutôt situé au niveau de la partie C-terminale de l' α -syn. Les F124-G* et T-SO508* sont eux, impactés seulement par le 10D2. Ceci suggère qu'ils reconnaissent l' α -syn au niveau de l'épitope reconnu par le 10D2 mais pas par les autres anticorps : ce qui correspond aux acides aminés 123 à 126 et suggère un site de liaison au niveau C-terminal de l' α -syn. Ces résultats ne sont pas cohérents pour le T-SO508 avec les résultats de test d'affinité contre la P110. En effet, Le T-SO508 se lie avec un k_d de 23,57 nM \pm 59,4% à la fibre P110 d' α -syn, ce qui suggérerait que le site de liaison de cet aptamères se trouvait au niveau N-terminal de l' α -syn, entre les acides aminés 0 à 110. L'aptamère F5R1* est impacté seulement par l'anticorps « Syn-1 » qui reconnaît un épitope très large : les acides aminés 15 à 123. Ce résultat ne donne donc pas beaucoup d'indication sur la situation du site de liaison du F5R1 sur α -syn.

2) Résultats de compétition pour la fibre R

Contrairement aux tests de compétition contre la fibre F, ceux de la fibre R sont très reproductibles. De même, toujours contrairement aux tests de compétition contre la fibre F, à quelques rares exceptions les quantités d'aptamère restées liées à la cible en présence de compétiteur sont toujours inférieures ou égales aux quantités retenues lors des conditions sans compétiteur, ce qui est logique.

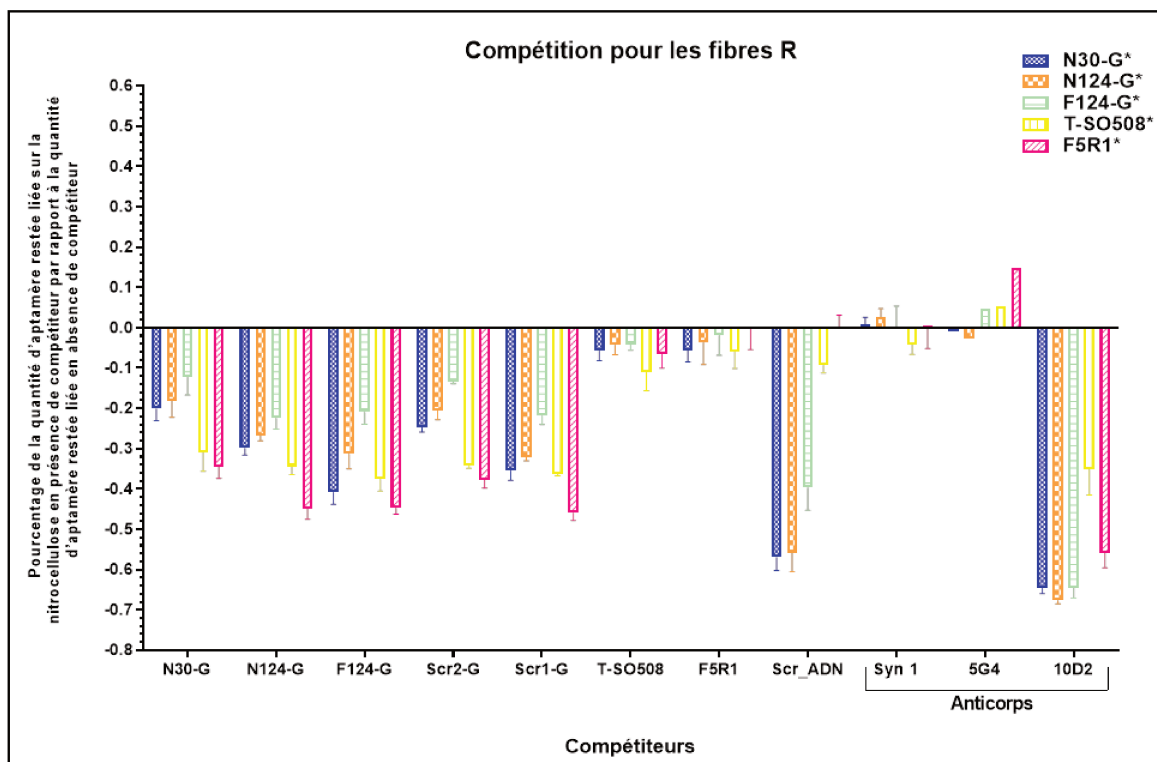


Figure 64 - Test de compétition entre les différents aptamères, et des anticorps anti- α -synucléine pour les fibres R d' α -synucléine. Ce graphique présente les résultats des tests de compétitions des aptamères pour les fibres R. Nous pouvons observer pour chaque aptamère testé, le pourcentage de la quantité d'aptamère restée liée sur la nitrocellulose en présence de compétiteur par rapport à la quantité d'aptamère restée liée en absence de compétiteur. Ceci correspond à la différence entre la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose en présence de compétiteur, et en absence de compétiteur, par rapport à la quantité d'aptamère restée liée à la membrane nitrocellulose absence de compétiteur. Le protocole utilisé est le même que celui ayant été présenté dans la Figure 62. Chaque point correspond au minimum à un triplicat de tests ayant été réalisés à des jours différents, à l'exception des tests où les anticorps 10D2 ont été utilisés comme compétiteurs, et qui ont été réalisés en duplicats, et des tests où l'anticorps 5G4 a été testé et qui n'ont été réalisés qu'une seule fois.

a) Analyse de tests avec les séquences aléatoires comme compétiteurs

Nous avons pu observer que, comme pour les tests de compétition contre la fibre F, le Scr_ADN (PiRT HTS) diminue très fortement la quantité d'oligonucléotide restée liée pour les ARN2'F-Py : Les N30-G* et N124-G* voient leur liaison chuter d'environ 60%, tandis que le F124-G* voit sa liaison diminuer de 40% environ. Le F5R1* et le T-SO508* ne sont pas impactés. Ceci peut s'expliquer, comme pour les tests de compétition pour la fibre F, par le fait le PiRT HTS peut s'hybrider aux oligonucléotide ARN2'F-Py (cf. Figure 63). Néanmoins, les N30-G* et N124-G* n'ont pas d'affinité pour la fibre R, et ne se lient à celle-ci que de manière « non spécifique » (cf. Tableau 14). Ceci discrédite donc l'hypothèse que nous avons formulée lors de l'analyse des résultats pour les tests de compétition sur la fibre F selon laquelle le Scr_ADN diminuait la liaison des oligonucléotides ARN2'F-Py en empêchant de se replier selon la structure

permettant la liaison aux fibre F. En effet, les oligonucléotides N30-G* et N124-G* se lient de manière « non-spécifique » aux fibres R et n'ont donc à priori pas besoin d'une structure particulière pour se lier aux fibres R. Une autre hypothèse peut expliquer ces résultats : nous avons remarqué lors des tests d'affinité que les oligonucléotides ARN2'F-Py avaient en moyenne une affinité non-spécifique pour les fibres R trois fois supérieure aux oligonucléotides ADN (cf. Résultats, partie III.A.2)c) ci-dessus). L'hybridation des aptamères ARN2'F-Py* à une séquence ADN peut donc diminuer leur affinité pour les fibres R, puisqu'une partie de leur séquence est impliquée dans une structure avec un oligonucléotide ADN et n'est plus disponible pour une interaction contre les fibres R.

Les Scr1-G et Scr2-G diminuent les quantités d'oligonucléotides liées aux fibres R de manière variable. Les N30-G* et N124-G* sont diminués entre 20 et 32%, ceci s'explique par le fait que ces séquences vont entrer en compétition avec les aptamères * pour les sites d'interaction non-spécifique. La liaison du F124-G* est diminuée de manière plus faible, de 13 à 20%. Ceci s'explique par le fait que le F124-G* a une affinité de type spécifique pour la fibre R (K_d de $5.67 \text{ nM} \pm 41.8\%$) : les Scr1-G et Scr2-G, qui se lient de manière non-spécifique aux fibres R, sont donc moins efficaces pour diminuer la liaison. Les T-SO508* et F5R1* ont leur liaison fortement diminuée par la présence des Scr1-G et Scr2-G (de -34 à -49%). Ceci est inattendu car ces deux aptamères se lient de manière spécifique aux fibre R avec des k_d de 20 à 30 nM. En effet, des séquences se liant aux fibres R de manière non-spécifique comme le Scr1-G et le Scr2-G, ne devraient à priori pas diminuer aussi fortement la liaison d'aptamère à leur cible. Néanmoins, les oligonucléotides ARN2'F-Py ayant en moyenne une affinité non-spécifique pour les fibres R trois fois supérieures aux oligonucléotides ADN, on peut comprendre que les Scr1-G et Scr2-G puissent diminuer de manière forte la liaison des N30-G* et N124-G*.

b) Analyse de tests avec les aptamères comme compétiteurs

Nous avons pu observer que les T-SO508 et F5R1 diminuent très faiblement (moins de 10%) les liaisons des oligonucléotides aux fibres R. Les N30-G, N124-G et F124-G diminuent fortement les liaisons des autres oligonucléotides. Le N30-G étant le compétiteur le moins efficace et le F124-G le plus efficace. Quel que soit le compétiteur (N30-G, N124-G ou F124-G), la liaison des aptamères est impactée de manière croissante selon l'ordre suivant : F124-G* (le moins impacté) N124-G*, N30-G*, T-SO508* et F5R1*, qui est le plus impacté. Ces résultats suggèrent que les aptamères ont à priori le même site de liaison sur la fibre R, ce qui est étrange car ces aptamères ont des affinités différentes pour les fibres R : certains (F124-G, T-SO508 et F5R1) se lient de manière spécifique tandis que d'autres (N30-G et N124-G) se lient de manière non-spécifique. Les résultats de compétition suggèrent que les aptamères ont le même site de liaison sur la fibre R mais des affinités différentes, rangées de manière croissante selon cet ordre : F5R1 et T-SO508 (affinités les moins forte), N30-G, N124-G et enfin le F124-G (affinité la plus forte).

a) Analyse de tests avec les anticorps comme compétiteurs

Nous avons pu observer que les anticorps « Syn-1 » et « 5G4 » ne diminuent les liaisons d'aucun des aptamères. On pourrait donc potentiellement envisager d'utiliser ces anticorps en « sandwich » avec les aptamères pour réaliser un test de détection des fibres R d' α -syn (cf. partie V.E.1) ci-dessus). L'anticorps « 10D2 » diminue les liaisons des aptamères de 35 à 67%. Ceci suggère que les aptamères se lient à la fibre R au niveau des acides aminés repérés par l'anticorps « 10D2 » mais pas par les anticorps « Syn1 » ni « 5G4 » : les acides aminés 123 à 126 donc.

Bilan :

Les résultats des tests de compétition contre la fibre F n'étaient pas forcément toujours très reproductibles. De plus, certains résultats étaient étranges : la présence de compétiteur semblant augmenter la quantité d'aptamères restée liée aux fibres F. Certains résultats ont pu être cependant établis avec certitude.

Ainsi, les tests de compétition mettant en jeu les aptamères comme compétiteurs montrent que le N30-G était le seul à être capable de diminuer de manière importante la liaison des autres aptamères à la fibre F. Ceci suggérait que les aptamères partageaient le même site de liaison sur la fibre F, mais que le N30-G était celui ayant l'affinité la plus forte. Les tests de compétition utilisant les anticorps ont donné des résultats différents selon les aptamères, ce qui est étonnant puisqu'ils semblent à priori partager le même site d'affinité sur la fibre F. Les résultats suggèrent néanmoins que les aptamères, à l'exception du F5R1, se lient à l'extrémité C-terminale de l' α -syn. L'anticorps « 5G4 » ne diminuant pas beaucoup la liaison de l'aptamère N30-G, il pourrait être envisageable de les utiliser « en sandwich » pour un test de détection.

Les résultats des tests de compétition contre la fibre R étaient, eux, bien plus reproductibles et aucun résultat n'était étrange : la présence de compétiteur n'augmentait pas la liaison des aptamères aux fibres R.

Les résultats de compétition suggèrent que les aptamères ont le même site de liaison sur la fibre R mais des affinités différentes, rangées de manière croissante selon cet ordre : F5R1 et T-SO508 (affinités les moins forte), N30-G, N124-G et enfin le F124-G (affinité la plus forte). L'anticorps « 10D2 » était capable de diminuer fortement la liaison des aptamères aux fibres R, mais pas le « Syn-1 » ni le « 5G4 ». Ces résultats suggéraient que les aptamères se liaient à la fibre R au niveau de la partie C-terminale, au niveau des acides aminés 123 à 126 de l' α -syn.

C. Essais de détection de fibres d' α -synucléine à l'aide d'aptamères

Nous avons réalisé des tests préliminaires de détection de fibre F en utilisant l'aptamère N30-G. Ces expériences visaient à fournir une preuve de principe montrant que l'aptamère N30-G pouvait bien être utilisé pour détecter des fibres F dans un échantillon.

Nous avons donc testé si le N30-G pouvait de manière significative détecter des fibres F ou des monomères dans un mélange par filtration sur colonne Sp6. Les colonnes Sp6 nous ont semblées être un outil de détection pertinent. Facile à manipuler, elles ne demandent qu'une centrifugeuse et sont donc facilement utilisables dans n'importe quel laboratoire. Nous

souhaitions également vérifier si l'aptamère N30-G était capable de distinguer les monomères des fibres F d' α -syn. Nous souhaitons aussi comparer les capacités de l'aptamère N30-G à celles de l'aptamère T-SO508. Nous avons utilisé comme séquences contrôles les Scr2-G et le Scr_ADN.

Les résultats des essais de détection sont présentés Figure 65. Nous avons pu observer que les résultats étaient relativement reproductibles, ce qui signifie que le test était donc fiable.

Nous pouvons observer que lorsque les oligonucléotides ont été présentés aux fibres F d' α -syn, 16.7% du N30-G, 2.1% du Scr2-G, 3.9% du T-SO508 et 3.0% du Scr_ADN sont élués dans la fraction du lavage au SDS 2% des colonnes Sp6. Ceci signifie que le N30-G est environ 8 fois mieux retenu aux fibres F que sa séquence aléatoire associée, et 4 fois mieux retenu que le T-SO508. Ces résultats sont une nouvelle confirmation de la capacité du N30-G à reconnaître les fibres F, et aussi de sa supériorité face au T-SO508.

Nous avons pu aussi observer que lorsque le N30-G a été présenté aux monomères, seul 1.1% des oligonucléotides sont élués dans la fraction d'élution du SDS 2%. Ceci signifie que le N30-G reconnaît à priori les fibres F d' α -syn environ 16 fois mieux que les monomères. Ceci vient confirmer les résultats obtenus lors des tests d'affinité par MST (cf. Résultats, partie III.A.3)b) ci-dessus), qui suggéraient que le N30-G avait une affinité pour les fibres F entre 10 et 100 fois supérieure à celle pour les monomères. De manière intéressante, nous pouvons voir que les fractions éluées par SDS 2% sont similaires pour le T-SO508 qu'il ait été présenté aux fibres F ou aux monomères (respectivement 3.9 et 3.8%). Ces résultats suggèrent que le T-SO508 ne réalise pas de distinction entre les fibres F et les monomères, ce qui est cohérent avec nos observations réalisées lors des tests d'affinités par filtration sur nitrocellulose (cf. Résultats, partie III.A.2)e) ci-dessus).

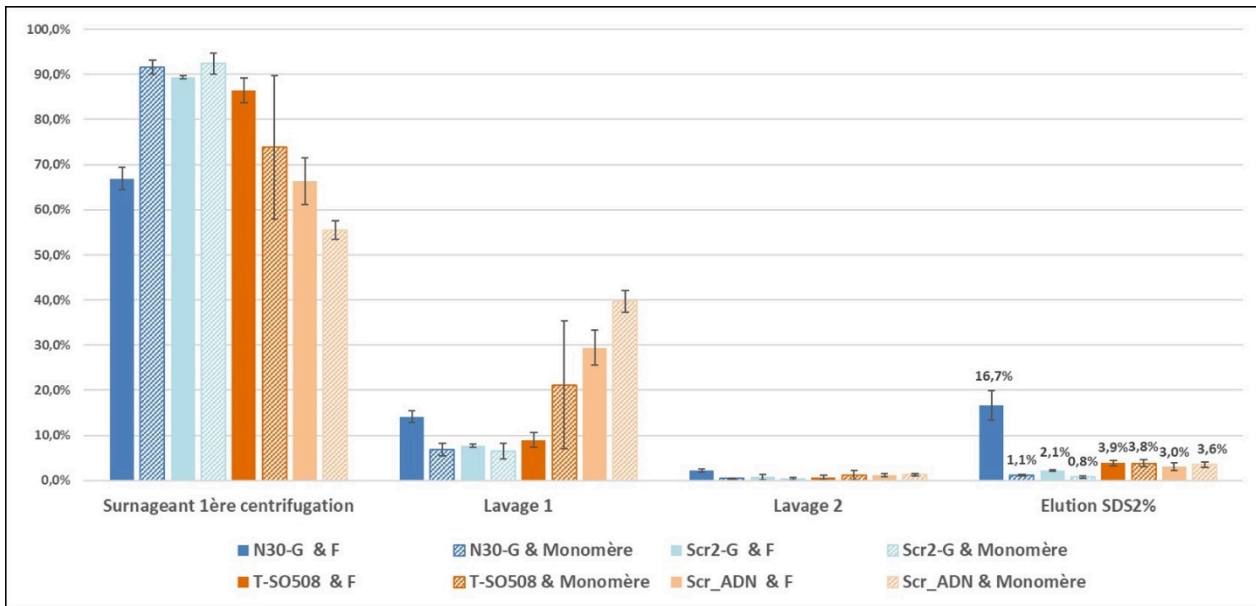


Figure 65 – Détection des fibres F d’ α -syn par le N30-G par séparation sur colonne Sp6. Ce graphique présente pour chacune des conditions, le pourcentage d’oligonucléotides récupérés à chaque fraction des tests de séparation par centrifugation sur colonne Sp6. Chaque point correspond à un duplicat. Les oligonucléotides radioactivement marqués au P^{32} (par hybridation à un SpG-LNA marqué au P^{32} pour les séquences ARN2’F-Py, par marquage direct pour les séquences ADN) ont été mélangés aux protéines à 250 nM (fibres F ou monomères d’ α -syn) en Ts1X, Igepal 0.1%. Après 30 min d’incubation à 37°C, 25 μ L des mélanges ont été déposés sur colonne Sp6 dont le tampon a été changé au préalable en Ts1X. Après une première centrifugation du dépôt, deux lavages au Ts1X de la colonne ont été réalisés. Les colonnes ont enfin été éluées par un lavage avec solution de SDS2%. Les fractions ont ensuite été déposées dans une plaque 24 puits, et la plaque exposée plusieurs heures sur un écran au phosphore photostimulable. L’analyse de l’exposition a permis une quantification de chacune des fractions pour chaque condition.

Nous avons aussi pu remarquer que les quantités éluées lors du 2^{ème} lavage sont pour chaque condition inférieure à 2%, ce qui signifie que deux lavages sont tout à fait suffisants pour ces conditions expérimentales.

Bilan :

Ces expériences montrent que le N30-G reconnaît 8 fois mieux les fibres F que sa séquence aléatoire associée Scr2-G, et quatre fois mieux que le T-SO508. Nous avons pu aussi observer que le N30-G reconnaît les fibres F d’ α -syn environ 16 fois mieux que les monomères, ce qui vient confirmer les résultats obtenus lors des tests d’affinité par MST. Ces résultats donnent une preuve de principe que l’aptamère N30-G peut être utilisé pour la détection de fibre F dans des échantillons grâce à la technique de séparation sur colonne Sp6.

DISCUSSION

Les aptamères sont des oligonucléotides dont la structure tridimensionnelle leur permet d'interagir avec une molécule cible. Ils sont souvent considérés comme des « anticorps synthétiques ». Les aptamères sont isolés par une méthode d'évolution dirigée appelée « SELEX » permettant de sélectionner un oligonucléotide capable de se lier à la molécule-cible, parmi une banque comportant un grand nombre de séquences différentes. Les aptamères sont des molécules à haut potentiel qui peuvent être utilisés pour un large éventail d'application : détection et diagnostic, imagerie, purification, thérapie et théranostique.

Les maladies neurodégénératives (MNs) restent à ce jour toujours principalement dépourvues de solutions thérapeutiques. Cette situation peut en partie être expliquée par le fait que la communauté scientifique peine à identifier avec certitude les causes à l'origine de ces pathologies. Cette thèse avait pour but de développer des sondes moléculaires spécifiques de plusieurs conformations de fibres d' α -syn. Les fibres d' α -syn sont retrouvées accumulées au sein d'agrégats dans le cerveau des patients pour plusieurs maladies neurodégénératives, qui sont regroupées sous le nom de « synucléinopathies ». Plusieurs équipes ont mis en évidence qu'en faisant varier les conditions d'assemblages des fibres d' α -syn, on pouvait obtenir différentes fibres avec des propriétés structurales et mécaniques distinctes. Des études ont montré que ces fibres déclenchaient des symptômes distincts lorsqu'elles étaient injectées dans le cerveau d'animaux. Ces résultats ont mené la communauté scientifique à formuler l'hypothèse selon laquelle l'existence des différentes synucléinopathies (MP, AMS, DCL) pourrait être expliqué par le fait que ces pathologies sont dues à des « souches » différentes de fibres.

Cette thèse avait donc pour but de sélectionner plusieurs aptamères reconnaissant de manière spécifique plusieurs conformations de fibres d' α -syn. Une fois ces sondes mises au point, nous souhaitons aussi mettre en place des méthodes de détection simples des fibres d' α -syn, potentiellement utilisables par un grand nombre de laboratoire. Le choix des aptamères pour développer de telles sondes semble judicieux. En effet, les aptamères sont comme les anticorps des sondes à hautes affinités. De plus, l'usage des contre-sélections permettait d'orienter la spécificité lors des sélections afin d'obtenir des aptamères réalisant une discrimination élevée entre les différentes structures de fibres.

Dans une première partie nous avons réalisé 10 tours de sélection pour deux SELEX nommés « R » et « 4F » visant à isoler des aptamères étant capables respectivement : de reconnaître la conformation R de fibre d' α -syn, mais pas les conformations F, 65 et 91, ou de reconnaître chacune des quatre conformations des fibres. Nous avons utilisé une méthode de séparation par filtration sur nitrocellulose. Cette méthode nous permettait de réaliser des contre-sélections en plus des sélections, et ainsi d'orienter la sélection de manière à isoler des aptamères avec des spécificités précises. Malheureusement nous avons mis en évidence plus tard au cours de ce travail de thèse que les fibres d' α -syn étaient très fortement retenues par interaction non-spécifique au plastique des tubes Eppendorf couramment utilisés au laboratoire par notre équipe. Puisque ces SELEX ont été réalisés sans utiliser des tubes à faible adsorption permettant d'éviter les problèmes de rétention de protéines, les sélections et contre-sélections ont été à priori gravement faussées. Nous avons été étonnés lors de l'analyse des données de séquençage, de ne pas trouver, de motifs communs entre les familles. Ceci

pourrait s'expliquer par le fait que les séquences sélectionnées lors de ces SELEX « faussés » soient majoritairement des séquences « parasites ». En effet, les résultats de criblage de l'affinité des aptamères pour les quatre fibres d' α -syn (cf. Figure 56), ont montrés que la majorité des séquences issues des SELEX « R » et « 4F » avaient une affinité pour les fibres d' α -syn semblable à celle d'une séquence aléatoire.

Dans une deuxième partie, nous avons eu l'idée de coupler l'usage du séquençage haut débit à une sélection branchée afin d'identifier au sein de la banque, des séquences ayant une affinité plus particulière pour une fibre par rapport aux autres. En effet, nous avons réalisé des tests pour mesurer l'affinité des 10 candidats issus des SELEX « R » et « 4F » pour les quatre fibres F, R, 65 et 91. Ces tests avaient montré que tous les candidats reconnaissent les quatre conformations de fibres, mais que certains avaient une affinité à priori plus forte pour une fibre. L'usage de la sélection branchée est occasionnellement utilisé dans le monde des aptamères. Nous nous sommes plus particulièrement appuyé sur les travaux de Dupont et son équipe pour l'élaboration de cette sélection branchée (Dupont et al., 2015). L'avantage est que nous avons facilement pu mettre en œuvre cette idée. Premièrement, notre équipe avait développé le logiciel Patternity-seq, qui a été aménagé pour l'analyse des SELEX branchés. Deuxièmement, la réalisation des SELEX « F » et « 4F » nous a permis d'avoir à disposition des banques progressivement enrichies en séquences ayant à priori une affinité pour les fibres d' α -syn. Ainsi, la banque issue du tour n°7 du SELEX « R » a été divisée en plusieurs quantités égales, qui ont été soumises à un tour de sélection dans des conditions différentes : contre les différentes fibres avec ou sans compétiteurs

Nous avons ensuite conçu entièrement *de novo* une méthode permettant d'identifier au sein de la banque les séquences reconnaissant spécifiquement une des fibres par rapport aux trois autres. Cette méthode nous permettait de trier les séquences de manière à identifier, pour chaque conformation de fibre celles : suffisamment enrichies pour que les résultats soient statistiquement fiables, s'enrichissant seulement pour la sélection d'une seule fibre et pas contre les autres, et s'enrichissant mieux dans la banque en présence de compétiteur qu'en absence de compétiteur. Nous avons ainsi obtenu pour chaque type de fibre une liste de séquences la reconnaissant à priori de manière spécifique et ce de manière statistiquement fiable. Pour choisir parmi ces séquences celles discriminant au mieux une conformation par rapport aux autres, nous avons classé celles-ci selon un ratio : appelé « Ratio des fréquences ». Ce ratio correspondait pour chaque séquence, au ratio de la fréquence de la séquence en présence de la conformation de fibre qu'elle reconnaît (en présence l'ARNt), par rapport au produit des fréquences de cette séquence, lorsqu'elle est confrontée aux trois autres conformations de fibres (en présence d'ARNt). Ce ratio, bien que capable de détecter des candidats prometteurs, comportait néanmoins un biais : il favorisait les séquences présentes à petites fréquences. Ainsi, prenons l'exemple de deux séquences présentes au départ dans la banque à respectivement 0.1% et 1% mais ayant le même comportement : leur fréquence doublant dans la banque lorsqu'elles sont sélectionnées contre la fibre F et diminuant de moitié lorsqu'elles sont sélectionnées contre les fibres R, 65 et 91. Le ratio pour la première séquence (présente à 0.1% dans la banque de départ) sera de : $0.2 / (0.05 \cdot 0.05 \cdot 0.05) = 1600$, tandis que le ratio de la 2^{ème} séquence (présente à 1% dans la banque de départ) sera de : $2 / (0.5 \cdot 0.5 \cdot 0.5)$

= 16. La différence entre les deux ratios est d'un facteur 100, alors que les comportements des séquences sont les mêmes. Un ratio optimal devrait même au contraire favoriser les séquences ayant les pourcentages les plus élevés. En effet, les comportements de celles-ci sont statistiquement plus fiables. De plus, à augmentation égale dans la banque, il est plus facile pour une séquence d'augmenter de 0.1 à 0.2% que de 1 à 2% car la compétition se fait contre moins de séquence. Après réflexion, le « ratio des fréquences » le plus juste à utiliser aurait été de réaliser le ratio de la fréquence de la séquence en présence de la conformation de fibre qu'elle reconnaît bien (en présence l'ARNt), par rapport à la somme des fréquences de cette séquence, lorsqu'elle est confrontée aux trois autres conformations de fibres (en présence d'ARNt). En effet, utiliser la somme et non le produit permet d'éviter de favoriser les séquences basse fréquence. Ainsi, lorsque l'on recalcule le ratio des deux séquences, on obtient 1.33 pour chacune, ce qui permet d'évaluer de la même manière les mêmes comportements.

Les résultats de la méthode de sélection branchée multiple étaient malheureusement décevants. Parmi les quatre séquences sélectionnées (F124, R84, P65_10854 et P91_70), aucune n'avait les spécificités attendues, c'est-à-dire qu'aucune ne reconnaissait une des conformations de fibres mieux que les trois autres. Etant donné que nous avons utilisé lors des sélections branchées des tubes n'étant pas à faible adsorption, il est possible que la méthode de sélection ait été fortement compromise. Il faudrait donc pour pouvoir évaluer la pertinence de cette méthode, recommencer les sélections avec le matériel approprié et réaliser la même analyse des données de séquençage haut débit.

De manière générale, la méthode combinant la sélection branchée et l'analyse des données de séquençage haut débit est prometteuse et pourrait-être utilisée pour identifier un aptamère ayant une forte spécificité pour une cible par rapport à une autre. Une autre utilisation de la méthode de sélection branchée multiple pourrait être la détection des séquences « parasites » dans un SELEX. En effet, il arrive fréquemment que certaines séquences s'enrichissent dans la banque d'oligonucléotides au cours d'une sélection mais sans avoir de réelle affinité pour la cible. Un des mécanismes expliquant l'existence de ces séquences parasites est le fait que ces séquences soient multipliées de manière bien plus efficace que les autres au moment de la PCR. Ainsi, lors des derniers tours de sélection d'un SELEX, réaliser en parallèle des amplifications PCR sans étape de sélection permettrait de détecter quelles séquences sont amplifiées du fait de la PCR et non de par leur affinité pour la cible. Une autre piste d'amélioration de la méthode de sélection branchée multiple serait la réalisation de chacune des branches en duplicat. Ceci permettrait d'améliorer la fiabilité de l'analyse des données de séquençage haut débit. Le calcul d'un enrichissement d'une séquence est en effet plus robuste lorsqu'il est mesuré à la même hauteur dans plusieurs expériences parallèles.

Dans une troisième partie, nous avons essayé de déterminer précisément l'affinité des dix candidats issus des SELEX « 4F » et « R » et des quatre candidats des sélections branchées multiples. Néanmoins, nous avons été confrontés à des problèmes de reproductibilité majeurs. La recherche des causes de ce phénomène, nous a permis d'identifier un problème technique important : les fibres d' α -syn étaient fortement adsorbées sur la surface des tubes plastiques que nous utilisons couramment. Nous avons identifié que l'usage de tubes spécialement conçus pour éviter l'adsorption des molécules réduit considérablement ce phénomène.

Néanmoins, nous avons réalisé que le problème d'adsorption était déjà présent lors de nos sélections, puisque nous avons utilisé des tubes plastiques standards. Le bon fonctionnement du processus de sélection a donc pu être impacté. Nous avons donc décidé de recommencer de nouveaux les SELEX, avec des tubes à « faible adsorption » afin d'éviter tout biais potentiel. Ces premières parties nous ont néanmoins permis de prendre en main notre projet, de détecter ce problème technique d'adsorption et d'y apporter une solution. Les autres articles des équipes ayant développées des aptamères contre des fibres d' α -syn ne mentionnaient pas l'utilisation de ce type de tube. Peut-être que leurs sélections ont été aussi compromises.

La quatrième partie de notre projet a consisté à mettre au point une nouvelle méthode de sélection sur colonne d'exclusion stérique (colonne Sp6) en vue de réaliser de nouvelles sélections. L'utilisation de colonnes Sp6 comme outil de séparation pour un SELEX a été rarement décrit (Yang et al., 2016), et cette méthode n'avait jamais été utilisée dans notre équipe. Il a donc été nécessaire de caractériser pleinement cette technique. Nous avons été étonnés de constater que les fibres et les monomères d' α -syn restaient à l'intérieur de la colonne Sp6. En effet, cette colonne d'exclusion stérique doit à priori laisser passer les molécules dont le poids moléculaire est supérieur à 6kDa. Nous avons formulé l'hypothèse que les fibres pourraient être retenues dans le gel du fait de leur longueur importante. Concernant les monomères, nous n'avons pas identifié d'explication certaine. Nous avons fait une série de vérification qui nous ont permis de vérifier qu'en présence du gel des colonnes Sp6, les fibres d' α -syn conservaient leur forme fibrillaire. Nous avons aussi vérifié que les protéines ne restaient pas liées au plastique des colonnes Sp6 par interaction non spécifique, comme sur le plastique des tubes Eppendorf. Néanmoins, rétrospectivement, deux points supplémentaires auraient mérité d'être aussi vérifiés. Tout d'abord, nous avons vérifié que deux lavages ne décrochaient pas de manière trop importante les fibres et monomères de la colonne. Mais nous avons réalisé jusqu'à 7 lavages de la colonne Sp6 pour l'étape de sélection à certains tours des SELEX. Il aurait fallu vérifier que les protéines « supportaient » bien 7 lavages sans se décrocher des colonnes de manière trop importante. De plus, il aurait été intéressant de vérifier que les fibres conservent bien leur forme fibrillaire sans se dépolymériser lors de l'étape de centrifugation dans les colonnes Sp6. Nous aurions pu récupérer le gel des colonnes Sp6 après centrifugation et avec la ThT vérifier si les fibres sont bien toujours présentes sous forme fibrillaire.

Nous avons réalisé deux SELEX appelés SELEX « F » et SELEX « F-spécifique » en parallèle en utilisant la méthode de séparation par colonne Sp6. Pour ces deux SELEX, nous avons systématiquement quantifié les différentes fractions issues des contre-sélections et des sélections, ce qui nous a permis de suivre au mieux l'évolution de ceux-ci. En effet, au cours d'un SELEX, lorsque la pression de sélection reste constante entre plusieurs tours, le fait que la quantité d'ARN2'F-Py retenue à l'issue d'un tour augmente au fur et à mesure des tours de sélection, est un signe que la banque s'enrichit en séquences répondant à la sélection. Nous n'avons cependant pas vu durant ces SELEX d'augmentation de matériel retenu entre deux tours de pression de sélection constante. Nous n'avons donc pas d'indicateurs permettant de signaler que les banques s'enrichissaient en séquences répondant à la sélection. Il est dommage que l'arrêt des sélections après 15 tours de SELEX n'ait pas été un choix motivé par

des observations. Nous avons en effet décidé d'arrêter la sélection pour voir si un enrichissement des banques en certaines séquences était observable, et dans le cas contraire nous aurions pu continuer à faire plus de tour de SELEX.

L'analyse des données de séquençage haut débit des banques des SELEX « F » et « F-spécifique » ont montré que les banques étaient très fortement enrichies au tours 15. Ceci était étonnant car les observations ne suggéraient pas que les banques se soient enrichies en séquences répondant bien à la sélection, c'est-à-dire en aptamères se liant aux fibres F d' α -syn avec une bonne affinité. Il nous a paru donc probable que parmi les séquences les plus enrichies de la banque se trouve en réalité beaucoup de séquences « parasites » n'étant pas capables de se lier aux fibres d' α -syn avec une bonne affinité. Néanmoins, il était tout à fait possible que des séquences avec une bonne affinité pour les fibres d' α -syn se soient également enrichies lors des sélections. Les résultats de criblage (cf. Figure 56) ont effectivement montré que les séquences majoritaires des familles de séquences s'étant enrichies lors des SELEX (N0, N1 et N2) n'ont pas d'affinité significativement plus élevée pour les fibres F par rapport aux séquences aléatoires. Des séquences ayant une affinité significative ont été aussi amplifiées lors des SELEX (N3, N30, N124), mais elles étaient présentes à des pourcentages plus faibles dans les banques. Ces observations montrent que l'utilisation du séquençage haut-débit est particulièrement pertinent pour l'analyse des SELEX : cela permet d'identifier des séquences à haut potentiel que le séquençage « classique » de type « Sanger » d'une centaine de clones n'aurait pas permis de détecter.

La cinquième partie de notre projet a consisté à tester l'affinité des candidats pour les différentes fibres d' α -syn (F, R, 65 et 91). Nous avons réalisé une première étape de criblage par filtration sur nitrocellulose qui nous a permis d'avoir une première approche globale des affinités et des spécificités de nos candidats. Cette étape a été précédée de mises au point concernant les compétiteurs et les détergents. Le compétiteur ayant été finalement retenu est l'ADNss en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides. Cette concentration en compétiteur est très faible par rapport aux concentrations classiquement utilisées pour les compétiteurs (généralement aux alentours de 100 μ g/ml). Ceci est dû au fait que l'ajout de compétiteur diminue très fortement la fixation des aptamères sur les fibres d' α -syn. Ce phénomène est très étonnant et suggère que la liaison des aptamères aux fibres d' α -syn ait deux composantes : une composante « spécifique », et une autre, très importante, de type « non-spécifique » pour laquelle les compétiteurs peuvent entrer en compétition. Une autre explication pourrait être que la présence de compétiteurs ait une influence sur la structure de la fibre, en altérant celle-ci. La liaison des aptamères serait donc compromise puisque les sites de liaison ont disparu. L'ajout de détergent dans un mélange afin de réduire les interactions non-spécifiques avec les surfaces est une procédure courante. Néanmoins, nous avons choisi une concentration en détergent assez élevée de 0.1%, généralement le détergent est utilisé en concentration de 0.01 à 0.05%. De plus, l'igepal se trouvait à la concentration de 1.7 mM dans le mélange, c'est-à-dire bien au-dessus de sa CMC (concentration micellaire critique), ce qui n'est pas recommandé puisque des micelles sont alors présentes dans le mélange. Les tests d'affinité sur nitrocellulose et les western blot réalisés montrent néanmoins que la présence de l'igepal à 0.1% dans le mélange ne semble pas perturber l'interaction entre les aptamères et

les fibres. Cependant, l'inconvénient majeur de l'ajout d'igepal dans le mélange est le fait que cela rende difficile la mesure précise de l'affinité des aptamères pour les monomères d' α -syn. En effet, 80% des monomères ne sont pas retenus sur la membrane nitrocellulose lors de la filtration, ce qui peut impacter fortement les mesures d'affinité des aptamères. Il était donc indispensable de mesurer l'affinité des aptamères pour les monomères d' α -syn par une autre méthode de mesure que la filtration sur nitrocellulose.

L'étape du criblage a été réalisée pour les candidats issus des SELEX « F » et « F-spécifique », et également pour ceux des SELEX « 4F » et « R » ainsi que pour ceux issus des sélections branchées multiples. Nous avons pu observer un premier résultat majeur : certaines fibres retiennent en moyenne de plus grande quantité d'oligonucléotide que les autres. A quelques exceptions près les oligonucléotides sont retenus sur la nitrocellulose de manière croissante suivant cet ordre : la fibre 91 (moins de rétention), la fibre F, la fibre 65 et enfin la fibre R. Cette observation est très étonnante puisqu'elle concerne à la fois les séquences qui se révéleront être des aptamères reconnaissant les fibres F et des séquences aléatoires (Scr1-G, Scr2-G) qui, elles, n'ont pas été sélectionnées. Cette observation montre que les quatre conformations de fibre présentent des surfaces différentes bien qu'elles soient composées de répétitions de la même protéine. Il est cependant dommage que les sélections réalisées n'aient pas pu s'affranchir de cet ordre. Nous pouvons donc ici constater, que nous retrouvons les conclusions réalisées par Rahimi dans ses travaux visant à sélectionner des aptamères contre des fibres amyloïdes : les oligonucléotides semblent avoir une forte affinité intrinsèque pour les fibres amyloïdes (Rahimi et al., 2009). Rahimi affirmait qu'il n'était donc pas possible d'obtenir des aptamères contre des fibres amyloïdes, puisque les séquences ne pouvaient avoir une vraie spécificité (Rahimi, 2018). Nos résultats semblent pourtant montrer qu'il est au contraire bien possible d'obtenir des aptamères spécifiques.

Nous avons pu observer que certains candidats restent liés aux fibres d' α -syn F en quantité bien plus importante que les séquences aléatoires. Les candidats ayant les ratios les plus élevés (N3-G, N30-G, N124-G par exemple) étaient issus des SELEX « F » et « F spécifique », ce qui semble logique. Néanmoins, certains candidats venant des SELEX « 4F » et des sélections branchées multiples semblent également prometteurs, ce qui paraît plus compliqué à comprendre étant donné qu'ils sont issus de processus de sélection ne les dirigeant pas vers une affinité pour cette fibre.

Les résultats d'affinités des candidats aptamères sont-ils corrélés à leur comportement dans la banque lors des sélections ?

- ❖ Concernant les anciens candidats (issus des SELEX « 4F », « R » et de la sélection branchée multiple) nous ne nous attendions pas à avoir des résultats d'affinité corrélés à leur évolution dans les banques au cours des sélections (cf. Figure 33), à cause des problèmes d'adsorption non-spécifique des fibres d' α -syn sur la paroi des tubes plastiques utilisés. Nous pouvons en effet constater que :
 - Les candidats issus du SELEX R ne reconnaissent pas particulièrement la fibre R.
 - Les candidats issus du SELEX « 4F » ne reconnaissent pas de manière comparable les quatre types de fibres.

- Concernant les candidats issus des sélections branchées multiples, nous n'obtenons pas non plus les résultats espérés : le candidat R84-G ne reconnaît pas spécifiquement la fibre R, le P65_10854-G ne reconnaît pas spécifiquement la fibre 65, ni le candidat P91_70-G la fibre 91. Le F124-G lui semble à priori légèrement mieux reconnaître la fibre F que les autres (ratio par rapport au scr1-G de 2 pour la fibre F, contre des ratios de 1.5 pour les fibres R et 65 et 2 pour la fibre 91), mais ce résultat semble plutôt fortuit au vu des autres observations.

Sachant que les sélections ont visiblement mal fonctionné, il est étonnant d'obtenir cependant des candidats se liant significativement mieux que le Scr1-G à certaines fibres. Ainsi, le 4F03-G, le F124-G et le P65-10854-G reconnaissent 2.5 fois mieux la fibre F que le Scr1-G. Ces affinités sont-elles dues au hasard ? Ceci voudrait dire que certains oligonucléotides pourraient avoir naturellement une affinité plus forte pour des fibres d' α -syn que d'autres.

- ❖ Concernant les candidats issus des SELEX « F » et « F-spécifique », trois groupes de séquences avaient été choisis, selon des objectifs différents (cf. Tableau 10 dans Résultats, partie II.B.4) ci-dessus).
 - Les candidats N0 à N20 avaient été choisis pour leur forte abondance au dernier tour et leur enrichissement élevé dans l'un ou l'autre des SELEX.
 - Les candidats N0-G, N1-G et N2-G ont des affinités pour les quatre types de cible ne différant pas du scr2-G. Sachant que ces séquences s'étaient très bien enrichies au cours des deux SELEX, on peut donc conclure qu'elles sont en réalité des « séquences parasites ». Ceci peut se comprendre de manière logique, puisque les observations ne suggéraient pas que la banque se soit enrichie en séquences répondant bien à la sélection, c'est-à-dire en aptamères se liant aux fibres F d' α -syn avec une bonne affinité. Il nous a donc paru probable que parmi les séquences les plus enrichies de la banque se trouve en réalité beaucoup de séquences « parasites » n'étant pas capables de se lier aux fibres d' α -syn avec une bonne affinité. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en réalisant de tests PCR pour vérifier si ces séquences s'amplifient mieux que les autres.
 - La séquence N3-G semble a priori reconnaître deux fois mieux la fibre F que la R. On peut remarquer que son facteur d'enrichissement dans le SELEX « F » est plus important que celui dans le SELEX « F-spécifique », les résultats de séquençage haut débit prédisaient donc plutôt une séquence ne distinguant pas les fibres F des fibres R.
 - Les candidats N4-G, N5-G, N15-G, et N20-G reconnaissent les fibres F en moyenne 1.5 fois mieux que le Scr2-G, ce qui est assez faible.
 - Les candidats N37, N62 et N164 ayant été choisis pour le bon enrichissement dans le SELEX « F-spécifique » mais pas dans le SELEX « F », on attendait donc des séquences reconnaissant la Fibre F mais pas la R.

- Les séquences N37-G et N164-G n'ont pas d'affinité différente par rapport au Scr2-G, on peut donc penser que ce sont des « séquences parasites ».
 - Le N62-G, lui, a une affinité légère pour les fibres F et R.
 - Puisque les résultats ne sont pas ceux attendus, on peut penser que les contre-sélections contre la fibre R ont été en fait une pression de sélection trop forte qui ont favorisé l'émergence de séquences parasites.
- Les candidats N30, N73 et N124 ont été choisis sur la base d'un enrichissement élevé dans le SELEX « F » mais pas dans le SELEX « F-spécifique ». Nous nous attendions donc à des séquences reconnaissant la fibre F mais pas de manière spécifique.
- La séquence N73-G n'a pas d'affinité différente par rapport au Scr2-G, on peut donc penser qu'elle est une « séquence parasite ».
 - Pour les N30-G et N124-G, nous avons pu observer que ces candidats avaient une affinité pour les fibres F de 3.5 fois supérieur par rapport au Scr2-G. Leurs affinités pour les fibres R sont entre 1.5 et 2 fois supérieur par rapport au Scr2-G.

Les résultats de séquençage haut débit du N3-G, N30-G et N124-G, suggèrent que le point commun des séquences ayant une bonne affinité pour F est d'être bien amplifiées dans le SELEX F, mais pas dans le « F-spécifique ». Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le SELEX « F-spécifique » a été conçu ayant une pression de sélection trop importante et amplifiant beaucoup de séquences parasites. Ecarter du choix des séquences celles s'étant amplifiées dans le SELEX « F-spécifique » permettrait d'éviter la sélection de séquences parasites.

Ainsi, réaliser une sélection pour isoler des séquences reconnaissant spécifiquement les fibres F par rapport aux fibres R est délicat. Un SELEX comme le SELEX « F-spécifique », où des contre-sélections contre la fibre R sont rajoutées dès le tour n°2, constituent en fait une pression de sélection trop forte car les fibres F et R se ressemblent beaucoup. Peut-être aurait-il fallu ajouter les contre-sélections plus tard dans le SELEX ? Cela aurait peut-être évité que les séquences les plus enrichies soient en réalité des séquences « parasites ». Cela aurait aussi rendu possible la détection au séquençage haut débit des séquences diminuant au sein de la banque au moment de l'ajout des contre-sélections, et donc non-spécifiques. Il aurait été également possible de détecter les séquences dont l'enrichissement au sein de la banque s'accroît plus fortement lors de l'ajout des contre-sélections, suggérant que ces séquences distinguent les fibres F des fibres R. Une autre possibilité toujours envisageable serait de réaliser une sélection branchée multiple, sur le modèle de celle précédemment réalisée, à partir d'un tour intermédiaire du SELEX « F ». Selon la même méthode utilisée, il pourrait être possible d'identifier des séquences ayant un comportement « spécifique » et donc capable de distinguer les fibres F des fibres R.

Ces résultats de mesure d'affinité confirment aussi que la présence des « motifs » n'est pas corrélée avec les préférences d'affinité des séquences. Ainsi, le motif n°1 est partagé par le candidat N0 qui est a priori une séquence « parasite », et par les candidats N3 et N30 qui sont au contraire des aptamères reconnaissant la fibre F avec une bonne affinité. La séquence N124 a le motif n°2 dans sa séquence. Les résultats des expériences de compétition suggéraient que

les aptamères N3, N30 et N124 avaient des sites de liaison comparables. Les motifs ne sont donc pas liés non plus à des sites de liaison différents.

Dans une sixième partie, nous avons réalisé pour les aptamères les plus intéressants des mesures d'affinité par gamme, par filtration sur nitrocellulose. Ceci nous a permis de mesurer les K_d et B_{max} des aptamères pour les monomères et les différentes fibres d' α -syn ainsi que pour d'autres fibres amyloïdes. Nous avons également réalisé ces mesures pour des aptamères issus de la littérature ayant été sélectionnés pour des fibres d' α -syn. Dans une septième partie, ces mesures d'affinités ont été complétées pour quelques candidats par des mesures d'affinité par thermophorèse à micro-échelle et par filtration sur colonne Sp6. Nous avons aussi réalisé des tests de compétition entre certains aptamères afin de mieux comprendre les localisations des sites de liaison.

Les mesures d'affinités ont permis de montrer que certains candidats avaient bien une affinité de type « spécifique » pour certaines fibres : la quantité d'oligonucléotide liée à la cible augmente en fonction de la concentration en candidat de manière hyperbolique et montre une saturation. D'autres candidats, eux, se différenciaient trop peu de la séquence aléatoire associée pour être considérés comme des aptamères se liant à leur cible de manière spécifique. Cependant, sachant que nous avons choisi, durant ces expériences, de garder constante la proportion de compétiteur (ADNss) par rapport à la quantité d'oligonucléotide, peut-être la saturation des courbes est-elle « artificielle ». Il faudrait réaliser des tests d'affinités avec des gammes d'oligonucléotides où la concentration en compétiteur reste constante.

Nous avons aussi pu observer un phénomène intéressant au niveau des séquences aléatoires : pour chaque test d'affinité contre les fibres d' α -syn, on peut observer en moyenne que les quantités de Scr1-G et de Scr2-G retenues sont presque similaires à chaque expérience, tandis que celle du Scr_ADN est trois fois plus basse en moyenne. Ceci suggère que les oligonucléotides ARN2'F-Py ont en moyenne une affinité non-spécifique pour les fibres d' α -syn trois fois plus forte que les oligonucléotides ADN. Nous retrouvons dans ces résultats de nouveau les conclusions réalisées par Rahimi dans ces travaux visant à sélectionner des aptamères contre des fibres amyloïdes : les oligonucléotides semblent avoir une forte affinité intrinsèque pour les fibres amyloïdes. Nous pouvons même ajouter une observation supplémentaire : les oligonucléotides ont une affinité intrinsèque pour les fibres d' α -syn, qui varie en fonction de leur chimie.

Ces expériences nous ont également permis de comparer pour les aptamères issus de la littérature, nos mesures d'affinités réalisées pour les fibres amyloïdes avec celles décrites dans les travaux publiés. Ces comparaisons doivent néanmoins être pondérées par deux différences importantes au niveau des conditions dans lesquels les aptamères ont été sélectionnés et caractérisés dans les travaux issus de la littérature, et les conditions dans lesquelles nous les avons testés dans ce travail. Tout d'abord, les aptamères n'ont pas été testés dans le tampon dans lequel ils ont été sélectionnés et caractérisés. De plus, les fibres contre lesquelles ils ont été sélectionnés et caractérisés peuvent avoir une conformation différente des nôtres, car elles ont été produites avec des protocoles différents.

- L'équipe ayant sélectionné le T-SO508, l'avait décrit comme se liant aux oligomères d' α -syn, mais pas aux monomères ni aux fibres (Tsukakoshi et al., 2012). Les données faisaient aussi état d'une réactivité secondaire pour les oligomères d' $A\beta$. Nous avons montré ici que le T-SO508 se liait à chacune des fibres amyloïdes testées, mais avec des affinités différentes (ie. k_d et B_{max} différents). Nos mesures montrent aussi que le T-SO508 se lie aussi aux monomères d' α -syn. Le T-SO508, semble donc n'avoir aucune spécificité pour une protéine ou une conformation en particulier. Un aptamère étant censé avoir une affinité spécifique, on peut discuter de la qualification d'aptamère du T-SO508.
- Les F5R1 et F5R2 ont été décrit comme se liant aux fibres d' α -syn, et le F5R1 plus particulièrement se liant aux monomères d' α -syn (Zheng et al., 2018; Ren et al., 2019). Nos travaux ont montré qu'en effet le F5R1 se liait aux fibres et aux monomères d' α -syn, tandis que le F5R2 n'avait pas d'affinité pour les monomères d' α -syn. Néanmoins, nous n'avons mesuré aucune affinité du F5R2 pour les fibres d' α -syn, contrairement aux résultats publiés.
- L'aptamère Tau3146 a été sélectionné contre l'isoforme Tau 441 monomérique (Lisi et al., 2018). Des mesures avaient montré que cet aptamère était capable de se lier aux isoformes Tau 441, Tau 381, Tau 352 et Tau 383 avec des k_d de l'ordre du nanomolaire. Nos travaux nous permettent d'ajouter que cet aptamère a une affinité très spécifique puisqu'il n'a pas d'affinité pour les fibres Tau3R, ni pour d'autres fibres amyloïdes ou même pour les monomères d' α -syn.
- L'aptamère M5-15 avait été décrit comme se liant aux monomères et aux oligomères d' α -syn (Tsukakoshi et al., 2010). Nos résultats, eux, montrent que cet aptamère n'a pas d'affinité pour les fibres d' α -syn.

Les mesures d'affinité réalisées nous ont également permis de mettre en lumière que l'aptamère N30-G remplissait les objectifs que nous nous étions fixés pour notre SELEX : il est capable de reconnaître la fibre F avec une affinité inférieure à 10 nM, il la distingue de la fibre R pour laquelle il n'a pas d'affinité. Nous avons aussi mis en évidence, avec trois méthodes de mesures différentes, que cet aptamère reconnaissait avec une affinité au moins 10 fois plus faible les monomères d' α -syn sous forme native (non fibrillaire). Le N30-G ne reconnaît pas non plus la fibre amyloïde- β .

Cependant, nous avons observé que le N30-G a une forte fixation pour les fibres Tau3R. Le N124-G et le F124-G partagent aussi cette affinité, qui, étonnamment, semble être de type « non-spécifique », sans que l'on puisse calculer un k_d précis. Cette affinité est à la fois bien plus forte que celle d'une séquence aléatoire mais aussi linéaire et non saturable comme celle d'une liaison de type non-spécifique. Ces résultats suggèrent que les oligonucléotides pourraient avoir différents « niveaux » d'affinité non-spécifique.

Rahimi affirmait en conclusion de ces travaux que les oligonucléotides avaient une affinité intrinsèque pour les fibres amyloïdes, et donc qu'en conséquent il était impossible de sélectionner un aptamère reconnaissant de manière spécifique une fibre amyloïde. Le N30-G

développé dans notre travail montre qu'en réalité obtenir un aptamère reconnaissant de manière spécifique une fibre amyloïde est possible. Il est cependant nécessaire pour arriver à ce résultat de faire la distinction entre les liaisons de type spécifique et non-spécifique. En effet, les résultats de criblage suggèrent que l'aptamère N30-G a bien une affinité pour les quatre conformations de fibres d' α -syn. C'est la comparaison du N30-G à une séquence aléatoire qui a mis en évidence que celui-ci se liait de manière plus importante que d'autres à la fibre F. C'est aussi la mesure précise de l'affinité (K_d et B_{max}) qui a permis de mettre en évidence qu'il n'y a que sur la fibre F que le N30-G se lie de manière spécifique.

Récemment, des avancées réalisées dans le domaine de la cryo-microscopie électronique ont permis d'obtenir les premières structures précises de fibres amyloïdes. La plupart des structures ont été obtenues à partir de fibres produites *in vitro*, mais certaines viennent de fibres provenant d'échantillon de patient. Ces fibres peuvent présenter des structures très diverses mais ont pour point commun d'être constituées d'une répétition de protéines empilées et repliées selon une même structure riche en feuillet- β . Les acides hydrophobes sont généralement positionnés à l'intérieur des structures, tandis que ceux hydrophiles (polaires, chargés etc.) sont présents à la surface des amyloïdes et donc accessibles aux ligands. Ainsi, en analysant les structures de fibres amyloïdes disponibles dans les bases de données (PDB), il est possible de déterminer quels acides aminés sont exposés dans chacune des structures, et plus encore quelles paires d'acides aminés présentes à la surface forment un site de liaison potentiel. La comparaison des sites de liaisons potentiels présents à la surface des fibres montre que, étonnamment, ceux-ci sont extrêmement similaires d'une fibre à l'autre. Ainsi par exemple, le site de liaison formé de l'association d'une lysine et d'une valine (séparés tous les deux par un acide aminé) est présent dans des fibres de Tau, d'amyloïde- β et d' α -syn. Il est donc possible d'expliquer le fait que certains aptamères ne soient pas spécifiques d'une seule fibre amyloïde par le fait que les oligonucléotides reconnaissent à la surface des fibres des sites de liaison extrêmement partagés.

Il serait très intéressant de déterminer le site d'accroche précis des aptamères. Les expériences de compétition suggèrent que les aptamères partagent les mêmes sites de liaison sur la fibre, mais que certains ont une liaison plus forte que d'autres et sont donc plus à même d'occuper les sites de liaison. Les B_{max} faibles des aptamères conduisaient à penser que les aptamères ne se liaient pas sur chaque monomère d' α -syn composant la fibre, mais sur un monomère sur 125. Ce résultat permettait d'expliquer les mesures de k_d différentes observées entre les méthodes de mesures par filtration et par thermophorèse à micro-échelle. Il est néanmoins difficile d'élaborer une explication pour cette observation.

Une piste de réflexion que nous avons envisagée est la grande taille des aptamères : le N30-G et le N124-G font ainsi 105 bases et le F124-G 120 bases (dont 24 à chaque fois impliqués dans une hybridation avec le SpG-LNA). Il est donc possible que les aptamères aient un site de liaison sur la fibre de grande taille et qu'un encombrement stérique empêche les autres aptamères de se lier à proximité. Afin d'avoir un ordre de grandeur de la taille du site de liaison d'un de nos aptamères sur une fibre d' α -syn, nous avons à l'aide du logiciel Pymol positionné deux aptamères à proximité d'une fibre F (cf. Figure 66). Ces deux aptamères de chimie ARN, sont de 41 (aptamère du GTP) et 91 bases (aptamère « Spinach »). Nous les avons

choisis car ils présentent pour l'un une structure allongée et pour l'autre une structure globulaire, qui nous donneront donc une idée de la taille maximale et minimale du site de liaison de nos aptamères.

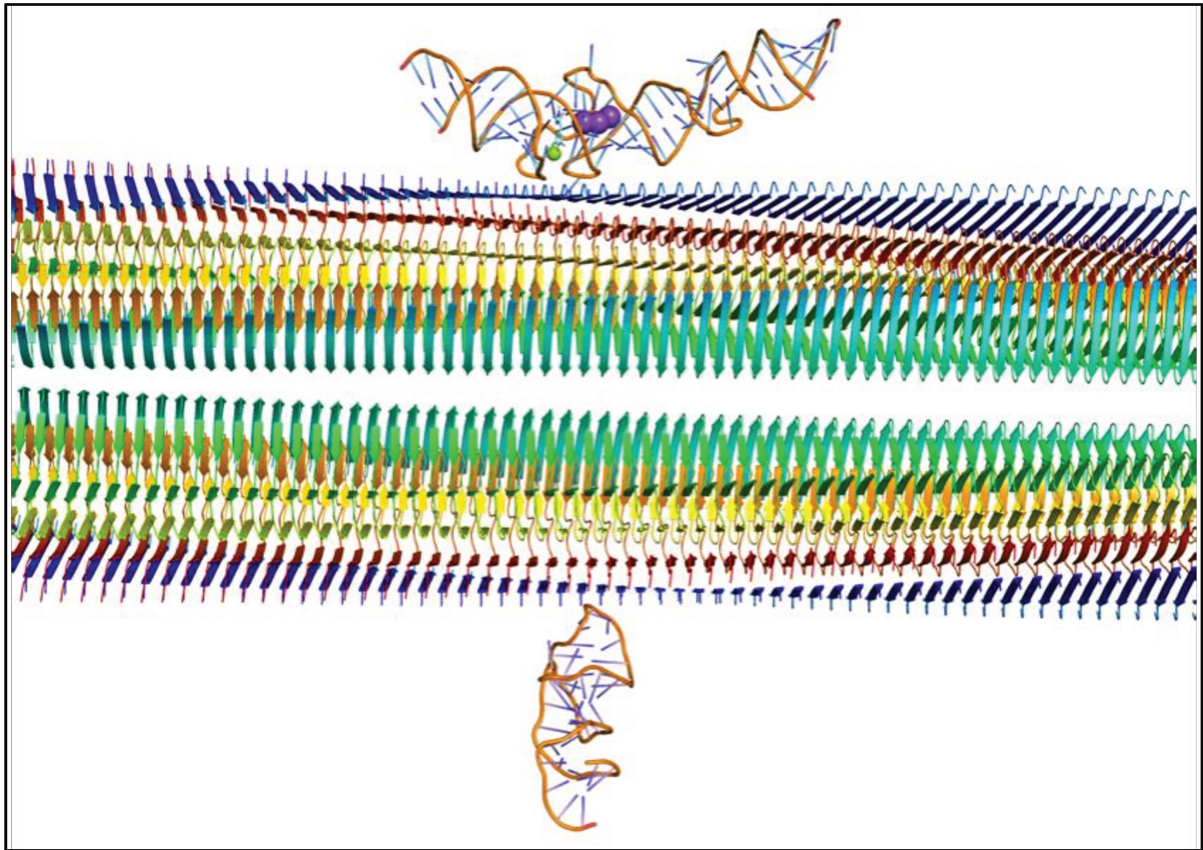


Figure 66 –Schéma comparant les tailles de deux aptamères par rapport à une fibre d'α-syn. Les aptamères « Spinach » (en haut) et l'aptamère du GTP (en bas), tous deux de chimie ARN, et respectivement de 91 et 41 bases (Identifiants PDB : 4TS2 et 2AU4) ont été positionnés à l'aide du logiciel Pymol à côté d'une fibre F d'α-syn (polymorphe 2B). Image réalisée par Luc Bousset, du laboratoire des maladies neurodégénératives, Molecular Imaging Research Center du CEA/CNRS.

Nous avons observé que l'aptamère « Spinach » de 91 bases couvre une surface d'une vingtaine de monomères d'α-syn sur la fibre, tandis que l'aptamère du GTP de 41 bases couvre 7 monomères seulement (Figure 66). Ainsi, la taille de nos aptamères, et des oligonucléotides testés de manière générale, implique un site de liaison comptant 7 à 20 monomères. Cette gêne « stérique » ne suffit cependant pas à expliquer le faible B_{max} mesuré lors de ces tests d'affinité. Des techniques d'imagerie par microscopie électronique permettraient peut-être de déterminer plus précisément les sites d'interaction des aptamères sur les fibres d'α-syn.

Enfin, analysées ensemble, certaines observations prêtent à réfléchir :

- Tout d'abord, de manière étonnante, les séquences aléatoires ne paraissent pas se lier aux fibres F selon des liaisons de type « non-spécifiques » comme attendu. En effet, les quantités de séquences aléatoires liées aux fibres F ne varient pas de manière linéaire et non saturable en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante (cf. Introduction, Figure 20). Les séquences aléatoires se lient aux monomères et aux fibres d' α -syn au contraire plutôt comme si des liaisons de type « spécifique » étaient en jeu : les quantités de séquences aléatoires liées aux fibres augmentent de manière hyperbolique en fonction de la concentration en oligonucléotide croissante et présentent une saturation. Ceci suggère que les oligonucléotides ont une affinité de type spécifique pour les fibres d' α -syn.
- Certains candidats aptamères (comme le R01) ont une affinité pour les fibres d' α -syn inférieure aux séquences aléatoires. Ceci est étonnant car en théorie l'accroche non-spécifique devrait être identique d'un oligonucléotide à l'autre s'ils ont la même taille et même chimie.
- Nous pouvons aussi remarquer qu'il y a au maximum une différence d'un facteur 4 ou 5 entre les quantités d'aptamères liées aux protéines et les quantités de séquences aléatoires de la même chimie liées aux protéines. Ceci est assez étonnant car ce rapport est plus élevé généralement pour les aptamères.
- Les résultats de compétition pour les fibres F et R suggéraient que les aptamères et les séquences aléatoires avaient le même site de liaison, mais que les aptamères avaient des affinités les plus fortes.
- La liaison des aptamères aux fibres est fortement diminuée en présence de compétiteur.

Ces différentes observations me poussent à formuler une hypothèse : les oligonucléotides (séquences aléatoires et aptamères) reconnaissent un site de liaison présent sur toutes les fibres amyloïdes (ce qui expliquerait les affinités secondaires observées). Ces liaisons sont donc de type « spécifiques » (ce qui expliquerait que les quantités de séquences aléatoires liées à la cible saturent lors des expériences de gamme). L'intensité de cette « affinité intrinsèque » est en partie déterminée par leur chimie (ce qui expliquerait les différences observées entre les séquences aléatoires ARN2'F-Py et ADN). Les séquences des aptamères influent aussi sur la liaison aux fibres en leur donnant une structure stabilisant ou déstabilisant leur liaison aux sites (ce qui expliquerait que certaines séquences se lient moins que les séquences aléatoires à la cible comme le R01, tandis que d'autres comme le N30-G sont des aptamères de forte affinités).

Finalement, une piste de réflexion pour la recherche d'aptamères « spécifiques » serait l'utilisation de la sélection branchée multiple, telle que nous l'avons utilisée dans ce travail de thèse. Certes, les résultats dans notre projet de cette stratégie de recherche ont été décevants, mais cet échec est probablement principalement dû à la non-utilisation des tubes à faible adsorption. Cette stratégie me semble donc faisable et très prometteuse.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les maladies neurodégénératives (MNs) sont un groupe de maladie caractérisées par une lente dégénérescence des cellules du cerveau. Ce sont des maladies très invalidantes, entraînant une perte d'autonomie progressive des malades. Les maladies neurodégénératives sont pour la plupart liées à l'âge. De par l'augmentation de la durée de vie, le nombre de patients augmente actuellement de manière forte, et les conséquences sociaux-économiques des MNs sont donc appelées à être de plus en plus importantes. Les MNs restent malheureusement à ce jour toujours principalement dépourvues de solutions thérapeutiques. Cette situation peut en partie être expliquée par le fait que la communauté scientifique peine à identifier avec certitude les causes à l'origine de ces pathologies. Un second frein majeur est que les MNs aux stades précoces présentent souvent des symptômes similaires, et un diagnostic précis ne peut généralement être posé qu'aux stades les plus avancés de la maladie.

Cette thèse avait pour but d'aider la communauté scientifique à mieux comprendre et mieux diagnostiquer les MNs. L'objectif de mon travail était de développer des sondes moléculaires, appelées aptamères, spécifiques de plusieurs conformations de fibres d' α -syn. En effet, les fibres d' α -synucléine sont retrouvées accumulées au sein d'agrégats dans le cerveau des patients pour plusieurs maladies neurodégénératives, qui sont regroupées sous le nom de « synucléinopathies ». Parmi elles on retrouve notamment la maladie de Parkinson (MP), l'atrophie multi-systématisée (AMS) ou la démence à corps de Lewy (DCL). Ces aptamères spécifiques des conformations de fibres d' α -syn permettrait d'étudier l'hypothèse selon laquelle l'existence des différentes synucléinopathies (MP, AMS, DCL) pourrait être expliqué par le fait que ces pathologies sont dues à des conformations différentes de fibres.

En utilisant la technique du SELEX, nous avons réussi à isoler plusieurs aptamères. Le plus prometteur, l'aptamère N30-G, de chimie ARN2'F-Py est capable de reconnaître une conformation de fibre d' α -syn nommée « F » avec une affinité entre 5 et 10 nM, et est également capable de la distinguer d'autres fibres d' α -syn qu'il ne reconnaît pas. Nous avons aussi mis en évidence, avec trois méthodes de mesures différentes, que cet aptamère reconnaissait avec une affinité au moins 10 fois plus faible la protéine α -syn sous forme native (non fibrillaire). Nous avons aussi montré que cet aptamère ne reconnaissait pas non plus la fibre amyloïde- β . Il avait cependant une affinité pour les fibres Tau1N3R, mais étonnamment de type « non-spécifique », sans que l'on puisse calculer un k_d précis.

Notre travail a aussi contribué à caractériser des aptamères ADN issus de SELEX réalisés précédemment par d'autres équipes. Nous avons mis ainsi en évidence que les aptamères T-SO508 et F5R1 de chimie ADN se liaient à plusieurs fibres amyloïdes différentes avec des affinités variables. Les aptamères M5-15 et F5R2, également de chimie ADN, n'étaient pas non plus capables de se lier aux fibres d' α -syn.

Nos tests de compétition entre les aptamères ont montré que ceux-ci partageaient les mêmes sites de liaisons sur les fibres, mais que certains aptamères avait une affinité supérieure aux autres. La petitesse des B_{max} calculés suggérait que les aptamères se liaient au maximum à un monomère sur 125 sur les fibres. D'autres études comme des essais de microscopie électronique pour identifier et comprendre les sites d'interactions des aptamères sur les fibres pourraient être judicieux.

L'objectif de notre thèse était de pouvoir donner à la communauté scientifique des outils de détection de fibres d' α -syn faciles à utiliser et pouvant être utilisables dans un grand nombre de laboratoires. Nous avons réalisé un premier essai de détection des fibres à l'aide de colonne d'exclusion stérique qui ont mis en évidence que l'aptamère N30-G était bien capable de détecter significativement des fibres F d' α -syn. Bien qu'il n'ait pas été démontré pour l'instant que cette conformation de fibre d' α -syn soit présente chez les patients atteints de synucléinopathies, la fibre « F » est utilisée comme modèle pour des études de propagation chez l'animal. La mise au point de méthodes de détection de la conformation F de fibre pourrait donc être utile pour ces études. Ceci constituerait aussi une preuve de principe que la détection de conformations précises de fibre amyloïde est possible dans des échantillons de patient. On peut envisager le développement de tests ELISA, en testant si l'anticorps 5G4 pourrait être utilisé en « sandwich » avec l'aptamère N30-G. Des tests dérivés de la qPCR exploitant la capacité des oligonucléotides à être amplifiés par PCR pourraient être aussi mis au point. Des modifications de l'aptamère peuvent donc être à envisager, en effet l'aptamère doit être capable de résister aux nucléases présentes dans les échantillons biologiques.

Ce travail a montré que les SELEX « classiques » contre une fibre de type « amyloïde » (fibre contenant des feuillets β -amyloïdes, comme les fibres Tau, A β , α -syn etc.) amplifient des aptamères ayant des affinités secondaires pour d'autres fibres amyloïdes. L'étape de criblage nous a permis d'identifier parmi les aptamères ceux qui ont une spécificité plus élevée et ceux qui ont une affinité secondaire moindre pour les autres fibres amyloïdes. Néanmoins, il pourrait être judicieux d'utiliser la technique de la sélection branchée multiple pour essayer d'identifier à l'aide du séquençage haut débit les séquences présentant une affinité spécifique pour une fibre amyloïde précise et pas d'affinité secondaire pour les autres types de fibres. Nous pourrions envisager de réaliser la sélection branchée multiple sur un tour intermédiaire du SELEX « F », selon la même méthode utilisée à partir du SELEX « R » dans ce travail : diviser la banque et réaliser des sélections parallèles contre différentes protéines ou fibres amyloïdes, puis déterminer en analysant les données de séquençage haut débit les séquences ayant une bonne affinité pour la fibre F mais pas pour les autres fibres amyloïdes (comme la fibre Tau). Un avantage est que nous avons déterminé l'affinité de différentes séquences (les candidats « N ») pour différentes fibres amyloïdes, ainsi nous pourrions avoir une première approche de la corrélation entre les résultats de séquençage haut débit et les affinités réelles des séquences. Une autre méthode envisageable pour sélectionner de manière plus générale des aptamères contre des fibres amyloïdes retrouvées dans des MNs, serait de réaliser plusieurs tours d'un nouveau SELEX contre plusieurs fibres amyloïdes en même temps. Cette banque présélectionnée pourrait être ensuite utilisée comme point de départ d'une sélection branchée multiple contre des fibres amyloïdes présentées individuellement.

Notre travail présente une preuve de principe qu'il est possible de sélectionner un aptamère spécifique d'une conformation de fibre amyloïde. Néanmoins, les derniers résultats des équipes de recherches montrent que les fibres recombinantes formées *in vitro* n'ont pas la même structure que celles amplifiées à partir des échantillons de patients. Il serait possible d'envisager de réaliser des sélections (SELEX, sélections branchées multiples) directement contre ces types de fibres. Les aptamères obtenus reconnaîtraient donc les fibres

« marqueurs » des MNs et pourraient donc être réellement utilisés pour le diagnostic des patients.

Enfin, s'il se révèle finalement compliqué d'obtenir des aptamères spécifiques d'une conformation de fibre, une autre méthode de détection envisageable serait d'utiliser le fait que même si les aptamères ont des affinités pour plusieurs fibres amyloïdes, ces affinités ont des degrés différents. Chaque fibre amyloïde aurait donc une « signature » différente, constituée des affinités de chaque aptamère pour celle-ci. Plutôt que de multiplier les détections en parallèle des fibres dans les échantillons de patients avec un aptamère à la fois, il serait possible de réaliser une incubation d'un mélange d'aptamère dans l'échantillon, et de récupérer les molécules s'étant liées aux constituants de l'échantillon par une technique de séparation simple (comme une colonne Sp6). La composition du mélange des oligonucléotides finalement retenus pourrait être ensuite déterminé précisément par qPCR ou par séquençage haut débit (dans le cadre d'une méthode de dépistage d'une population importante) et constituer ainsi un « code barre » de la composition en fibres amyloïdes présentes dans l'échantillon. La présence de différentes fibres amyloïdes dans l'échantillon pourrait ainsi être déterminée, et ainsi un diagnostic moléculaire de la pathologie du patient réalisé.

MATERIEL & METHODES

I. Techniques utilisées pour la sélection in vitro

A. Sélection de banque lors des SELEX

1) Obtention des banques de départ

Afin de pouvoir commencer le SELEX nous devons tout d'abord obtenir la banque de départ sous forme ARN 2'-Fluoro-Pyrimidine.

Pour chaque SELEX, une banque sous forme ADN a été commandée chez Eurogentec. Cette banque a été purifiée par une électrophorèse dans un gel d'acrylamide en condition dénaturante afin de ne travailler qu'avec les séquences ayant la longueur attendue (96 bp pour les SELEX « R » et « 4F » et 81 bases pour les SELEX « F » et « F-spécifique »).

Afin de pouvoir procéder à la transcription de la banque, il a fallu d'abord allonger celle-ci côté 5' afin de rajouter la séquence formant le promoteur pour l'ARN polymérase du phage T7 (présente sur les amorces p73 et p72). Cette étape d'élongation correspond à un cycle de PCR, en utilisant seulement l'amorce p73 (pour le SELEX « R » et « 4F ») ou p72 (pour les SELEX « F » et « F-spécifique »).

Des tests préliminaires rapides ont permis d'identifier que la température d'hybridation des amorces permettant une élongation optimale de la banque était 57°C. 10 nmoles de banque purifiée ont été hybridées avec leur amorce (p73 pour les SELEX « R » et « 4F » et p72 pour les SELEX « F » et « F-spécifique ») avant de générer une matrice d'ADN double brin par un cycle de PCR. Cette matrice d'ADN double brin a également été purifiée par une électrophorèse dans un gel d'acrylamide en condition non-dénaturante.

Pour la préparation des banques pour les SELEX « R » et « 4F », il a été constaté de manière inattendue que l'on pouvait observer sur le gel lors de cette migration deux bandes distinctes rapprochées. La différence de hauteur pouvant s'expliquer par des migrations différentes dû à des séquences différentes, nous avons décidé d'utiliser ces deux bandes comme matrice de départ. Ces deux bandes distinctes ont néanmoins été éluées puis transcrites en ARN 2'-F-Py séparément, afin de conserver la diversité existante a priori entre ces deux bandes. Pour constituer la banque initiale de départ du SELEX, 2 nmoles d'ARN 2'-F-Py de chacune des deux bandes ont été mélangées.

2) Protéines mises à disposition

Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Ronald Melki, cette équipe nous a fourni les protéines nécessaires aux travaux.

Cette équipe a réalisé l'expression de la protéine d' α -syn humaine chez la bactérie *Escherichia coli*. Ces protéines ont ensuite été purifiées et assemblées en fibres F, R, 65 et 91 selon des protocoles publiés précédemment (Bousset et al., 2013; Makky et al., 2016). Une fois ces assemblages contrôlés et caractérisés, ils ont été repris dans le tampon de sélection 1 X (Ts1X) à la concentration de 100 μ M. Une concentration de 100 μ M signifie que la concentration de la solution est de 100 μ M en monomère d' α -syn composant les fibres.

Un premier lot de protéine a été utilisé, comportant des aliquots de fibre F, R, 65 et 91 ainsi que des monomères d' α -syn. Ce lot a été utilisé pour les SELEX « R » et « 4F » ainsi que pour les tests d'affinité qui ont été réalisés à la suite de ces SELEX. Chacun des assemblages de protéine a été repris en Ts1X puis divisé en petits aliquots de 12 μ L. Ces protéines ont ensuite été stockées à -80°C (pour une conservation optimale), ce qui permettait de ne sortir pour chaque expérience que le nombre d'aliquots nécessaires. Pour être utilisés, ces tubes étaient déposés directement dans la carboglace en sortie du congélateur à -80°C, puis décongelés rapidement dans un bain-marie à 37°C pendant 3 minutes. Cette procédure devait être impérativement respectée afin d'éviter que les structures de fibres d' α -syn ne soient dépolymérisées lors d'un passage trop long aux températures proches de 0 degrés.

Un deuxième lot de fibre F et R ainsi que de monomères d' α -syn a été réalisé pour les SELEX « F » et « F-spécifique ». Les aliquots ont été repris en PBS et conservés dans une étuve à 37°C.

3) Sélection sur nitrocellulose (SELEX « R » et « 4F », et sélection branchée multiple)

Les fibres F,R,65 et 91 étant potentiellement neurotoxiques, les étapes de sélection du SELEX ont été réalisées en niveau P3 et nous avons reçu pour consigne de manipuler celles-ci lors du SELEX dans des conditions de sécurité spéciales (Bousset et al., 2016; Fenyi et al., 2018).

a) Préparation des membranes nitrocelluloses au KOH

Les membranes de nitrocellulose (membrane HAWP de 0.45 μ) utilisées pour les sélections (ronde, de 2.5 cm de diamètre - HAWP 02500), mais aussi celle utilisées pour les tests d'affinité (Rouleau - de référence Millipore HAWP00010) ont été pré-traitées avant utilisation par du KOH afin de réduire la fixation des oligonucléotides sur la membrane nitrocellulose (Wong and Lohman, 1993).

Pour cela, les membranes sont incubées 20 min dans une solution de KOH 0.5 M (sous agitation constante). Les membranes sont ensuite rincées trois fois avec de l'eau Milli-Q (3 bains successif d'une minute avec agitation douce à la main), afin d'enlever toute trace de KOH. Les membranes ont ensuite été plongées dans un bain de Tris 100mM (pH 7.5) pendant 45 min et sous agitation. Les membranes étaient ensuite conservées avant utilisation à 4°C dans du Tris 100mM (pH 7.5).

b) Contres-sélection et sélections sur nitrocellulose (réalisées lors des SELEX « R » et « 4F »)

Les SELEX « R » et « 4F » ont été réalisés par filtration sur nitrocellulose. A l'exception du tour n°1 qui était composé d'une sélection contre un mélange des quatre fibres F, R, 65 et 91, chaque tour de SELEX était composé de deux contre-sélections suivie d'une sélection.

Chacun des tours de sélection des SELEX « 4F » et « R » commençaient par une contre-sélection contre les monomères d' α -syn. La banque ARN2'F-Py (cf. Tableau 5, partie Résultats) en Ts1X, subissait tout d'abord un choc thermique : 5 min à 85°C, 5 min à 4°C (dans la glace),

5 min à 37°C. La banque était ensuite incubée à 37°C en Ts1X dans 500µL avec 1.2 nmol de monomères d'α-syn. Le temps d'incubation a varié au cours des tours, afin d'augmenter progressivement la pression de sélection.

Temps d'incubation	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9 <i>Ultracentrifugation</i>	T10
Contres-sélections	-	45 min	45 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	45 min	30 min
Sélection	60 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min	45 min

Tableau 15 - Evolution des temps d'incubation lors des SELEX "4F" et "R"

La membrane de nitrocellulose (ronde, HAWP02500) pré-traitée au KOH était équilibrée pendant plusieurs minutes dans un bain en Ts1X. Cette membrane était ensuite déposée sur un appareil de filtration appelé « Swinnex » (Référence : Dutscher 044094), et les 500 µL de solution de contre-sélection déposés au goutte à goutte dessus. Ces swinnex permettaient de récupérer facilement la solution passée à travers le filtre, et ainsi de passer à l'étape suivante facilement. La membrane de nitrocellulose dans le swinnex était ensuite lavée avec 500µL de Ts1X. Nous récupérons donc 1 ml en volume total.

Pour la 2^{ème} contre-sélection, 1.2 nmol des fibres F, 91 et 65 ont été mélangées au 1 mL issu de la contre-sélection n°1 du SELEX « R ». Et 1.2 nmol de monomères d'α-syn sont mélangées au 1 ml issu de la contre-sélection n°1 du SELEX « 4F ». Après incubation, le processus de contre-sélection suivi était le même que pour les contre-sélection n°1. Nous récupérons donc en moyenne 1.5 mL issu des contre-sélections.

Pour les sélections, les 1.5ml issu des contre-sélections n°2 étaient mélangés en Ts1X avec 1.2 nmol de fibre pour le SELEX « R » et à 1200 pmol de fibre F, R, 65 ou 91 selon le tour de sélection du SELEX « 4F » (cf. Tableau 5). Après incubation à 37°C, les mélanges de sélection étaient déposés au goutte à goutte sur les membranes nitrocelluloses. Cette opération était réalisée à l'aide d'un appareil de filtration permettant de filtrer 12 membranes simultanément (Référence : Merck-Millipore XX2702550). Ce support permettait d'aller plus rapidement mais permettait moins facilement la récupération des solutions passées à travers le filtre, il était donc mieux adapté à l'étape de sélection. Après dépôt des mélanges de sélection, les membranes étaient lavées avec 3 mL de Ts1X.

c) Contre-sélection et sélection par ultracentrifugation
(Tour n°9 des SELEX « R » et « 4F »)

Le tour n°9 des SELEX « R » et « 4F » était composé d'une seule étape permettant simultanément de faire une contre-sélection contre les monomères et une sélection contre la fibre R.

Pour cela, après le choc thermique des oligonucléotides ARN2'F-Py de la banque, celle-ci a été mélangée dans 500 µL de Ts1X avec 1.2 nmol de fibre R et 1.2 nmol de monomère d'α-syn. Après l'incubation à 37°C, les tubes ont été ultracentrifugés pendant 45 min à 100 000g. Le surnageant (contenant les oligonucléotides s'étant liés aux monomères) a été éliminé. Le

culot formé par les fibres R (et contenant les oligonucléotides s'étant potentiellement liés aux fibres R) a été lavé par addition de 500 µL de Ts1X suivi d'une ultracentrifugation à 100 000g de 13 min. Les surnageant a ensuite été éliminé et le culot repris par 500µL de 7M urée, Ts1X.

4) Sélection sur colonne d'exclusion stérique (SELEX « F » et « F spécifique »)

Pour les SELEX « F » et « F spécifique » les étapes de sélection du SELEX n'ont pas été réalisées en laboratoire de bio-sécurité de niveau P3 car il s'est avéré que les quantités de fibres qui étaient manipulées étaient très faibles et en plus elles étaient en solution. Nous avons néanmoins suivi des consignes de sécurité pour manipuler ces fibres (Bousset et al., 2016; Fenyi et al., 2018).

a) Remise en tampon Ts1X des colonnes

Les contre-sélections et sélections sont réalisées par filtration sur colonne Sp6 (Biorad – 7326201 - Micro Bio-Spin P-6 Gel Columns, SSC Buffer). Avant les étapes de contre-sélection ou de sélection, le tampon SSC des colonnes est changé pour notre tampon Ts1X. Pour cela nous suivons les instructions données par Bio-rad pour changer à 99.9% le tampon des biospin : nous réalisons quatre centrifugations successives de 1 min à 1000 g après avoir ajouté dans la colonne 500µL de Ts1X.

b) Contre-sélection et sélection réalisées

15 tours de sélection ont été réalisés pour les SELEX « F » et « F-spécifique ». De manière à augmenter progressivement la pression de sélection, nous avons fait varier certaines des conditions de sélection : quantité et concentration de la banque ARN2'F-Py lors de la contre-sélection, quantité de fibre F lors de l'étape de sélection, temps d'incubation lors des contre-sélection et sélections, nombre de lavage lors des sélections (cf. Tableau 9, partie Résultats).

Pour chacun des tours de sélection réalisé, la banque ARN2'F-Py a tout d'abord subi un choc thermique (5 min à 37°C, 5 min à 4°C dans la glace). Pour le SELEX « F-spécifique », une première contre-sélection contre les fibres R et les monomères d'α-syn est tout d'abord réalisée, et le mélange banque ARN2'F-Py/ fibre R et monomère est incubé à 37°C dans un tube à faible adsorption (Eppendorf –tube ProteinLoBind ou Dutscher – tube 045514 hydrophobe à faible adsorption).

A la fin de l'incubation, le mélange de contre-sélection ARN2'F-Py/ fibre R et monomère du SELEX « F-spécifique » est déposé au goutte à goutte sur le gel d'une colonne Sp6. Pour le SELEX « F », une simple contre-sélection est réalisée contre le support de sélection (i.e la colonne Sp6) : la banque d'ARN2'F-Py en Ts1X est donc déposée seule au goutte à goutte sur la colonne Sp6. Les colonnes sont ensuite centrifugées 4 min à 1000 g. Les éluats issus de centrifugation sont récupérés et utilisés comme départ des étapes de sélection des SELEX « F » et « F-spécifique ».

Toutes les fractions résultantes des SELEX étant mesurées par spectrofluorométrie afin d'analyser au mieux les dynamiques en cours lors des SELEX. Deux lavages de 75µl au Ts1X et deux éluions au SDS2% des colonnes Sp6 ont également été réalisées après les contre-sélections.

Les surnageants récupérés après les contre-sélections sont ensuite mélangés aux fibres F selon la quantité choisie pour le tour (cf. Tableau 9, partie Résultats), et le mélange est incubé à 37°C toujours dans un tube à faible adsorption (cf. Tableau 9, partie Résultats). Après l'incubation, les mélanges de sélection sont déposés au goutte à goutte sur les colonnes et une première centrifugation des colonnes Sp6 (4 min -1000 g) est réalisé. Plusieurs lavages des colonnes par addition de 75µL de Ts1X suivi de centrifugation (4 min -1000g) sont ensuite réalisés successivement (cf. Tableau 9, partie Résultats). L'éluion finale des oligonucléotides restés dans les colonnes liées au fibre R est réalisée en deux lavages successifs des colonnes avec 150 µL de SDS 2%.

5) Extraction des ARN2'F-Py sélectionnés

Les oligonucléotides sélectionnés lors de ces tours de sélection ont ensuite été extraits des solutions de SDS 2% par phénol-chloroforme selon le protocole décrit pour l'extraction d'ARN par (Green and Sambrook, 2012a). La seule différence étant que nous ne réalisons pas l'étape de chauffage préconisée. (Références des produits utilisés : Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol en proportion (25:24:1)- Sigma, 77617 ; Chloroform:isoamyl alcohol en proportion (24:1) - Sigma, C0549).

La précipitation à l'éthanol réalisée à la fin du protocole d'extraction est faite en rajoutant 5 µL de « linear polyacrylamide » (LPA) qui permet de favoriser la précipitation en cas de faible quantité d'ARN2'F-Py. Les culots obtenus sont ensuite repris en eau.

Afin d'éliminer toute trace de phénol dans les solutions, une purification était également réalisée à l'aide d'une colonne Sp6 (4 min -1000g) : le phénol, une molécule de poids moléculaire faible, reste dans la colonne tandis que les oligonucléotides, eux sont élués lors de la centrifugation.

6) Quantifications des fractions d'ARN2'F-Py

a) Quantification à l'aide du kit Quant-iT RiboGreen - Pour les SELEX « 4F » et « R »

Pour les SELEX « 4F » et « R » les fractions d'ARN2'F-Py sélectionnées à l'issu du tour de sélection ont été quantifiées à l'aide du kit Quant-iT RiboGreen (ThermoFisher – référence : R11490). Nous avons suivi le protocole de dosage fourni par le fabriquant. La gamme étalon de référence a été préparée de 0 à 100 ng/ml, et les mesures de fluorescence ont été réalisées en plaque 96 puits à l'aide d'un spectrofluorimètre.

b) Mesure d'absorbance au spectrofluorimètre - Pour les SELEX « F » et « F-spécifique »

Pour les SELEX « F » et « F-spécifique », les quantités d'ARN2'F-Py récupérées sont quantifiées avec l'aide du spectrofluorimètre. Sachant que la quantification en cuve nécessite un volume de 100µL au minimum, les mesures ont été suivies d'une 2^{ème} précipitation à l'éthanol pour reprendre les ARN2'F dans un volume compatible avec une Rétro-transcription (RT). Cette précipitation a été réalisée selon le protocole indiqué par (Green and Sambrook, 2012b) pour la précipitation de l'ARN à l'éthanol. Nous avons également rajouté 5 µL de « linear polyacrylamide » (LPA) pour favoriser la précipitation en cas de faible quantité d'ARN2'F-Py.

Toutes les fractions (surnageant, lavages, éluions) des contre-sélections et sélections des SELEX « F » et « F-spécifique » ont sont ensuite également quantifiées.

B. Amplification des banques après sélection

1) Traitement à la DNase - Pour les SELEX « 4F » et « R »

Pour les SELEX « 4F » et « R », avant la rétro-transcription des ARN2'F-Py en ADN, nous avons réalisées un traitement visant à éliminer d'éventuelles traces d'ADN contaminant, afin de ne pas avoir de séquences parasitant l'amplification des ARN2'F-Py. Pour cela, nous avons utilisé le kit de suppression d'ADN DNA-free (Ambion – AM1906).

Nous n'avons pas utilisé ce kit pour les SELEX « F » et « F-spécifique », car il s'agissait d'une précaution optionnelle, que nous avons décidé d'enlever du protocole de sélection afin de gagner du temps.

2) Transcription inverse des ARN2'F-Py en ADN

La transcription inverse (RT) a été réalisée en utilisant le kit Transcriptase inverse SuperScript II (Thermofisher – 18064022). Les oligonucléotides ARN2'F-Py en mélange avec 2.4 µM d'amorce PiRT sont incubés 10 min à 70°C puis 2 min à 50°C. Le reste du mix de RT est ensuite ajouté selon les proportions du Tableau 16, et le mélange incubé 50 min à 50°C.

	C₀	C_{finale}	<i>Référence des produits</i>
PiRT (Amorce)	20,0 µM	2,4 µM	
Tampon 5X "first strand buffer"	5 X	1 X	<i>Invitrogen P/N Y02321</i>
DTT à 0,1 M	0,1 M	10,00 mM	<i>Invitrogen - P/N Y00147</i>
dNTP	10,0 mM	0,5 mM	<i>Sigma D7295</i>
Superscript II	200,0 U/µL	10,0 U/µL	<i>Invitrogen P/N 100004925</i>

Tableau 16 - Composition d'un mix de transcription inverse

J'ai généralement réalisé un volume de 40 µL de RT pour chaque tour de SELEX. Les seules exceptions ont été les tours 2 et 3 des SELEX « F » et « F-spécifique » pour lesquels 45.8µL et 20µL de RT avaient été réalisés.

3) Amplification par PCR

Trois Taq Polymérase différentes ont été utilisées au cours de ces travaux : l'AmpliTaq Gold 360 (ThermoFisher - Applied Biosystems - Référence : 4398813), l'Accuprime GC-Rich (ThermoFisher - Invitrogen - Référence :12337) et la OneTaq Hot Start (New England Biolabs – Référence M0481).

Lors des SELEX « 4F » et « R » nous avons, lors de l'étape d'amplification, fait varier à chaque tour de sélection la Taq polymérase utilisée (cf. Tableau 17). Cette précaution visait à empêcher que certaines séquences, mieux amplifiées par certaines Taq polymérase prennent le dessus sur les autres, sans avoir pour autant de meilleur affinité pour la cible. Pour les SELEX « F » et « F-spécifique » seule la One Taq Hot Start a été utilisée.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
Nombre de cycle PCR	25	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Taq utilisée	Accuprime GC-rich	Accuprime GC-rich	AmpliTaq Gold 360	Accuprime GC-rich	AmpliTaq Gold 360	Accuprime GC-rich	One Taq Hot start	Accuprime GC-rich	Accuprime GC-rich	One Taq Hot start

Tableau 17 – Tableau indiquant les Taq polymérase utilisées à chaque tour des SELEX « R » et « 4F », ainsi que le nombre de tour de PCR réalisé.

Les mélanges PCR ont été réalisés selon les tableaux Figure 67. Les cycles PCR adaptés à chaque Taq polymérase sont aussi présentés Figure 67. Les amorces utilisées pour les PCR sont présentées Tableau 18.

p72	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATCCGTTGAGGCTGA 3'
p73	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTATCCGTTGGAGGCAT 3'
PiRT	5' CCTACACGACGCTCTCCGATCT 3'

Tableau 18 - Amorces utilisées pour l'amplification PCR. L'amorce p72 a été utilisée pour les PCR des SELEX « F » et « F-spécifique », puisque cette amorce correspond à la banque utilisée pour ces SELEX. De même, l'amorce p73 a été utilisée pour les SELEX « R » et « 4F » ainsi que pour les sélections branchées multiples. Le PiRT est l'autre amorce utilisée pour toutes les PCR.

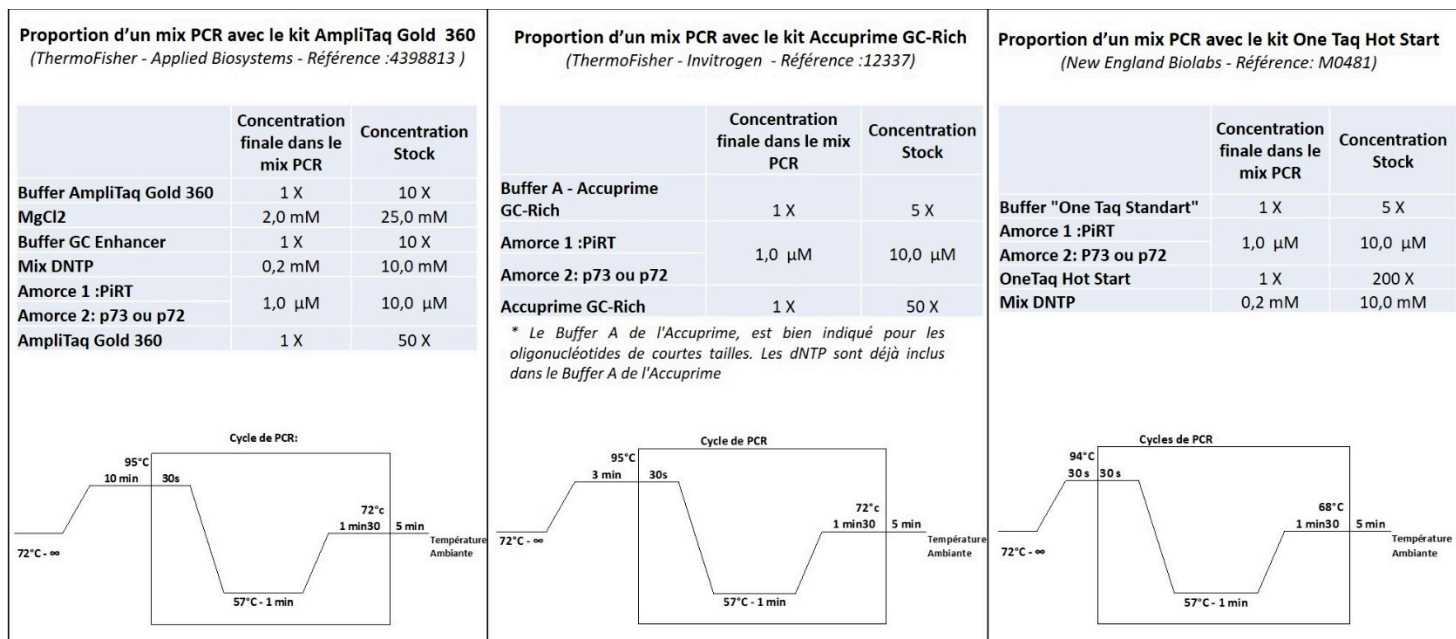


Figure 67 - Composition des mix PCR réalisés pour chaque Taq Polymérase, et cycles de PCR associés

Le volume de PCR réalisé pour chaque tour de SELEX « R » et « 4F » était de 500 µL. Pour les SELEX « F » et « F-spécifique » le volume de PCR était de 400 µL à chaque tour (à l'exception des tours n°1 et 2 où le volume de PCR était de 500µL).

Pour les SELEX « R » et « 4F » nous avons dû réaliser un grand nombre de cycle de PCR pour avoir une amplification suffisante du matériel (cf. Tableau 17). Ceci est probablement dû aux petites quantités de matériel sélectionnées à l'issu de chaque tour de sélection (cf. Résultats, partie. I.A.2)b) ci-dessus). Pour les SELEX « F » et « F-spécifique », 15 cycles de PCR étaient généralement suffisants pour avoir une amplification suffisante du matériel. Nous avons dû néanmoins ajouter pour certains tours quelques cycles car l'amplification n'était pas suffisante à 15 tours (c'est-à-dire, les bandes correspondantes à la banque amplifiées sur gel agarose n'étaient pas assez visibles). Ainsi, 16 cycles de PCR ont été réalisés pour les tours 7, 18 pour le tour n°2, et 20 pour les tours n°1 et 15.

L'amplification PCR était généralement vérifiée par migration sur un gel d'agarose 3%-TBE1X où du GelRed (Biotum – 41003) était ajouté à 0.1%. 5µl du mix PCR dont on souhaitait vérifier l'amplification était mélangé à 1µL de bleu de charge et déposé dans un puit sur le gel. Après migration de 20 min à 100 V, le gel était exposé aux UV afin de révéler les bandes d'oligonucléotides présentes dans le mix PCR. La taille des oligonucléotides correspondant aux bandes observées était estimée par comparaison des bandes présentes dans le « ladder » (ThermoFisher – « Generuler ultra low range » SM1213) déposé sur le gel agarose en même temps que les mix PCR.

4) Transcription par l'ARN polymérase T7

Le mélange des PCR, était ensuite concentré par un amicon 30 k (Merck - UFC503096). Ceci permettait de réduire le volume du mélange mais aussi d'enlever les dNTP du mix n'ayant pas été utilisés pendant la PCR.

Le mélange de produit PCR était ensuite mélangé aux réactifs de transcription selon les proportions indiquées dans le Tableau 19. La composition du tampon H5X utilisé dans le mélange de transcription est décrite Tableau 20. Le mélange était incubé à 37°C pendant une nuit entière.

	Concentration finale	Concentration stock	Référence
Tampon H5X	1 X	5 X	<i>Réalisé par l'équipe</i>
Triton X100	0.1%	100 %	<i>Sigma T8787</i>
DTT	8,0 mM	1,0 M	<i>Préparé au laboratoire</i>
ATP	3,00 mM	100,00 mM	<i>Sigma 272056</i>
GTP	3,00 mM	100,00 mM	<i>Sigma 272076</i>
2F'UTP	3,00 mM	100,00 mM	<i>Trilink N1010</i>
2F'CTP	3,00 mM	100,00 mM	<i>Trilink N1008</i>
DMSO	10 %	100 %	<i>Sigma D9170</i>
Pyrophosphatase	2,00 U/ml	100,00 U/ml	<i>Roche 10108987001</i>
T7 ARN polymérase H772R	1 X	10 X	<i>Purifiée au laboratoire</i>

Tableau 19 - Composition du mélange utilisé pour la transcription avec l'ARN polymérase T7

	Concentration finale	Concentration Stock	Référence
Hepes	200,0 mM	1,00 M	Sigma – H0887
MgCl2	60,0 mM	2,00 M	Sigma - 68475
NaCl	50,0 mM	5,00 M	Sigma – S5150
Spermidine	10,0 mM	1,00 M	Sigma – 85558-56

Tableau 20 - Composition du tampon H5X utilisé pour les transcription

Le volume de transcription utilisé était de 500 µL pour chacun des tours des SELEX « R » et « 4F ». Pour les SELEX « F » et « F-spécifique », le volume de transcription était de 200 µL à chacun des tours, à l'exception du tour n°1 pour lequel le volume de transcription était de 400 µL.

C. Purification par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE)

1) Préparation du gel acrylamide 6% en TBE

a) Préparation du tampon 7M Urée-Polyacrylamide 6% en TBE 1X

Dans une éprouvette de 1L, 420g d'urée (Sigma - U5375) sont mélangés à 100 mL de TBE 10X, (Invitrogen 15581) et 400 mL environ d'eau milliQ. La solution homogénéisée est

ensuite chauffée à 37°C jusqu'à dissolution complète de la solution. 150 ml d'acrylamide/bis-acrylamide 19:1 40%, (BP1406-1 - Fisher Bioreagent) sont ensuite ajoutés sous hotte au mélange. De l'eau milliQ est ensuite ajouté pour compléter la solution jusqu'à 1L. La solution est ensuite stockée à 4°C jusqu'à son utilisation.

b) Préparation du gel Polyacrylamide

Deux plaques en verre de quarante centimètres sont soigneusement nettoyées puis montées avec deux espaceurs et maintenues solidement avec des pinces. Sous hotte, 45 ml de tampon 7M Urée-Polyacrylamide 6% en TBE 1X sont mélangés à 450 µL d'APS (Persulfate d'ammonium) 10% et 45µL de TEMED (Sigma – T7024). La solution est homogénéisée rapidement puis coulée progressivement entre les deux plaques. La solution une fois déposée, le gel est laissé à polymériser 30 min avant migration.

2) Purification des produits de transcription

a) Préparation et migration sur gel polyacrylamide

La première étape de la purification des produits de transcription est la dégradation des produits PCR par une DNase spécifique de l'ADN et laissant intact l'ARN. 1µL de la DNase (Ambion DNase I AM2222) est ajouté pour 50 µL de solution de transcription. Le mélange est ensuite incubé pendant 20 min à 37°C.

Nous réalisons ensuite une précipitation à l'éthanol selon le protocole indiqué par (Green and Sambrook, 2012b) pour la précipitation de l'ARN à l'éthanol. L'étape de chauffage du mélange n'est cependant pas réalisée. Les culots obtenus sont finalement repris pour la migration dans un tampon dénaturant (7M urée, TbE1X) contenant deux colorants : le bleu de bromophénol et le xylène cyanol.

Juste avant d'être déposé sur le gel polyacrylamide pour la migration, les échantillons subissent une dénaturation thermique de 5 min à 85°C. La migration est réalisée en 30 et 50 W pendant 1 à 2H. Les colorants bleus permettent de surveiller l'avancée de la migration. Celle-ci est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol arrive en bas du gel.

A la fin de la migration, l'ARN2'F-Py est révélée par UV-shadow, et les bandes adéquates découpées du gel selon le protocole décrit pour la séparation des ARN par électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide-urée (Green and Sambrook, 2012c).

b) Elution de l'ARN2'F-Py

Deux méthodes d'éluion différentes ont été utilisées : l'éluion « lente » et l'éluion « rapide ».

La méthode d'éluion « lente » a été utilisée lors des SELEX « 4F » et « R ». Les bandes de gel découpées sont déposées dans des tubes falcon en plastique contenant 14 ml de tampon d'éluion composé de TE1X (TE 100X - Sigma 39285) et de 25 mM NaCl (NaCl 5 M - Sigma S5150). Les tubes sont alors laissés en agitation sur roue en chambre froide (4°C) pendant la nuit entière.

La méthode d'élution « rapide » a été utilisée lors des SELEX « F » et « F-spécifique ». Le morceau de gel découpé est transféré dans un tube Falcon 15 contenant 7 ml de tampon (TE + NaCl 25 mM), et subit ensuite un choc thermique : le tube est congelé en carboglace 15 min, puis chauffé au bain marie à 85°C 5 minutes, de nouveau congelé en carboglace 15 min, puis chauffé de nouveau au bain marie à 85°C 5 minutes. Les 7 ml sont ensuite déposés dans un amicon Ultra 15 -10K (Sigma - UFC901096). 7 nouveaux ml de tampon sont ensuite ajoutés sur le gel contenu dans le tube Falcon 15. Le tube est alors laissé en agitation sur roue en chambre froide (4°C) pendant 1H au moins. Les 7 ml sont ensuite ajoutés dans l'amicon Ultra 15 -10K.

Pour les deux méthodes d'élution, l'amicon Ultra 15-10K, contenant les 14 ml de tampon d'élution, est alors centrifugé 30 minutes à 4000 g. Une précipitation à l'éthanol est alors réalisée, toujours selon le protocole de (Green and Sambrook, 2012b) pour la précipitation de l'ARN à l'éthanol. Les culots obtenus sont ensuite repris dans du Ts1X directement. La solution est ensuite dosée au nanodrop afin de quantifier la quantité d'ARN2'F-Py obtenue.

D. Séquençage haut débit des banques des tours des SELEX

Les banques sont séquencées en mélange sur des machines illumina réalisant des séquençages de 100 à 300 millions de séquences en même temps. Afin de pouvoir savoir à quelle banque appartient chaque séquence, on réalise une PCR permettant à la fois de rajouter des adaptateurs permettant le séquençage illumina, mais aussi un index à chaque banque permettant d'identifier toutes les séquences la composant.

1) PCR avec amorce contenant des index spécifiques pour chaque banque

Pour pouvoir réaliser le séquençage des banques avec des machines il faut rajouter à chaque banque des adaptateurs côté 3' et côté 5'.

Un adaptateur universel est rajouté côté 5' à l'aide de l'amorce PiRT HTS (Tableau 21). La séquence du PiRT HTS est constituée de l'amorce PiRT à laquelle a été rajoutée la séquence nécessaire au séquençage par les machines illumina.

Un adaptateur permettant le multiplexage des banques pour le séquençage est rajouté côté 3' (Figure 68). Les séquences des amorces sont constituées des parties constantes des banque 72 ou 73, d'un adaptateur « TrueSeq » universel et d'un index composé de 6 bases permettant de distinguer les banques entre elles (Tableau 22).

PIRT HTS	Amorce PiRT 5' AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT 3'
-----------------	---

Tableau 21 – Séquence de l'adaptateur universel pour le séquençage Illumina

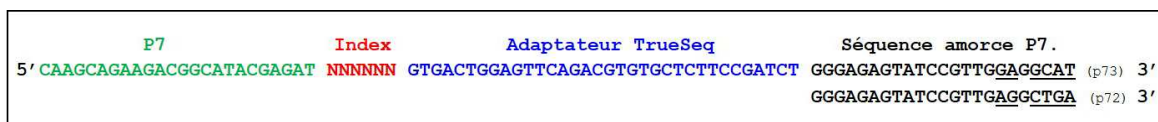


Figure 68 – Schéma de construction des amorces-adaptateur de multiplexage pour la PCR pour le séquençage haut débit

index 1	CGTGAT	index 17	CTCTAC	index 33	CGCCTG
index 2	ACATCG	index 18	GCGGAC	index 34	GCCATG
index 3	GCCTAA	index 19	TTTCAC	index 35	AAAATG
index 4	TGGTCA	index 20	GGCCAC	index 36	TGTTGG
index 5	CACTGT	index 21	CGAAAC	index 37	ATTCCG
index 6	ATTGGC	index 22	CGTACG	index 38	AGCTAG
index 7	GATCTG	index 23	CCACTC	index 39	GTATAG
index 8	TCAAGT	index 24	GCTACC	index 40	TCTGAG
index 9	CTGATC	index 25	ATCAGT	index 41	GTCGTC
index 10	AAGCTA	index 26	GCTCAT	index 42	CGATTA
index 11	GTAGCC	index 27	AGGAAT	index 43	GCTGTA
index 12	TACAAG	index 28	CTTTTG	index 44	ATTATA
index 13	TTGACT	index 29	TAGTTG	index 45	GAATGA
index 14	GGAACT	index 30	CCGGTG	index 46	TCGGGA
index 15	TGACAT	index 31	ATCGTG	index 47	CTTCGA
index 16	GGACGG	index 32	TGAGTG	index 48	TGCCGA

Tableau 22 - Tableaux des séquences des index utilisés pour les amorces pour le séquençage Illumina

Les PCR de préparation des banques pour le séquençage sont réalisées avec la OneTaq Hot Start (Figure 67). Pour 100 µL de PCR, 1µL de matrice provenant d'un échantillon de PCR mis de côté à chaque tour a été ajouté. On choisit pour chaque banque à séquencer un index, dont l'amorce correspondante est ajoutée dans le mélange PCR. L'autre amorce utilisée est le PiRT-HTS. On réalise généralement 10 cycles de PCR, qui sont suffisants pour une amplification.

2) Quantification sur Gel d'Agarose et mélange des banques

Même si un grand nombre de séquences sont présentées pour le séquençage, seul un certain nombre seront réellement séquencées (de quelques millions à quelques centaines millions selon les machines). Afin d'optimiser le séquençage et avoir des répartitions équivalentes de nombre de séquences séquencées par banque, il faut mélanger les banques de manière proportionnelle afin de présenter un mélange composé de banque en proportion équivalente.

Pour cela, les amplifications PCR sont quantifiées après une migration sur gel (agarose 3%, TBE1X) à l'aide du logiciel ImageJ. Les amplifications PCR des différentes banques sont ensuite mélangées de manière à avoir les banques en proportion équivalente.

3) Purification sur Gel d'Agarose et quantification de l'échantillon final

Les mélanges de banque sont ensuite purifiés par migration sur gel agarose 3%, TBE1X. L'exposition du gel au UV permet de visualiser les bandes d'amplification PCR. Elles sont alors découpées et déposées dans un falcon de 15 ml dans lequel on rajoute 10 ml de tampon d'élution (TE - NaCl 25 mM). Les tubes sont alors laissés en agitation sur roue en chambre froide (4°C) pendant la nuit entière.

Le lendemain, le tampon d'élution est déposé dans un amicon 30 k (Merck - UFC903024), et l'amicon centrifugé 20 min à 4000 g. Cette étape permet de réduire le volume de tampon d'élution. Une précipitation à l'éthanol est alors réalisée, toujours selon le protocole de (Green and Sambrook, 2012b) pour la précipitation de l'ARN à l'éthanol. Les culots obtenus sont ensuite repris dans de l'eau directement.

L'échantillon est ensuite quantifié à l'aide d'un Qubit. Les mesures sont réalisées selon le protocole du fabricant, pour un échantillon de type « dsDNA ». L'échantillon quantifié est ensuite déposé à la plateforme d'Imagif du CNRS à Gif sur Yvette qui se charge du séquençage sur des machines illumina (machines MiSeq ou NextSeq).

E. Analyses des résultats de séquençage Haut débit

L'analyse des données de séquençage haut débit ont été réalisées à l'aide du logiciel Patternity-seq développé au sein de l'équipe. Les méthodes utilisées ont été précédemment décrites (Nguyen Quang et al., 2016, 2018).

II. Techniques utilisées pour la mesure d'affinité des candidats aptamères contre les cibles protéiques

A. Production des candidats aptamères ARN2'F-Py

Les matrices ADN des candidats choisis à l'issue de l'analyse des données de séquençage haut débit sont commandées chez Eurogentec pour les candidats issus des SELEX « 4F » et « R » et de la sélection branchée multiple, chez Invitrogen pour les SELEX « F » et « F-spécifique ».

La PCR est réalisée suivie d'une transcription puis d'une purification PAGE selon les méthodes précédemment décrites (cf. Matériel et Méthodes, partie I.B ci-dessus). Seuls quelques points diffèrent :

On réalise ensuite pour chacune des matrices une PCR avec les amorces PiRT-G et p72 (pour les candidats issus des SELEX « F » et « F-spécifique ») ou p73 (pour les candidats issus des SELEX « 4F » et « R » et de la sélection branchée multiple). Ceci permet d'obtenir les candidats avec une extension de 24 bases en 3' pouvant alors s'hybrider avec une Spacer-G LNA (Tableau 23). On réalise des PCR d'un volume de 200µL par candidat, dans lequel on ajoute comme matrice 2µL de matrice ADN à 1µM.

PiRT-G	5' TAGGCAGTCACGCTGGGGCAATGCCCTACACGACGCTCTCCGATCT 3'
Spacer-G LNA	5' TAGGCA ^G TCAC ^G CTGGGGCAATGC 3' G : LNA(G)

Tableau 23 – Séquences de l'amorce PiRT-G et de l'oligonucléotide Spacer-G LNA

Les transcriptions sont réalisées pour un volume de 100 µL. Les mélanges de transcriptions ont été incubés à 37°C 1H. Après la purification PAGE, les échantillons sont élués sur la nuit, par le protocole d'éluion « lente ». On obtient pour chacun des candidats entre 2 et 3 nmol d'ARN2'F-Py.

B. Mesure de l'affinité par filtration sur nitrocellulose ou par colonne d'exclusion stérique.

Ces mesures étant réalisées avec les candidats marqués de manière radioactives au P³², les manipulations sont réalisées dans une pièce dédiée à la manipulation des isotopes radioactifs, et selon les conditions de sécurité demandées pour ce type d'expérience.

1) Marquage des candidats au P³²

Pour les candidats ARN2'F-Py nous avons marqué dans la 2^{ème} partie de notre thèse le SpG-LNA qui est de chimie ADN, et qui était ensuite associé par hybridation aux candidats. Les candidats issus de la littérature étant de chimie ADN, ont été marqués directement à l'aide d'ATP gamma ³²P.

Les oligonucléotides ont été marqués au P³² avec une T4 Polynucléotide Kinase (Thermofisher EK0032). L'ADN est mélangé à la kinase (1µL de kinase à 10U/µL pour un volume de 50µL) dans le tampon de réaction A. La quantité d'ATP gamma ³²P est ajoutée en fonction de la décroissance de la source, de la quantité d'ADN à marquer et de l'intensité du marquage souhaité. Le mélange est incubé pendant 30 min à 37°C.

Pour enlever les molécules d'ATP gamma ³²P qui n'ont pas réagies, le mélange de marquage est ensuite purifié sur colonne Sp6, dont le tampon SSC a été au préalable changé en Ts1X selon les modalités décrites plus haut (cf. Matériel et Méthodes, partie 0 ci-dessus).

2) Préparation des mélanges d'incubation : candidats aptamères radiomarqués et protéine

a) Hybridation des candidats ARN2'F-Py avec le SpG-LNA marqué au P³²

La première étape de préparation des mélanges candidats/protéines est l'hybridation des candidats ARN2'F-Py avec le SpG-LNA ayant été marqué au P³².

L'hybridation pour être optimale doit être réalisée à concentration élevée. Les candidats à 1µM étaient donc mélangés au SpG-LNA marqué au P³² à 0,8 µM. Le mélange est réalisé avec une concentration en SpG-LNA inférieure à celle du candidat afin d'être certain de ne pas avoir de SpG-LNA radioactif non associé à un oligonucléotide.

Le mélange subit un choc thermique, qui permet d'optimiser l'hybridation entre les deux séquences : 85°C - 3 minutes, 3 minutes dans la glace, puis 3 minutes à 37°C.

b) Protocole réalisé pour les expériences de criblage 10 nM oligonucléotide/ 1µM protéine sur nitrocellulose ou sur colonne Sp6

Les expériences de criblage ont été réalisées à 10 nM oligonucléotide/ 1µM protéine avec de l'ADNss en proportion 5-1 (ie. 1.7µg/ml). Les incubations ont été réalisées dans des plaques PCR (pour la séparation sur nitrocellulose) ou dans des tubes eppendorf « protein Lobind » (pour la séparation sur colonne Sp6), dans lesquelles les solutions de protéines et d'aptamères sont distribuées séparément.

Les solutions d'oligonucléotide sont réalisées à 20 nM, dans une solution de Ts1X, igepal 0.1%. Les mélanges de protéine sont réalisés à 2.0 µM dans des tubes à faible adsorption (eppendorf « Protein LoBind ») en Ts1X, igepal 0.1%, et l'ADNss est ajouté à 3.47 µg/ml. Les protéines venant des stocks contenus à - 80°C sont décongelées selon les méthodes décrites dans la partie Matériel et Méthodes I.A.2) ci-dessus.

Lorsque la séparation est réalisée sur nitrocellulose, les solutions de protéines et d'oligonucléotides sont déposées dans la plaque PCR à la pipette multicanale de manière à réaliser les mélanges à 10 nM oligonucléotide/ 1µM protéine voulus. Lorsque la séparation est réalisée sur colonne Sp6, les incubations sont réalisées dans des tubes à faible adsorption (Eppendorf – protein LoBind).

Les mélanges sont incubés 30 minutes dans une étuve chauffée à 37°C. On fait l'hypothèse que l'équilibre est bien atteint pour chaque interaction protéine/oligonucléotide.

c) Protocole réalisé pour les expériences de gamme d'oligonucléotide, par filtration sur nitrocellulose

Pour les expériences de gamme d'oligonucléotide, des protéines à 250 nM ont été présentées à des gammes d'oligonucléotide de 0.78 à 100 nM. L'ADNss en tant que compétiteur non-spécifique a été mis en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides.

Les solutions d'oligonucléotide sont réalisées à 150 nM dans une solution de Ts1X, igepal 0.1%, contenant de l'ADNss à 25.9 µg/ml (ie.en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides). Les mélanges de protéine sont réalisés à 3.0 µM dans des tubes à faible adsorption (eppendorf « Protein LoBind ») en Ts1X, igepal 0.1%.

Les solutions d'oligonucléotides sont déposées dans la plaque PCR à la pipette multicanaux puis diluées en cascade dans une solution de Ts1X, igepal 0.1% à la pipette multicanaux. Les solutions de protéines sont ensuite ajoutées à la pipette multicanaux de manière à réaliser les mélanges oligonucléotide/ protéine voulus.

Les mélanges sont incubés 30 minutes dans une étuve chauffée à 37°C. On fait l'hypothèse que l'équilibre est bien atteint pour chaque interaction protéine/oligonucléotide.

3) Etape de séparation :

a) Filtration sur nitrocellulose

La membrane nitrocellulose a été préparée au KOH selon le protocole décrit dans la partie Matériel et Méthode, I.A.3)a) ci-dessus. La filtration est réalisée sur un appareil Minifold à 96 puits (GE HEALTHCARE – 10447900). Afin de quantifier les quantités d'oligonucléotides restées liées aux protéines sur la membrane nitrocellulose, on ajoute en dessous de la nitrocellulose une membrane Hybond N+ (GE HEALTHCARE - RPN203B) qui a la propriété de retenir tous type d'oligonucléotide, et qui retient donc tous les oligonucléotides non restés liés aux protéines sur la nitrocellulose. Avant l'installation des deux membranes sur l'appareil Minifold, celles-ci sont plongées dans des bains de Ts1X afin de s'imprégner de Ts1X, de sorte que les mélanges protéines/oligonucléotides soient déposés et filtrés dans une solution de Ts1X.

Avant le dépôt des mélanges protéines/oligonucléotides marqués au P^{32} , 100 μL de Ts1X est déposé sur chaque puit, puis la filtration est mise en route afin de vérifier que le processus de filtration fonctionne correctement. On re-dépose de nouveau 100 μL de solution Ts1X dans les puits, car cela facilite le dépôt des solutions protéine/oligonucléotide.

Les mélanges protéines/oligonucléotide sont déposés depuis les plaques PCR dans lesquelles se sont déroulées les incubations, sur la membrane nitrocellulose installée sur le minifold à l'aide d'une pipette multicanaux. On dépose généralement 25 μL par puit. Le dépôt est alors filtré à l'aide d'une pompe à vide. On réalise alors deux lavages successifs de 75 μL de Ts1X pour chaque puit à l'aide d'une pipette multicanaux. Les membranes sont alors séchées par une filtration en continue pendant environ 5 minutes.

Les deux membranes sont ensuite exposées sur une membrane autoradiographique (PerkinElmer - MultiSensitive Phosphor Screens – Référence 7001723) afin de quantifier les dépôts.

b) Passage sur colonne d'exclusion stérique

Le tampon des colonnes Sp6 est changé selon la méthode expliquée dans la partie Matériel et Méthodes I.A.4)a) ci-dessus.

Le mélange protéine/oligonucléotide est déposé sur une colonne Sp6 (volume entre 25 et 75 μL) au goutte à goutte. La colonne Sp6 est installée sur un tube à faible adsorption (Eppendorf Protein LoBind) et la colonne est alors centrifugée 4 min à 1000 g (selon les indications du fabricant). On enlève alors le tube associé à la colonne Sp6 et on le remplace par un autre.

On réalise alors deux lavages successifs pour lesquels : 75 μL de Ts1X sont déposés sur la colonne Sp6, la colonne est centrifugée 4 minutes à 1000 g, le tube dans lequel le surnageant est tombé et enlevé et remplacé par un autre. Finalement l'élution est faite par addition sur la colonne de 150 μL de SDS 2% (qui dépolymérise les fibres et libère donc les oligonucléotides restés liés aux fibres).

4) Mesure des quantités liées et non liées des oligonucléotides

a) Révélation par exposition sur membrane autoradiographique

Les membranes nitrocellulose et hybond N+ peuvent être exposées de quelques minutes à plusieurs jours sur des membranes autoradiographique (PerkinElmer - MultiSensitive Phosphor Screens – Référence 7001723). L'important est que le signal ne sature pas car cela fausserait les mesures. Les membranes autoradiographiques sont visualisées par l'appareil « Cyclone Plus storage phosphor system » de Perkin Elmer qui fournit des images en format .tif correspondant aux signaux radioactifs observés sur les membranes nitrocelluloses et hybond.

On utilise le logiciel OptiQuant pour réaliser la quantification des points à partir des signaux observés sur les membranes nitrocellulose et hybond. On commence d'abord par soustraire le « bruit » au signal de chacun des points.

Pour l'étape du criblage, nous avons considéré que pour chaque puit, la somme des signaux nitrocellulose+ hybond correspondait à 100% des oligonucléotides déposés au niveau du puit. On peut donc calculer la quantité (en fmoles) d'oligonucléotides retenue sur la nitrocellulose, et donc à priori restées liées aux protéines.

Pour l'étape des gammes d'oligonucléotides, le delta dans les premiers et derniers points de concentration de la gamme d'oligonucléotide (entre 0.78 et 100 nM) faisait que les points des concentrations les plus élevées avaient des signaux saturés au niveau de l'hybond (ie. Le signal des oligonucléotides non liés aux protéines) lorsque ceux sur la nitrocellulose (ie. Le signal des oligonucléotides restés liés aux protéines) étaient tout juste visibles. Nous avons donc dû exposer les membranes de manière longue afin de voir les points les plus faibles avec des signaux significatifs. Les points sur la nitrocellulose sont donc tous quantifiés à partir du point de concentrations la plus basse (0.78 nM) pour lequel nous avons considéré que la somme des signaux nitrocellulose et hybond correspondait à 100% des oligonucléotides déposés au niveau du puit.

b) Comptage sur plaque 24 puits des fractions récupérées par passage sur colonne d'exclusion stérique

Chacune des fractions récupérées (surnageant de 1^{ère} centrifugation, lavages, éluions au SDS 2%) est déposée dans un puit d'une plaque 24 puits. On ajoute dans chacun des puits 400µL d'eau afin de permettre le phénomène de scintillation qui permet le comptage de la radioactivité par le compteur.

5) Révélation par Western Blot des protéines α -syn sur une membrane nitrocellulose

La première étape consiste à « bloquer » les sites non-spécifiques des protéines sur la membrane à révéler. La membrane nitrocellulose est incubée sous agitation 1H (au moins) dans une solution de TBS - Tween20 à 0.1 % - lait 5 %. A la fin de l'incubation, la solution est

remplacée par une autre solution contenant l'anticorps primaire (TBS - Tween20 0.1 % - lait 1%- Anticorps Syn1/clone 42 BD 610787 au 1/10 000ème). Après une incubation sous agitation d'une heure maximum, on lave la membrane trois fois avec une solution de TBS - Tween20 0.1 %. La membrane nitrocellulose est ensuite incubée avec une solution contenant l'anticorps secondaire (TBS - Tween20 0.1 % - lait 1 % - Goat anti-mouse IgG HRP GTX213111-01 au 1/5000ème). Après une incubation sous agitation d'une heure maximum, on lave la membrane trois fois avec une solution de TBS - Tween20 0.1 %. La membrane peut être ensuite conservée pour la nuit dans une solution de TBS - Tween20 0.1 %.

La membrane est ensuite révélée par chimiluminescence à l'aide d'un réactif « Substrat de transfert Western Pierce ECL » (Thermo 32106). On enlève la nitrocellulose de sa solution de TBST. Le réactif ECL est préparé selon les indications du fabricant et puis déposé sur la nitrocellulose. La chimiluminescence de la membrane est ensuite visualisée au CHEMIDOC (Biorad).

C. Mesure d'affinité par Thermophorèse à micro-échelle

Ces mesures ont été réalisées à la plateforme de biophysique moléculaire (PFBMI) de l'institut Pasteur.

Les candidats ont été hybridés par choc thermique à un SpG LNA fluorescent : le 5' Cy5-SpG-LNA. Chaque oligonucléotide candidat est mélangé à 1µM avec le 5' Cy5-SpG-LNA à 0,8 µM, et le mélange subit un choc thermique : 85°C - 3 minutes, 3 minutes dans la glace, puis 3 minutes à 37°C.

5'Cy5-SpacerG-LNA :	5' Cy5 -TAGGCAGTCAC G CTGGGGCAATGC 3'	G : LNA(G)
----------------------------	---	-------------------

Tableau 24 –Séquence du 5' Cy5-SpacerG-LNA

Nous avons réalisé une première solution de protéine ou monomère à 10 µM de 20µL en Ts1X, Igepal 0.1%. Nous avons réalisé ensuite une dilution sériée de cette première solution de deux en deux sur 16 points de cette solution en Ts1X, Igepal 0.1%.

Nous avons réalisé pour chaque oligonucléotide hybridé au 5' Cy5-SpG-LNA une solution à 20 nM en Ts1X, Igepal 0.1% avec du ssDNA en proportion 5-1 par rapport aux oligonucléotides (ie. à 3.54 µg/ml).

On réalise alors un mélange de 10µL de chaque dilution de protéine avec 10µL de solution d'oligonucléotide pour obtenir une gamme de 0.153 nM à 5µM de protéine, avec une concentration constante de 10 nM en oligonucléotide.

Les 16 capillaires sont alors remplis par capillarité à partir des tubes de chaque solution. Les mesures ont ensuite été réalisées selon les indications de la plateforme

REFERENCES

- Ababneh, N., Alshaer, W., Allozi, O., Mahafzah, A., El-Khateeb, M., Hillaireau, H., Noiray, M., Fattal, E., and Ismail, S. (2013). In Vitro Selection of Modified RNA Aptamers Against CD44 Cancer Stem Cell Marker. *Nucl. Acid Ther.* *23*, 401–407.
- Abounit, S., Bousset, L., Loria, F., Zhu, S., de Chaumont, F., Pieri, L., Olivo-Marin, J.-C., Melki, R., and Zurzolo, C. (2016). Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J.* *35*, 2120–2138.
- Adamczyk, A., Kacprzak, M., and Kaźmierczak, A. (2007). Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneurosomes. *Folia Neuropathol* *45*, 230–235.
- Agbas, A. (2018). Trends of Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases. *Neurochemical Basis of Brain Function and Dysfunction*.
- Agrawal, M., and Biswas, A. (2015). Molecular diagnostics of neurodegenerative disorders. *Front Mol Biosci* *2*, 54.
- Alshaer, W., Hillaireau, H., Vergnaud, J., Ismail, S., and Fattal, E. (2015). Functionalizing Liposomes with anti-CD44 Aptamer for Selective Targeting of Cancer Cells. *Bioconjugate Chem.* *26*, 1307–1313.
- Alshaer, W., Hillaireau, H., and Fattal, E. (2018). Aptamer-guided nanomedicines for anticancer drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *134*, 122–137.
- Amaya-González, S., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., and Lobo-Castañón, M.J. (2013). Aptamer-Based Analysis: A Promising Alternative for Food Safety Control. *Sensors (Basel)* *13*, 16292–16311.
- Andersen, E.S. (2010). Prediction and design of DNA and RNA structures. *N Biotechnol* *27*, 184–193.
- Anwar, S., Peters, O., Millership, S., Ninkina, N., Doig, N., Connor-Robson, N., Threlfell, S., Kooner, G., Deacon, R.M., Bannerman, D.M., et al. (2011). Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J. Neurosci.* *31*, 7264–7274.
- Aquino-Jarquín, G., and Toscano-Garibay, J.D. (2011). RNA Aptamer Evolution: Two Decades of SELEction. *International Journal of Molecular Sciences* *12*, 9155–9171.
- Ariazi, J., Benowitz, A., De Biasi, V., Den Boer, M.L., Cherqui, S., Cui, H., Douillet, N., Eugenin, E.A., Favre, D., Goodman, S., et al. (2017). Tunneling Nanotubes and Gap Junctions—Their Role in Long-Range Intercellular Communication during Development, Health, and Disease Conditions. *Front Mol Neurosci* *10*.
- Askanas, V., Engel, W.K., Alvarez, R.B., McFerrin, J., and Broccolini, A. (2000). Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *59*, 592–598.
- Aykul, S., and Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Anal. Biochem.* *508*, 97–103.
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., and Iwatsubo, T. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* *152*, 879–884.

- Bartel, D.P., and Szostak, J.W. (1993). Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]. *Science* *261*, 1411–1418.
- Bartels, T., Kim, N.C., Luth, E.S., and Selkoe, D.J. (2014). N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. *PLoS ONE* *9*, e103727.
- Batista, P., and Pereira, A. (2016). Quality of Life in Patients with Neurodegenerative Diseases. p.
- Beach, T.G. (2017). A Review of Biomarkers for Neurodegenerative Disease: Will They Swing Us Across the Valley? *Neurol Ther* *6*, 5–13.
- Becker, K., Wang, X., Vander Stel, K., Chu, Y., Kordower, J., and Ma, J. (2018). Detecting Alpha Synuclein Seeding Activity in Formaldehyde-Fixed MSA Patient Tissue by PMCA. *Mol. Neurobiol.* *55*, 8728–8737.
- Bekris, L.M., Yu, C.-E., Bird, T.D., and Tsuang, D.W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol* *23*, 213–227.
- Beloborodov, S.S., Bao, J., Krylova, S.M., Shala-Lawrence, A., Johnson, P.E., and Krylov, S.N. (2018). Aptamer facilitated purification of functional proteins. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* *1073*, 201–206.
- Benarroch, E.E., Schmeichel, A.M., Low, P.A., Boeve, B.F., Sandroni, P., and Parisi, J.E. (2005). Involvement of medullary regions controlling sympathetic output in Lewy body disease. *Brain* *128*, 338–344.
- Benatar, M., Wu, J., Andersen, P.M., Lombardi, V., and Malaspina, A. (2018). Neurofilament light: A candidate biomarker of presymptomatic amyotrophic lateral sclerosis and phenoconversion. *Ann. Neurol.* *84*, 130–139.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *J Clin Invest* *115*, 1449–1457.
- Biancalana, M., and Koide, S. (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* *1804*, 1405–1412.
- Blackwell, T.K., and Weintraub, H. (1990). Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* *250*, 1104–1110.
- Blackwell, T.K., Kretzner, L., Blackwood, E.M., Eisenman, R.N., and Weintraub, H. (1990). Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. *Science* *250*, 1149–1151.
- Bonnet, A.M., Jutras, M.F., Czernecki, V., Corvol, J.C., and Vidailhet, M. (2012). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease in 2012: relevant clinical aspects. *Parkinsons Dis* *2012*, 198316.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Bockmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nature Communications* *4*, 2575.
- Bousset, L., Brundin, P., Bockmann, A., Meier, B., and Melki, R. (2016). An Efficient Procedure for Removal and Inactivation of Alpha-Synuclein Assemblies from Laboratory Materials. *J Parkinson Dis* *6*, 143–151.

- Bouvier-Muller, A., and Duconge, F. (2018a). Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases. *Biochimie* 145, 73–83.
- Bouvier-Muller, A., and Duconge, F. (2018b). Application of aptamers for in vivo molecular imaging and theranostics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 134, 94–106.
- Bower, J.H., Maraganore, D.M., McDonnell, S.K., and Rocca, W.A. (1997). Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976 to 1990. *Neurology* 49, 1284–1288.
- Braak, H., Tredici, K.D., Rüb, U., de Vos, R.A.I., Jansen Steur, E.N.H., and Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* 24, 197–211.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., and Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica* 112, 389–404.
- Bradley, W.G., Andrew, A.S., Traynor, B.J., Chiò, A., Butt, T.H., and Stommel, E.W. (2018). Gene-Environment-Time Interactions in Neurodegenerative Diseases: Hypotheses and Research Approaches. *AON* 25, 261–267.
- Brahic, M., Bousset, L., Bieri, G., Melki, R., and Gitler, A.D. (2016). Axonal transport and secretion of fibrillar forms of α -synuclein, A β 42 peptide and HTTExon 1. *Acta Neuropathol.* 131, 539–548.
- Braun, A.R., Sevcsik, E., Chin, P., Rhoades, E., Tristram-Nagle, S., and Sachs, J.N. (2012). α -Synuclein induces both positive mean curvature and negative Gaussian curvature in membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2613–2620.
- Breitsprecher, D., Schlinck, N., Witte, D., Duhr, S., Baaske, P., and Schubert, T. (2016). Aptamer Binding Studies Using MicroScale Thermophoresis. *Methods Mol. Biol.* 1380, 99–111.
- Briston, T., and Hicks, A.R. (2018). Mitochondrial dysfunction and neurodegenerative proteinopathies: mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* 46, 829–842.
- Brown, D.R. (2007). Interactions between metals and α -synuclein – function or artefact? *The FEBS Journal* 274, 3766–3774.
- Brown, R.C., Lockwood, A.H., and Sonawane, B.R. (2005). Neurodegenerative Diseases: An Overview of Environmental Risk Factors. *Environ Health Perspect* 113, 1250–1256.
- Brundin, P., and Melki, R. (2017). Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci* 37, 9808–9818.
- Burré, J. (2015). The Synaptic Function of α -Synuclein. *J Parkinsons Dis* 5, 699–713.
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M.R., and Südhof, T.C. (2010). Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667.
- Bussell, R., and Eliezer, D. (2003). A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins. *J. Mol. Biol.* 329, 763–778.
- Butler, B., Saha, K., Rana, T., Becker, J.P., Sambo, D., Davari, P., Goodwin, J.S., and Khoshbouei, H. (2015). Dopamine Transporter Activity Is Modulated by α -Synuclein. *J. Biol. Chem.* 290, 29542–29554.

- Calì, T., Ottolini, D., Negro, A., and Brini, M. (2012). α -Synuclein controls mitochondrial calcium homeostasis by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria interactions. *J. Biol. Chem.* *287*, 17914–17929.
- Camicioli, R. (2004). Distinguish Different Dementias. *The Canadian Review of Alzheimer's Disease and Other Dementias* *8*.
- Carey, J., Cameron, V., de Haseth, P.L., and Uhlenbeck, O.C. (1983). Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site. *Biochemistry* *22*, 2601–2610.
- Chandra, S., Chen, X., Rizo, J., Jahn, R., and Südhof, T.C. (2003). A broken alpha-helix in folded alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* *278*, 15313–15318.
- Charcot, J.-M. (1872). De la paralysie agitante. *Leçons Sur Les Maladies Du Système Nerveux*, 155–188.
- Chatterjee, D., and Kordower, J.H. (2019). Immunotherapy in Parkinson's disease: Current status and future directions. *Neurobiol Dis* *132*, 104587.
- Chauveau, F., Pestourie, C., and Tavitian, B. (2006). Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. *Pathologie Biologie* *54*, 251–258.
- Cheng, H.-C., Ulane, C.M., and Burke, R.E. (2010). Clinical Progression in Parkinson's Disease and the Neurobiology of Axons. *Ann Neurol* *67*, 715–725.
- Choi, B.-K., Choi, M.-G., Kim, J.-Y., Yang, Y., Lai, Y., Kweon, D.-H., Lee, N.K., and Shin, Y.-K. (2013). Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 4087–4092.
- Chrysostome, V., Tison, F., Yekhlief, F., Sourgen, C., Baldi, I., and Dartigues, J.F. (2004). Epidemiology of multiple system atrophy: a prevalence and pilot risk factor study in Aquitaine, France. *Neuroepidemiology* *23*, 201–208.
- Chung, C.Y., Koprach, J.B., Siddiqi, H., and Isacson, O. (2009). Dynamic changes in presynaptic and axonal transport proteins combined with striatal neuroinflammation precede dopaminergic neuronal loss in a rat model of AAV alpha-synucleinopathy. *J. Neurosci.* *29*, 3365–3373.
- Cibiel, A., Dupont, D.M., and Ducongé, F. (2011). Methods To Identify Aptamers against Cell Surface Biomarkers. *Pharmaceuticals* *4*, 1216–1235.
- Cibiel, A., Quang, N.N., Gombert, K., Thézé, B., Garofalakis, A., and Ducongé, F. (2014). From Ugly Duckling to Swan: Unexpected Identification from Cell-SELEX of an Anti-Annexin A2 Aptamer Targeting Tumors. *PLOS ONE* *9*, e87002.
- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., and Gross, R.E. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol. Sci.* *30*, 475–483.
- Civit, L., Theodorou, I., Frey, F., Weber, H., Lingnau, A., Gröber, C., Blank, M., Dambrune, C., Stunden, J., Beyer, M., et al. (2019). Targeting hormone refractory prostate cancer by in vivo selected DNA libraries in an orthotopic xenograft mouse model. *Scientific Reports* *9*, 4976.
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *30*, 255–289.

- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (1998). Accelerated in vitro fibril formation by a mutant α -synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nature Medicine* 4, 1318–1320.
- Conway, K.A., Harper, J.D., and Lansbury, P.T. (2000). Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39, 2552–2563.
- Cooper, A.A., Gitler, A.D., Cashikar, A., Haynes, C.M., Hill, K.J., Bhullar, B., Liu, K., Xu, K., Strathearn, K.E., Liu, F., et al. (2006). α -Synuclein Blocks ER-Golgi Traffic and Rab1 Rescues Neuron Loss in Parkinson's Models. *Science* 313, 324–328.
- Covell, D.J., Robinson, J.L., Akhtar, R.S., Grossman, M., Weintraub, D., Bucklin, H.M., Pitkin, R.M., Riddle, D., Yousef, A., Trojanowski, J.Q., et al. (2017). Novel conformation-selective alpha-synuclein antibodies raised against different in vitro fibril forms show distinct patterns of Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 604–620.
- Craig, N.L. (2010). *Molecular Biology: Principles of Genome Function* (OUP Oxford).
- Crowther, R.A., Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1998). Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated α -synuclein. *FEBS Letters* 436, 309–312.
- Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T., and Sulzer, D. (2004). Impaired Degradation of Mutant α -Synuclein by Chaperone-Mediated Autophagy. *Science* 305, 1292–1295.
- Danzer, K.M., Haasen, D., Karow, A.R., Moussaud, S., Habeck, M., Giese, A., Kretschmar, H., Hengerer, B., and Kostka, M. (2007). Different Species of α -Synuclein Oligomers Induce Calcium Influx and Seeding. *J Neurosci* 27, 9220–9232.
- Darwin, C. (1860). *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. *Br Foreign Med Chir Rev* 25, 367–404.
- Davidson, W.S., Jonas, A., Clayton, D.F., and George, J.M. (1998). Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes. *J. Biol. Chem.* 273, 9443–9449.
- D'Costa, D.F., Sheehan, L.J., Phillips, P.A., and Moore-Smith, B. (1995). The levodopa test in Parkinson's disease. *Age Ageing* 24, 210–212.
- Decressac, M., Mattsson, B., Weikop, P., Lundblad, M., Jakobsson, J., and Björklund, A. (2013). TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from α -synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1817–E1826.
- Delic, V., Chandra, S., Abdelmotilib, H., Maltbie, T., Wang, S., Kem, D., Scott, H.J., Underwood, R.N., Liu, Z., Volpicelli-Daley, L.A., et al. (2018). Sensitivity and Specificity of Phospho-Ser129 α -Synuclein Monoclonal Antibodies. *J Comp Neurol* 526, 1978–1990.
- Dellafore, M.A., Montserrat, J.M., and Iribarren, A.M. (2016). Modified Nucleoside Triphosphates for In-vitro Selection Techniques. *Frontiers in Chemistry* 4, 18.
- Devine, M.J., Gwinn, K., Singleton, A., and Hardy, J. (2011). Parkinson's disease and α -synuclein expression. *Movement Disorders* 26, 2160–2168.
- Di Primo, C., and Lebars, I. (2007). Determination of refractive index increment ratios for protein-nucleic acid complexes by surface plasmon resonance. *Anal. Biochem.* 368, 148–155.

- Dickson, D.W. (2012). *Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology*. Cold Spring Harb Perspect Med 2.
- Dickson, D.W., Braak, H., Duda, J.E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G.M., Hardy, J., Leverenz, J.B., Del Tredici, K., Wszolek, Z.K., et al. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology* 8, 1150–1157.
- Dieriks, B.V., Park, T.I.-H., Fourie, C., Faull, R.L.M., Dragunow, M., and Curtis, M.A. (2017). α -synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. *Sci Rep* 7.
- Dobbelstein, M., and Shenk, T. (1995). In vitro selection of RNA ligands for the ribosomal L22 protein associated with Epstein-Barr virus-expressed RNA by using randomized and cDNA-derived RNA libraries. *Journal of Virology* 69, 8027–8034.
- Donadio, V., Incensi, A., El-Agnaf, O., Rizzo, G., Vaikath, N., Del Sorbo, F., Scaglione, C., Capellari, S., Elia, A., Stanzani Maserati, M., et al. (2018). Skin α -synuclein deposits differ in clinical variants of synucleinopathy: an in vivo study. *Scientific Reports* 8, 14246.
- Du, X., Li, Y., Xia, Y.-L., Ai, S.-M., Liang, J., Sang, P., Ji, X.-L., and Liu, S.-Q. (2016). Insights into Protein–Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. *Int J Mol Sci* 17.
- Duongé, F., and Toulmé, J.J. (1999). In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *RNA* 5, 1605–1614.
- Duffy, M.F., Collier, T.J., Patterson, J.R., Kemp, C.J., Luk, K.C., Tansey, M.G., Paumier, K.L., Kanaan, N.M., Fischer, D.L., Polinski, N.K., et al. (2018). Lewy body-like alpha-synuclein inclusions trigger reactive microgliosis prior to nigral degeneration. *J Neuroinflammation* 15, 129.
- Dugger, B.N., and Dickson, D.W. (2017). *Pathology of Neurodegenerative Diseases*. Cold Spring Harb Perspect Biol 9.
- Dunning, C.J.R., George, S., and Brundin, P. (2013). What's to like about the prion-like hypothesis for the spreading of aggregated α -synuclein in Parkinson disease? *Prion* 7, 92–97.
- Dupont, D.M., Larsen, N., Jensen, J.K., Andreasen, P.A., and Kjems, J. (2015). Characterisation of aptamer-target interactions by branched selection and high-throughput sequencing of SELEX pools. *Nucleic Acids Research* 43, e139.
- Eggers, C., Pedrosa, D.J., Kahraman, D., Maier, F., Lewis, C.J., Fink, G.R., Schmidt, M., and Timmermann, L. (2012). Parkinson Subtypes Progress Differently in Clinical Course and Imaging Pattern. *PLoS One* 7.
- Ejlervskov, P., Rasmussen, I., Nielsen, T.T., Bergström, A.-L., Tohyama, Y., Jensen, P.H., and Vilhardt, F. (2013). Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 α) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. *J. Biol. Chem.* 288, 17313–17335.
- El-Agnaf, O.M., Jakes, R., Curran, M.D., Middleton, D., Ingenito, R., Bianchi, E., Pessi, A., Neill, D., and Wallace, A. (1998a). Aggregates from mutant and wild-type alpha-synuclein proteins and NAC peptide induce apoptotic cell death in human neuroblastoma cells by formation of beta-sheet and amyloid-like filaments. *FEBS Lett.* 440, 71–75.

El-Agnaf, O.M.A., Jakes, R., Curran, M.D., and Wallace, A. (1998b). Effects of the mutations Ala30 to Pro and Ala53 to Thr on the physical and morphological properties of α -synuclein protein implicated in Parkinson's disease. *FEBS Letters* 440, 67–70.

Eliezer, D., Kutluay, E., Bussell, R., and Browne, G. (2001). Conformational properties of alpha-synuclein in its free and lipid-associated states. *J. Mol. Biol.* 307, 1061–1073.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818–822.

Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1992). Selection in vitro of single-stranded DNA molecules that fold into specific ligand-binding structures. *Nature* 355, 850–852.

Fagerqvist, T., Lindström, V., Nordström, E., Lord, A., Tucker, S.M.E., Su, X., Sahlin, C., Kasrayan, A., Andersson, J., Welander, H., et al. (2013). Monoclonal antibodies selective for α -synuclein oligomers/protofibrils recognize brain pathology in Lewy body disorders and α -synuclein transgenic mice with the disease-causing A30P mutation. *J. Neurochem.* 126, 131–144.

Fairfoul, G., McGuire, L.I., Pal, S., Ironside, J.W., Neumann, J., Christie, S., Joachim, C., Esiri, M., Evetts, S.G., Rolinski, M., et al. (2016). Alpha-synuclein RT-QuIC in the CSF of patients with alpha-synucleinopathies. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 812–818.

Fares, M.-B., Ait-Bouziad, N., Dikiy, I., Mbefo, M.K., Jovičić, A., Kiely, A., Holton, J.L., Lee, S.-J., Gitler, A.D., Eliezer, D., et al. (2014). The novel Parkinson's disease linked mutation G51D attenuates in vitro aggregation and membrane binding of α -synuclein, and enhances its secretion and nuclear localization in cells. *Hum Mol Genet* 23, 4491–4509.

Fauvet, B., Mbefo, M.K., Fares, M.-B., Desobry, C., Michael, S., Ardah, M.T., Tsika, E., Coune, P., Prudent, M., Lion, N., et al. (2012). α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J. Biol. Chem.* 287, 15345–15364.

Fenyi, A., Coens, A., Bellande, T., Melki, R., and Bousset, L. (2018). Assessment of the efficacy of different procedures that remove and disassemble alpha-synuclein, tau and A-beta fibrils from laboratory material and surfaces. *Sci Rep* 8, 10788.

Fenyi, A., Leclair-Visonneau, L., Clairembault, T., Coron, E., Neunlist, M., Melki, R., Derkinderen, P., and Bousset, L. (2019). Detection of alpha-synuclein aggregates in gastrointestinal biopsies by protein misfolding cyclic amplification. *Neurobiol Dis* 129, 38–43.

Fernandez, H.H. (2015). 2015 Update on Parkinson disease. *Cleve Clin J Med* 82, 563–568.

Fiore, E., Dausse, E., Dubouchaud, H., Peyrin, E., and Ravelet, C. (2015). Ultrafast capillary electrophoresis isolation of DNA aptamer for the PCR amplification-based small analyte sensing. *Front Chem* 3.

Flagmeier, P., Meisl, G., Vendruscolo, M., Knowles, T.P.J., Dobson, C.M., Buell, A.K., and Galvagnion, C. (2016). Mutations associated with familial Parkinson's disease alter the initiation and amplification steps of α -synuclein aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 10328–10333.

Forier, C., Boschetti, E., Ouhammouch, M., Cibiel, A., Duconge, F., Nogre, M., Tellier, M., Bataille, D., Bihoreau, N., Santambien, P., et al. (2017). DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources. *J Chromatogr A* 1489, 39–50.

- Forman, M.S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2004). Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nature Medicine* 10, 1055–1063.
- Förster, U., Weigand, J.E., Trojanowski, P., Suess, B., and Wachtveitl, J. (2012). Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Res* 40, 1807–1817.
- Fortin, D.L., Troyer, M.D., Nakamura, K., Kubo, S., Anthony, M.D., and Edwards, R.H. (2004). Lipid rafts mediate the synaptic localization of alpha-synuclein. *J. Neurosci.* 24, 6715–6723.
- Freundt, E.C., Maynard, N., Clancy, E.K., Roy, S., Bousset, L., Sourigues, Y., Covert, M., Melki, R., Kirkegaard, K., and Brahic, M. (2012). Neuron-to-neuron transmission of α -synuclein fibrils through axonal transport. *Ann. Neurol.* 72, 517–524.
- Fried, M., and Crothers, D.M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 9, 6505–6525.
- Fujishiro, H., Nakamura, S., Sato, K., and Iseki, E. (2015). Prodromal dementia with Lewy bodies. *Geriatr Gerontol Int* 15, 817–826.
- Fusco, G., De Simone, A., Gopinath, T., Vostrikov, V., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., and Veglia, G. (2014). Direct observation of the three regions in α -synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat Commun* 5, 3827.
- Galvin, J.E., Uryu, K., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (1999). Axon pathology in Parkinson's disease and Lewy body dementia hippocampus contains α -, β -, and γ -synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13450–13455.
- Gao, H.M., and Hong, J.S. (2008). Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. *Trends Immunol* 29, 357–365.
- Gath, J., Bousset, L., Habenstein, B., Melki, R., Bockmann, A., and Meier, B.H. (2014). Unlike twins: an NMR comparison of two alpha-synuclein polymorphs featuring different toxicity. *PLoS One* 9, e90659.
- Gelinas, A.D., Davies, D.R., Edwards, T.E., Rohloff, J.C., Carter, J.D., Zhang, C., Gupta, S., Ishikawa, Y., Hirota, M., Nakaishi, Y., et al. (2014). Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand. *J. Biol. Chem.* 289, 8720–8734.
- Gelpi, E., Navarro-Otano, J., Tolosa, E., Gaig, C., Compta, Y., Rey, M.J., Martí, M.J., Hernández, I., Valldeoriola, F., Reñé, R., et al. (2014). Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov. Disord.* 29, 1010–1018.
- George, J.M. (2002). The synucleins. *Genome Biol.* 3, REVIEWS3002.
- Giasson, B.I., Duda, J.E., Murray, I.V.J., Chen, Q., Souza, J.M., Hurtig, H.I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2000a). Oxidative Damage Linked to Neurodegeneration by Selective α -Synuclein Nitration in Synucleinopathy Lesions. *Science* 290, 985–989.
- Giasson, B.I., Jakes, R., Goedert, M., Duda, J.E., Leight, S., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.Y. (2000b). A panel of epitope-specific antibodies detects protein domains distributed throughout human α -synuclein in lewy bodies of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research* 59, 528–533.

- Gilman, S., Wenning, G.K., Low, P.A., Brooks, D.J., Mathias, C.J., Trojanowski, J.Q., Wood, N.W., Colosimo, C., Dürr, A., Fowler, C.J., et al. (2008). Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71, 670–676.
- Girardot, M., Gareil, P., and Varenne, A. (2010). Interaction study of a lysozyme-binding aptamer with mono- and divalent cations by ACE. *Electrophoresis* 31, 546–555.
- Girardot, M., Li, H.-Y., Descroix, S., and Varenne, A. (2011). Determination of binding parameters between lysozyme and its aptamer by frontal analysis continuous microchip electrophoresis (FACMCE). *J. Chromatogr. A* 1218, 4052–4058.
- Girardot, M., d’Orlye, F., Descroix, S., and Varenne, A. (2013). Aptamer-conjugated nanoparticles: Preservation of targeting functionality demonstrated by microchip electrophoresis in frontal mode. *Anal. Biochem.* 435, 150–152.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., and James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease. *Nature* 349, 704–706.
- Gokulrangan, G., Unruh, J.R., Holub, D.F., Ingram, B., Johnson, C.K., and Wilson, G.S. (2005). DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy. *Anal. Chem.* 77, 1963–1970.
- Gold, L., and Tuerk, C. (1993). Methods for identifying nucleic acid ligands.
- Gold, L., and Tuerk, C. (1995). Nucleic acid ligands.
- Gómez-Río, M., Caballero, M.M., Górriz Sáez, J.M., and Mínguez-Castellanos, A. (2016). Diagnosis of Neurodegenerative Diseases: The Clinical Approach. *Curr Alzheimer Res* 13, 469–474.
- Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Feinsod, M., and Guyer, D.R. (2004). Pegaptanib for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine* 351, 2805–2816.
- Graham, J.G., and Oppenheimer, D.R. (1969). Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 32, 28–34.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012a). Total RNA extraction from *Saccharomyces cerevisiae* using hot acid phenol. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set* par Green, Michael R., Sambrook, Joseph: New | Russell Books, pp. 362–363.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012b). Precipitation of RNA with Ethanol. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set* par Green, Michael R., Sambrook, Joseph: New | Russell Books, pp. 372–374.
- Green, M.R., and Sambrook, J. (2012c). Separation of RNA according to size: Electrophoresis of RNA through Denaturing Urea Polyacrylamide Gels. In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition): Three-volume set* par Green, Michael R., Sambrook, Joseph: New | Russell Books, pp. 393–400.
- Green, R., Ellington, A.D., and Szostak, J.W. (1990). In vitro genetic analysis of the *Tetrahymena* self-splicing intron. *Nature* 347, 406–408.

- Greten-Harrison, B., Polydoro, M., Morimoto-Tomita, M., Diao, L., Williams, A.M., Nie, E.H., Makani, S., Tian, N., Castillo, P.E., Buchman, V.L., et al. (2010). $\alpha\beta\gamma$ -Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 19573–19578.
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., Peyrin, J.-M., and Perrier, A.L. (2019). Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Reports* *12*, 230–244.
- Grima, J.C., Daigle, J.G., Arbez, N., Cunningham, K.C., Zhang, K., Ochaba, J., Geater, C., Morozko, E., Stocksdales, J., Glatzer, J.C., et al. (2017). Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex. *Neuron* *94*, 93-107.e6.
- Groenning, M. (2010). Binding mode of Thioflavin T and other molecular probes in the context of amyloid fibrils-current status. *J Chem Biol* *3*, 1–18.
- Groveman, B.R., Orrù, C.D., Hughson, A.G., Raymond, L.D., Zanusso, G., Ghetti, B., Campbell, K.J., Safar, J., Galasko, D., and Caughey, B. (2018). Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α -synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by α Syn RT-QuIC. *Acta Neuropathologica Communications* *6*, 7.
- Guardia-Laguarta, C., Area-Gomez, E., Rüb, C., Liu, Y., Magrané, J., Becker, D., Voos, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2014). α -Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. *J. Neurosci.* *34*, 249–259.
- Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N.M., Mona, D., Ringler, P., Lauer, M.E., Riek, R., Britschgi, M., and Stahlberg, H. (2018). Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. *ELife* *7*.
- Guerrero-Ferreira, R., Taylor, N.M., Arteni, A.A., Kumari, P., Mona, D., Ringler, P., Britschgi, M., Lauer, M.E., Makky, A., Verasdonck, J., et al. (2019). Two new polymorphic structures of human full-length alpha-synuclein fibrils solved by cryo-electron microscopy. *Elife* *8*.
- Guo, J.L., Covell, D.J., Daniels, J.P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D.M., Kwong, L.K., Xu, Y., Trojanowski, J.Q., et al. (2013). Distinct α -Synuclein Strains Differentially Promote Tau Inclusions in Neurons. *Cell* *154*.
- Gupta, S., Hirota, M., Waugh, S.M., Murakami, I., Suzuki, T., Muraguchi, M., Shibamori, M., Ishikawa, Y., Jarvis, T.C., Carter, J.D., et al. (2014). Chemically modified DNA aptamers bind interleukin-6 with high affinity and inhibit signaling by blocking its interaction with interleukin-6 receptor. *J. Biol. Chem.* *289*, 8706–8719.
- Hakami, A.R., Ball, J.K., and Tarr, A.W. (2015). Non-ionic detergents facilitate non-specific binding of M13 bacteriophage to polystyrene surfaces. *Journal of Virological Methods* *221*, 1–8.
- Hardy, J. (2006). A Hundred Years of Alzheimer's Disease Research. *Neuron* *52*, 3–13.
- Hardy, J. (2018). Neurodegeneration: the first mechanistic therapy and other progress in 2017. *The Lancet Neurology* *17*, 3–5.
- Hardy, J. (2019). Failures in Protein Clearance Partly Underlie Late Onset Neurodegenerative Diseases and Link Pathology to Genetic Risk. *Front. Neurosci.* *13*.
- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* *256*, 184–185.

- Haruna, I., and Spiegelman, S. (1965). Autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science* *150*, 884–886.
- Hashimoto, M., Hsu, L.J., Sisk, A., Xia, Y., Takeda, A., Sundsmo, M., and Masliah, E. (1998). Human recombinant NACP/alpha-synuclein is aggregated and fibrillated in vitro: relevance for Lewy body disease. *Brain Res.* *799*, 301–306.
- Hathout, Y., Brody, E., Clemens, P.R., Cripe, L., DeLisle, R.K., Furlong, P., Gordish-Dressman, H., Hache, L., Henricson, E., Hoffman, E.P., et al. (2015). Large-scale serum protein biomarker discovery in Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *112*, 7153–7158.
- Heemels, M.T. (2016). Neurodegenerative diseases. *Nature* *539*, 179.
- Heise, H., Hoyer, W., Becker, S., Andronesi, O.C., Riedel, D., and Baldus, M. (2005). Molecular-level secondary structure, polymorphism, and dynamics of full-length α -synuclein fibrils studied by solid-state NMR. *PNAS* *102*, 15871–15876.
- Henderson, M.X., Covell, D.J., Chung, C.H., Pitkin, R.M., Sandler, R.M., Decker, S.C., Riddle, D.M., Zhang, B., Gathagan, R.J., James, M.J., et al. (2020). Characterization of novel conformation-selective alpha-synuclein antibodies as potential immunotherapeutic agents for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* *136*, 104712.
- Herva, M.E., Zibae, S., Fraser, G., Barker, R.A., Goedert, M., and Spillantini, M.G. (2014). Anti-amyloid compounds inhibit α -synuclein aggregation induced by protein misfolding cyclic amplification (PMCA). *J. Biol. Chem.* *289*, 11897–11905.
- Hildebrandt, E., Zhang, Q., Cant, N., Ding, H., Dai, Q., Peng, L., Fu, Y., DeLucas, L.J., Ford, R., Kappes, J.C., et al. (2014). A Survey of Detergents for the Purification of Stable, Active Human Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). *Biochim Biophys Acta* *1838*, 2825–2837.
- Hirao, I., Kimoto, M., and Lee, K.H. (2018). DNA aptamer generation by ExSELEX using genetic alphabet expansion with a mini-hairpin DNA stabilization method. *Biochimie* *145*, 15–21.
- Holford, N., and Nutt, J.G. (2008). Disease progression, drug action and Parkinson's disease: Why time cannot be ignored. *Eur J Clin Pharmacol* *64*, 207–216.
- Hollenstein, M. (2011). Expanding the Catalytic Repertoire of DNAzymes by Modified Nucleosides. *Chimia* *65*, 770–775.
- Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., and Jovin, T.M. (2004). Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. *Biochemistry* *43*, 16233–16242.
- Ingelsson, M. (2016). Alpha-Synuclein Oligomers-Neurotoxic Molecules in Parkinson's Disease and Other Lewy Body Disorders. *Frontiers in Neuroscience* *10*, 408.
- Jäger, S., Rasched, G., Kornreich-Leshem, H., Engeser, M., Thum, O., and Famulok, M. (2005). A versatile toolbox for variable DNA functionalization at high density. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 15071–15082.
- Jakes, R., Spillantini, M.G., and Goedert, M. (1994). Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* *345*, 27–32.

- Jao, C.C., Hegde, B.G., Chen, J., Haworth, I.S., and Langen, R. (2008). Structure of membrane-bound α -synuclein from site-directed spin labeling and computational refinement. *PNAS* *105*, 19666–19671.
- Jarrett, J.T., and Lansbury, P.T. (1993). Seeding “one-dimensional crystallization” of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer’s disease and scrapie? *Cell* *73*, 1055–1058.
- Jellinger, K.A. (2010). Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* *14*, 457–487.
- Jellinger, K.A. (2018). Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy1. *J. Alzheimers Dis.* *62*, 1141–1179.
- Jenco, J.M., Rawlingson, A., Daniels, B., and Morris, A.J. (1998). Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry* *37*, 4901–4909.
- Jenison, R.D., Gill, S.C., Pardi, A., and Polisky, B. (1994). High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* *263*, 1425–1429.
- Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H.M., Duhr, S., Baaske, P., and Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* *1077*, 101–113.
- Jing, M., and Bowser, M.T. (2011). Methods for measuring aptamer-protein equilibria: a review. *Anal. Chim. Acta* *686*, 9–18.
- Jung, B.C., Lim, Y.-J., Bae, E.-J., Lee, J.S., Choi, M.S., Lee, M.K., Lee, H.-J., Kim, Y.S., and Lee, S.-J. (2017). Amplification of distinct α -synuclein fibril conformers through protein misfolding cyclic amplification. *Exp. Mol. Med.* *49*, e314.
- Kalra, P., Dhiman, A., Cho, W.C., Bruno, J.G., and Sharma, T.K. (2018). Simple Methods and Rational Design for Enhancing Aptamer Sensitivity and Specificity. *Front Mol Biosci* *5*.
- Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer’s disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* *10*, 698–712.
- Katsuno, M., Sahashi, K., Iguchi, Y., and Hashizume, A. (2018). Preclinical progression of neurodegenerative diseases. *Nagoya J Med Sci* *80*, 289–298.
- Kaur, H., Bruno, J.G., Kumar, A., and Sharma, T.K. (2018). Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines. *Theranostics* *8*, 4016–4032.
- Kidd, P.M. (2008). Alzheimer’s disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev* *13*, 85–115.
- Kim, D.-K., Lim, H.-S., Kawasaki, I., Shim, Y.-H., Vaikath, N.N., El-Agnaf, O.M.A., Lee, H.-J., and Lee, S.-J. (2016). Anti-aging treatments slow propagation of synucleinopathy by restoring lysosomal function. *Autophagy* *12*, 1849–1863.
- Kim, H.-Y., Stojadinovic, A., and Izadjoo, M.J. (2014). Immunization, hybridoma generation, and selection for monoclonal antibody production. *Methods Mol. Biol.* *1131*, 33–45.

- Kim, S., Jeon, B.S., Heo, C., Im, P.S., Ahn, T.-B., Seo, J.-H., Kim, H.-S., Park, C.H., Choi, S.H., Cho, S.-H., et al. (2004). Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *FASEB J.* *18*, 1615–1617.
- Knight, R., and Yarus, M. (2003). Analyzing partially randomized nucleic acid pools: straight dope on doping. *Nucleic Acids Res* *31*, e30.
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., and Dobson, C.M. (2014). The amyloid state and its association with protein misfolding diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 384–396.
- Kontopoulos, E., Parvin, J.D., and Feany, M.B. (2006). Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 3012–3023.
- Kordower, J.H., Chu, Y., Hauser, R.A., Freeman, T.B., and Olanow, C.W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat. Med.* *14*, 504–506.
- Kordower, J.H., Olanow, C.W., Dodiya, H.B., Chu, Y., Beach, T.G., Adler, C.H., Halliday, G.M., and Bartus, R.T. (2013). Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. *Brain* *136*, 2419–2431.
- Kosaka, K. (1978). Lewy bodies in cerebral cortex. Report of three cases. *Acta Neuropathol* *42*, 127–134.
- Kosaka, K. (1990). Diffuse lewy body disease in Japan. *J Neurol* *237*, 197–204.
- Kosaka, K. (2014). Lewy body disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* *90*, 301–306.
- Kosaka, K., Matsushita, M., and Oyanagi, S. (1980). A clinicopathological study of the "Lewy body disease." *Psychiatria et Neurologia Japonica* *292–311*.
- Kovacs, G.G., Wagner, U., Dumont, B., Pikkarainen, M., Osman, A.A., Streichenberger, N., Leisser, I., Verchère, J., Baron, T., Alafuzoff, I., et al. (2012). An antibody with high reactivity for disease-associated α -synuclein reveals extensive brain pathology. *Acta Neuropathol* *124*, 37–50.
- Ku, T.-H., Zhang, T., Luo, H., Yen, T.M., Chen, P.-W., Han, Y., and Lo, Y.-H. (2015). Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Tool for Biotechnology and Biomedical Sensing. *Sensors (Basel)* *15*, 16281–16313.
- Lavedan, C., Leroy, E., Dehejia, A., Buchholtz, S., Dutra, A., Nussbaum, R.L., and Polymeropoulos, M.H. (1998). Identification, localization and characterization of the human γ -synuclein gene. *Hum Genet* *103*, 106–112.
- Lebouvier, T., Chaumette, T., Damier, P., Coron, E., Touchefeu, Y., Vrignaud, S., Naveilhan, P., Galmiche, J.-P., Varannes, S.B. des, Derkinderen, P., et al. (2008). Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* *57*, 1741–1743.
- Lee, C.S., Schulzer, M., Mak, E.K., Snow, B.J., Tsui, J.K., Clane, S., Hammerstad, J., and Clane, D.B. (1994). Clinical observations on the rate of progression of idiopathic parkinsonism. *Brain: A Journal of Neurology* *117*, 501–507.
- Lee, H.-J., Patel, S., and Lee, S.-J. (2005). Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J. Neurosci.* *25*, 6016–6024.

Lee, H.-J., Suk, J.-E., Patrick, C., Bae, E.-J., Cho, J.-H., Rho, S., Hwang, D., Masliah, E., and Lee, S.-J. (2010). Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* *285*, 9262–9272.

Levenshtein, V.I. (1966). Binary codes capable of correcting deletions, insertions and reversals.

Levenson, R.W., Sturm, V.E., and Haase, C.M. (2014). Emotional and behavioral symptoms in neurodegenerative disease: A model for studying the neural bases of psychopathology. *Annu Rev Clin Psychol* *10*, 581–606.

LeVine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* *2*, 404–410.

Lewczuk, P., Matzen, A., Blennow, K., Parnetti, L., Molinuevo, J.L., Eusebi, P., Kornhuber, J., Morris, J.C., and Fagan, A.M. (2017). Cerebrospinal Fluid A β 42/40 Corresponds Better than A β 42 to Amyloid PET in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* *55*, 813–822.

Li, B., Ge, P., Murray, K.A., Sheth, P., Zhang, M., Nair, G., Sawaya, M.R., Shin, W.S., Boyer, D.R., Ye, S., et al. (2018a). Cryo-EM of full-length α -synuclein reveals fibril polymorphs with a common structural kernel. *Nature Communications* *9*, 3609.

Li, J.-Y., Englund, E., Holton, J.L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A.J., Lashley, T., Quinn, N.P., Rehncrona, S., Björklund, A., et al. (2008a). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat. Med.* *14*, 501–503.

Li, M., Lin, N., Huang, Z., Du, L., Altier, C., Fang, H., and Wang, B. (2008b). Selecting Aptamers for a Glycoprotein through the Incorporation of the Boronic Acid Moiety. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 12636–12638.

Li, Y., Zhao, C., Luo, F., Liu, Z., Gui, X., Luo, Z., Zhang, X., Li, D., Liu, C., and Li, X. (2018b). Amyloid fibril structure of α -synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Research* *28*, 897–903.

Lightfoot, H.L., Hagen, T., Tatum, N.J., and Hall, J. (2019). The diverse structural landscape of quadruplexes. *FEBS Letters* *593*, 2083–2102.

Lisi, S., Fiore, E., Scarano, S., Pascale, E., Boehman, Y., Ducongé, F., Chierici, S., Minunni, M., Peyrin, E., and Ravelet, C. (2018). Non-SELEX isolation of DNA aptamers for the homogeneous-phase fluorescence anisotropy sensing of tau Proteins. *Analytica Chimica Acta* *1038*, 173–181.

Luk, K.C., Song, C., O'Brien, P., Stieber, A., Branch, J.R., Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Exogenous α -synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *PNAS* *106*, 20051–20056.

Luk, K.C., Kehm, V., Carroll, J., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2012). Pathological α -Synuclein Transmission Initiates Parkinson-like Neurodegeneration in Nontransgenic Mice. *Science* *338*, 949–953.

Madine, J., Doig, A.J., and Middleton, D.A. (2006). A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry* *45*, 5783–5792.

Maezawa, I., Hong, H.-S., Liu, R., Wu, C.-Y., Cheng, R.H., Kung, M.-P., Kung, H.F., Lam, K.S., Oddo, S., LaFerla, F.M., et al. (2008). Congo red and thioflavin-T analogs detect A β oligomers. *Journal of Neurochemistry* *104*, 457–468.

- Makky, A., Bousset, L., Polesel-Maris, J., and Melki, R. (2016). Nanomechanical properties of distinct fibrillar polymorphs of the protein alpha-synuclein. *Scientific Reports* 6.
- Malik, B.R., Maddison, D.C., Smith, G.A., and Peters, O.M. (2019). Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease. *Mol Brain* 12, 100.
- Mao, X., Ou, M.T., Karuppagounder, S.S., Kam, T.-I., Yin, X., Xiong, Y., Ge, P., Umanah, G.E., Brahmachari, S., Shin, J.-H., et al. (2016). Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* 353.
- Maroteaux, L., Campanelli, J.T., and Scheller, R.H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.* 8, 2804–2815.
- Marras, C., and Lang, A. (2013). Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 409–415.
- Matsumoto, J., Stewart, T., Sheng, L., Li, N., Bullock, K., Song, N., Shi, M., Banks, W.A., and Zhang, J. (2017). Transmission of α -synuclein-containing erythrocyte-derived extracellular vesicles across the blood-brain barrier via adsorptive mediated transcytosis: another mechanism for initiation and progression of Parkinson's disease? *Acta Neuropathol Commun* 5, 71.
- Matteucci, M.D., and Caruthers, M.H. (1981). Synthesis of deoxyoligonucleotides on a polymer support. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 3185–3191.
- Mayo, M.C., and Bordelon, Y. (2014). Dementia with Lewy bodies. *Semin Neurol* 34, 182–188.
- Mazzulli, J.R., Zunke, F., Isacson, O., Studer, L., and Krainc, D. (2016). α -Synuclein-induced lysosomal dysfunction occurs through disruptions in protein trafficking in human midbrain synucleinopathy models. *PROC. NAT. ACAD. OF SCI. (U.S.A.)* 113, 1931–1936.
- McCann, H., Stevens, C.H., Cartwright, H., and Halliday, G.M. (2014). α -Synucleinopathy phenotypes. *Parkinsonism Relat. Disord.* 20 Suppl 1, S62-67.
- McFarland, M.A., Ellis, C.E., Markey, S.P., and Nussbaum, R.L. (2008). Proteomics analysis identifies phosphorylation-dependent alpha-synuclein protein interactions. *Mol. Cell Proteomics* 7, 2123–2137.
- Mclsaac, T.L., Fritz, N.E., Quinn, L., and Muratori, L.M. (2018). Cognitive-Motor Interference in Neurodegenerative Disease: A Narrative Review and Implications for Clinical Management. *Front Psychol* 9, 2061.
- McKeith, I.G. (2006). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the Consortium on DLB International Workshop. *J. Alzheimers Dis.* 9, 417–423.
- McKeith, I.G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E.K., Dickson, D.W., Hansen, L.A., Salmon, D.P., Lowe, J., Mirra, S.S., Byrne, E.J., et al. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47, 1113–1124.
- McKeith, I.G., Dickson, D.W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J.T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J.E., Lippa, C., Perry, E.K., et al. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65, 1863–1872.

- Meng, H.-W., Pagano, J.M., White, B.S., Toyoda, Y., Min, I.M., Craighead, H.G., Shalloway, D., Lis, J.T., Xiao, K., and Jin, M.M. (2014). Discovering aptamers by cell-SELEX against human soluble growth factors ectopically expressed on yeast cell surface. *PLoS ONE* 9, e93052.
- Michaud, M., Jourdan, E., Ravelet, C., Villet, A., Ravel, A., Grosset, C., and Peyrin, E. (2004). Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers. *Anal. Chem.* 76, 1015–1020.
- Mizuno, N., Varkey, J., Kegulian, N.C., Hegde, B.G., Cheng, N., Langen, R., and Steven, A.C. (2012). Remodeling of lipid vesicles into cylindrical micelles by α -synuclein in an extended α -helical conformation. *J. Biol. Chem.* 287, 29301–29311.
- Mrak, R.E., and Griffin, W.S.T. (2007). Dementia with Lewy bodies: Definition, diagnosis, and pathogenic relationship to Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat* 3, 619–625.
- Müller, M., Weigand, J.E., Weichenrieder, O., and Suess, B. (2006). Thermodynamic characterization of an engineered tetracycline-binding riboswitch. *Nucleic Acids Res.* 34, 2607–2617.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273.
- Murphy, D.D., Rueter, S.M., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M. (2000). Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 20, 3214–3220.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* 177, 244–249.
- Nakai, M., Fujita, M., Waragai, M., Sugama, S., Wei, J., Akatsu, H., Ohtaka-Maruyama, C., Okado, H., and Hashimoto, M. (2007). Expression of alpha-synuclein, a presynaptic protein implicated in Parkinson's disease, in erythropoietic lineage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 104–110.
- Naqvi, E. (2017). Parkinson's Disease Statistics.
- Näsström, T., Wahlberg, T., Karlsson, M., Nikolajeff, F., Lannfelt, L., Ingelsson, M., and Bergström, J. (2009). The lipid peroxidation metabolite 4-oxo-2-nonenal cross-links α -synuclein causing rapid formation of stable oligomers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378, 872–876.
- Näsström, T., Gonçalves, S., Sahlin, C., Nordström, E., Screpanti Sundquist, V., Lannfelt, L., Bergström, J., Outeiro, T.F., and Ingelsson, M. (2011). Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells. *PLoS ONE* 6, e27230.
- Nemani, V.M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M.K., Chaudhry, F.A., Nicoll, R.A., and Edwards, R.H. (2010). Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle recluster after endocytosis. *Neuron* 65, 66–79.
- Ng, E.W.M., Shima, D.T., Calias, P., Cunningham, E.T., Guyer, D.R., and Adamis, A.P. (2006). Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 123–132.
- Nguyen Quang, N., Perret, G., and Duconge, F. (2016). Applications of High-Throughput Sequencing for In Vitro Selection and Characterization of Aptamers. *Pharmaceuticals (Basel)* 9.

- Nguyen Quang, N., Bouvier, C., Henriques, A., Lelandais, B., and Duconge, F. (2018). Time-lapse imaging of molecular evolution by high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research* 46, 7480–7494.
- Ninkina, N., Peters, O.M., Connor-Robson, N., Lytkina, O., Sharfeddin, E., and Buchman, V.L. (2012). Contrasting effects of α -synuclein and γ -synuclein on the phenotype of cysteine string protein α (CSP α) null mutant mice suggest distinct function of these proteins in neuronal synapses. *J. Biol. Chem.* 287, 44471–44477.
- Okazaki, H., Lipkin, L.E., and Aronson, S.M. (1961). Diffuse intracytoplasmic ganglionic inclusions (Lewy type) associated with progressive dementia and quadriplegia in flexion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 20, 237–244.
- Oueslati, A. (2016). Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Parkinsons Dis* 6, 39–51.
- Oueslati, A., Fournier, M., and Lashuel, H.A. (2010). Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog. Brain Res.* 183, 115–145.
- Paciotti, S., Bellomo, G., Gatticchi, L., and Parnetti, L. (2018). Are We Ready for Detecting alpha-Synuclein Prone to Aggregation in Patients? The Case of “Protein-Misfolding Cyclic Amplification” and “Real-Time Quaking-Induced Conversion” as Diagnostic Tools. *Front Neurol* 9, 415.
- Padilla, R., and Sousa, R. (1999). Efficient synthesis of nucleic acids heavily modified with non-canonical ribose 2'-groups using a mutant T7 RNA polymerase (RNAP). *Nucleic Acids Res* 27, 1561–1563.
- Paleologou, K.E., Schmid, A.W., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fredenburg, R.A., Lansbury, P.T., Fernandez, C.O., Eliezer, D., Zweckstetter, M., et al. (2008). Phosphorylation at Ser-129 but not the phosphomimics S129E/D inhibits the fibrillation of alpha-synuclein. *J. Biol. Chem.* 283, 16895–16905.
- Paleologou, K.E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fernandez, C.O., Schmid, A., Chugini, F., Gai, W.P., et al. (2010). Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J. Neurosci.* 30, 3184–3198.
- Pankratz, N., Nichols, W.C., Uniacke, S.K., Halter, C., Rudolph, A., Shults, C., Conneally, P.M., and Foroud, T. (2003). Significant Linkage of Parkinson Disease to Chromosome 2q36-37. *Am J Hum Genet* 72, 1053–1057.
- Papka, M., Rubio, A., and Schiffer, R.B. (1998). A Review of Lewy Body Disease, an Emerging Concept of Cortical Dementia. *JNP* 10, 267–279.
- Parkinson, J. (1817). An Essay on the Shaking Palsy. *JNP* 14, 223–236.
- Pasanen, P., Myllykangas, L., Siitonen, M., Raunio, A., Kaakkola, S., Lyytinen, J., Tienari, P.J., Pöyhönen, M., and Paetau, A. (2014). Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol. Aging* 35, 2180.e1-5.
- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344.

- Perret, G., and Boschetti, E. (2018). Aptamer affinity ligands in protein chromatography. *Biochimie* 145, 98–112.
- Perrin, R.J., Payton, J.E., Barnett, D.H., Wraight, C.L., Woods, W.S., Ye, L., and George, J.M. (2003). Epitope mapping and specificity of the anti- α -synuclein monoclonal antibody Syn-1 in mouse brain and cultured cell lines. *Neuroscience Letters* 349, 133–135.
- Pestourie, C., Tavitian, B., and Duconge, F. (2005). Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie* 87, 921–930.
- Petrovic, I.N., Ling, H., Asi, Y., Ahmed, Z., Kukkle, P.L., Hazrati, L.-N., Lang, A.E., Revesz, T., Holton, J.L., and Lees, A.J. (2012). Multiple system atrophy-parkinsonism with slow progression and prolonged survival: a diagnostic catch. *Mov. Disord.* 27, 1186–1190.
- Pfeiffer, R.F. (2003). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2, 107–116.
- Pieri, L., Madiona, K., Bousset, L., and Melki, R. (2012). Fibrillar α -synuclein and huntingtin exon 1 assemblies are toxic to the cells. *Biophys. J.* 102, 2894–2905.
- Platella, C., Riccardi, C., Montesarchio, D., Roviello, G.N., and Musumeci, D. (2017). G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 1429–1447.
- Pollock, R., and Treisman, R. (1990). A sensitive method for the determination of protein-DNA binding specificities. *Nucleic Acids Res* 18, 6197–6204.
- Postuma, R.B., Aarsland, D., Barone, P., Burn, D.J., Hawkes, C.H., Oertel, W., and Ziemssen, T. (2012). Identifying prodromal Parkinson's disease: Pre-Motor disorders in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 27, 617–626.
- Pouclet, H., Lebouvier, T., Coron, E., des Varannes, S.B., Rouaud, T., Roy, M., Neunlist, M., and Derkinderen, P. (2012). A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 45, 305–309.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., and Steeves, T.D.L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* 29, 1583–1590.
- Prusiner, S.B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515–1522.
- Przedborski, S., Vila, M., and Jackson-Lewis, V. (2003). Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *J Clin Invest* 111, 3–10.
- Rahimi, F. (2018). Aptamers Selected for Recognizing Amyloid beta-Protein-A Case for Cautious Optimism. *Int J Mol Sci* 19.
- Rahimi, F., Murakami, K., Summers, J.L., Chen, C.H., and Bitan, G. (2009). RNA aptamers generated against oligomeric A β 40 recognize common amyloid aptatopes with low specificity but high sensitivity. *PLoS One* 4, e7694.
- Ravelet, C., Grosset, C., and Peyrin, E. (2006). Liquid chromatography, electrochromatography and capillary electrophoresis applications of DNA and RNA aptamers. *Journal of Chromatography A* 1117, 1–10.

Recasens, A., and Dehay, B. (2014). Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front Neuroanat* *8*.

Ren, X., Zhao, Y., Xue, F., Zheng, Y., Huang, H., Wang, W., Chang, Y., Yang, H., and Zhang, J. (2019). Exosomal DNA Aptamer Targeting alpha-Synuclein Aggregates Reduced Neuropathological Deficits in a Mouse Parkinson's Disease Model. *Mol Ther Nucleic Acids* *17*, 726–740.

Ricciarelli, R., and Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol* *15*, 926–935.

Robertson, D.L., and Joyce, G.F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature* *344*, 467–468.

Rocca, W.A. (2018). The burden of Parkinson's disease: a worldwide perspective. *The Lancet Neurology* *17*, 928–929.

Roostaei, A., Côté, S., and Roucou, X. (2009). Aggregation and amyloid fibril formation induced by chemical dimerization of recombinant prion protein in physiological-like conditions. *J. Biol. Chem.* *284*, 30907–30916.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* *10*, S10–S17.

Rostami, J., Holmqvist, S., Lindström, V., Sigvardson, J., Westermark, G.T., Ingelsson, M., Bergström, J., Roybon, L., and Erlandsson, A. (2017). Human Astrocytes Transfer Aggregated Alpha-Synuclein via Tunneling Nanotubes. *J. Neurosci.* *37*, 11835–11853.

Rothlisberger, P., and Hollenstein, M. (2018). Aptamer chemistry. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *134*, 3–21.

Rothlisberger, P., Levi-Acobas, F., Sarac, I., Baron, B., England, P., Marliere, P., Herdewijn, P., and Hollenstein, M. (2017). Facile immobilization of DNA using an enzymatic his-tag mimic. *Chem. Commun.* *53*, 13031–13034.

Röthlisberger, P., Gasse, C., and Hollenstein, M. (2017). Nucleic Acid Aptamers: Emerging Applications in Medical Imaging, Nanotechnology, Neurosciences, and Drug Delivery. *Int J Mol Sci* *18*.

Ruckman, J., Green, L.S., Beeson, J., Waugh, S., Gillette, W.L., Henninger, D.D., Claesson-Welsh, L., and Janjić, N. (1998). 2'-Fluoropyrimidine RNA-based aptamers to the 165-amino acid form of vascular endothelial growth factor (VEGF165). Inhibition of receptor binding and VEGF-induced vascular permeability through interactions requiring the exon 7-encoded domain. *J. Biol. Chem.* *273*, 20556–20567.

Saborio, G.P., Permanne, B., and Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* *411*, 810–813.

Sano, K., Atarashi, R., Satoh, K., Ishibashi, D., Nakagaki, T., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Murayama, S., Mishima, K., and Nishida, N. (2018). Prion-Like Seeding of Misfolded α -Synuclein in the Brains of Dementia with Lewy Body Patients in RT-QUIC. *Mol. Neurobiol.* *55*, 3916–3930.

Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., and Quinn, N.P. (1999). Prevalence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy: a cross-sectional study. *Lancet* *354*, 1771–1775.

- Schrag, A., Horsfall, L., Walters, K., Noyce, A., and Petersen, I. (2015). Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol* 14, 57–64.
- Schweighauser, M., Shi, Y., Tarutani, A., Kametani, F., Murzin, A.G., Ghetti, B., Matsubara, T., Tomita, T., Ando, T., Hasegawa, K., et al. (2020). Structures of α -synuclein filaments from multiple system atrophy. *Nature* 585, 464–469.
- Scott, D., and Roy, S. (2012). α -Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *J Neurosci* 32, 10129–10135.
- Sevcsik, E., Trexler, A.J., Dunn, J.M., and Rhoades, E. (2011). Allosteric in a disordered protein: oxidative modifications to α -synuclein act distally to regulate membrane binding. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7152–7158.
- Shahnawaz, M., Tokuda, T., Waragai, M., Mendez, N., Ishii, R., Trenkwalder, C., Mollenhauer, B., and Soto, C. (2017). Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol* 74, 163–172.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., Frosch, M.P., Walsh, D.M., Hamilton, J.A., and Selkoe, D.J. (2003). The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 37, 583–595.
- Sharrad, D.F., Chen, B.N., Gai, W.P., Vaikath, N., El-Agnaf, O.M., and Brookes, S.J.H. (2017). Rotenone and elevated extracellular potassium concentration induce cell-specific fibrillation of α -synuclein in axons of cholinergic enteric neurons in the guinea-pig ileum. *Neurogastroenterol. Motil.* 29.
- Shrivastava, A.N., Redeker, V., Fritz, N., Pieri, L., Almeida, L.G., Spolidoro, M., Liebmann, T., Bousset, L., Renner, M., Lena, C., et al. (2015). alpha-synuclein assemblies sequester neuronal alpha3-Na⁺/K⁺-ATPase and impair Na⁺ gradient. *EMBO J* 34, 2408–2423.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C., and Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 108–117.
- Stein, C.A., and Castanotto, D. (2017). FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol. Ther.* 25, 1069–1075.
- Stoltenburg, R., Reinemann, C., and Strehlitz, B. (2007). SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 24, 381–403.
- Stuendl, A., Kunadt, M., Kruse, N., Bartels, C., Moebius, W., Danzer, K.M., Mollenhauer, B., and Schneider, A. (2016). Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain* 139, 481–494.
- Tamo, W., Imaizumi, T., Tanji, K., Yoshida, H., Mori, F., Yoshimoto, M., Takahashi, H., Fukuda, I., Wakabayashi, K., and Satoh, K. (2002). Expression of alpha-synuclein, the precursor of non-amyloid beta component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci. Lett.* 326, 5–8.
- Tanik, S.A., Schultheiss, C.E., Volpicelli-Daley, L.A., Brunden, K.R., and Lee, V.M.Y. (2013). Lewy body-like α -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. *J. Biol. Chem.* 288, 15194–15210.

- Theodore, S., Cao, S., McLean, P.J., and Standaert, D.G. (2008). Targeted overexpression of human α -synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of parkinson disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 67, 1149–1158.
- Thiesen, H.J., and Bach, C. (1990). Target Detection Assay (TDA): a versatile procedure to determine DNA binding sites as demonstrated on SP1 protein. *Nucleic Acids Res.* 18, 3203–3209.
- Tison, F., Yekhlief, F., Chrysostome, V., and Sourgen, C. (2000). Prevalence of multiple system atrophy. *Lancet* 355, 495–496.
- Toh, S.Y., Citartan, M., Gopinath, S.C.B., and Tang, T.-H. (2015). Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosensors and Bioelectronics* 64, 392–403.
- Trexler, A.J., and Rhoades, E. (2009). Alpha-synuclein binds large unilamellar vesicles as an extended helix. *Biochemistry* 48, 2304–2306.
- Trojanowski, J.Q., Revesz, T., and Neuropathology Working Group on MSA (2007). Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33, 615–620.
- Trojsi, F., Christidi, F., Migliaccio, R., Santamaría-García, H., and Santangelo, G. (2018). Behavioural and Cognitive Changes in Neurodegenerative Diseases and Brain Injury. *Behav Neurol* 2018.
- Tsukakoshi, K., Harada, R., Sode, K., and Ikebukuro, K. (2010). Screening of DNA aptamer which binds to alpha-synuclein. *Biotechnology Letters* 32, 643–648.
- Tsukakoshi, K., Abe, K., Sode, K., and Ikebukuro, K. (2012). Selection of DNA aptamers that recognize alpha-synuclein oligomers using a competitive screening method. *Analytical Chemistry* 84, 5542–5547.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Senczuk, A.M., Kita, Y., and Arakawa, T. (2007). Effects of salts on protein–surface interactions: applications for column chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 96, 1677–1690.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505–510.
- Uéda, K., Fukushima, H., Masliah, E., Xia, Y., Iwai, A., Yoshimoto, M., Otero, D.A., Kondo, J., Ihara, Y., and Saitoh, T. (1993). Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11282–11286.
- Uversky, V.N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry* 103, 17–37.
- Vaikath, N.N., Majbour, N.K., Paleologou, K.E., Ardah, M.T., van Dam, E., van de Berg, W.D.J., Forrest, S.L., Parkkinen, L., Gai, W.-P., Hattori, N., et al. (2015). Generation and characterization of novel conformation-specific monoclonal antibodies for α -synuclein pathology. *Neurobiology of Disease* 79, 81–99.
- Vaikath, N.N., Hmila, I., Gupta, V., Erskine, D., Ingelsson, M., and El-Agnaf, O.M.A. (2019). Antibodies against alpha-synuclein: tools and therapies. *J Neurochem* 150, 612–625.

- Vaish, N.K., Larralde, R., Fraley, A.W., Szostak, J.W., and McLaughlin, L.W. (2003). A novel, modification-dependent ATP-binding aptamer selected from an RNA library incorporating a cationic functionality. *Biochemistry* *42*, 8842–8851.
- Van der Perren, A., Gelders, G., Fenyi, A., Bousset, L., Brito, F., Peelaerts, W., Van den Haute, C., Gentleman, S., Melki, R., and Baekelandt, V. (2020). The structural differences between patient-derived α -synuclein strains dictate characteristics of Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol.*
- Vargas, J.Y., Grudina, C., and Zurzolo, C. (2019). The prion-like spreading of α -synuclein: From in vitro to in vivo models of Parkinson's disease. *Ageing Research Reviews* *50*, 89–101.
- Vassar, P.S., and Culling, C.F. (1959). Fluorescent stains, with special reference to amyloid and connective tissues. *Arch Pathol* *68*, 487–498.
- Verasdonck, J., Bousset, L., Gath, J., Melki, R., Bockmann, A., and Meier, B.H. (2016). Further exploration of the conformational space of alpha-synuclein fibrils: solid-state NMR assignment of a high-pH polymorph. *Biomol Nmr Assign* *10*, 5–12.
- Vinores, S.A. (2006). Pegaptanib in the treatment of wet, age-related macular degeneration. *Int J Nanomedicine* *1*, 263–268.
- Volles, M.J., and Lansbury, P.T. (2002). Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein Is Sensitive to Parkinson's Disease-Linked Mutations and Occurs by a Pore-like Mechanism. *Biochemistry* *41*, 4595–4602.
- Volles, M.J., Lee, S.-J., Rochet, J.-C., Shtilerman, M.D., Ding, T.T., Kessler, J.C., and Lansbury, P.T. (2001). Vesicle Permeabilization by Protofibrillar α -Synuclein: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Parkinson's Disease. *Biochemistry* *40*, 7812–7819.
- Volpicelli-Daley, L.A., Luk, K.C., Patel, T.P., Tanik, S.A., Riddle, D.M., Stieber, A., Meaney, D.F., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2011). Exogenous α -Synuclein Fibrils Induce Lewy Body Pathology Leading to Synaptic Dysfunction and Neuron Death. *Neuron* *72*, 57–71.
- Wang, C., Zhao, C., Li, D., Tian, Z., Lai, Y., Diao, J., and Liu, C. (2016). Versatile Structures of alpha-Synuclein. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *9*, 48.
- Wang, R., Epstein, J., Charoenvit, Y., Baraceros, F.M., Rahardjo, N., Gay, T., Banania, J.-G., Chattopadhyay, R., Vega, P. de la, Richie, T.L., et al. (2004). Induction in Humans of CD8+ and CD4+ T Cell and Antibody Responses by Sequential Immunization with Malaria DNA and Recombinant Protein. *The Journal of Immunology* *172*, 5561–5569.
- Wang, S., Mata-Fink, J., Kriegsman, B., Hanson, M., Irvine, D.J., Eisen, H.N., Burton, D.R., Wittrup, K.D., Kardar, M., and Chakraborty, A.K. (2015). Manipulating the Selection Forces during Affinity Maturation to Generate Cross-Reactive HIV Antibodies. *Cell* *160*, 785–797.
- Wang, T.T., Tan, G.S., Hai, R., Pica, N., Petersen, E., Moran, T.M., and Palese, P. (2010). Broadly Protective Monoclonal Antibodies against H3 Influenza Viruses following Sequential Immunization with Different Hemagglutinins. *PLOS Pathogens* *6*, e1000796.
- Webber, J., Stone, T.C., Katilius, E., Smith, B.C., Gordon, B., Mason, M.D., Tabi, Z., Brewis, I.A., and Clayton, A. (2014). Proteomics analysis of cancer exosomes using a novel modified aptamer-based array (SOMAscan™) platform. *Mol. Cell Proteomics* *13*, 1050–1064.

- Westphal, C.H., and Chandra, S.S. (2013). Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J. Biol. Chem.* *288*, 1829–1840.
- Williams, A. (2002). Defining neurodegenerative diseases. *BMJ* *324*, 1465–1466.
- Wit, R.H. de, Munnik, S.M. de, Leurs, R., Vischer, H.F., and Smit, M.J. (2016). Molecular Pharmacology of Chemokine Receptors. *Methods in Enzymology*.
- Wolf, K. (2012). Alzheimer's Prion Connection. *Chemical & Engineering News*.
- Wong, I., and Lohman, T.M. (1993). A double-filter method for nitrocellulose-filter binding: application to protein-nucleic acid interactions. *PNAS* *90*, 5428–5432.
- Wong, Y.C., and Krainc, D. (2016). Lysosomal trafficking defects link Parkinson's disease with Gaucher's disease. *Mov. Disord.* *31*, 1610–1618.
- Wong, Y.C., and Krainc, D. (2017). α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nature Medicine* *23*, 1–13.
- World Alzheimer Report (2019). *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. 160.
- Wu, C., Wang, Z., Lei, H., Zhang, W., and Duan, Y. (2007). Dual Binding Modes of Congo Red to Amyloid Protofibril Surface Observed in Molecular Dynamics Simulations. *J. Am. Chem. Soc.* *129*, 1225–1232.
- www.a2mcl.org Association des Aidants et Malades à Corps de Lewy.
- www.fondation-mederic-alzheimer.org (2017).
- www.franceparkinson.fr (2020). Comprendre la maladie de Parkinson.
- www.orpha.net (2006). www.orpha.net.
- Xilouri, M., Brekk, O.R., and Stefanis, L. (2013). α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol. Neurobiol.* *47*, 537–551.
- Yamamoto, R., Baba, T., and Kumar, P.K. (2000). Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of Tat protein of HIV-1. *Genes Cells* *5*, 389–396.
- Yang, K.-A., Pei, R., and Stojanovic, M.N. (2016). In vitro selection and amplification protocols for isolation of aptameric sensors for small molecules. *Methods* *106*, 58–65.
- Ye, L., Velasco, A., Fraser, G., Beach, T.G., Sue, L., Osredkar, T., Libri, V., Spillantini, M.G., Goedert, M., and Lockhart, A. (2008). In vitro high affinity alpha-synuclein binding sites for the amyloid imaging agent PIB are not matched by binding to Lewy bodies in postmortem human brain. *J Neurochem* *105*, 1428–1437.
- Yu, L., Cui, J., Padakanti, P.K., Engel, L., Bagchi, D.P., Kotzbauer, P.T., and Tu, Z. (2012). Synthesis and in vitro evaluation of alpha-synuclein ligands. *Bioorg Med Chem* *20*, 4625–4634.
- Zhang, J., Li, X., and Li, J.-D. (2019). The Roles of Post-translational Modifications on α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Diseases. *Front Neurosci* *13*.
- Zhang, W., Liu, Q.X., Guo, Z.H., and Lin, J.S. (2018). Practical Application of Aptamer-Based Biosensors in Detection of Low Molecular Weight Pollutants in Water Sources. *Molecules* *23*.

Zheng, Y., Qu, J., Xue, F., Zheng, Y., Yang, B., Chang, Y., Yang, H., and Zhang, J. (2018). Novel DNA Aptamers for Parkinson's Disease Treatment Inhibit alpha-Synuclein Aggregation and Facilitate its Degradation. *Mol Ther Nucleic Acids* *11*, 228–242.

Zhu, G., and Chen, X. (2018). Aptamer-based targeted therapy. *Adv Drug Deliv Rev* *134*, 65–78.

Zhu, Z., Ravelet, C., Perrier, S., Guieu, V., Fiore, E., and Peyrin, E. (2012). Single-Stranded DNA Binding Protein-Assisted Fluorescence Polarization Aptamer Assay for Detection of Small Molecules. *Anal. Chem.* *84*, 7203–7211.

Zibae, S., Jakes, R., Fraser, G., Serpell, L.C., Crowther, R.A., and Goedert, M. (2007). Sequence Determinants for Amyloid Fibrillogenesis of Human α -Synuclein. *Journal of Molecular Biology* *374*, 454–464.

Annexe A



Application of aptamers for *in vivo* molecular imaging and theranostics

Alix Bouvier-Müller^{a,b,c}, Frédéric Ducongé^{a,b,c,*}

^a CEA, Fundamental Research Division (DRF), Institut of Biology François Jacob (Jacob), Molecular Imaging Research Center, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

^b Neurodegenerative Diseases Laboratory, CNRS CEA URA 2210, Fontenay-aux-Roses, France

^c Paris-Saclay University, Fontenay-aux-Roses, France



ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 March 2018

Received in revised form 6 July 2018

Accepted 16 August 2018

Available online 17 August 2018

Keywords:

SELEX

In vivo imaging

Imaging probes

Nanomedicine

Biodistribution

ABSTRACT

Nucleic acid aptamers are small three-dimensional structures of oligonucleotides selected to bind to a target of interest with high affinity and specificity. *In vitro*, aptamers already compete with antibodies to serve as imaging probes, e.g. for microscopy or flow cytometry. However, they are also increasingly used for *in vivo* molecular imaging. Accordingly, aptamers have been evaluated over the last twenty years in almost every imaging modality, including single photon emission computed tomography, positron emission tomography, magnetic resonance imaging, fluorescence imaging, echography, and x-ray computed tomography. This review focuses on the studies that were conducted *in vivo* with aptamer-based imaging probes. It also presents how aptamers have been recently used to develop new types of probes for multimodal imaging and theranostic applications.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	95
2. Applications of aptamers for molecular imaging	96
2.1. Aptamers as probes for nuclear imaging	96
2.1.1. Single photon emission computed tomography (SPECT)	96
2.1.2. Positron emission tomography (PET)	98
2.2. <i>In vivo</i> fluorescence imaging with aptamers	98
2.3. Magnetic resonance imaging (MRI) with aptamers.	99
2.4. Ultrasound imaging.	99
3. Multimodal imaging with aptamers.	99
4. Use of aptamers for theranostics	100
4.1. Delivery of anthracycline drugs and imaging	100
4.2. Delivery of taxane drugs and imaging.	101
4.3. Delivery of nucleic acid drugs and imaging	102
4.4. Photodynamic therapy (PDT) and imaging	102
4.5. Photothermal therapy (PTT) and imaging	102
4.6. Drug delivery and multimodal imaging	102
5. Conclusions & perspectives.	103
Acknowledgments	104
References.	104

Abbreviations: BzdU, N-(benzylcarboxyamido)-2'-deoxyuridine; DiR, dioctadecyl-3,3,30,30-tetramethyl indotricarbocyanine iodide; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; LNA, locked nucleic acid; MRI, magnetic resonance imaging; MUC1, Mucin-1; NIR, near-infrared imaging; NP(s), nanoparticle(s); PDT, photodynamic therapy; PET, positron emission tomography; PSMA, prostate specific membrane antigen; PTT, photothermal therapy; SPECT, single photon emission computed tomography; SPION(s), superparamagnetic iron oxide nanocrystal(s); X-ray CT, X-ray computerized tomography.

* Corresponding author.

E-mail address: frederic.duconge@cea.fr (F. Ducongé).

1. Introduction

Molecular imaging of living subjects allows the study of molecular and cellular events in their native environment, instead of having to remove cells or tissues before analysis. It is now routinely used in clinics to diagnose various diseases, as well as evaluate drug efficacy. There are several imaging modalities available and most require a molecular-imaging probe. Chemistry or biochemistry plays a crucial role in the development of such probes, which are usually constructed by combining three molecular components (Fig. 1): 1) a component to provide a signal that can be detected by an imaging instrument, 2) a ligand that can specifically interact with the molecular target of interest, and 3) a spacer that links the two previous components together. The spacer is not always mandatory and the two first components may sometimes be directly linked together. Once introduced into the living subject, the location of the molecular imaging probes can be monitored by an imaging system. The probe is generally injected intravenously, but other routes of administration can be used. Just after injection, the probe is distributed throughout the body of the subject. Then, part of the probe is expected to bind to its molecular target, whereas the rest is cleared from the tissues. Accordingly, the imaging system should detect a higher signal in tissue expressing the target than the others (Fig. 2).

The first molecular imaging probes were derived from natural molecules that are involved in metabolism. For example, one of the most famous radiotracers used for cancer imaging is 2-deoxy-2-[^{18}F]fluoro-D-glucose (^{18}F -FDG), which is a radiolabeled glucose analog. However, there is now an increasing demand to develop new types of molecular imaging probes that can bind to targets for which there are no available or known natural ligands. These new probes are often made from macromolecules that can be tailored to interact with any molecular target of interest. These macromolecules use four forces of interaction (ionic bonds, hydrogen bonds, hydrophobic effects, and van der Waals interactions) to adopt three-dimensional (3D) structures and specifically interact with their target. Such forces are often called “weak bonds” because they require little energy to break. However, the 3D structure of a macromolecule can allow it to form many such weak interactions with a target of interest to, ultimately, bind to it with a very high affinity.

Peptides and proteins can provide a myriad of 3D structures able to generate high affinity ligands. For example, antibodies are well-known ligands that can bind to their target with very high affinity and

specificity. This property has been exploited to develop drugs and molecular imaging probes. However, proteins have many disadvantages when used as molecular imaging probes. First, their 3D structures can be unstable and difficult to maintain, not only *in vivo* but also *in vitro* during labeling steps. In addition, they are almost impossible to produce chemically, except for small peptides. Thus, they require bio-production processes that are not only costly but can also cause problems of batch-to-batch reproducibility. Finally, they may face problems of immune response, e.g. only humanized antibodies can be injected into humans, but cannot be easily evaluated in immuno-competent animal models, which reject them.

Like amino-acid polymers, nucleic acid sequences can form many 3D structures. This property is used in nature by RNAs to interact with a variety of molecules or to have catalytic activities (e.g. protein synthesis or splicing). Since 1990, several combinatorial approaches have been developed to exploit and analyze these properties of nucleic acids. Tuerk and Gold popularized such methods as SELEX (for systematic evolution of ligands by exponential enrichment) [1] and the nucleic acid-based ligands identified by this technique were baptized “aptamers” by Ellington and Szostak from the Latin “*aptus*”, meaning “to fit” [2]. Although the selection of aptamers has undergone many improvements and refinements [3–8], they are still based on the same principle (Fig. 3). A population of oligonucleotide sequences known as “candidates” is synthesized. They contain a randomly synthesized region, which is framed by two known sequences that can be amplified by PCR. This population is then subjected to an *in vitro* selection process, which extracts candidates that bind to a chosen target from the rest. These candidates are then amplified by PCR or RT-PCR and transcribed *in vitro* before being used in a new *in vitro* selection round. During the amplification step, mutations may occur, leading to the appearance of candidates that are slightly different from their parents, some of which may have higher affinity for the target. Accordingly, the population is expected to evolve through several rounds of selection and amplification, in a Darwinian fashion, favoring the progressive enrichment of the sequences with the highest affinity. Sequencing a sample of the population can then identify such sequences. Recently, high-throughput sequencing has led to a better understanding of this molecular evolution process and better identification of the aptamers [9]. The main weakness of RNA and DNA sequences is to be rapidly degraded by nucleases. The half-life of the oligonucleotide RNA is a few seconds in the plasma whereas for DNA it is around 30 to 60 min [10]. Several chemical modifications have been introduced in aptamers to protect them from nuclease degradation including modified bases, modified sugar and modifications on the phosphodiester linkage [11]. The most common strategy is to use chemically modified nucleotides that can be directly incorporated by polymerases during SELEX. For example, 2'Fluoro nucleotides are often used and the half-life time of 2'Fluoro-pyrimidine RNA sequences is around 5 to 15 h in plasma [10]. Chemical modifications could also be incorporated post-selection but they can change the structure of aptamers and affect their binding. Since their discovery, aptamers have been selected against a wide variety of targets, from small molecules to proteins to even complexes of targets present on the cell surface [3,12,13]. Aptamers have provided fundamental insights concerning the versatility of RNA, supporting its involvement in the origin of life [14,15]. In parallel, aptamers have been increasingly used for biotechnological applications, such as biosensors [16], bio-purification [17], biomarker discovery [18], and the regulation of gene expression [19]. Furthermore, one aptamer has already been commercialized as a drug for the treatment of age-related macular degeneration and several others are currently in clinical trials [20].

Because of their high specificity and affinity, aptamers are promising tools for molecular imaging [21–24]. Over the last 20 years, several aptamers have been tested as molecular probes in almost every imaging modality, including positron emission tomography (PET), single photon emission computed tomography (SPECT), magnetic resonance imaging (MRI), echography, X-ray computed tomography (X-ray CT), and fluorescence imaging. This review presents an up-to-date summary of the

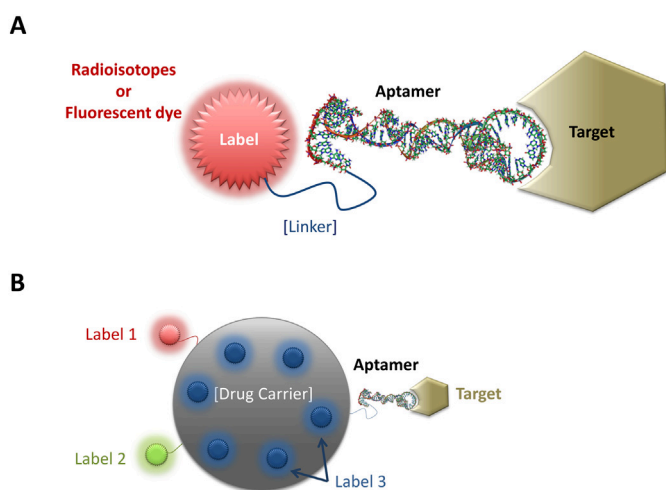


Fig. 1. Scheme of aptamer-based molecular imaging probes. A) An aptamer is conjugated by a linker to a molecule (label) that allows detection by a molecular imaging instrument. Such probes are generally used for nuclear or fluorescence imaging aided by radioisotopes or fluorescent dyes, respectively. B) For MRI and CT imaging techniques, aptamers are linked to contrast agents based on nanoparticles. These nanoparticles can be simultaneously labeled with several labels to build multimodal imaging probes. They can also be used to co-deliver drugs for theranostic applications.

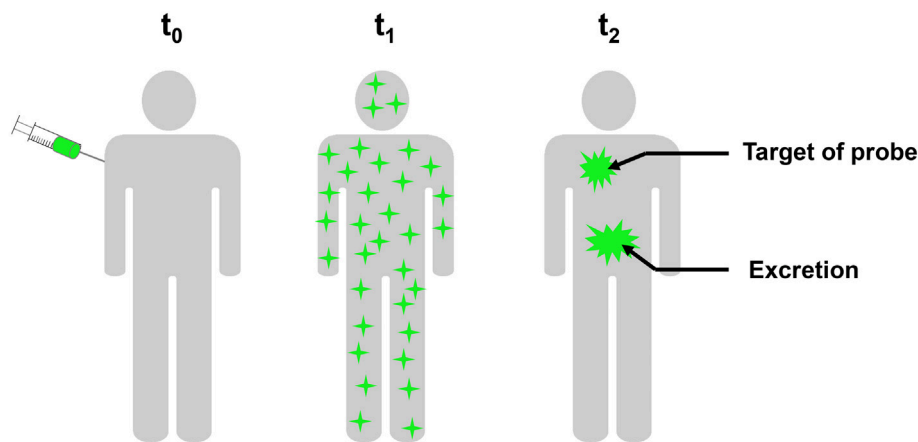


Fig. 2. Principle of molecular imaging. At t_0 , the contrast agent (in green) is injected inside the subject. Then, it spreads over the whole body (t_1) and is finally eliminated via excretory organs, except in the area of interest where the probe interacts with the target (t_2).

investigations that have been performed *in vivo* and the recent use of aptamers to develop new types of probes for multimodal imaging and theranostic applications. We have tried to exhaustively list all these studies in tables (see Tables 1, 2 and 3), but have chosen not to describe them all in detail, but rather to present general conclusions that can be drawn from these experiments.

2. Applications of aptamers for molecular imaging

2.1. Aptamers as probes for nuclear imaging

Nuclear imaging uses molecular imaging probes that are radioactively labeled. These probes are usually called “radiotracers” or “radio-pharmaceuticals”. Once injected into subjects, external detectors (gamma cameras) detect the radiation emitted by such probes. This

signal is then used to reconstruct images that allow quantitative measures of probe localization at various times post-injection. Several different modalities of nuclear imaging can be used, depending on the radioisotope, some of which have been developed for the radiolabeling of aptamers [25,26]. 2D scintigraphy or 3D imaging by SPECT use β emitters (such as ^{99m}Tc , ^{123}I , or ^{111}In) that can be directly detected by gamma cameras. In contrast, PET uses positron-emitting (β^+) radionuclides (such as ^{11}C , ^{18}F , ^{68}Ga , or ^{64}Cu) that need first to be annihilated by an electron to release two gamma rays, which are emitted at an angle that approximates 180° . Radiolabeled aptamers have been evaluated as probes for these imaging modalities (Table 1).

2.1.1. Single photon emission computed tomography (SPECT)

The first trial to test aptamers in molecular imaging was performed in 1997 by Charlton et al. [27]. This study used a DNA aptamer (called

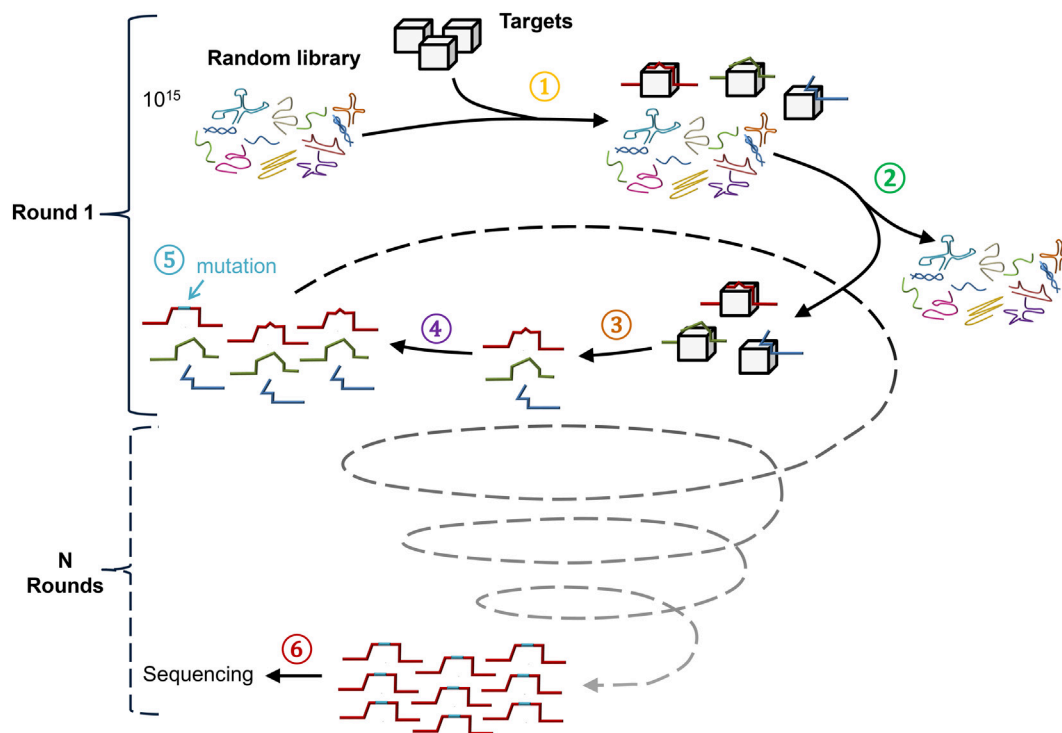


Fig. 3. General principle of aptamer selection by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). A random oligonucleotide library is incubated with a target (1). Sequences that bind to the target are conserved, whereas others are eliminated (2). The selected sequences are then extracted (3) and amplified by PCR (or RT-PCR followed by *in vitro* transcription for RNA libraries) (4). During this step, mutations can appear (5). The new library enters a new cycle of selection-amplification. Over the successive cycles, sequences that provide the best binding to the target are amplified and can be identified by sequencing (6).

Table 1

In vivo studies using aptamers to develop molecular imaging probes. Except when mentioned, all preclinical models were nude mice bearing subcutaneous tumor xenografts (S.) or orthotopic tumor xenografts (O.).

Target	Name	Chemistry	Imaging	Labeling	Preclinical model	References
Neutrophil elastase	NX21909	DNA	SPECT	^{99m} Tc	Artificially induced inflammation in male Harlan Sprague-Dawley rats	[27]
Thrombin	ODN1& ODN2	DNA	Scintigraphy (SPECT)	¹²³ I	Rabbit jugular vein model using thrombus supplemented with human thrombin	[87]
Thrombin		DNA	Ultrasound	Microbubbles	Rabbit Deep Venous Thrombosis Model	[59,88]
Tenascin-C	TTA1	2'OMe-Pu, 2' F-Py RNA	SPECT	^{99m} Tc	S. (U251 cells) and O. (MDA-MB-435 cells)	[89] [28]
Tenascin-C	GBI-10	DNA	PET	¹⁸ F and ⁶⁴ Cu	S. (U87MG cells or H460) and O. (MDA-MB-435)	[40]
MUC1	MUC1	DNA	<i>Ex vivo</i> Scintigraphy	^{99m} Tc	S. (MCF-7 cells)	[90]
MUC1	AptA & AptB	DNA	SPECT	^{99m} Tc	S. (MCF-7 cells)	[29]
MUC1		Modified DNA	Fluorescence	Quantum Dots	S. (A549 cells)	[91]
MUC1	P0	DNA	Fluorescence	Cy3	S. (MCF-7 cells)	[52]
Nucleolin	AS1411	DNA	PET	⁶⁴ Cu	S. (H460 cells)	[38]
Nucleolin	AS1411	DNA	SPECT	^{99m} Tc	S. (DU-145 cells)	[30]
Nucleolin	AS1411	DNA	MRI	Magnetic NPs	S. (HeLa cells)	[55]
IGHM	TD05	DNA	Fluorescence	Cy5	S. (Ramos cells)	[44]
IGHM	TD05	DNA	Fluorescence	Cy5 FITC	S. (Ramos cells)	[45]
IGHM	TD05	DNA	Fluorescence	Cy5	S. (Ramos cells)	[47]
ErbB2-expressing breast cancer cell line	HER2	2'F-Py RNA	SPECT	^{99m} Tc	S. (SKOV-3 cells)	[31,92]
EGFRvIII	U2	DNA	SPECT	¹⁸⁸ Re	S. (U87MG cells)	[32]
PTK7	Sgc8	DNA	Fluorescence	Cy5	S. (CCRF-CEM cells)	[51]
PTK7	Sgc8	DNA	PET	¹⁸ F	S. (U87MG cells or HCT116 cells) and tumor metastases (HCT116 cells)	[40,93]
(1 → 3)-β-D-glucan	seq6 & seq30	DNA	SPECT	^{99m} Tc	Mice infected with <i>S. aureus</i> or immunosuppressed and infected with <i>C. albicans</i>	[35]
Peptidoglycan	Antibac1	DNA	SPECT	^{99m} Tc	Mice infected with <i>S. aureus</i> or <i>C. albicans</i>	[36]
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA20, SA23 and SA34	DNA	SPECT	^{99m} Tc	Mice infected with <i>S. aureus</i>	[37]
MMP-9	F3B	2'OMe-Pu, 2' F-Py RNA	SPECT / Fluorescence	^{99m} Tc or ¹¹¹ In / Cy5	S. (A375 cells)	[33,34]
VEGFR2		BzdU DNA	MRI	Magnetic Nps	O. (U87MG cells)	[56]
αvβ3 Integrin	Apt _{avβ3}	BzdU DNA	MRI	Magnetic Nps	S. (A431 cells)	[57]
VEGF ₁₆₅	VEGF165-aptamer	2'OMe-Pu, 2' F-Py RNA	MRI	USPIO	O. (BEL-7402 cells)	[58]
Aβ fibrils	β55	RNA	Fluorescence	Fluorescein	APP/PS1 transgenic mice	[53]
ATP		DNA	Fluorescence	TPdye & graphene oxide	Two-day-old zebrafish	[94]
CD30		RNA & DNA	Fluorescence	IRD800CW	Several subcutaneous tumor xenografts	[95]
Annexin A2	ACE4	2'F-Py RNA	Fluorescence	AF680	S. (MCF-7 cells)	[46]
SGC7901 cells	S4a	DNA	Fluorescence	Quantum Dots / Cy5/BHQ2	S. (SGC7901 cells)	[96]
VCAM-1			Fluorescence	Cy5.5	Transgenic APP/PS1 mice.	[54]
EGFRvIII	A32	DNA	Fluorescence	Quantum Dots	O. (U87MG cells)	[97]
PTK7	Sgc8-c	DNA	SPECT or Fluorescence	^{99m} Tc or Alexa647 dye	S. (B16F1 cells and A20 cells)	[48]

NX21909) that binds to neutrophil elastase, which is a serine protease secreted by neutrophils during inflammation. This aptamer was radiolabeled with ^{99m}Tc and intravenously injected into rats with induced inflammation in a forelimb. The biodistribution of the aptamer was measured by scintigraphy and compared to that of a reference IgG used clinically to image inflammation and a negative control oligonucleotide. Every compound exhibited a higher signal in the inflamed forelimb than the contro-lateral healthy forelimb. In addition, a higher signal was measured with the aptamer than the control oligonucleotide in the inflamed forelimb. Finally, the control oligonucleotide and the aptamer showed faster clearance than the reference IgG. This led the aptamer to reach a signal-to-noise ratio of 4.3 ± 0.6 just 2 h post-injection, whereas the best ratio obtained by the antibody was only 3.1 ± 0.1 and occurred 3 h post-injection.

Hicke et al. further evaluated an aptamer using SPECT for cancer imaging in 2006 [28]. This aptamer, called TTA1, was selected against tenascin C (TN-C), an extracellular matrix protein overexpressed in many tumors. This aptamer was a 2'fluoro-pyrimidine RNA oligomer. Accordingly, every pyrimidine of this aptamer contained a fluor group in the 2' position of the ribose; this chemical modification is known to provide greater resistance against degradation by nucleases. In contrast,

the previously described anti-elastase aptamer used natural DNA chemistry, which is expected to be rapidly degraded by nucleases *in vivo*. The biodistribution of the TTA1 aptamer was measured by SPECT imaging after intravenous injection in mice bearing subcutaneous tumor xenografts from human U251 glioblastoma cells. A maximum uptake of 6% of injected dose/g (ID/g) was achieved in the tumor 10 min after intravenous injection of [^{99m}Tc]-radiolabeled TTA1. The aptamer in the tumor then continuously decreased, but 1.9% ID/g was still present 3 h post-injection. A negative control aptamer showed initial tumor absorption that was half of that of TTA1 (3% ID/g) at 10 min but it was rapidly cleared from the tumor, with only 0.04% ID/g still present 3 h post-injection. This aptamer demonstrated rapid blood clearance and reached a tumor-to-blood ratio of approximately 50 just 3 h after injection. Such rapid clearance can be explained by rapid renal excretion, as well as nuclease degradation. Indeed, the aptamer detected in the blood 3 h after injection was completely degraded, whereas the radioactivity present in the tumor at that time corresponded mostly to non-degraded aptamer. The authors suggested that the aptamer could have been partially protected against nucleases when bound to its target. This study also examined the importance of the radiometal chelator and the injected dose in the biodistribution of the probe. Three different

chelators were compared for radiolabeling of the aptamer. The clearance of the aptamer was markedly different from the three chelators, although they had less of an effect on tumor targeting. Finally, increasing the injected dose was shown to correlate with increased circulation time of the aptamer in blood and higher absorption by the tumor, suggesting that the clearance of this aptamer should be saturable.

Several other aptamers have been evaluated by SPECT imaging for tumor targeting (see Table 1). They were mostly selected against proteins that are overexpressed at the surface of cancer cells. These studies confirmed that aptamers are rapidly cleared from the bloodstream and eliminated either by hepatobiliary and/or urinary excretion. Two DNA aptamers, selected against Mucin 1 (MUC1) [29] and nucleolin [30], demonstrated higher uptake in the tumors than muscle, suggesting that they can bind to their targets *in vivo*. These aptamers were, however, evaluated without comparing them to a negative oligonucleotide control. Thus, it is impossible to know whether tumor uptake was linked to their interaction with their target or to higher vascularization of the tumor. For example, similar tumor uptake was observed with a 2' F-Py RNA aptamer selected against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), but comparison of the aptamer with that of a control sequence showed the two to have the same tumor uptake [31]. This demonstrates the importance of including this control in such studies to determine whether tumor uptake of an aptamer is non-specific or results from an interaction with its target.

Accordingly, two aptamers demonstrated significantly higher tumor uptake than a control oligonucleotide: a DNA aptamer selected against epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) [32] and a fully modified aptamer (2'Ome-Purine/2'F-Py) that binds to matrix metalloproteinase-9 (MMP9) [33,34]. The latter was radiolabeled either with ^{99m}Tc -MAG or ^{111}In -DOTA [34]. Significant tumor targeting was observed for both labels, but high hepatobiliary excretion was observed for the ^{99m}Tc -MAG-labeled aptamer, whereas the ^{111}In -DOTA-labeled aptamer was mostly eliminated by the urinary pathway. This result confirmed that labeling can strongly influence the biodistribution of aptamers.

Recently, three studies published by the group of Antero Silva Ribeiro de Andrade investigated the use of aptamers as probes for the detection of bacterial infections by SPECT imaging [35–37]. These aptamers were selected against various structural cell-wall components of bacteria. Scintigraphy of *Staphylococcus aureus* infected mice using ^{99m}Tc -radiolabeled aptamers demonstrated that the bacterial infection could be located, with target to non-target ratios that were statistically higher than those achieved for a control sequence.

2.1.2. Positron emission tomography (PET)

Four studies have evaluated the use of aptamers as probes for PET imaging in several cancer models (Table 1). Two used a DNA aptamer (AS1411) that binds to nucleolin. This protein, over-expressed on the surface of many cancerous cells, can internalize when it binds the aptamer. In 2014, Li et al. conjugated the extremity of the AS1411 aptamer with four different chelators, allowing radiolabeling with ^{64}Cu [38]. They demonstrated that these chelators can substantially alter internalization of the aptamer *in vitro*. They also demonstrated that the biodistribution and tumor targeting of this aptamer changes, depending on the chelator used, similar to the SPECT imaging studies. The same AS1411 aptamer was also evaluated by Park et al. using a control sequence [39]. In this study, the aptamer was elongated by a sequence of 15 nucleotides that was then hybridized to an antisense oligonucleotide previously radiolabeled with ^{18}F by click chemistry. This clever methodology makes it possible to easily radiolabel several aptamers at the same time using the ^{18}F -radiolabeled antisense oligonucleotide. The efficacy and specificity of tumor targeting of this aptamer was evaluated by micro-PET in mice carrying tumor xenografts. High absorption was observed in the kidneys, intestines, and liver for both the aptamer and the control sequence. However, the aptamer showed slightly higher tumor targeting than the control sequence. They carried out a blocking experiment to confirm the specificity of tumor targeting

by co-injecting a 100-fold molecular excess of unlabeled AS1411 aptamers. Tumor uptake was reduced by a factor of two, suggesting that part of the tumor targeting was possibly specific.

In 2015, Jacobson et al. evaluated two other aptamers as probes for PET imaging [40]. First, they evaluated an aptamer against tenascin-C. They used a DNA aptamer that is completely different from the 2'-fluoro-Py RNA aptamer previously studied by SPECT imaging (see above). It was radiolabeled with either ^{64}Cu or ^{18}F before being evaluated by PET imaging in mice bearing a subcutaneous tumor xenograft. Although this aptamer was described to have poor binding at 37 °C (Kd in the μM range) [41], it demonstrated higher tumor uptake than a scrambled control sequence for both labeling strategies. However, the 2'-fluoro-Py-labeled aptamer, previously evaluated by SPECT, showed 10-fold higher uptake by the tumor 1 h after injection (3 versus 0.3%ID/g) and also demonstrated a 10-fold higher tumor/blood ratio 3 h after injection (50 versus 4).

Then, the same group studied a DNA aptamer selected against protein tyrosine kinase-7 (PTK7), a member of the receptor tyrosine kinase superfamily that is highly expressed in various human malignancies [42]. The aptamer was evaluated in mice bearing subcutaneous tumors from the HCT116 and U87MG cell lines. PET studies showed specific accumulation of the ^{18}F -radiolabeled aptamer in HCT116 tumors, which express high levels of PTK7, and lower uptake by U87MG tumors, which express lower levels of PTK7. Uptake of the aptamer was higher than that of the control sequence in both models. The specificity was also confirmed by an 80% inhibition of uptake when the radioactive aptamer was co-injected with a large excess of unlabeled aptamer. Furthermore, the aptamer demonstrated higher uptake by liver metastases from HCT116 cells than by the subcutaneous tumor. Finally, they found that increasing the injected dose increased tumor targeting of the aptamer, as previously observed.

2.2. *In vivo* fluorescence imaging with aptamers

In vivo fluorescence imaging is similar to fluorescence microscopy but at a macroscopic level. This type of imaging has become widespread in laboratories. However, unlike other molecular imaging techniques, the use of fluorescence imaging is technically more difficult because biological tissues absorb and disperse photons and can also generate strong autofluorescence, obscuring the collection and quantification of signals. Nevertheless, significant progress has been made in the mathematical models that describe the propagation of photons in tissues. Moreover, the illumination and detection instruments available have improved and this type of imaging is now widely used for small rodent imaging. In addition, it shows promise for several applications in humans, especially for image-assisted surgery.

Many fluorescent probes have been designed using aptamers (Table 1). The simplest way is to graft the aptamer with a small organic dye. Generally, fluorophores emitting in the near infrared are preferred because biological tissues absorb less photons and have less autofluorescence at these wavelengths. The fluorescent aptamer is then intravenously injected into living subjects and fluorescence imaging is performed at various times. Usually, “planar imaging” is used for qualitative or semi-quantitative 2D imaging. This technique uses wide-field illumination for the excitation of a fluorophore inside animals and a highly sensitive camera to record the fluorescence signals. Planar imaging is strongly affected by light scattering. Thus, it is mainly used for imaging surface tissues, such as subcutaneous tumor xenografts, comparing the fluorescence signal inside the tissue of interest with the background signal originating from a reference area [43]. This approach has been used with many aptamers that bind to proteins overexpressed at the surface of cancer cells (Table 1). They have generally demonstrated higher fluorescence signals of the tumor than that of the background from a few minutes after injection up to several hours [44–48].

In vivo visualization and quantification of the fluorescence signal have been improved by the development of fluorescence diffuse optical

tomography (fDOT). This imaging technique, also called fluorescence molecular tomography (FMT), requires instruments that have a transillumination mode for excitation, generally by lasers. In contrast to planar images, fDOT can reconstruct the original fluorescence emission signal in three dimensions using algorithms. We previously compared fDOT and PET to monitor the biodistribution of oligonucleotides inside mice [49]. Although fDOT was less sensitive, it was able to measure similar concentrations of oligonucleotides ranging from 3 nM to 1 μ M. We were able to more precisely quantify the tumor targeting of an anti-annexin A2 aptamer using this technique [46]. Three hours after injection, the quantity of this aptamer in the tumor was approximately 14 times higher than that of a control sequence. fDOT was also used by Mi et al. to quantify the tumor targeting of an aptamer that binds to DHX9, an RNA helicase protein [50]. In this study, the aptamer was evaluated in an animal model of hepatic colorectal cancer metastases. In contrast to a subcutaneous xenograft, it was difficult to evaluate the size of such tumors, that can vary highly between animals. Nevertheless, one of the major advantages of fluorescence imaging is that it can measure several fluorophores at the same time. The authors used this property to normalize the tumor targeting of their aptamer by another fluorescent probe that targets the tumor.

A major drawback of molecular imaging is the difficulty to discriminate the specific binding of a probe from its non-specific distribution. However, unlike other types of imaging, in which the probes continuously produce a signal over time, it is possible to modulate fluorescence emission of a fluorophore according to its environment. This property has been used to develop activatable probes, also called “smart fluorescent probes”, that can produce a fluorescent signal only when they are bound to their target. Hence, Shi et al. developed an activatable aptamer probe (AAP) using a DNA aptamer targeting PTK7 [51]. They produced this AAP by elongating the aptamer with a poly-thymidine sequence and partially hybridizing it to a short DNA sequence containing a fluorophore and a quencher attached at each extremity. In the absence of the target, the construct forms a hairpin structure that brings the fluorophore close to the quencher, resulting in quenching of the fluorescence. However, when the aptamer is bound to the membrane receptors of cancer cells, its conformation changes, resulting in an activated fluorescence signal. This construct was evaluated in mice bearing subcutaneous tumors. The AAP displayed substantially enhanced contrast relative to classical labeling, in which the aptamer is continuously fluorescent. Furthermore, such enhanced contrast was achieved within 15 min after intravenous injection, whereas the always-on probe required more time to achieve maximal contrast because of the need to wait for clearance of the unbound probe.

Li et al. designed another activatable fluorescent probe with a DNA aptamer that binds to cell-surface MUC1, which is overexpressed in many malignant tumors [52]. In this case, the Cy3-labeled aptamer was π - π stacked on the surface of oxidized mesoporous carbon nanospheres, resulting in quenched fluorescence. After exposure to MUC1, the aptamer is gradually released from the oxidized mesoporous carbon nanosphere due to a much stronger interaction with the protein, resulting in fluorescence recovery. Although this construct led to promising *in vitro* results, it needs to be optimized for *in vivo* use. Indeed, a targeted fluorescent signal in the tumor was achieved by intra-tumoral injection, but not intravenous injection.

Recently, two aptamers were tested by fluorescence imaging in animal models of Alzheimer's disease [53,54]. One aptamer, called β -55, binds to amyloid fibrils found in Alzheimer's disease but not the A- β 40 monomer. Farrar et al. fluorescently labeled this aptamer and used it to visualize amyloid plaques in APP/PS1 transgenic mice *in vivo* using two-photon imaging [53].

2.3. Magnetic resonance imaging (MRI) with aptamers

MRI uses strong magnetic fields, electric field gradients, and radio waves to generate images. MRI is known to have very high spatial

resolution, but is relatively insensitive. Contrast agents have been developed to improve sensitivity, including T1-positive paramagnetic agents and T2-negative superparamagnetic nanoparticles. A few studies have been conducted to specifically address the use of aptamers to improve the imaging of tumors using contrast agents [55–58]. The aptamers studied bind to proteins that are expressed on the surface of proliferating endothelial cells during angiogenesis, such as nucleolin, $\alpha_v\beta_3$ integrin, vascular endothelial growth factor, and vascular endothelial growth factor receptor type 2 (VEGFR2). The fact that MRI contrast agents are sometimes large (up to several hundred nm in diameter), may explain why trials mostly targeted biomarkers that do not require extravasation from the bloodstream to be reached. These studies all demonstrated improved MRI contrast in tumors relative to nanoparticles without aptamers. However, no one compared signals using the same nanoparticle conjugated with a negative-control oligonucleotide, although conjugation of a negatively charged oligonucleotide can substantially affect the biodistribution of a nanoparticle. Thus, as already mentioned, it is difficult to know whether the signal is due to the interaction of the aptamer with its target or to higher non-specific uptake of the nanoparticle by the tumor.

2.4. Ultrasound imaging

Ultrasound imaging, also called echography, is a non-invasive method widely used in clinical settings for real-time anatomical and functional imaging. It uses a probe to send ultrasound pulses and record the sound echoes off the tissues. These echoes can be used to reconstruct an image, as different tissues reflect varying degrees of sound. The most common contrast agents used in molecular ultrasound are micron-sized, gas-containing microbubbles. Nakatsuka et al. functionalized such microbubbles with an aptamer that binds to thrombin [59]. Thrombin acts in the blood coagulation pathway to convert soluble fibrinogen into insoluble strands of fibrin, as well as catalyze other coagulation-related reactions. They observed a five-fold increase in acoustic activity in the clot region after injection of the microbubbles in a static thrombosis model in a rabbit. However, they did not compare their results with those using the same microbubbles conjugated with a control sequence.

3. Multimodal imaging with aptamers

Each imaging modality has advantages and disadvantages. Thus, there are an increasing number of hybrid instruments that offer the possibility of combining several imaging modalities. Similarly, multimodal imaging probes based on nanoparticles are being developed for detection by different imaging modalities. Several such probes have used aptamers as specific targeting agents (Table 2). For example, Hwang et al. used a cobalt-ferrite nanoparticle surrounded by fluorescent rhodamine in a silica shell matrix [60]. This nano-object, already detectable by MRI and fluorescence imaging, was conjugated with an anti-nucleolin aptamer before being further radiolabeled with ^{67}Ga for detection by SPECT imaging. They then evaluated the biodistribution of this multimodal-imaging probe in mice bearing subcutaneous tumor xenografts. As a negative control, they used the same construct in which they replaced the aptamer by a mutant aptamer in which several guanines were substituted with cytosines. Scintigraphy revealed higher tumor absorption of the nanoparticles conjugated to the aptamer than for those conjugated to the control sequence 24 h after intravenous injection. T2-weighted MR images of the same mice detected the presence of nanoparticles in tumors only when conjugated with the aptamer. Finally, higher tumor uptake of the nanoparticles conjugated to the aptamer was further confirmed by *ex vivo* fluorescence imaging of extracted organs. As expected, SPECT imaging was more sensitive and provided better quantification, whereas MRI provided better resolution. Apart from preclinical research, the use of this type of probe in humans is debatable. Indeed, the design of multimodal imaging probes is

Table 2
In vivo studies using aptamers to develop multimodal molecular imaging probes. Except when mentioned, all preclinical models were nude mice bearing subcutaneous tumor xenografts (S.) or orthotopic tumor xenografts (O.).

Target	Name	Chemistry	Imaging	Labeling	Preclinical model	References
Nucleolin	AS1411	DNA	SPECT / Fluorescence / MRI	⁶⁷ Ga / rhodamine B / Magnetic NPs	S. (C6 cells)	[60]
Nucleolin	AS1411	DNA	PET / Fluorescence	⁶⁴ Cu / Rhodamine B	S. (4 T1 cells)	[98]
Nucleolin	AS1411	DNA	PET / Fluorescence	¹⁸ F / Cy5	S. (C6 cells)	[39]
Nucleolin	AS1411	DNA	CT / Fluorescence	Gold NPs / dye	S. (CL1–5 cells)	[61]
PSMA	A10–3.2	2'F-Py RNA	Echography / Fluorescence	Nanobubbles / Cy5.5	S. (PC-3 cells)	[99]
TLS11a	Apt1	DNA	MRI/ Fluorescence	Magnetic NPs / FITC	O. (HepG2 cells)	[100]
HIF-1 α		DNA	Dual MRI (T1&T2)	Magnetic NPs	S. (Panc-1 cells)	[101]
Transcription factor TF-AP-1	5ECdsAP1	DNA	MRI / Fluorescence	SPION / fluorescein	Mice after amphetamine exposure and transgenic mice with neuronal negative A-FOS mutant protein	[102]

necessarily more complicated and costly. Furthermore, combining SPECT and MRI to detect the presence of a tumor does not provide any additional information over the use of either of these modalities alone. A more optimal approach would be to use a dual-modality probe that can be used during an initial whole-body examination to identify the location of a tumor and then assist in locating it during tumor resection surgery. Thus, most existing multimodal imaging probes combine fluorescence, which can be detected during surgery, with a whole-body imaging modality, such as PET, SPECT, MRI, or X-ray CT. For example, Li et al. conjugated the anti-nucleolin aptamer to fluorescent gold nanoparticles, which can be detected both by X-ray CT and fluorescence imaging [61]. This dual-modal imaging probe was detected in tumors by CT imaging 30 min after intravenous injection in mice bearing subcutaneous tumor xenografts. Furthermore, the tumor can be easily visualized during surgery under ultraviolet light, due to an orange-red fluorescent signal emitted from the nanoparticles. Such tumor targeting was not achieved by the same nanoparticle without an aptamer; however, further experiments should be performed with a control oligonucleotide to determine whether the enhanced contrast is due to interaction of the aptamer with its target.

4. Use of aptamers for theranostics

The term “theranostics” is used to define the research that is carried out to combine diagnostic and therapeutic capabilities into a single agent and develop more specific individualized therapies. This is because many existing therapies are effective only for a limited number of patient subpopulations and at selective stages of the disease. Thus, a nano-object that can co-deliver a therapy and an imaging agent could allow imaging to be used during treatment to determine whether the treatment is reaching the pathological area. It would therefore be possible to provide more specific therapeutic protocols to individuals to likely provide a better prognosis. Another advantage offered by theranostics is the simultaneous improvement of treatment efficiency and reduction in side effects for patients by specific targeting with the aptamer. Indeed, the treatment should be specifically addressed to the disease area instead of being spread throughout the body, with the result that healthy tissues receive a lower dose. Several theranostic strategies using aptamers have been evaluated *in vivo* in cancer models (Table 3). For all these strategies, it is necessary to use a conjugation method to attach the aptamer at the nanoparticle surface and to verify that the aptamer conserve its binding capacity. In addition, several conjugation methods could be evaluated to define the best spacer between aptamers and nanoparticles, as well as to define the best number of aptamers to conjugate per nanoparticle [62].

4.1. Delivery of anthracycline drugs and imaging

Most theranostic studies with aptamers concern the co-delivery of imaging agents and anthracycline drugs (predominantly doxorubicin).

These drugs interact with DNA by intercalation, inhibiting replication, and deregulating gene expression. The first way to deliver the drugs was to load it in various types of nanoparticles that were further labeled for detection by imaging and conjugated to aptamers. This approach was used by Pascual et al. who loaded doxorubicin in mesoporous silica nanoparticles that were further conjugated with an anti-MUC1 aptamer and radiolabeled by ⁹⁹Tc [63]. Specific targeting and drug delivery of the nanoparticle was demonstrated *in vitro* on cells and scintigraphy showed that the nanoparticles can target a subcutaneous tumor *in vivo*. However, the *in vivo* biodistribution was not compared to that of the same nanoparticle conjugated with a control sequence. A similar strategy was used by Mosafer et al. who entrapped superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and doxorubicin in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-based nanoparticles that were further conjugated to the anti-nucleolin aptamer [64,65]. Higher tumor targeting was observed by MRI for the nanoparticles conjugated with the aptamer than for unconjugated nanoparticles. Furthermore, the nanoparticles conjugated with the aptamer provided significantly higher inhibition of tumor growth and prolonged survival of mice bearing C26 colon carcinoma xenografts.

Another method to deliver drugs is to covalently attach them to the surface of nanoparticles. This strategy was used by Salva et al. who conjugated an anti-MUC1 aptamer to Quantum Dots and further attached doxorubicin to their surface *via* a pH-sensitive hydrazone bond [66]. These bonds are stable in general circulation at a neutral and slightly basic pH but undergo rapid hydrolysis in the acidic environment of endosomes. Accordingly, it should release the drug specifically in cancer cells that express nucleolin because they should internalize the nanoparticles *via* the aptamer. *In vivo* fluorescence imaging demonstrated that the Quantum Dots accumulated more in subcutaneous xenografts when they were conjugated to the aptamer. Furthermore, the therapeutic efficiency of these nanoparticles was slightly improved by the aptamer *in vitro*, but were not evaluated *in vivo*.

Doxorubicin was also conjugated to the surface of luminescent gold nanoclusters by Chen et al. [67]. They further conjugated this nanoparticle with two targeting moieties: the anti-nucleolin aptamer and a cyclic Arg-Gly-Asp (cRGD) peptide, which binds to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins, which are up-regulated in tumor endothelial cells. *In vivo* fluorescence imaging demonstrated significantly greater tumor targeting when the nanoparticles were conjugated with the dual targeting agents than when they were unconjugated, and slightly greater tumor targeting than nanoparticles conjugated with only cRGD. Intravenous injection of the nanoparticles conjugated with the dual targeting agents every 48 h induced greater inhibition of tumor growth than unconjugated nanoparticles and free doxorubicin.

Finally, the property of anthracyclines to intercalate into DNA has been used to load nanoparticles. Hence, Yu et al. used an aptamer that binds to the prostate-specific membrane antigen (PSMA), which is over expressed on some prostate tumors [68]. They elongated the sequence of the aptamer by an additional (CGA)₇ repeat that was

Table 3

In vivo studies using aptamers to develop theranostic agents. Except when mentioned, all preclinical models were nude mice bearing subcutaneous tumor xenografts (S.) or orthotopic tumor xenografts (O.).

Target	Name	Chemistry	Imaging	Labeling	Therapy	Preclinical model	References
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	Dye	Doxorubicin	S. (U87MG cells)	[67]
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	DiR	Docetaxel	O. (C6 cells)	[73]
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	Molecular beacon	Antagomir	S. (C6 cells)	[75]
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	DiR	Paclitaxel	O. (U87-PMT48-luc cells)	[72]
Nucleolin	AS1411	DNA	MRI	SPION	Doxorubicin	S. (C26 cells)	[64,65]
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	DiR	Docetaxel	O. (C6 cells)	[103]
Nucleolin	AS1411	DNA	Fluorescence	IR-780	Docetaxel	S. (MCF-7 or MDA-MB-231 cells) and spontaneous breast cancer bearing mice	[71]
Nucleolin & MUC1	AS1411 & S2.2	DNA	Echography		Docetaxel & PTT	S. (S180 cells)	[80]
MUC1		DNA	SPECT	^{99m} Tc		S. (MDA-MB-231 cells)	[104]
MUC1	P ₀	DNA	Fluorescence	Doxorubicin	Doxorubicin	S. (MCF-7 cells)	[105]
MUC1	MUC1	DNA	Fluorescence	Cy3	Doxorubicin	S. (MCF-7 cells)	[79]
MUC1	S2.2	DNA	Fluorescence	Quantum Dots	PTT	S. (MCF-7 cells)	[106]
MUC1	5TR1	DNA	MRI	SPION	Epirubicin	S. (C26 cells)	[69]
MUC1		DNA	PET	^{99m} Tc	Doxorubicin	S. (MDA-MB-231 cells)	[63]
MUC1	MUC1	DNA	Fluorescence	Quantum Dot	Doxorubicin	S. (A2780/AD cells)	[66]
PTK7	Sgc8	DNA	Fluorescence	Doxorubicin	Doxorubicin	S. (CEM cells)	[107]
PTK7	Sgc8c	DNA	Fluorescence	Cy5	Doxorubicin	S. (CEM cells)	[70]
PTK7	Sgc8c	DNA	Fluorescence	Cy5	PTT	S. (CCRF-CEM cells)	[77]
EGFR		2'F-Py RNA	SPECT	¹¹¹ In	∅	O. (OSC-19 cells)	[108]
EGFR			Fluorescence	Quantum Dot	SIRNA	S. (MDA-MB-231 cells)	[109]
EpCAM & Nucleolin		LNA	Fluorescence/ MRI / X-ray	VivoTag 680 XL / Fe ₃ O ₄	Bovine lactoferrin	S. (Caco-2 cells)	[81]
Hepatocellular carcinoma cells	TLS11a	ssDNA	Fluorescence	Chlorin e6	PDT/PTT/AQ4N	S. (HepG2 cells)	[110]
HER2 & A549 cells	S6	DNA	Fluorescence	Cy5	PTT	S. (A549 cells)	[78]
MDA-MB-231 cells	Apt S1	DNA	Fluorescence	R16 FP	PDT	S. and O. (MDA-MB-231 cells)	[76]
PSMA	A9	RNA	MRI	SPION	Doxorubicin	S. (LNCaP cells)	[68]
U87 cells	GMT8	DNA	Fluorescence	DiR	Docetaxel	O. (U87 cells)	[74]

hybridized to a sequence previously conjugated to the surface of SPIONs. This double strand pairing was not only used to conjugate the aptamer but also for the loading of doxorubicin, which is known to predominantly bind to consecutive CG base pair regions. The biodistribution of this complex was then evaluated by MRI in nude mice bearing subcutaneous tumors. From 1 h after injection, the nanoparticles conjugated with the aptamer demonstrated ten-fold higher tumor targeting than those conjugated with a scrambled control sequence. They then evaluated the *in vivo* therapeutic efficiency by injecting the nanoparticles every five days for 15 days. The mean fold increase in tumor volume (from day 0 to day 25) in mice was significantly less when the nanoparticles were conjugated to the aptamer than when a scrambled sequence was used (3.4 ± 0.6 -fold vs 5.2 ± 0.6 -fold) or free doxorubicin (5.0 ± 0.4 -fold). A similar loading strategy was also used by Jalilian et al. who loaded a MUC1 aptamer, that was conjugated to SPIONs, with epirubicin [69]. MRI demonstrated higher tumor targeting of the nanoparticles conjugated with the aptamer than unconjugated nanoparticles, similarly to the previous study. Furthermore, they also demonstrated greater inhibition of tumor growth.

The property of doxorubicin to intercalate into DNA was also used by Lei et al. to develop a smart split aptamer-based activatable theranostic probe [70]. They used the Sgc8c aptamer that interacts with a cancer-associated membrane PTK-7. The Sgc8c aptamer was split into two parts and linked *via* a short DNA linker labeled with a fluorophore. The central part of this linker was then hybridized with a complementary short DNA strand to which was attached a quencher that abolishes the fluorescence emission of the fluorophore. It was also loaded with doxorubicin, as the double helix region linker/short DNA strand was GC rich. The construct was designed to disassemble when the structure of the aptamer changes during its interaction with PTK-7, releasing the doxorubicin and activating the emission of a fluorescent signal. Both therapy and imaging were validated *in vitro*. They also evaluated the construct *in vivo* by fluorescence imaging in nude mice bearing subcutaneous

tumors. The tumor showed high fluorescence just 15 min post-injection, but the therapeutic efficiency was not evaluated.

4.2. Delivery of taxane drugs and imaging

Several theranostic studies have been performed with aptamers for the co-delivery of imaging agents and taxane drugs, such as paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere), which are widely used as chemotherapy agents. The principal mechanism of action of these drugs is to disrupt the microtubule functions that are essential for cell division. In contrast to anthracyclines, which are hydrophilic, taxanes are hydrophobic. Thus, the theranostics nanosystems developed for those drugs are different.

Tao et al. used a nano-precipitation method with an acetone/water system to prepare nanoparticles of cholic acid functionalized with a star-shaped block copolymer consisting of PLGA and vitamin E TPGS loaded with docetaxel and a near infrared fluorescent dye [71]. The surface of these nanoparticles was further conjugated with the anti-nucleolin aptamer. The resulting nanoparticles were evaluated in two mouse models in which the mice received subcutaneous tumor xenografts from human breast cancer cell lines. The nanoparticles conjugated with the aptamer demonstrated four-fold higher tumor targeting 24 h after intravenous injection than unconjugated nanoparticles or free dye by fluorescence imaging. Furthermore, they also demonstrated greater inhibition of tumor growth.

The anti-nucleolin aptamer was also used by Luo et al. to target poly (L-c-glutamyl-glutamine) nanoconjugates loaded with paclitaxel and a fluorescent dye [72]. In contrast to most of the studies described previously, these nanoparticles were not evaluated in subcutaneous models, but in nude mice that develop orthotopic brain tumors from intracranial injection of human U87 MG glioblastoma cells. Fluorescence imaging revealed two-fold higher tumor targeting by the nanoparticles conjugated with the aptamer than unconjugated nanoparticles 24 h after intravenous injection. Furthermore, when the nanoparticles were injected

every three days, the median survival of mice that received the nanoparticles (52 days) was significantly longer than those treated with unconjugated nanoparticles (47 days), free Taxol (40 days), or a control saline solution (36 days). Similar results were obtained by Gao et al. in another orthotopic brain tumor model. They also used the anti-nucleolin aptamer attached to the surface of poly(ethylene glycol)-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with docetaxel and fluorescence dye [73]. The surface of the nanoparticle was also conjugated with a peptide previously screened by phage display to cross the blood brain barrier (BBB). Fluorescence imaging demonstrated that this peptide enhanced brain uptake of the nanoparticles and that addition of the aptamer increased uptake by the tumor. Furthermore, injection of the dual-targeting nanoparticle every three days, for a total of three injections, significantly improved the median survival of mice over those that received the nanoparticles with only one targeting agent. The same nanoparticle achieved the same result using another aptamer selected to recognize glioblastoma cancer cells, but without the need of the peptide to cross the BBB [74]. This may be explained by the fact that the BBB is perhaps disrupted during growth of the brain tumor.

4.3. Delivery of nucleic acid drugs and imaging

Two studies have described the use of aptamers for the codelivery of nucleic acid drugs and an imaging agent. Kim et al. developed a fluorescent-activatable probe that can detect the expression of a miRNA and simultaneously inhibit its function [75]. This probe was constructed by conjugating the anti-nucleolin aptamer and a fluorescent molecular beacon to the surface of magnetic-fluorescent nanoparticles. The molecular beacon was designed to provide fluorescence emission upon hybridization with the micro-RNA (miRNA) 221. This interaction can also inhibit the function of miRNA 221, which promotes cancer by an antisense-like effect. C6 cells were first transfected by the probe before being subcutaneously implanted into nude mice. *In vivo* fluorescence imaging revealed that the miRNA could be detected in cancer cells for up to four days. The probe was also injected directly into already implanted subcutaneous tumors. It significantly decreased tumor growth relative to injections with PBS.

Recently, an anti-EGFR aptamer was used to target liposomes containing Quantum dots for fluorescent imaging and siRNA molecules for therapy in mice carrying subcutaneous tumor xenografts [109]. At 4 h post-injection, nanoparticles conjugated with the aptamer demonstrated two-fold higher tumor targeting than unconjugated nanoparticles. However, the fluorescence was cleared from the tumor by 24 h and the therapeutic efficiency was not evaluated.

4.4. Photodynamic therapy (PDT) and imaging

Photodynamic therapy (PDT) uses a photosensitizing chemical substance that produces molecular oxygen when excited by light, causing cell death. Tian et al. in 2014 attempted to perform photodynamic therapy using nanomicelles encapsulating a pH activatable fluorescent probe and a near-infrared photosensitizer, called R16FP, as a theranostic [76]. The nanomicelles were targeted by an aptamer previously selected against MDA-MB-231 human breast cancer cells. The goal was to use the fluorescent dye to detect when nanomicelles reached the lysosomes of cancer cells to determine when to carry out NIR irradiation of the tumor region to induce the PDT. Upon irradiation, R16FP mediates the generation of reactive oxygen species (ROS) and can thus cause lysosomal destruction and subsequent cell death. *In vivo* fluorescence images of subcutaneous MDA-MB-231 tumor-bearing mice were acquired at various times post-i.v. injection. The tumor/background fluorescence signal ratio gradually increased and reached a maximum 24 h after injection. Furthermore, tumor targeting was higher for nanoparticles conjugated to aptamers than those that were unconjugated or conjugated to a scrambled control sequence. PDT was evaluated by NIR

irradiation of the tumor 24 h post-injection. Treatment resulted in the inhibition of tumor growth and the tumor tissues showed noticeable necrosis. Furthermore, histological analysis of several organs from the PDT-treated mice showed no signs of injury, suggesting insignificant toxic side effects.

4.5. Photothermal therapy (PTT) and imaging

Photothermal therapy (PTT) uses electromagnetic radiation (mostly infrared wavelengths) to bring a sensitizer to an excited state, at which point it then releases vibrational energy (heat) that can kill the targeted cells. Two studies have described the use of fluorescently-labeled nanoparticles targeted by aptamers for guided PTT. In 2016, Ye et al. used Cu—Au alloy nanostructures as sensitizers addressed by the Sgc8c aptamer, which targets PTK7 [77]. This system was labeled with Cy5 for fluorescent imaging. *In vivo* fluorescence imaging revealed higher tumor targeting by the targeting nanoparticles than those conjugated with a negative control scrambled sequence 2 h after intravenous injection into CCRF-CEM tumor bearing mice. PTT was evaluated in mice that received an intratumoral injection of the nanoparticles and subsequently exposed to 980 nm irradiation for 5 min. They observed tumor necrosis and even complete disappearance of the tumor four days after PTT treatment. The second study, by Shi et al. in 2014, used Au(core)/Ag-Au(shell) nanoparticles as sensitizers [78]. These nanoparticles were conjugated to an activatable aptamer probe (AAP) with quenched fluorescence in the free state. As previously described, such probes can emit fluorescence when bound to their target. Under the guidance of this fluorescent imaging signal, PTT was performed in nude mice bearing tumor xenografts by exposing the tumor to a 980 nm laser for 5 min. The tumor gradually became necrotic and tumor growth was inhibited at the necrotic site.

Two other studies used the PTT strategy, not only to kill cancer cells but also to control delivery of the drugs to inside the tumors. The first was conducted in 2006 by Chuang et al. [79]. Doxorubicin was encapsulated, with ammonium bicarbonate and gold nanocages, into liposomes conjugated to MUC1 aptamers. Exposure of the gold nanocages to NIR light can produce localized heat and the heating of ammonium bicarbonate generates CO₂ bubbles. This can disrupt liposomes and locally liberate doxorubicin. An activatable aptamer probe was used to monitor the interaction of aptamer with its target. The signal was maximal at the tumor site 30 min post-injection and disappeared by 1 h, suggesting that the nanoparticles were rapidly internalized. Thus, mice were injected every four days with the liposome and tumors were subjected to PTT 1 h after injection. The size of the tumor decreased over time, whereas it increased in untreated mice or mice treated with free doxorubicin. Furthermore, the size of the tumor decreased less using the same theranostic system without NIR irradiation.

In 2017, Zhao et al. used the same theranostic strategy [80]. However, the drug encapsulated in the liposomes was docetaxel and the system was targeted by two aptamers. The liposomes were coated with gold nanoshells, which served as sensitizers. Inhibition of tumor growth in mice bearing S180 cell tumors was also observed relative to several control groups, including mice injected with non-targeted liposomes. Ultrasound imaging was also performed: such liposomes provided better tumor resolution and allowed longer observation than Sonovue, a commonly used ultrasound contrast agent.

4.6. Drug delivery and multimodal imaging

In 2015, Roy et al. performed one of the first trials of combination drug delivery and multimodal imaging [81]. They coupled NIR, MRI, and CT imaging with the delivery of bovine lactoferrin, an emerging anticancer drug [82]. Fe₃O₄ and bovine lactoferrin were encapsulated in alginate-enclosed, chitosan-conjugated, calcium phosphate nanocarriers. The resulting nanoparticles were targeted with locked nucleic acid (LNA) aptamers against epithelial cell adhesion molecules and

nucleolin. *In vivo* therapeutic efficiency of these nanoparticles was evaluated in subcutaneous tumor bearing mice that were orally fed the nanoparticles for 45 days. Complete regression of the tumors was observed for 70% of the mice fed the nanoparticles. Most importantly, mice injected with aptamer-targeted nanoparticles showed three-fold lower tumor recurrence after 30 days than those injected with non-targeted nanoparticles. Three imaging techniques were used to measure specific internalization of the targeted nanoparticles into the tumors. For fluorescent imaging, VivoTag 680 XL was encapsulated into the nanoparticles and the nanoparticles fed to the mice for 48 h. The fluorescence intensity of the tumor was higher for mice fed the aptamer-targeted nanoparticles than those fed the non-targeted nanoparticles. MRI and X-ray CT imaging confirmed higher tumor targeting.

5. Conclusions & perspectives

Although aptamers represent a promising class of ligands, their use as molecular imaging probes is relatively new. Nonetheless, the number of *in vivo* preclinical studies using aptamers has increased significantly in recent years (Fig. 4). To date, the reported applications of aptamers for molecular imaging and theranostics have been almost exclusively focused on cancer (Fig. 4C) and half have focused on four targets (Fig. 4D). This is partially because most aptamers are currently selected against cancer biomarkers. However, the scope of application should extend to other diseases, such as neurodegenerative and infectious diseases, as the number of aptamers identified each year increases [83,84].

A number of issues are still largely unresolved. For example, the degradation of these imaging probes *in vivo* requires further study. This information is missing from almost all published studies while it is

mandatory to better interpret the imaging results. For example, there is an increasing use of natural DNA aptamers whereas it is known that DNA degrades rapidly in plasma, which raises questions about the validity of results obtained several hours after injection. Another issue is the potential toxicity of aptamers that is almost never studied. Aptamers are often considered to have low immunogenicity and low toxicity. However oligonucleotides could potentially be recognized by the innate immune system *via* germline-encoded-pattern-recognition receptors (PRRs) like Toll-like receptors (TLRs) [85]. Accordingly, aptamers immunogenicity should be more studied before further development. Moreover, their fast excretion through renal clearance could also limit the use of aptamers. One of the solutions is to conjugate the aptamer with high molecular weight molecules that can reduce the renal filtration. For instance, the conjugation of the aptamer with polyethylene glycol (PEG) has been widely used [11]. However, such conjugation could affect the affinity of aptamers. Additionally, too few studies have compared the biodistribution of the imaging probe with that of one comprised of a random sequence of the same size and chemistry. Without this important negative control, it is impossible to determine whether the tumor targeting observed in many studies is due to the interaction of the aptamer with its target or improved passive tumor targeting by the so call “enhanced permeability effect”. Indeed, new blood vessels formed during tumor growth are usually disorganized and contain wide pores. In addition, tumors exhibit poor lymphatic drainage. Both of these phenomena can promote the diffusion and trapping of molecular imaging probes within the tumor interstitium, without the need to bind to a specific molecular target [86].

Several studies have also demonstrated that labeling can affect the biodistribution of aptamers and also affect their binding. However,

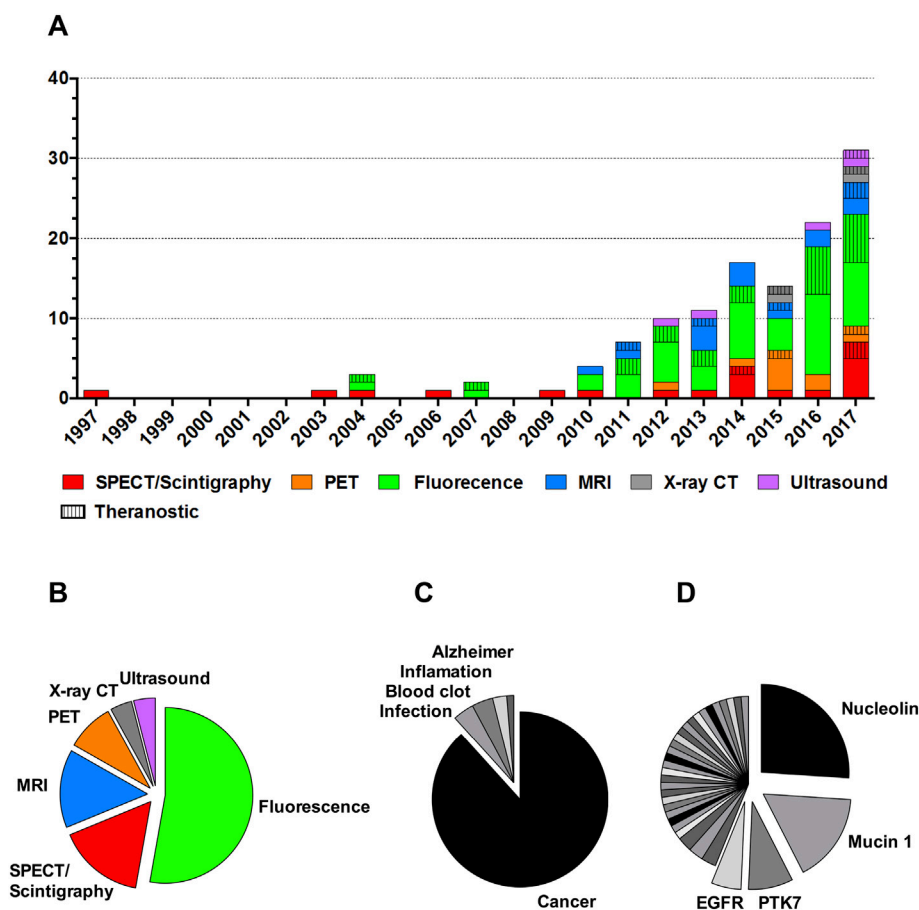


Fig. 4. *In vivo* studies evaluating the use of aptamers to design imaging probes or theranostic agents. A) Repartition of studies over time by imaging modality. B) Repartition of studies over time by imaging modality. C) Repartition of studies by disease model. D) Repartition of studies by target.

very few studies have measured the dissociation constant (Kd) of their molecular probes, although this information is crucial for comparing studies, especially those that are performed with the same aptamer, but different labeling. Finally, most studies have been conducted in nude mice bearing tumor xenografts. However, many studies have demonstrated the limitations of such models, which have little resemblance to real cancer. It would thus be very informative to test the biodistribution of aptamer-based imaging probes on other cancer models, such as transgenic mice that develop metastases.

In conclusion, the use of aptamers to develop imaging probes or theranostics agents is still in its infancy, but the successful preclinical results already achieved in a short time are impressive. Several studies have already demonstrated significant proof of concept, which may lead to further progress towards clinical trials in the future.

Acknowledgments

Our aptamer studies are supported by grants from Investissement d'Avenir ANR-11-INBS-0011 – NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences. ABM was supported by a PhD fellowship (CEA-irtélis).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249 (1990) 505–510 (New York, N.Y.).
- A.D. Ellington, J.W. Szostak, In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822.
- L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, Diversity of oligonucleotide functions, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 763–797.
- T. Fitzwater, B. Polisky, A SELEX primer, *Methods Enzymol.* 267 (1996) 275–301.
- S.E. Osborne, A.D. Ellington, Nucleic acid selection and the challenge of combinatorial chemistry, *Chem. Rev.* 97 (1997) 349–370.
- S.C. Gopinath, Methods developed for SELEX, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 171–182.
- A. Cibiel, D.M. Dupont, F. Ducongé, Methods to identify aptamers against cell surface biomarkers, *Pharmaceuticals* 4 (2011) 1216–1235.
- M.C. Mercier, M. Dontenwill, L. Choulier, Selection of nucleic acid aptamers targeting tumor cell-surface protein biomarkers, *Cancer* 9 (2017).
- N. Nguyen Quang, G. Perret, F. Ducongé, Applications of high-throughput sequencing for in vitro selection and characterization of aptamers, *Pharmaceuticals* 9 (2016) 76.
- R.R. White, B.A. Sullenger, C.P. Rusconi, Developing aptamers into therapeutics, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 929–934.
- S.J. Ni, H.Z. Yao, L.L. Wang, J. Lu, F. Jiang, A.P. Lu, G. Zhang, Chemical modifications of nucleic acid aptamers for therapeutic purposes, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017).
- C. Pestourie, B. Tavitian, F. Ducongé, Aptamers against extracellular targets for in vivo applications, *Biochimie* 87 (2005) 921–930.
- A. Cibiel, C. Pestourie, F. Ducongé, In vivo uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging, *Biochimie* 94 (2012) 1595–1606.
- P.K.R. Kumar, A.D. Ellington, Artificial evolution and natural ribozymes, *FASEB J.* 9 (1995) 1183–1195.
- R.R. Breaker, G.F. Joyce, The expanding view of RNA and DNA function, *Chem. Biol.* 21 (2014) 1059–1065.
- F. Pfeiffer, G. Mayer, Selection and biosensor application of aptamers for small molecules, *Front. Chem.* 4 (2016) 25.
- C. Forier, E. Boschetti, M. Ouhammouch, A. Cibiel, F. Ducongé, M. Nogue, M. Tellier, D. Bataille, N. Bihoreau, P. Santambien, S. Chtourou, G. Perret, DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources, *J. Chromatogr. A* 1489 (2017) 39–50.
- M.V. Berezovski, M. Lechmann, M.U. Musheev, T.W. Mak, S.N. Krylov, Aptamer-facilitated biomarker discovery (AptaBiD), *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 9137–9143.
- C. Berens, B. Suess, Riboswitch engineering – making the all-important second and third steps, *Curr. Opin. Biotechnol.* 31C (2014) 10–15.
- J. Zhou, J. Rossi, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (3) (2016) 181–202.
- S. Missailidis, A. Perkins, Update: aptamers as novel radiopharmaceuticals: their applications and future prospects in diagnosis and therapy, *Cancer Biother. Radiopharm.* 22 (2007) 453–468.
- H. Hong, S. Goel, Y. Zhang, W. Cai, Molecular imaging with nucleic acid aptamers, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 4195–4205.
- A.Z. Wang, O.C. Farokhzad, Current progress of aptamer-based molecular imaging, *J. Nucl. Med.* 55 (3) (2014) 353–356.
- C.A. Dougherty, W. Cai, H. Hong, Applications of aptamers in targeted imaging: state of the art, *Curr. Top. Med. Chem.* 15 (2015) 1138–1152.
- B. Tavitian, F. Ducongé, R. Boisgard, F. Dolle, In vivo imaging of oligonucleotide aptamers, *Methods Mol. Biol.* 535 (2009) 241–259.
- M. Gijts, A. Aerts, N. Impens, S. Baatout, A. Luxen, Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy, *Nucl. Med. Biol.* 43 (2016) 253–271.
- J. Charlton, J. Sennello, D. Smith, In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase, *Chem. Biol.* 4 (1997) 809–816.
- B.J. Hicke, A.W. Stephens, T. Gould, Y.F. Chang, C.K. Lynott, J. Heil, S. Borkowski, C.S. Hilger, G. Cook, S. Warren, P.G. Schmidt, Tumor targeting by an aptamer, *J. Nucl. Med.* 47 (2006) 668–678.
- C.D. Pieve, A.C. Perkins, S. Missailidis, Anti-MUC1 aptamers: radiolabelling with (99m)Tc and biodistribution in MCF-7 tumour-bearing mice, *Nucl. Med. Biol.* 36 (2009) 703–710.
- Z. Noaparast, S.J. Hosseinimehr, M. Piramoon, S.M. Abedi, Tumor targeting with a (99m)Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells, *J. Drug Target.* 23 (2015) 497–505.
- K. Varmira, S.J. Hosseinimehr, Z. Noaparast, S.M. Abedi, A HER2-targeted RNA aptamer molecule labeled with 99mTc for single-photon imaging in malignant tumors, *Nucl. Med. Biol.* 40 (8) (2013) 980–986.
- X. Wu, H. Liang, Y. Tan, C. Yuan, S. Li, X. Li, G. Li, Y. Shi, X. Zhang, Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo, *PLoS One* 9 (2014), e09752.
- S. Da Rocha Gomes, J. Miguel, L. Azema, S. Eimer, C. Ries, E. Dausse, H. Loiseau, M. Allard, J.J. Toulme, (99m)Tc-MAG-3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloproteinase-9, *Bioconjug. Chem.* 23 (11) (2012) 2192–2200.
- D. Kryza, F. Debordeaux, L. Azema, A. Hassan, O. Paurelle, J. Schulz, C. Savona-Baron, E. Charignon, P. Bonazza, J. Taleb, P. Fernandez, M. Janier, J.J. Toulme, Ex vivo and in vivo imaging and biodistribution of aptamers targeting the human matrix metalloproteinase-9 in melanomas, *PLoS One* 11 (2016), e0149387.
- C.M. de Sousa Lacerda, I.M. Ferreira, S.R. Dos Santos, A.L. de Barros, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, A.S. de Andrade, (1–3)-beta-D-glucan aptamers labeled with technetium-99m: biodistribution and imaging in experimental models of bacterial and fungal infection, *Nucl. Med. Biol.* 46 (2017) 19–24.
- I.M. Ferreira, C.M. de Sousa Lacerda, S.R. Dos Santos, A.L.B. de Barros, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, A.S.R. de Andrade, Detection of bacterial infection by a technetium-99m-labeled peptidoglycan aptamer, *Biomed. Pharmacother* 93 (2017) 931–938.
- S.R.D. Santos, C.M. de Sousa Lacerda, I.M. Ferreira, A.L.B. de Barros, S.O. Fernandes, V.N. Cardoso, A.S.R. de Andrade, Scintigraphic imaging of *Staphylococcus aureus* infection using 99mTc radiolabeled aptamers, *Appl. Radiat. Isot.* 128 (2017) 22–27 Including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine.
- J. Li, H. Zheng, P.J. Bates, T. Malik, X.F. Li, J.O. Trent, C.K. Ng, Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: preliminary assessment in lung cancer, *Nucl. Med. Biol.* 41 (2014) 179–185.
- J.Y. Park, T.S. Lee, I.H. Song, Y.L. Cho, J.R. Chae, M. Yun, H. Kang, J.H. Lee, J.H. Lim, W. G. Cho, W.J. Kang, Hybridization-based aptamer labeling using complementary oligonucleotide platform for PET and optical imaging, *Biomaterials* 100 (2016) 143–151.
- O. Jacobson, X. Yan, N. Gang, I.D. Weiss, Y. Ma, L.P. Szajek, B. Shen, D.O. Kiesewetter, X. Chen, PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-strand DNA aptamer, *J. Nucl. Med.* 56 (4) (2015) 616–621.
- D.A. Daniels, H. Chen, B.J. Hicke, K.M. Swiderek, L. Gold, A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 15416–15421.
- O. Jacobson, I.D. Weiss, L. Wang, Z. Wang, X. Yang, A. Dewhurst, Y. Ma, G. Zhu, G. Niu, D.O. Kiesewetter, N. Vasdev, S.H. Liang, X. Chen, 18F-labeled single-stranded DNA aptamer for PET imaging of protein tyrosine kinase-7 expression, *J. Nucl. Med.* 56 (2015) 1780–1785.
- I. Theodorou, N.N. Quang, K. Gombert, B. Theze, B. Lelandais, F. Ducongé, In vitro and in vivo imaging of fluorescent aptamers, *Methods Mol. Biol.* 1380 (2016) 135–150.
- H. Shi, Z. Tang, Y. Kim, H. Nie, Y.F. Huang, X. He, K. Deng, K. Wang, W. Tan, In vivo fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-SELEX, *Chem. Asian. J.* 5 (2010) 2209–2213.
- P. Gong, B. Shi, M. Zheng, B. Wang, P. Zhang, D. Hu, D. Gao, Z. Sheng, C. Zheng, Y. Ma, L. Cai, PEI protected aptamer molecular probes for contrast-enhanced in vivo cancer imaging, *Biomaterials* 33 (2012) 7810–7817.
- A. Cibiel, N.N. Quang, K. Gombert, B. Theze, A. Garofalakis, F. Ducongé, From ugly duckling to swan: unexpected identification from cell-SELEX of an anti-Annexin A2 aptamer targeting tumors, *PLoS One* 9 (2014), e87002.
- H. Shi, X. He, W. Cui, K. Wang, K. Deng, D. Li, F. Xu, Locked nucleic acid/DNA chimeric aptamer probe for tumor diagnosis with improved serum stability and extended imaging window in vivo, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 138–144.
- V. Calzada, M. Moreno, J. Newton, J. Gonzalez, M. Fernandez, J.P. Gambini, M. Ibarra, A. Chabalgoity, S. Deutscher, T. Quinn, P. Cabral, H. Cerecetto, Development of new PTK7-targeting aptamer-fluorescent and -radiolabelled probes for evaluation as molecular imaging agents: lymphoma and melanoma in vivo proof of concept, *Bioorg. Med. Chem.* 25 (2017) 1163–1171.
- A. Garofalakis, A. Dubois, B. Kuhnast, D.M. Dupont, I. Janssens, N. Mackiewicz, F. Dolle, B. Tavitian, F. Ducongé, In vivo validation of free-space fluorescence tomography using nuclear imaging, *Opt. Lett.* 35 (2010) 3024–3026.

- [50] J. Mi, Y. Liu, Z.N. Rabbani, Z. Yang, J.H. Urban, B.A. Sullenger, B.M. Clary, In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs, *Nat. Chem. Biol.* 6 (2009) 22–24.
- [51] H. Shi, X. He, K. Wang, X. Wu, X. Ye, Q. Guo, W. Tan, Z. Qing, X. Yang, B. Zhou, Activatable aptamer probe for contrast-enhanced in vivo cancer imaging based on cell membrane protein-triggered conformation alteration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 3900–3905.
- [52] C. Li, Y. Meng, S. Wang, M. Qian, J. Wang, W. Lu, R. Huang, Mesoporous carbon nanospheres featured fluorescent aptasensor for multiple diagnosis of cancer in vitro and in vivo, *ACS Nano* 9 (2015) 12096–12103.
- [53] C.T. Farrar, C.M. William, E. Hudry, T. Hashimoto, B.T. Hyman, RNA aptamer probes as optical imaging agents for the detection of amyloid plaques, *PLoS One* 9 (2014), e89901.
- [54] T. Simao, A. Ng, D. Fatehi, S. Corluca, A. Abulrob, M. Zourab, Development of an anti-vascular cell adhesion protein-1 aptamer for molecular imaging and inflammation detection in transgenic mouse model of Alzheimer's disease, *J. Biomed. Nanotechnol.* 11 (2015) 2264–2274.
- [55] H. Hu, A. Dai, J. Sun, X. Li, F. Gao, L. Wu, Y. Fang, H. Yang, L. An, H. Wu, S. Yang, Aptamer-conjugated Mn_{3O₄}/SiO₂ core-shell nanoprobes for targeted magnetic resonance imaging, *Nanoscale* 5 (2013) 10447–10454.
- [56] B. Kim, J. Yang, M. Hwang, J. Choi, H.O. Kim, E. Jang, J.H. Lee, S.H. Ryu, J.S. Suh, Y.M. Huh, S. Haam, Aptamer-modified magnetic nanoprobe for molecular MR imaging of VEGFR2 on angiogenic vasculature, *Nanoscale Res. Lett.* 8 (2013) 399.
- [57] E.K. Lim, B. Kim, Y. Choi, Y. Ro, E.J. Cho, J.H. Lee, S.H. Ryu, J.S. Suh, S. Haam, Y.M. Huh, Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin α 5 β 3 via magnetic resonance imaging, *J. Biomed. Mater. Res. A* 102 (2014) 49–59.
- [58] X.G. You, R. Tu, M.L. Peng, Y.J. Bai, M. Tan, H.J. Li, J. Guan, L.J. Wen, Molecular magnetic resonance probe targeting VEGF165: preparation and in vitro and in vivo evaluation, *Contrast Media Mol. Imaging* 9 (2014) 349–354.
- [59] M.A. Nakatsuka, C.V. Barback, K.R. Fitch, A.R. Farwell, S.C. Esener, R.F. Mattrey, J.N. Cha, A.P. Goodwin, In vivo ultrasound visualization of non-occlusive blood clots with thrombin-sensitive contrast agents, *Biomaterials* 34 (2013) 9559–9565.
- [60] W. Hwang Do, H.Y. Ko, J.H. Lee, H. Kang, S.H. Ryu, I.C. Song, D.S. Lee, S. Kim, A nucleolin-targeted multimodal nanoparticle imaging probe for tracking cancer cells using an aptamer, *J. Nucl. Med.* 51 (2010) 98–105.
- [61] C.H. Li, T.R. Kuo, H.J. Su, W.Y. Lai, P.C. Yang, J.S. Chen, D.Y. Wang, Y.C. Wu, C.C. Chen, Fluorescence-guided probes of aptamer-targeted gold nanoparticles with computed tomography imaging accesses for in vivo tumor resection, *Sci. Rep.* 5 (2015), 15675.
- [62] Z. Xiao, O.C. Farokhzad, Aptamer-functionalized nanoparticles for medical applications: challenges and opportunities, *ACS Nano* 6 (2012) 3670–3676.
- [63] L. Pascual, C. Cerqueira-Coutinho, A. Garcia-Fernandez, B. de Luis, E.S. Bernardes, M. S. Albernaz, S. Missailidis, R. Martinez-Manez, R. Santos-Oliveira, M. Orzaez, F. Sancenon, MUC1 aptamer-capped mesoporous silica nanoparticles for controlled drug delivery and radio-imaging applications, *Nanomedicine* 13 (2017) 2495–2505.
- [64] J. Mosafer, K. Abnous, M. Tafaghodi, A. Mokhtarzadeh, M. Ramezani, In vitro and in vivo evaluation of anti-nucleolin-targeted magnetic PLGA nanoparticles loaded with doxorubicin as a theranostic agent for enhanced targeted cancer imaging and therapy, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut. V* (113) (2017) 60–74.
- [65] J. Mosafer, M. Teymouri, K. Abnous, M. Tafaghodi, M. Ramezani, Study and evaluation of nucleolin-targeted delivery of magnetic PLGA-PEG nanospheres loaded with doxorubicin to C6 glioma cells compared with low nucleolin-expressing L929 cells, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 72 (2017) 123–133.
- [66] R. Savla, O. Taratula, O. Garbuzenko, T. Minko, Tumor targeted quantum dot-mucin 1 aptamer-doxorubicin conjugate for imaging and treatment of cancer, *J. Control. Release* 153 (2011) 16–22.
- [67] D. Chen, B. Li, S. Cai, P. Wang, S. Peng, Y. Sheng, Y. He, Y. Gu, H. Chen, Dual targeting luminescent gold nanoclusters for tumor imaging and deep tissue therapy, *Biomaterials* 100 (2016) 1–16.
- [68] M.K. Yu, D. Kim, I.H. Lee, J.S. So, Y.Y. Jeong, S. Jon, Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Small* 7 (2011) 2241–2249.
- [69] S.H. Jalalian, S.M. Taghdisi, N. Shahidi Hamedani, S.A. Kalat, P. Lavaee, M. Zandkarimi, N. Ghows, M.R. Jaafari, S. Naghibi, N.M. Danesh, M. Ramezani, K. Abnous, Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.* 50 (2013) 191–197.
- [70] Y. Lei, J. Tang, H. Shi, X. Ye, X. He, F. Xu, L. Yan, Z. Qiao, K. Wang, Nature-inspired smart DNA nanoductor for activatable in vivo cancer imaging and in situ drug release based on recognition-triggered assembly of split aptamer, *Anal. Chem.* 88 (2016) 11699–11706.
- [71] W. Tao, X. Zeng, J. Wu, X. Zhu, X. Yu, X. Zhang, J. Zhang, G. Liu, L. Mei, Polydopamine-based surface modification of novel nanoparticle-aptamer bioconjugates for in vivo breast cancer targeting and enhanced therapeutic effects, *Theranostics* 6 (2016) 470–484.
- [72] Z. Luo, Z. Yan, K. Jin, Q. Pang, T. Jiang, H. Lu, X. Liu, Z. Pang, L. Yu, X. Jiang, Precise glioblastoma targeting by AS1411 aptamer-functionalized poly (l-gamma-glutamylglutamine)-paclitaxel nanoconjugates, *J. Colloid Interface Sci.* 490 (2017) 783–796.
- [73] H. Gao, J. Qian, S. Cao, Z. Yang, Z. Pang, S. Pan, L. Fan, Z. Xi, X. Jiang, Q. Zhang, Precise glioma targeting of and penetration by aptamer and peptide dual-functioned nanoparticles, *Biomaterials* 33 (2012) 5115–5123.
- [74] H. Gao, J. Qian, Z. Yang, Z. Pang, Z. Xi, S. Cao, Y. Wang, S. Pan, S. Zhang, W. Wang, X. Jiang, Q. Zhang, Whole-cell SELEX aptamer-functionalised poly(ethyleneglycol)-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles for enhanced targeted glioblastoma therapy, *Biomaterials* 33 (2012) 6264–6272.
- [75] J.K. Kim, K.-J. Choi, M. Lee, M.-h. Jo, S. Kim, Molecular imaging of a cancer-targeting theranostics probe using a nucleolin aptamer- and microRNA-221 molecular beacon-conjugated nanoparticle, *Biomaterials* 33 (1) (2011) 207–217.
- [76] J. Tian, L. Ding, H. Ju, Y. Yang, X. Li, Z. Shen, Z. Zhu, J.S. Yu, C.J. Yang, A multifunctional nanomicelle for real-time targeted imaging and precise near-infrared cancer therapy, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 53 (2014) 9544–9549.
- [77] X. Ye, H. Shi, X. He, Y. Yu, D. He, J. Tang, Y. Lei, K. Wang, Cu-Au alloy nanostructures coated with aptamers: a simple, stable and highly effective platform for in vivo cancer theranostics, *Nanoscale* 8 (2016) 2260–2267.
- [78] H. Shi, X. Ye, X. He, K. Wang, W. Cui, D. He, D. Li, X. Jia, Au@Ag/Au nanoparticles assembled with activatable aptamer probes as smart "nano-doctors" for image-guided cancer thermotherapy, *Nanoscale* 6 (2014) 8754–8761.
- [79] E.Y. Chuang, C.C. Lin, K.J. Chen, D.H. Wan, K.J. Lin, Y.C. Ho, P.Y. Lin, H.W. Sung, A FRET-guided, NIR-responsive bubble-generating liposomal system for in vivo targeted therapy with spatially and temporally precise controlled release, *Biomaterials* 93 (2016) 48–59.
- [80] F. Zhao, J. Zhou, X. Su, Y. Wang, X. Yan, S. Jia, B. Du, A smart responsive dual aptamers-targeted bubble-generating nanosystem for cancer triplex therapy and ultrasound imaging, *Small* 13 (2017).
- [81] K. Roy, R.K. Kanwar, J.R. Kanwar, LNA aptamer based multi-modal, Fe_{3O₄}-saturated lactoferrin (Fe_{3O₄}-bLF) nanocarriers for triple positive (EpCAM, CD133, CD44) colon tumor targeting and NIR, MRI and CT imaging, *Biomaterials* 71 (2015) 84–99.
- [82] H. Tsuda, T. Kozu, G. Iinuma, Y. Ohashi, Y. Saito, D. Saito, T. Akasu, D.B. Alexander, M. Futakuchi, K. Fukumachi, J. Xu, T. Kakizoe, M. Iigo, Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial, *Biomaterials* 23 (2010) 399–409 *Int. J. Role Metal Ions Biol. Biochem. Med.*
- [83] A. Bouvier-Muller, F. Duongé, Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases, *Biochimie* 145 (2018) 73–83.
- [84] K.S. Park, Nucleic acid aptamer-based methods for diagnosis of infections, *Biosens. Bioelectron.* 102 (2018) 179–188.
- [85] M. Avci-Adali, H. Steinle, T. Michel, C. Schlensak, H.P. Wendel, Potential capacity of aptamers to trigger immune activation in human blood, *PLoS One* 8 (2013).
- [86] H. Maeda, G.Y. Bharate, J. Daruwala, Polymeric drugs for efficient tumor-targeted drug delivery based on EPR-effect, *Eur. J. Pharmaceut. Biopharmaceut. V* (71) (2009) 409–419.
- [87] H. Dougan, J.I. Weitz, A.R. Stafford, K.D. Gillespie, P. Klement, J.B. Hobbs, D.M. Lyster, Evaluation of DNA aptamers directed to thrombin as potential thrombus imaging agents, *Nucl. Med. Biol.* 30 (2003) 61–72.
- [88] M.A. Nakatsuka, R.F. Mattrey, S.C. Esener, J.N. Cha, A.P. Goodwin, Aptamer-crosslinked microbubbles: smart contrast agents for thrombin-activated ultrasound imaging, *Adv. Mater.* 24 (45) (2012) 6010–6016 (deerfield beach, Fla.).
- [89] H. Zhang, 99mTc-Mercaptoacetyl-Glu-Glu-aptamer specific for tenascin-C, *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)2004 Bethesda MD.*
- [90] K.E. Borbas, C.S. Ferreira, A. Perkins, J.I. Bruce, S. Missailidis, Design and synthesis of mono- and multimeric targeted radiopharmaceuticals based on novel cyclen ligands coupled to anti-MUC1 aptamers for the diagnostic imaging and targeted radiotherapy of cancer, *Bioconjug. Chem.* 18 (2007) 1205–1212.
- [91] C. Zhang, X. Ji, Y. Zhang, G. Zhou, X. Ke, H. Wang, P. Tinnefeld, Z. He, One-pot synthesized aptamer-functionalized CdTe:Zn²⁺ quantum dots for tumor-targeted fluorescence imaging in vitro and in vivo, *Anal. Chem.* 85 (2013) 5843–5849.
- [92] K. Varmira, S.J. Hosseinimehr, Z. Noaparast, S.M. Abedi, An improved radiolabelled RNA aptamer molecule for HER2 imaging in cancers, *J. Drug Target.* 22 (2014) 116–122.
- [93] L. Wang, O. Jacobson, D. Avdic, B.H. Rotstein, I.D. Weiss, L. Collier, X. Chen, N. Vasdev, S.H. Liang, Ortho-stabilized (18) F-Azido click agents and their application in PET imaging with single-stranded DNA aptamers, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 54 (2015) 12777–12781.
- [94] M. Yi, S. Yang, Z. Peng, C. Liu, J. Li, W. Zhong, R. Yang, W. Tan, Two-photon graphene oxide/aptamer nanosensing conjugate for in vitro or in vivo molecular probing, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3548–3554.
- [95] Z. Zeng, P. Parekh, Z. Li, Z.Z. Shi, C.H. Tung, Y. Zu, Specific and sensitive tumor imaging using biostable oligonucleotide aptamer probes, *Theranostics* 4 (2014) 945–952.
- [96] F. Ding, S. Guo, M. Xie, W. Luo, C. Yuan, W. Huang, Y. Zhou, X.L. Zhang, X. Zhou, Diagnostic applications of gastric carcinoma cell aptamers in vitro and in vivo, *Talanta* 134 (2015) 30–36.
- [97] J. Tang, N. Huang, X. Zhang, T. Zhou, Y. Tan, J. Pi, L. Pi, S. Cheng, H. Zheng, Y. Cheng, Aptamer-conjugated PEGylated quantum dots targeting epidermal growth factor receptor variant III for fluorescence imaging of glioma, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 3899–3911.
- [98] L. Tang, X. Yang, L.W. Dobrucki, I. Chaudhury, Q. Yin, C. Yao, S. Lezmi, W.G. Helderich, T.M. Fan, J. Cheng, Aptamer-functionalized, ultra-small, monodisperse silica nanoconjugates for targeted dual-modal imaging of lymph nodes with metastatic tumors, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 51 (2012) 12721–12726.
- [99] X. Fan, Y. Guo, L. Wang, X. Xiong, L. Zhu, K. Fang, Diagnosis of prostate cancer using anti-PSMA aptamer A10–3.2-oriented lipid nanobubbles, *Int. J. Nanomed.* 11 (2016) 3939–3950.
- [100] Z. Wei, Y. Wu, Y. Zhao, L. Mi, J. Wang, J. Wang, J. Zhao, L. Wang, A. Liu, Y. Li, W. Wei, Y. Zhang, S. Liu, Multifunctional nanoprobe for cancer cell targeting and simultaneous fluorescence/magnetic resonance imaging, *Anal. Chim. Acta* 938 (2016) 156–164.

- [101] H. Zhu, L. Zhang, Y. Liu, Y. Zhou, K. Wang, X. Xie, L. Song, D. Wang, C. Han, Q. Chen, Aptamer-PEG-modified Fe₃O₄@Mn as a novel T1- and T2- dual-model MRI contrast agent targeting hypoxia-induced cancer stem cells, *Sci. Rep.* 6 (2016), 39245.
- [102] C.H. Liu, J. Ren, C.M. Liu, P.K. Liu, Intracellular gene transcription factor protein-guided MRI by DNA aptamers in vivo, *FASEB J.* 28 (2014) 464–473.
- [103] L. Shan, Indotricarbocyanine-loaded AS1411 DNA aptamer- and TGN peptide-modified poly(ethylene glycol)-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles, *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*, 2004 Bethesda MD.
- [104] F. Santos do Carmo, E. Ricci-Junior, C. Cerqueira-Coutinho, M.S. Albernaz, E.S. Bernardes, S. Missailidis, R. Santos-Oliveira, Anti-MUC1 nano-aptamers for triple-negative breast cancer imaging by single-photon emission computed tomography in induced animals: initial considerations, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 53–60.
- [105] C. Li, M. Qian, S. Wang, H. Jiang, Y. Du, J. Wang, W. Lu, N. Murthy, R. Huang, Aptavalve-gated mesoporous carbon nanospheres image cellular mucin and provide on-demand targeted drug delivery, *Theranostics* 7 (2017) 3319–3325.
- [106] J. Gao, C. Wu, D. Deng, P. Wu, C. Cai, Direct synthesis of water-soluble aptamer-ag2 s quantum dots at ambient temperature for specific imaging and photothermal therapy of cancer, *Adv. Healthcare Mate.* 5 (2016) 2437–2449.
- [107] G. Zhu, J. Zheng, E. Song, M. Donovan, K. Zhang, C. Liu, W. Tan, Self-assembled, aptamer-tethered DNA nanotrains for targeted transport of molecular drugs in cancer theranostics, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 7998–8003.
- [108] M.P. Melancon, M. Zhou, R. Zhang, C. Xiong, P. Allen, X. Wen, Q. Huang, M. Wallace, J.N. Myers, R.J. Stafford, D. Liang, A.D. Ellington, C. Li, Selective uptake and imaging of aptamer- and antibody-conjugated hollow nanospheres targeted to epidermal growth factor receptors overexpressed in head and neck cancer, *ACS Nano* 8 (2014) 4530–4538.
- [109] M.W. Kim, H.Y. Jeong, S.J. Kang, M.J. Choi, Y.M. You, C.S. Im, T.S. Lee, I.H. Song, C.G. Lee, K.J. Rhee, Y.K. Lee, Y.S. Park, Cancer-targeted nucleic acid delivery and quantum dot imaging using egf receptor aptamer-conjugated lipid nanoparticles, *Sci. Rep.* 7 (2017) 9474.
- [110] D. Zhang, A. Zheng, J. Li, M. Wu, L. Wu, Z. Wei, N. Liao, X. Zhang, Z. Cai, H. Yang, G. Liu, X. Liu, J. Liu, Smart Cu(II)-aptamer complexes based gold nanoplatfor for tumor micro-environment triggered programmable intracellular prodrug release, photodynamic treatment and aggregation induced photothermal therapy of hepatocellular carcinoma, *Theranostics* 7 (2017) 164–179.

Annexe B



Review

Nucleic acid aptamers for neurodegenerative diseases

Alix Bouvier-Müller ^{a, b, c}, Frédéric Ducongé ^{a, b, c, *}^a CEA, Fundamental Research Division (DRF), Institute of Biology François Jacob (Jacob), Molecular Imaging Research Center, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France^b Neurodegenerative Diseases Laboratory, CNRS CEA UMR 9199, Fontenay-aux-Roses, France^c Paris-Saclay University, Paris-Sud University, Fontenay-aux-Roses, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 September 2017

Accepted 31 October 2017

Available online 20 November 2017

Keywords:

Aptamers

Neurodegenerative disease

Alzheimer

Parkinson

Prion

Tauopathies

ABSTRACT

The increased incidence of neurodegenerative diseases represents a huge challenge for societies. These diseases are characterized by neuronal death and include several different pathologies, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, Huntington's disease and transmissible spongiform encephalopathies. Most of these pathologies are often associated with the aggregation of misfolded proteins, such as amyloid- β , tau, α -synuclein, huntingtin and prion proteins. However, the precise mechanisms that lead to neuronal dysfunction and death in these diseases remain poorly understood. Nucleic acid aptamers represent a new class of ligands that could be useful to better understand these diseases and develop better diagnosis and therapy. In this review, several of these aptamers are presented as well as their applications for neurodegenerative diseases.

© 2017 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	74
2. Aptamers for prionopathies	74
2.1. Aptamers against murine prion proteins	75
2.2. Aptamers against bovine prion proteins	76
2.3. Aptamers against ovine prion proteins	76
2.4. Aptamers against human prion proteins	76
3. Aptamers for tauopathies	76
4. Aptamers for Alzheimer's disease	77
4.1. Aptamers against amyloid- β	77
4.2. Aptamers against the BACE1 enzyme	78
4.3. Use of aptamers to identified new biomarkers of AD	78
5. Aptamers for Parkinson's disease	78
5.1. Aptamers against α -synuclein	78
5.2. Aptamers against dopamine	78
6. Aptamers for Huntington's disease	79
7. Aptamers for multiple sclerosis	79
8. Aptamers for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration	80
9. Conclusions and perspectives	80
Conflicts of interest	80
Acknowledgements	80
References	80

* Corresponding author. CEA, Fundamental Research Division (DRF), Institute of Biology François Jacob (Jacob), Molecular Imaging Research Center, 18 Route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

E-mail address: frederic.duconge@cea.fr (F. Ducongé).

Abbreviations

AD	Alzheimer's disease
A- β	Amyloid- β
A- β_{40}	Amyloid- $\beta_{(1-40)}$
ALS	Amyotrophic Lateral Sclerosis
APP	Amyloid precursor protein
BACE1	β -secretase-1 enzyme
BBB	Blood Brain Barrier
CNS	Central Nervous System
DA	Dopamine
FTD	Frontotemporal dementia
FTLD	Frontotemporal lobar degeneration
HD	Huntington disease
MS	Multiple sclerosis
NDS	Neurodegenerative diseases
PD	Parkinson disease
PrP ^C	Normal cellular prion protein
PrP ^{Sc}	Abnormal isoforms of prion protein
TSEs	Transmissible Spongiform Encephalopathies

1. Introduction

Since 1990, molecular evolution processes have been developed to isolate nucleic acid-based ligands. These ligands are usually named “aptamers” [1], from the Latin *aptus* meaning to fit, and the method to identify them is often known as “SELEX” for Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment [2]. The SELEX has been extensively reviewed elsewhere [3–8]. Basically, a starting library of oligonucleotide sequences that contains a region of random base composition is synthesized. Sequences can be in natural DNA or RNA chemistry or in modified nucleic acids that can be incorporated by polymerases [9]. These modifications can be used to increase their resistance to nucleases (for instance 2'Fluoro, 2'Amino or 2'O-methyl) or to provide them with new binding capabilities (for instance providing hydrophobic groups). Then, the library is incubated with a target and the sequences that can bind to the target are extracted from the others before being amplified by PCR (or RT-PCR and *in vitro* transcription for RNA library). The repetition of incubation, partition and amplification steps leads to a Darwinian evolution of the library. The aptamer sequences with high affinity for the target are predominantly amplified, whereas the frequency of the others decreases in the library. Consequently, after several rounds of *in vitro* selection (usually approximately 4–15), aptamers can be identified by sequencing a sample of the library. Currently, it is even possible to use high-throughput sequencing to better analyse the enrichment of sequences during SELEX [10]. Nevertheless, it is well known that sequences that do not bind to the target could also be amplified by SELEX, for instance, sequences that are highly potent to be amplified by polymerases or that bind to the selection support. Therefore, sequences must be individually tested for binding in order to identify aptamers [11].

Aptamers can be selected against a wide variety of targets from small compounds (for instance vitamins, amino acids, or antibiotics) to macromolecules (nucleic acids structures, peptides or proteins). Usually, aptamers can bind to their targets with a dissociation constant K_d in the nM to pM range, but for small molecules their affinity is often lower with K_d in the μ M range. Currently, several aptamers are already enrolled in clinical trials, and one is already approved for the treatment of age-related macular degeneration [12]. In addition to therapy, aptamers can

rival antibodies for several applications including biosensors [13], purification processes [14] and diagnosis [15]. However, they present many advantages compared with antibodies. For instance, aptamers are less expensive and much more stable in long term storage, they seem to lack immunogenicity, and they can be chemically synthesized and easily conjugated, which make them ideal addressing moieties [16,17].

The use of aptamers can open new perspectives for neurodegenerative diseases (NDS). NDS include a wide range of pathologies and are very different in their causes and symptoms, which have in common the phenomenon of neuronal death. Some NDS are age-related, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease or tauopathies. Other diseases have genetic causes, such as the Huntington's disease or other causes such as multiple sclerosis or transmissible spongiform encephalopathy.

Some NDS are characterized by the progressive apparition and spreading of aggregated misfolded proteins in the brain, which is the case for Alzheimer's disease, Parkinson's disease, tauopathies, Huntington's disease and transmissible spongiform encephalopathy. The protein aggregation process involves misfolded proteins that become prone to self-association into small aggregates, which are sometimes called oligomers. Then, these aggregates can recruit additional monomers and extend through fibrillar structures. The accumulation of fibrils can form aggregation bodies of greater size that could be intracellular or extracellular. The link between the aggregation phenomena and neurodegeneration is generally poorly understood. For each disease, it is not clear which species in the aggregation process (the misfolded starting monomer, the oligomer or the final aggregation body) is toxic for neurons. Furthermore, the aggregation of one protein is not always specific to one disease and the aggregation of one protein could be found in different NDS. Accordingly, different pathologies associated with the aggregation of the same protein could be regrouped. For instance, different diseases associated with the aggregation of the prion protein could be regrouped as “prionopathies” [18], those associated with tau protein could be regrouped as “tauopathies” [19] and those associated with the aggregation of α -synuclein could be regrouped as “synucleinopathies” [20].

Aptamers selected for neurodegenerative diseases can have different applications [21,22]. Aptamers could be used for basic research to better understand the development of these diseases. However, they could also be used to develop new kinds of diagnosis or therapy. This review aims to provide an update on the literature in this field.

2. Aptamers for prionopathies

Several aptamers have been developed for “prionopathies”, also named transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases [23]. These NDS could affect animals (such as bovine spongiform encephalopathy or “mad cow”) and humans (as Creutzfeldt–Jakob disease or kuru disease). The characteristic of TSEs is the conversion of a normal α -helix-rich cellular prion protein (PrP^C) into abnormal β -sheet-rich isoforms that are insoluble and resistant to protease K (PrP^{Sc}, Sc refers to “scrapie”). It has been demonstrated that the pathological three-dimensional conformation of these proteins could be transmitted not only between cells but also from one individual to another. This discovery allowed Stanley Prusiner to receive a Nobel Prize in 1997 because he showed that certain proteins could be infectious agents in the same way as viruses, bacteria and parasites. The means by which prions damage the host remains unclear, but some experiments have suggested a role for the PrP^{Sc} in neuronal dysfunction and death [24]. Aptamers have been selected against different prion proteins to study the pathology or set up sensors able to detect the protein

from different species and different conformations (Table 1).

2.1. Aptamers against murine prion proteins

Weiss et al. selected the first aptamers against prion proteins in 1997 [25]. They selected several RNA aptamers (Apt1, -2 and -3) against a recombinant Syrian golden hamster prion protein rPrP₂₃₋₂₃₁ (rPrP^C) fused to glutathione S-transferase (GST). These aptamers form a G-quartet structure that can interact with the N-terminal amino acids 23 to 52. Furthermore, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) have demonstrated that the aptamers can bind specifically to the prion protein in brain homogenates from wild-type mice, hamsters (Syrian golden), and cattle. In contrast, no interaction was detected using brain homogenates from both PrP knockout mice and brain homogenates isolated from scrapie-infected mice.

In 2005, another RNA aptamer, named “60-3”, was selected against the mouse PrP₂₃₋₂₃₀ (mPrP₂₃₋₂₃₀). This RNA aptamer

demonstrated a high affinity for the protein with a K_d of 5.6 ± 1.5 nM. The 2'-fluoro pyrimidine-modified RNA version of this aptamer, named “60-3F”, provided a slightly lower affinity with a K_d of 22 ± 4 nM. This aptamer (60-3F) was able to detect PrP^C in dot blot or Northwestern blotting assays [26].

Another SELEX was performed in DNA chemistry against the mouse PrP₂₃₋₂₃₀ in its α -form (i.e., PrP^C). The best aptamer identified, named “4-9”, binds with a similar affinity to both PrP^C and PrP^{Sc} with a K_d approximately 100 nM [27]. Then, the same team set up a detection system based on the conformational change of this aptamer upon binding. This system had a detection limit of 125 nM for the full-length PrP [28].

DNA aptamers were also obtained against a His-tagged truncated murine prion protein (H-MoPrP₉₀₋₂₃₁) immobilized on magnetic beads. Several of these DNA aptamers were able to bind the protein with a K_d between 18 and 79 nM [29]. In 2012, one of these aptamers, named 4C-6, was used to set up a label-free aptasensor using Sybr green. The fluorescence signal provided a linear

Table 1
Aptamers for prion proteins. In the column “Target”, the target written in bold is the target used to perform the SELEX.

Aptamer	Target	Chemistry	K_d	Reference	Use
<i>Aptamers against murine prion protein</i>					
Ap1 Ap2 Ap3	Recombinant Syrian golden hamster rPrP₂₃₋₂₃₁ (rPrP^C)	RNA	ND	[25]	Detection: [25]
60-3	mPrP₂₃₋₂₃₀	RNA 2'-F-Py RNA	5.6 ± 1.5 nM 22 ± 4 nM	[26]	
4-9	α-PrP (i.e., PrP^C) β-PrP (i.e., PrP^{Sc})	DNA	0.113 μ M 0.1 μ M	[27]	Detection: [28]
4C3 4C5 4C6 4C8 4C10 4C17 4C20 4C26	His-tagged murine prion (H-MoPrP₉₀₋₂₃₁)	DNA	48 nM 30 nM 20 nM 56 nM 33 nM 19 nM 79 nM 18 nM	[29]	Detection: [30] Detection - Sandwich: [48–52]
<i>Aptamers against bovine prion protein</i>					
SAF-93	Bovine PrP^{Sc} fibrils α -bPrP ₂₃₋₂₃₀ β -bPrP ₂₃₋₂₃₀ β -bPrP ₉₀₋₂₃₀ α -bPrP ₉₀₋₂₃₀	2'-F-Py RNA	23.4 ± 1.2 nM 82.9 \pm 6.6 nM 16.0 \pm 1.8 nM 341 \pm 35.4 nM 32.2 \pm 3.7 nM	[31]	Therapy: [31]
SAF-93 _(1-34,35bioU,36-60)	β -bPrP	2'-F-Py RNA	8.4 ± 1.4 nM	Rational engineering from [31]; [32]	
apt#1	bPrP₂₅₋₂₄₁ β -bPrP ₂₅₋₂₄₁	RNA	31 ± 6 nM 220 \pm 70 nM	[33]	Detection: [33]
r(GGA) ₄₋₁₇	bPrP	RNA	9.4 ± 4.0 nM	Rational engineering from [33]; [33]	
R12 (also named r(GGA) ₄)	bPrP- β bPrP bPrP- β	RNA	78 ± 30 nM 8.5 ± 3.4 nM 280 ± 80 nM	Rational engineering from [33]; [34]	Therapy: [35]
<i>Aptamers against ovine prion protein</i>					
RM312	Ovine recombinant PrP	RNA	20 nM	[36]	
<i>Aptamers against human prion protein</i>					
DP7	Human PrP₉₀₋₁₂₉ Human PrP Mouse PrP Syrian hamster PrP Mouse-hamster-mouse chimaera 3F4	2'-F-Py RNA	1.7 μ M 0.1 μ M 0.19 μ M 0.17 μ M	[37]	Therapy: [37]
SSAP1-2 SSAP1-4 SSAP1-6 SSAP1-9 SSAP1-13 SSAP3-10 SSAP310A SSAP3-24 SSAP3-59	Recombinant human prion (PrP^C₂₃₋₂₃₁)	DNA	ND	[38]	Detection: [39–45] Imaging: [46,47] Detection - Sandwich: [48–52]

relationship with the prion protein concentration ranging from 13 to 156 nM [30].

2.2. Aptamers against bovine prion proteins

Rhie et al. selected a 2'-fluoro pyrimidine-modified RNA aptamer, named SAF-93, which had a tenfold higher affinity for the bovine PrP^{Sc} than for PrP^C [31]. This study was performed using several recombinant bovine PrPs of various lengths that were purified from bacteria. These proteins were refolded into an α -helical conformation or β -oligomer form. SAF-93 binds β -PrP₂₃₋₂₃₀ (i.e., PrP^{Sc}) with a K_d of 16.0 ± 1.8 nM and α -PrP₂₃₋₂₃₀ (i.e., PrP^C) with a K_d of 82.9 ± 6.6 nM. The affinity of SAF-93 was reduced with PrP₉₀₋₂₃₀ suggesting that there were two binding sites on the protein for this aptamer. Remarkably, this aptamer was able to inhibit the conformational switch of the protein in a cell-free conversion assay. The same group further identified the minimum-binding site of the aptamer [32]. Accordingly, the size of the aptamer was halved and its affinity improved with a K_d below 10 nM for the bovine β -PrP₂₃₋₂₃₀. Slot blot studies with a biotinylated version of this aptamer showed that the new aptamer detected the β -form more efficiently than the α -form.

Other RNA aptamers were selected against a longer version of the bovine prion protein (bPrP₂₅₋₂₄₁) by Murakami et al. [33]. The best binder, named apt#1, may form a G-quartet structure and binds to bPrP₂₅₋₂₄₁ with a K_d of 31 ± 6 nM. In contrast, its affinity for the β -form of the protein (β -bPrP₂₅₋₂₄₁) was 220 ± 70 nM. After a 5'-biotinylation, this aptamer was used to specifically detect PrP^C in bovine brain homogenate by a Northwestern blotting assay. Using several mutants of the protein, the authors showed that the aptamer binds within 25–131 of the bPrP sequence. Surprisingly, when the size of the aptamer was reduced to a 17-nt sequence (r(GGA)₄17), it increased its affinity for both form of the protein with a K_d of 9.4 ± 4.0 nM and 78 ± 30 nM for bPrP and β -bPrP, respectively. The same group further studied another minimized version of this aptamer named R12. It contains a 12-nt tandem repeat r(GGA)₄ that was able to interact with bPrP with a K_d of 8.5 ± 3.4 nM and with β -bPrP with a K_d of 280 ± 80 nM. Structural studies revealed that R12 forms an intramolecular parallel G quadruplex containing a G:G:G:G tetrad and G(:A):G:G(:A):G hexad planes [34]. The same group that completed this structural analysis demonstrated that R12 forms a dimer where each monomer simultaneously binds to two portions of PrP^C. They also demonstrated that mouse neuronal cells persistently infected with the transmissible spongiform encephalopathy agent had reduced level of PrP^{Sc} when cells are incubated with 10 μ M of R12 for 72 h [35].

2.3. Aptamers against ovine prion proteins

In 2006, an RNA aptamer, named RM312, was selected against the ovine recombinant PrP₂₃₋₂₃₄. It can bind to the protein with a K_d of 20 nM [36].

2.4. Aptamers against human prion proteins

In 2002, Proske et al. isolated a nuclease resistant 2'-fluoro pyrimidine-modified RNA aptamer, named DP7, which binds a domain of the human prion protein (PrP₉₀₋₁₂₉) that is thought to be important for the conversion of PrP^C into PrP^{Sc} [37]. Filter-binding studies demonstrated that DP7 binds to the full-length human, mouse, and hamster prion proteins with K_d s around the hundred nM. Furthermore, the incubation of 700 nM of DP7 with prion-infected neuroblastoma cells for 16 h reduced the relative proportion of de novo synthesized PK-resistant PrP^{Sc}.

Several DNA aptamers were also selected against a recombinant

human cellular prion protein PrP^C₂₃₋₂₃₁ by Takemura et al. [38]. EMSAs and dot blot analyses demonstrated that height aptamers could bind to the protein. Aptamers were also able to detect the denatured protein in Southwestern blots. These aptamers bound to mammalian PrPs isolated by immuno-precipitation from brain of healthy sheep, calf, piglet, and deer, suggesting they are not species-specific. Most importantly, these aptamers were expected to have no affinity for the PrP^{Sc} since they did not bound to the proteinase K-digested fragment of the prion protein isolated from scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. Several of these DNA aptamers were further used in many studies in order to develop detection tests using fluorescence [39–41], chemiluminescence [42], surface plasmon resonance (SPR) [43] or electrochemistry [44,45]. Some of them were also used as tools for imaging to study the different phases of PrP^C endocytosis in cells [46,47]. Finally, it was possible to improve the specificity of the detection using a sandwich strategy combining a DNA aptamer identified by Takemura et al. (SSAP3-10) with a 4C-6 DNA aptamer previously identified by Bibby et al. [48–52]. Those aptamers recognized two different epitopes of the prion protein; SSAP3-10 binds with the 23–90 epitope and 4C-6 with the 90–231 epitope. Furthermore, the binding of these two aptamers could be affected by the guanidinium denaturation. Indeed, unlike PrP^C, PrP^{Sc} is not denatured by guanidinium. Accordingly, PrP^C was not able to bind the aptamers after denaturation. This property was used to discriminate PrP^{Sc} and PrP^C [48,49].

3. Aptamers for tauopathies

Several neurodegenerative diseases are associated with the aggregation of the tau (tubulin-associated unit) protein from monomers (without defined secondary structures) into oligomers enriched in β -sheets [19]. These diseases include Alzheimer's disease (AD), frontotemporal lobar degeneration (FTLD), Logopenic Aphasia, Corticobasal Degeneration or Progressive Supranuclear Palsy. All these diseases are now associated with the term tauopathies although they have distinct histopathological and ultrastructure characteristics [53]. Different studies have been performed to select aptamers against the tau protein or other proteins that could have an effect on tauopathies (Table 2).

Tau is known to have good affinity for DNA, and particularly double-stranded DNA [54,55]. In 2005, Krylova et al. investigated whether it could also bind to single-stranded DNA (ssDNA) [56]. They tested the binding of 3 different short ssDNA sequences that were randomly chosen. The binding capacities of those sequences were assessed by non-equilibrium capillary electrophoresis. Unexpectedly, one of these oligonucleotides, called "ssDNA₁", bound to tau₃₈₁ with an affinity that is more than one hundred times better than the other two sequences. Although this sequence was not found by an *in vitro* selection process, it was considered as an aptamer due to its affinity for the protein (K_d of 190 ± 10 nM). Furthermore, this sequence was further used to develop an aptamer/antibody sandwich assay that is able to detect femtomolar concentrations of tau protein in human plasma [57]. An RNA aptamer, named Tau-1, was also selected against the human protein tau₄₀, which is the longest isoform of human tau (2N4R isoform) [58]. The K_d of this aptamer was not measured, but it was able to inhibit the *in vitro* oligomerisation of tau. Furthermore, it also inhibited the oligomerisation of tau in a HEK293 cell line expressing the human tau₄₀.

RNA aptamers selected against USP₁₄, a component of the ubiquitin-proteasome system (UPS), could also be interesting for tauopathies [59]. Recent findings have suggested that USP₁₄ could be a therapeutic target for diseases where toxic proteins accumulate [60]. Lee et al. demonstrated that 3 aptamers (USP₁₄₋₁, USP₁₄₋₂,

Table 2
Aptamers for tauopathies.

Aptamer	Target	Chemistry	K _d	Reference	Use
ssDNA1	tau ₃₈₁	DNA	190 ± 10 nM	No SELEX [56]	Detection: [57]
Tau 1	Human tau ₄₀ oligomers	RNA	ND	[58]	Inhibitor: [58]
USP ₁₄₋₁ USP ₁₄₋₂ USP ₁₄₋₃	Ubiquitin-Proteasome System (UPS)	RNA	ND	[59]	Facilitate Tau degradation: [59]

and USP₁₄₋₃) selected against this protein were able to specifically inhibit USP₁₄ deubiquitinating activity and, as a consequence, facilitated the degradation of many UPS substrate including the protein tau.

4. Aptamers for Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is the one of the major age-related neurodegenerative disease. AD is characterized by amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the brain that contain the aggregated proteins amyloid- β (A- β) peptides and hyperphosphorylated tau, respectively [61]. The misfolding of these proteins is suspected to be toxic for neurons by disrupting the normal function of cell, inducing oxidative stress and causing inflammation, which finally lead to cellular death and neurodegeneration. However, it is important to mention that there is still an important debate to clarify which forms (misfolded monomer, oligomer or final aggregation body) is more toxic [62,63]. While aptamers previously described for tauopathies could be useful for AD, other aptamers have been developed for this disease (Table 3).

4.1. Aptamers against amyloid- β

As the aggregation of the peptide A- β is the hallmark of AD, many studies have been done to build aptamers against this peptide [64]. Those aptamers could be used as tools to study the aggregation phenomena but also to develop new therapeutic agents.

In 2002, Ylera et al. selected RNA aptamers against amyloid- β (1-40) (A- β ₄₀) [65]. The dissociation constants of these aptamers were calculated by analytical affinity chromatography. K_d were in the range of 29–48 nM, and the aptamer with the best affinity was named β -55. Additional studies showed that this aptamer could bind to amyloid fibrils but not to A- β ₄₀ monomer. This aptamer was further fluorescently labelled by Farrar et al. and used as optical

imaging agents [66]. Its ability to stain amyloid plaques was demonstrated *ex vivo* in frozen-section of brain tissue from AD subjects. While plaques were clearly visible with the β -55 aptamer, only a few very faint positive plaques were observed with a control sequence. Furthermore, this aptamer was further use to visualize plaque in APP/PS1 transgenic mice using *in vivo* 2-photon imaging.

RNA aptamers were also selected by Rahimi et al. against covalently stabilized A- β ₄₀ trimers [67]. This study used different selection strategies in order to identify aptamers that can bind oligomers but not A- β ₄₀ fibrils. The binding of 33 sequences was evaluated, but none were able to bind the trimer. However, all of the sequences were able to bind to A- β ₄₀ fibrils. Further studies were performed using two sequences (KM33 and KM41) that present a better binding to fibrils and a naive library. These sequences were identified to bind other amyloid fibrils including calcitonin, islet amyloid poly-peptide (IAPP), insulin, lysozyme, and prion_{106–126}. Therefore, it suggests that fibrils can bind non specifically to RNA sequences with high affinity. Accordingly, these RNAs were able to detect fibril formation with similar sensitivity than thioflavin T which is a dye commonly used to study fibril formation because it displays enhanced fluorescence upon binding to β -sheet-rich structures.

Takahashi et al. selected two other RNA aptamers, named N2 and E2, against A- β ₄₀ conjugated with a colloidal gold nanoparticle (A β -AuNP) [68]. These two aptamers, named N2 and E2, had low affinity for the monomeric form of A- β ₄₀ with K_d of 21.6 and 10.9 μ M, respectively. However, an ELISA revealed that these aptamers can inhibit *in vitro* the aggregation A β at 25 μ M. Transmission electron micrographs suggested that the aptamers can stop the fibrillization of A- β ₁₋₄₀ at the stage of small aggregates. The N2 aptamer was further used to build a luminescent aptamer-ruthenium complex system for the detection of A- β [69]. The luminescence intensity of the complex was reduced due to the strong interaction of aptamer with A- β monomer/small oligomers.

Table 3
Aptamers for Alzheimer's disease.

Aptamer	Target	Chemistry	K _d	Reference	Use
β 55	A- β ₄₀	RNA	29 nM	[65]	Detection: [66]
KM33 KM41	A- β ₄₀ oligomers (trimers)	RNA	ND	[67]	
N2	A- β ₄₀	RNA	21.6 μ M	[68]	Inhibitor: [68,69]
E2			10.9 μ M		Detection: [69]
T-SO508	A- β ₄₀ oligomers	DNA	25 nM	[70]	Detection: [71–73]
TH14 S10 H15 S15 S24	BACE1-CT	RNA	280 nM 360 nM 420 nM 770 nM 1100 nM	[76]	Inhibitor: [76]
A1 A4	BACE1	DNA	68.5 ± 8.1 nM 15.3 ± 2.0 nM	[77]	Inhibitor: [77]

Furthermore, atomic force microscopy revealed that the complex can also inhibit the formation of fibrils.

Finally, Tsukakoshi et al. unexpectedly identified a DNA aptamer, named T-SO508, against the A- β_{40} peptide [70]. After a SELEX against α -synuclein oligomers, T-SO508 was found to bind to α -synuclein oligomers with a K_d of 68 nM. However, it can also bind A- β_{40} oligomers with an even better affinity (K_d of 25 nM), suggesting that both oligomers share a common structure. Following this study, T-SO508 was used by Zhu et al. to set up a label-free molecular beacon (MB) system integrated with an enzyme-free amplification strategy [71]. This system was able to quantify A- β oligomers and to monitor the A- β aggregation process *in vitro*. This aptamer was also used to develop two other assays that were able to quantify A- β oligomers in artificial cerebrospinal fluid [72,73].

4.2. Aptamers against the BACE1 enzyme

BACE1, also named β -secretase, is an enzyme responsible for the A- β peptides generation by cleavage of amyloid precursor protein (APP) [74]. The inhibition of BACE1 seems to be a promising method to reduce A- β generation, and so is a potential method for Alzheimer's disease therapy [75].

Several RNA aptamers have been selected against the intracellular domain of BACE1 (B1-CT) [76]. After 12-rounds of SELEX, several aptamers were identified to bind B1-CT with K_d s between 300 and 1100 nM. One of these aptamers (named S10) was able to inhibit the fixation of B1-CT to the copper chaperone for superoxide dismutase-1 (CSS). It has been demonstrated that CSS can bind to the intracellular part of BACE1 and may impact the APP processing by transferring copper. In contrast, the aptamer did not interfere with the fixation of two other partners of BACE1: the ADP ribosylation factor-binding (GGA1) protein and with the casein kinase-dependent phosphorylation. While the therapeutic efficiency of this aptamer was not evaluated, it could be useful for studying the role of the BACE1-CSS interaction in AD.

DNA aptamers were also selected against the extracellular domain of BACE-1 [77]. After 7 rounds of selection, two aptamers (A1 and A4) were identified to bind to BACE1 with up to twenty fold better affinity than the RNA aptamers previously identified against the intracellular domain of BACE1. The aptamer A1 binds to the protein with a K_d approximately 15 nM, and it was able to inhibit BACE1 activity *in vitro*. Moreover, it was able to decrease the level of A- β_{40} and A- β_{42} secreted by M17 human neuroblastoma cells stably expressing Swedish mutant APP.

4.3. Use of aptamers to identified new biomarkers of AD

The company SomaLogic Inc. has used aptamers to develop a multiplex assay (named SOMAscan[®]) to measure protein expression profiles. This assay uses chemically modified aptamers and can quantify up to 1300 proteins. This technology has been used to study which proteins showed age-dependent changes in the CSF of 90 cognitively normal adults of different ages. It was found that several proteins involved in inflammation or responses to injury in the central nervous system increase with the age [78]. Then, SOMAscan[®] was used to study the expression of 94 potential biomarker candidates of AD in the plasma of 677 subjects. These biomarkers were chosen based on the literature. Nine of these protein candidates were found to be associated with AD-related phenotypes, suggesting that they could be used to develop a blood test for the disease [15].

One of these 9 biomarkers was the α -1 antitrypsin (AAT), which is a protease inhibitor. Kim et al. used an aptamer against this protein to set up a biosensor based on surface plasmon resonance [79]. This system was able to measure the concentration of AAT in serum.

5. Aptamers for Parkinson's disease

Parkinson's disease (PD) is the 2nd most common neurodegenerative disease after AD. PD is characterized by symptoms of motor impairment: postural instability, resting tremor, bradykinesia and rigidity [80]. PD is neuropathologically marked by a decrease in dopamine due to the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. PD is also characterized by the presence of cytoplasmic Lewy Body in neurons that contains aggregated α -synuclein [81]. α -synuclein aggregation in Lewy bodies has also been found in other neurodegenerative diseases such as dementia with Lewy bodies, multiple system atrophy and certain tauopathies [53]. Several aptamers have been used for this pathology (Table 4).

5.1. Aptamers against α -synuclein

Tsukakoshi et al. selected several DNA aptamers against α -synuclein. The first selection of aptamers was performed against the monomeric form of the protein [82]. Dot blot assays showed that one of these aptamers, named M5-15, can bind both the monomeric and oligomeric form of α -synuclein. However, it seems to have a better affinity for the oligomeric form. M5-15 was also able to discriminate α -synuclein from A- β_{42} . Then, a selection was performed against oligomeric forms of α -synuclein [70]. Height DNA aptamers were identified to bind with a higher affinity to the oligomeric form rather than the monomeric or fibrillary form. Unexpectedly, all these aptamers also bind to A- β_{40} oligomers, as described earlier in this review. Dot blot studies revealed that one aptamer, named T-SO517, was able to detect the apparition of oligomeric species in an *in vitro* fibrillization process. This aptamer was used to set up several aptasensors in order to detect α -synuclein oligomers [83].

5.2. Aptamers against dopamine

Since PD is characterized by a degeneration of dopaminergic neurons, it induces a decrease of dopamine (DA) in the brain [84]. The monitoring of this neurotransmitter is therefore crucial for this pathology. Mannironi et al. have selected a RNA aptamer, named dopa2, against DA [85]. This aptamer binds DA with a K_d of 2.8 μ M and a 96 nucleotides long version of this aptamer, named dopa2/c.1, had an even better affinity (K_d of 1.6 ± 0.17 μ M). Further experiments demonstrated that a 57 nucleotides long version of this aptamer, named dopa1.30/c.30, can still bind DA but without providing its K_d . Surprisingly, the RNA aptamer dopa1.30/c.30 could be converted in a DNA aptamer that has a K_d of approximately 0.7 μ M [86]. Such conversion is usually unsuccessful because RNA and DNA present usually very different 3D-structures.

The dopa1.30/c.30 aptamer in RNA or DNA chemistry was used to build several detection systems (see Table 4). However, Alvarez-Martos et al. recently demonstrated that the RNA aptamer seems to be more specific [87]. Indeed, they compared both chemistries in the same biosensor. Only the RNA aptamer was able to distinguish dopamine from other structurally related components such as norepinephrine.

A particular type of aptamer named "ribonucleopeptide" (RNP) had also been selected against DA [88]. In that case the Rev Responsive Element (RRE) RNA was added at the extremity of each sequences of the starting library before being complexed with the Rev peptide. Thus, RNP aptamers could be easily converted into fluorescent sensors by modification of the N-terminal of the Rev peptide with different fluorophores. Several RNP aptamers were identified to bind dopamine with K_d between 3 and 15 μ M. Two of these aptamers, named DH05 and DHc65, were used to construct

Table 4
Aptamers for Parkinson's disease.

Aptamer	Target	Chemistry	K _d	Reference	Use
M5-15	α -synuclein oligomer	DNA	ND	[82]	
T-S0508	α -synuclein oligomer	DNA	68 nM	[70]	Detection:
T-S0517			ND		[83]
T-S0530			63 nM		
dopa2	dopamine	RNA	2.8 μ M	[85]	
dopa2/c.1	dopamine	RNA	1.6 \pm 0.17 μ M	[85]	
dopa1.30/c.30 (often mentioned as dopa2)	dopamine	RNA	ND	[85]	Detection:
dopa1.30/c.30 (often mentioned as dopa2)	dopamine	DNA	0.7 μ M	NO SELEX, RNA aptamer changed in DNA:	Detection:
DL02	dopamine	Ribonucleopeptide (RNP) complex	14.9 \pm 2.3 μ M	[86]	[113–126]
DH05			4.1 \pm 1.4 μ M	[88]	Detection:
DHc25			60 \pm 9.5 μ M		[89]
DHc58			42 \pm 6 μ M		
DHc65			3.2 \pm 0.4 μ M		

ratiometric fluorescent sensors [89].

6. Aptamers for Huntington's disease

Huntington's disease (HD) is a dominant inherited autosomal genetic disorder that results in neurological degeneration causing severe motor, cognitive and psychiatric disorders [90]. This disease is associated with mutated forms of huntingtin (Htt) that originate from an increased number of glutamine codons (CAG) in the gene. These mutations lead to the production of a misfolded protein that can aggregate [91].

It has been demonstrated that certain classes of oligodeoxynucleotides such as G-rich oligonucleotides (GROs) can inhibit the aggregation of proteins [92]. Skogen et al. tested this type of oligonucleotide measuring the aggregation of mutant Htt fragment composed the 171 amino acids of the N-terminal part of Htt with a tract of 58 glutamine residues [93]. A sequence of 20 guanines, named HDG, was able to inhibit Htt aggregation *in vitro*. Although this sequence was not found by SELEX, it could also inhibit the aggregation of Htt fused to eGFP (eGFP-Htt) in human embryonic kidney cell line and in PC12 cell line. However, this study did not investigate whether HDG could affect the expression level of the Htt mutant in these cells. Therefore, further investigations are needed to better understand how HDG can act.

7. Aptamers for multiple sclerosis

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by local destruction of the insulating myelin surrounding neuronal axons [94]. Patients suffer from visual loss, gait and cognitive impairment. There is currently no treatment that prevents progression or induce

repair, so MS treatment is a major challenge [95]. Interestingly, several aptamers were evaluated as therapeutic agents for MS (Table 5).

In 2008, Wang et al. evaluated the therapeutic effect of an aptamer against midkine (MK) in an experimental autoimmune encephalo-myelitis (EAE) mouse model [96]. Midkine is a basic heparin-binding growth factor that is up-regulated in the spinal cord during the induction and progression of the pathology [97]. The authors found that this growth factor inhibit the expansion of the CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cell population. During this study, they used a 49-mer RNA aptamer developed by RIBOMIC Inc. and functionally optimized by the introduction of fluorine and O-methyl at the 2' position of each ribose and with a cholesterol moiety and inverted dT tags at the 5' and 3' ends, respectively. The K_d of this aptamer was estimated to be 0.9 nM. The intraperitoneal injection of this aptamer in mice induced expansion of the CD24⁺ and CD25⁺ regulatory T cell (Tregs) population. Most importantly, it was able to prevent autoimmune attacks and alleviates EAE symptoms in a dose dependent manner. These results suggest that this aptamer could be a good candidate for therapy of autoimmune diseases such as multiple sclerosis. Then, Sonobe et al. investigated more precisely how the anti-MK aptamer can affect Tregs cells [98]. They observed that the aptamer was able to increase the numbers of CD11c^{low}CD45RB⁺ dendritic cells and Tregs in the draining lymph nodes.

Nastasijevic et al. evaluated another therapeutic aptamer, named LJM-3064, which was selected against murine myelin [99]. The K_d of this DNA aptamer for its target was not calculated. However, it promoted *in vivo* remyelination of CNS lesions in mice infected by Theiler's encephalomyelitis virus. Noticeably, the aptamer was 3'-biotinylated and conjugated to streptavidin before injection in order to enhance its stability and reduce its clearance

Table 5
Aptamers for multiple sclerosis.

Aptamer	Target	Chemistry	K _d	Reference	Use
	midkine	RNA	0.9 nM	unpublished	Inhibitor/therapy:
LJM-3064	murine myelin	DNA	ND	[99]	[96,98] Therapy:
MBPcl3	murine myelin	DNA	ND	[101]	[99,100] Detection:
Apt2–9	myelin basic protein (MBP) autoantibody	2'-F-Py RNA	15 \pm 4 nM	[102]	[101] Detection:
Apt2–9a			3.0 \pm 0.5 nM		[102]
Apt2–9b			1.4 \pm 0.7 nM		
Apt2–9c			1.2 \pm 0.1 nM		

[100].

Other DNA aptamers against myelin were selected by Rozenblum et al. [101]. These aptamers were not evaluated for potential therapeutic effects; however, one aptamer, named MBPcl3, was used to visualize myelin-rich regions in mouse brain tissue by histochemistry.

A 2'-F-Py RNA aptamer was also selected against the proteolytic autoantibodies that recognize the myelin basic protein (MBP) [102]. These autoantibodies have been discovered to contribute to demyelination and to the development of MS. 2'-F-Py RNAs were selected against a mixture of polyclonal anti-MBP immunoglobulins from different patients. Forty-five clones were sequenced after the 10th round and one round screening permit to identify an aptamer Apt2-9 with a K_d of 15 ± 4 nM. A shortened version (Apt2-9c) has an even better affinity (K_d of 1.2 ± 0.1 nM). Apt2-9c was conjugated with obelin, a photoprotein, to build a bioluminescent sensor. This biosensor was validated in solid phase assay with patient immunoglobulins.

8. Aptamers for amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration

The TAR RNA-binding protein named TDP-43, a ubiquitously expressed RNA binding protein (RBP), was found to be a major component of ubiquitin-positive inclusions observed in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and frontotemporal lobar degeneration (FTLD) [103]. ALS is an adult-onset neurodegenerative disease characterized by a rapid progressive paralysis and death from respiratory failure within 2–3 years [104]. Frontotemporal lobar degeneration (FTLD) regroups several distinct clinical variants, all characterized by progressive decline in behaviour or language and associated with degeneration of the frontal and anterior temporal lobes [105].

In order to identify the recognition sequences of TDP-43, a SELEX was performed by Ishiguro et al. [106]. Using this method, they identified that TDP-43 can bind RNA sequences that form a four-stranded G-quadruplex structure (named G4). Further studies in rat cortical neurons using a double-fluorescent probe system, revealed that TDP-43 transport G4-containing mRNA from nucleus up to neurites. This experiment demonstrated how *in vitro* selection could be useful to elucidate toxicity mechanisms.

9. Conclusions and perspectives

NDs have a devastating impact on individuals, families and societies. Unfortunately, these diseases have no cure while their incidence will grow continually with the progressive increase of life span. Therefore, finding treatments for neurodegenerative diseases is a goal of increasing urgency. However, the precise mechanisms that lead to neuronal dysfunction and death remain poorly understood even after decades of research. In addition to other molecular probes, aptamers should contribute to progress in the basic research for NDs. Indeed, they can provide invaluable tools to identify and validate new molecular targets that could further be used to develop novel therapeutic interventions.

However, although this review presents several aptamers that have been used for NDs, their number is very low compared with those that are developed for other pathologies such as cancer or infectious diseases.

Three main reasons could explain this situation. First, there is less funding for research in NDs compared with other diseases. Second, NDs remain poorly understood and there are still debates on the role of aggregated proteins in these diseases. For instance, it remains unknown if these proteins are toxic and, if yes, which protein species are the more toxic depending on the pathologies (*i.*

e. misfolded starting monomer, the oligomer or the final aggregation body). To resolve this, aptamers able to discriminate different protein species could be very helpful. The major obstacle is to isolate particular species of these proteins because they can form several different aggregates *in vitro* that could be quite different from those found in patients. Moreover, the variation of *in vitro* protocols could lead to different conformation of a particular protein specie. For instance, Peelaerts et al. have shown that different conformation of α -synuclein fibrils could be obtained *in vitro*. These different fibrils lead to different type of synucleinopathies once injected into animals [107]. Some of the works presented in this review have tried to obtain aptamers able to discriminate different protein species [58,67,70,82]. These studies use different species of a protein that appears during the aggregation process (monomer, oligomer or fiber). However, the protocols used to isolate these species are generally complex. Furthermore, these proteins tend to aggregate and it is difficult to guarantee their stability during the different rounds of SELEX. Accordingly, the ability of aptamers to discriminate among different protein species has often been unsatisfactory. The third major obstacle to the development of aptamers for NDs, is that as with other macromolecules, aptamers are thought to have difficulty penetrating brain tissues. Definitely, the blood brain barrier (BBB) that occurs along all blood capillaries in the brain is known to prevent the delivery of macromolecules, including the aptamers. However, several delivery strategies have been recently developed to cross the BBB, for instance, using nanoparticles or ultrasound [108,109]. It has also been proven that aptamers could be selected to cross the BBB [110]. Although further investigations are mandatory to explore all these strategies, the problem of BBB passage may be solved in the next decade. Furthermore, if aptamers do not cross the BBB easily, they could be useful for many other applications such as the detection of biomarkers in blood or in the CSF. Hence, most of the aptamers described in this review have been used to develop biosensors. For all these reasons, we believe that the use of aptamers in NDs has only just begun and is expected to increase in the future.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

Our studies on aptamers are supported by grants from Investissement d'Avenir ANR-11-INBS-0011 - NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences. ABM was supported by a PhD fellowship (CEA-irtélis).

References

- [1] A.D. Ellington, J.W. Szostak, *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature* 346 (1990) 818–822.
- [2] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science* 249 (1990) 505–510.
- [3] L. Gold, B. Polisky, O. Uhlenbeck, M. Yarus, Diversity of oligonucleotide functions, *Annu. Rev. Biochem.* 64 (1995) 763–797.
- [4] T. Fitzwater, B. Polisky, A SELEX primer, *Methods Enzymol.* 267 (1996) 275–301.
- [5] S.E. Osborne, I. Matsumura, A.D. Ellington, Aptamers as therapeutic and diagnostic reagents: problems and prospects, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1 (1997) 5–9.
- [6] P. Dua, S. Kim, D.K. Lee, Nucleic acid aptamers targeting cell-surface proteins, *Methods* 54 (2011) 215–225.
- [7] S.C. Gopinath, Methods developed for SELEX, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 171–182.
- [8] A. Cibiel, D.M. Dupont, F. Ducongé, Methods to identify aptamers against cell surface biomarkers, *Pharmaceuticals* 4 (2011) 1216.
- [9] M.A. Dellafiore, J.M. Montserrat, A.M. Iribarren, Modified nucleoside

- triphosphates for in-vitro selection techniques, *Front. Chem.* 4 (2016) 18.
- [10] N. Nguyen Quang, G. Perret, F. Ducongé, Applications of high-throughput sequencing for in vitro selection and characterization of aptamers, *Pharmaceuticals* 9 (2016) 76.
- [11] N. Nguyen Quang, C. Pestourie, A. Cibiel, F. Ducongé, How to measure the affinity of aptamers for membrane proteins expressed on the surface of living adherent cells, *Methods* 97 (2016) 35–43.
- [12] A.D. Keefe, S. Pai, A. Ellington, Aptamers as therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 537–550.
- [13] F. Pfeiffer, G. Mayer, Selection and biosensor application of aptamers for small molecules, *Front. Chem.* 4 (2016) 25.
- [14] C. Forier, E. Boschetti, M. Ouhammouch, A. Cibiel, F. Ducongé, M. Nogre, M. Tellier, D. Bataille, N. Bihoreau, P. Santambien, S. Chtourou, G. Perret, DNA aptamer affinity ligands for highly selective purification of human plasma-related proteins from multiple sources, *J. Chromatogr. A* 1489 (2017) 39–50.
- [15] S.J. Kiddle, M. Sattlecker, P. Proitsis, A. Simmons, E. Westman, C. Bazenet, S.K. Nelson, S. Williams, A. Hodges, C. Johnston, H. Soinenen, I. Kloszewska, P. Mecocci, M. Tsolaki, B. Vellas, S. Newhouse, S. Lovestone, R.J. Dobson, Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: a systematic review and replication study, *J. Alzheimer's Dis. JAD* 38 (2014) 515–531.
- [16] C. Pestourie, B. Tavittian, F. Ducongé, Aptamers against extracellular targets for in vivo applications, *Biochimie* 87 (2005) 921–930.
- [17] A. Cibiel, C. Pestourie, F. Ducongé, In vivo uses of aptamers selected against cell surface biomarkers for therapy and molecular imaging, *Biochimie* 94 (2012) 1595–1606.
- [18] A.Q.C. Araujo, Prionic diseases, *Arq. Neuro-Psiquiat* 71 (2013) 731–737.
- [19] T. Arendt, J.T. Stieler, M. Holzer, Tau and tauopathies, *Brain Res. Bull.* 126 (2016) 238–292.
- [20] M. Goedert, R. Jakes, M.G. Spillantini, The synucleinopathies: twenty years on, *J. Park. Dis.* 7 (2017) S53–S71.
- [21] E.M. McConnell, M.R. Holahan, M.C. DeRosa, Aptamers as promising molecular recognition elements for diagnostics and therapeutics in the central nervous system, *Nucleic acid. Ther.* 24 (2014) 388–404.
- [22] J. Qu, S. Yu, Y. Zheng, Y. Zheng, H. Yang, J. Zhang, Aptamer and its applications in neurodegenerative diseases, *Cell. Mol. life Sci. CMLS* 74 (2017) 683–695.
- [23] A. Aguzzi, A.M. Calella, Prions: protein aggregation and infectious diseases, *Physiol. Rev.* 89 (2009) 1105–1152.
- [24] A. Aguzzi, J. Falsig, Prion propagation, toxicity and degradation, *Nat. Neurosci.* 15 (2012) 936–939.
- [25] S. Weiss, D. Proske, M. Neumann, M.H. Groschup, H.A. Kretzschmar, M. Famulok, E.L. Winnacker, RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP, *J. Virol.* 71 (1997) 8790–8797.
- [26] S. Sekiya, K. Noda, F. Nishikawa, T. Yokoyama, P.K. Kumar, S. Nishikawa, Characterization and application of a novel RNA aptamer against the mouse prion protein, *J. Biochem.* 139 (2006) 383–390.
- [27] D. Ogasawara, H. Hasegawa, K. Kaneko, K. Sode, K. Ikebukuro, Screening of DNA aptamer against mouse prion protein by competitive selection, *Prion* 1 (2007) 248–254.
- [28] D. Ogasawara, N.S. Hachiya, K. Kaneko, K. Sode, K. Ikebukuro, Detection system based on the conformational change in an aptamer and its application to simple bound/free separation, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1372–1376.
- [29] D.F. Bibby, A.C. Gill, L. Kirby, C.F. Farquhar, M.E. Bruce, J.A. Garson, Application of a novel in vitro selection technique to isolate and characterise high affinity DNA aptamers binding mammalian prion proteins, *J. Virol. methods* 151 (2008) 107–115.
- [30] S.J. Xiao, P.P. Hu, G.F. Xiao, Y. Wang, Y. Liu, C.Z. Huang, Label-free detection of prion protein with its DNA aptamer through the formation of T-Hg²⁺-T configuration, *J. Phys. Chem. B* 116 (2012) 9565–9569.
- [31] A. Rhie, L. Kirby, N. Sayer, R. Wellesley, P. Disterer, I. Sylvester, A. Gill, J. Hope, W. James, A. Tahiri-Alaoui, Characterization of 2'-fluoro-RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 39697–39705.
- [32] N.M. Sayer, M. Cubin, A. Rhie, M. Bullock, A. Tahiri-Alaoui, W. James, Structural determinants of conformationally selective, prion-binding aptamers, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 13102–13109.
- [33] K. Murakami, F. Nishikawa, K. Noda, T. Yokoyama, S. Nishikawa, Anti-bovine prion protein RNA aptamer containing tandem GGA repeat interacts both with recombinant bovine prion protein and its beta isoform with high affinity, *Prion* 2 (2008) 73–80.
- [34] T. Mashima, A. Matsugami, F. Nishikawa, S. Nishikawa, M. Katahira, Unique quadruplex structure and interaction of an RNA aptamer against bovine prion protein, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) 6249–6258.
- [35] T. Mashima, F. Nishikawa, Y.O. Kamatari, H. Fujiwara, M. Saimura, T. Nagata, T. Kodaki, S. Nishikawa, K. Kuwata, M. Katahira, Anti-prion activity of an RNA aptamer and its structural basis, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 1355–1362.
- [36] R. Mercey, I. Lantier, M.C. Maurel, J. Grosclaude, F. Lantier, D. Marc, Fast, reversible interaction of prion protein with RNA aptamers containing specific sequence patterns, *Archiv. Virol.* 151 (2006) 2197–2214.
- [37] D. Proske, S. Gilch, F. Wopfner, H.M. Schatzl, E.L. Winnacker, M. Famulok, Prion-protein-specific aptamer reduces PrP^{Sc} formation, *Chembiochem* a Eur. J. Chem. Biol. 3 (2002) 717–725.
- [38] K. Takemura, P. Wang, I. Vorberg, W. Surewicz, S.A. Priola, A. Kanthasamy, R. Pottathil, S.G. Chen, S. Sreevatsan, DNA aptamers that bind to PrP(C) and not PrP(Sc) show sequence and structure specificity, *Exp. Biol. Med.* (Maywood, N.J.) 231 (2006) 204–214.
- [39] S.J. Xiao, P.P. Hu, Y.F. Li, C.Z. Huang, T. Huang, G.F. Xiao, Aptamer-mediated turn-on fluorescence assay for prion protein based on guanine quenched fluophor, *Talanta* 79 (2009) 1283–1286.
- [40] L. Zhan, L. Peng, Y. Yu, S.J. Zhen, C.Z. Huang, Sensitive spectrofluorometry of cellular prion protein based on the on-off interaction between fluorescent dye-labelled aptamers and multi-walled carbon nanotubes, *Analysis* 137 (2012) 4968–4973.
- [41] L. Zhan, L.J. Liang, S.J. Zhen, C.M. Li, C.Z. Huang, Aptamer-based spectrofluorometry for cellular prion protein using N,N'-bis[3,3'-(dimethylamino)propylamine]-3,4,9,10-perylene-tetracarboxylic diimide, *Analysis* 138 (2013) 825–830.
- [42] M.T. Hossain, T. Shibata, T. Kabashima, M. Kai, Aptamer-mediated chemiluminescence detection of prion protein on a membrane using trimethoxyphenylglyoxal, *Anal. Sci. Int. J. Jpn. Soc. Anal. Chem.* 26 (2010) 645–647.
- [43] A. Miodek, A. Poturnayova, M. Snejdarkova, T. Hianik, H. Korri-Yousoufi, Binding kinetics of human cellular prion detection by DNA aptamers immobilized on a conducting polypyrrole, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2505–2514.
- [44] A. Miodek, G. Castillo, T. Hianik, H. Korri-Yousoufi, Electrochemical aptasensor of human cellular prion based on multiwalled carbon nanotubes modified with dendrimers: a platform for connecting redox markers and aptamers, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7704–7712.
- [45] P. Yu, X. Zhang, E. Xiong, J. Zhou, X. Li, J. Chen, A label-free and cascaded dual-signaling amplified electrochemical aptasensing platform for sensitive prion assay, *Biosens. Bioelectron.* 85 (2016) 471–478.
- [46] L.Q. Chen, S.J. Xiao, P.P. Hu, L. Peng, J. Ma, L.F. Luo, Y.F. Li, C.Z. Huang, Aptamer-mediated nanoparticle-based protein labeling platform for intracellular imaging and tracking endocytosis dynamics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3099–3110.
- [47] Y.W. Zhou, C.M. Li, Y. Liu, C.Z. Huang, Effective detection and cell imaging of prion protein with new prepared targetable yellow-emission silver nanoclusters, *Analysis* 138 (2013) 873–878.
- [48] S.J. Xiao, P.P. Hu, X.D. Wu, Y.L. Zou, L.Q. Chen, L. Peng, J. Ling, S.J. Zhen, L. Zhan, Y.F. Li, C.Z. Huang, Sensitive discrimination and detection of prion disease-associated isoform with a dual-aptamer strategy by developing a sandwich structure of magnetic microparticles and quantum dots, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9736–9742.
- [49] S.J. Xiao, P.P. Hu, L.Q. Chen, S.J. Zhen, L. Peng, Y.F. Li, C.Z. Huang, A visual dual-aptamer logic gate for sensitive discrimination of prion diseases-associated isoform with reusable magnetic microparticles and fluorescence quantum dots, *PLoS one* 8 (2013), e53935.
- [50] P.P. Hu, L.L. Zheng, L. Zhan, J.Y. Li, S.J. Zhen, H. Liu, L.F. Luo, G.F. Xiao, C.Z. Huang, Metal-enhanced fluorescence of nano-core-shell structure used for sensitive detection of prion protein with a dual-aptamer strategy, *Anal. Chim. acta* 787 (2013) 239–245.
- [51] A. Miodek, G. Castillo, T. Hianik, H. Korri-Yousoufi, Electrochemical aptasensor of cellular prion protein based on modified polypyrrole with redox dendrimers, *Biosens. Bioelectron.* 56 (2014) 104–111.
- [52] P.P. Hu, H. Liu, L. Zhan, L.L. Zheng, C.Z. Huang, Coomassie brilliant blue R-250 as a new surface-enhanced Raman scattering probe for prion protein through a dual-aptamer mechanism, *Talanta* 139 (2015) 35–39.
- [53] V.L. Villemagne, M.T. Fodero-Tavoletti, C.L. Masters, C.C. Rowe, Tau imaging: early progress and future directions, *the Lancet, Neurology* 14 (2015) 114–124.
- [54] V.G. Corces, R. Manso, J. Delatorre, J. Avila, A. Nasr, G. Wiche, Effects of DNA on microtubule assembly, *Eur. J. Biochem.* 105 (1980) 7–16.
- [55] Q. Hua, R.Q. He, N. Haque, M.H. Qu, A.D. Alonso, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Microtubule associated protein tau binds to double-stranded but not single-stranded DNA, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 413–421.
- [56] S.M. Krylova, M. Musheev, R. Nutiu, Y. Li, G. Lee, S.N. Krylov, Tau protein binds single-stranded DNA sequence specifically—the proof obtained in vitro with non-equilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures, *FEBS Lett.* 579 (2005) 1371–1375.
- [57] S. Kim, A.W. Wark, H.J. Lee, Femtomolar detection of tau proteins in undiluted plasma using surface plasmon resonance, *Anal. Chem.* 88 (2016) 7793–7799.
- [58] J.H. Kim, E. Kim, W.H. Choi, J. Lee, J.H. Lee, H. Lee, D.E. Kim, Y.H. Suh, M.J. Lee, Inhibitory RNA aptamers of tau oligomerization and their neuroprotective roles against proteotoxic stress, *Mol. Pharm.* 13 (2016) 2039–2048.
- [59] J.H. Lee, S.K. Shin, Y. Jiang, W.H. Choi, C. Hong, D.E. Kim, M.J. Lee, Facilitated tau degradation by USP14 aptamers via enhanced proteasome activity, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10757.
- [60] B.H. Lee, M.J. Lee, S. Park, D.C. Oh, S. Elsasser, P.C. Chen, C. Gartner, N. Dimova, J. Hanna, S.P. Gygi, S.M. Wilson, R.W. King, D. Finley, Enhancement of proteasome activity by a small-molecule inhibitor of USP14, *Nature* 467 (2010) 179–184.
- [61] P. Scheltens, K. Blennow, M.M. Breteler, B. de Strooper, G.B. Frisoni, S. Salloway, W.M. Van der Flier, Alzheimer's disease, *Lancet* 388 (2016) 505–517.
- [62] B.A. Yankner, T. Lu, Amyloid beta-protein toxicity and the pathogenesis of Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4755–4759.
- [63] S.M. Pritchard, P.J. Dolan, A. Vitkus, G.V.W. Johnson, The toxicity of tau in

- Alzheimer disease: turnover, targets and potential therapeutics, *J. Cell. Mol. Med.* 15 (2011) 1621–1635.
- [64] R. Roychoudhuri, M. Yang, M.M. Hoshi, D.B. Teplow, Amyloid beta-protein assembly and Alzheimer disease, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 4749–4753.
- [65] F. Ylera, R. Lurz, V.A. Erdmann, J.P. Furst, Selection of RNA aptamers to the Alzheimer's disease amyloid peptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290 (2002) 1583–1588.
- [66] C.T. Farrar, C.M. William, E. Hudry, T. Hashimoto, B.T. Hyman, RNA aptamer probes as optical imaging agents for the detection of amyloid plaques, *PLoS one* 9 (2014), e89901.
- [67] F. Rahimi, K. Murakami, J.L. Summers, C.H. Chen, G. Bitan, RNA aptamers generated against oligomeric Abeta40 recognize common amyloid aptatopes with low specificity but high sensitivity, *PLoS one* 4 (2009), e7694.
- [68] T. Takahashi, K. Tada, H. Mihara, RNA aptamers selected against amyloid beta-peptide (Abeta) inhibit the aggregation of Abeta, *Mol. Biosyst.* 5 (2009) 986–991.
- [69] E. Babu, P. Muthu Mareeswaran, V. Sathish, S. Singaravelu, S. Rajagopal, Sensing and inhibition of amyloid-beta based on the simple luminescent aptamer-ruthenium complex system, *Talanta* 134 (2015) 348–353.
- [70] K. Tsukakoshi, K. Abe, K. Sode, K. Ikebukuro, Selection of DNA aptamers that recognize alpha-synuclein oligomers using a competitive screening method, *Anal. Chem.* 84 (2012) 5542–5547.
- [71] L. Zhu, J. Zhang, F. Wang, Y. Wang, L. Lu, C. Feng, Z. Xu, W. Zhang, Selective amyloid beta oligomer assay based on abasic site-containing molecular beacon and enzyme-free amplification, *Biosens. Bioelectron.* 78 (2016) 206–212.
- [72] Y. Zhou, H. Zhang, L. Liu, C. Li, Z. Chang, X. Zhu, B. Ye, M. Xu, Fabrication of an antibody-aptamer sandwich assay for electrochemical evaluation of levels of beta-amyloid oligomers, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35186.
- [73] L.F. Jiang, B.C. Chen, B. Chen, X.J. Li, H.L. Liao, H.M. Huang, Z.J. Guo, W.Y. Zhang, L. Wu, Detection of Abeta oligomers based on magnetic-field-assisted separation of aptamer-functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and BaYF₅:Yb,Er nanoparticles as upconversion fluorescence labels, *Talanta* 170 (2017) 350–357.
- [74] R. Vassar, B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers, M. Citron, Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science* 286 (1999) 735–741.
- [75] R. Vassar, The beta-secretase, BACE - a prime drug target for Alzheimer's disease, *J. Mol. Neurosci.* 17 (2001) 157–170.
- [76] A. Rentmeister, A. Bill, T. Wahle, J. Walter, M. Famulok, RNA aptamers selectively modulate protein recruitment to the cytoplasmic domain of beta-secretase BACE1 in vitro, *RNA* (New York, N.Y.) 12 (2006) 1650–1660.
- [77] H. Liang, Y. Shi, Z. Kou, Y. Peng, W. Chen, X. Li, S. Li, Y. Wang, F. Wang, X. Zhang, Inhibition of BACE1 activity by a DNA aptamer in an Alzheimer's disease cell model, *PLoS one* 10 (2015), e0140733.
- [78] G.S. Baird, S.K. Nelson, T.R. Keeney, A. Stewart, S. Williams, S. Kraemer, E.R. Peskind, T.J. Montine, Age-dependent changes in the cerebrospinal fluid proteome by slow off-rate modified aptamer array, *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 446–456.
- [79] S. Kim, H.J. Lee, Direct detection of alpha-1 antitrypsin in serum samples using surface plasmon resonance with a new aptamer-antibody sandwich assay, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7235–7240.
- [80] J. Jankovic, Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *J. Neurol. Neurosurg. Ps.* 79 (2008) 368–376.
- [81] L. Breydo, J.W. Wu, V.N. Uversky, Alpha-Synuclein misfolding and Parkinson's disease, *Bba-Mol Basis Dis.* 1822 (2012) 261–285.
- [82] K. Tsukakoshi, R. Harada, K. Sode, K. Ikebukuro, Screening of DNA aptamer which binds to alpha-synuclein, *Biotechnol. Lett.* 32 (2010) 643–648.
- [83] K. Sun, N. Xia, L.J. Zhao, K. Liu, W.J. Hou, L. Liu, Aptasensors for the selective detection of alpha-synuclein oligomer by colorimetry, surface plasmon resonance and electrochemical impedance spectroscopy, *Sens. Actuat B-Chem* 245 (2017) 87–94.
- [84] D. Sulzer, Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease, *Trends Neurosci.* 30 (2007) 244–250.
- [85] C. Mannironi, A. Di Nardo, P. Fruscoloni, G.P. Tocchini-Valentini, In vitro selection of dopamine RNA ligands, *Biochemistry* 36 (1997) 9726–9734.
- [86] R. Walsh, M.C. DeRosa, Retention of function in the DNA homolog of the RNA dopamine aptamer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388 (2009) 732–735.
- [87] I. Alvarez-Martos, E.E. Ferapontova, Electrochemical label-free aptasensor for specific analysis of dopamine in serum in the presence of structurally related neurotransmitters, *Anal. Chem.* 88 (2016) 3608–3616.
- [88] F.F. Liew, T. Hasegawa, M. Fukuda, E. Nakata, T. Morii, Construction of dopamine sensors by using fluorescent ribonucleopeptide complexes, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 4473–4481.
- [89] C. Annoni, E. Nakata, T. Tamura, F.F. Liew, S. Nakano, M.L. Gelmi, T. Morii, Construction of ratiometric fluorescent sensors by ribonucleopeptides, *Org. Biomol. Chem.* 10 (2012) 8767–8769.
- [90] C.A. Ross, S.J. Tabrizi, Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment, *Lancet Neurol.* 10 (2011) 83–98.
- [91] G. Bates, Huntington aggregation and toxicity in Huntington's disease, *Lancet* 361 (2003) 1642–1644.
- [92] H. Parekh-Olmedo, J. Wang, J.F. Gusella, E.B. Kmieciak, Modified single-stranded oligonucleotides inhibit aggregate formation and toxicity induced by expanded polyglutamine, *J. Mol. Neurosci.* 24 (2004) 257–267.
- [93] M. Skogen, J. Roth, S. Yerkes, H. Parekh-Olmedo, E. Kmieciak, Short G-rich oligonucleotides as a potential therapeutic for Huntington's Disease, *BMC Neurosci.* 7 (2006) 65.
- [94] A. Compston, A. Coles, Multiple sclerosis, *Lancet* 372 (2008) 1502–1517.
- [95] M.A. Friese, B. Schattling, L. Fugger, Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis, *Nat. Rev. Neurol.* 10 (2014) 225–238.
- [96] J. Wang, H. Takeuchi, Y. Sonobe, S. Jin, T. Mizuno, S. Miyakawa, M. Fujiwara, Y. Nakamura, T. Kato, H. Muramatsu, T. Muramatsu, A. Suzumura, Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 3915–3920.
- [97] T. Muramatsu, Midkine: a promising molecule for drug development to treat diseases of the central nervous system, *Curr. Pharm. Des.* 17 (2011) 410–423.
- [98] Y. Sonobe, H. Li, S. Jin, S. Kishida, K. Kadomatsu, H. Takeuchi, T. Mizuno, A. Suzumura, Midkine inhibits inducible regulatory T cell differentiation by suppressing the development of tolerogenic dendritic cells, *J. Immunol. Baltim. Md.* 1950 188 (2012) 2602–2611.
- [99] B. Nastasijevic, B.R. Wright, J. Smestad, A.E. Warrington, M. Rodriguez, L.J. Maher 3rd, Remyelination induced by a DNA aptamer in a mouse model of multiple sclerosis, *PLoS one* 7 (2012), e39595.
- [100] K. Perschbacher, J.A. Smestad, J.P. Peters, M.M. Standiford, A. Denic, B. Wootla, A.E. Warrington, M. Rodriguez, L.J. Maher 3rd, Quantitative PCR analysis of DNA aptamer pharmacokinetics in mice, *Nucleic Acid. Ther.* 25 (2015) 11–19.
- [101] G.T. Rozenblum, T. Kaufman, A.D. Vitullo, Myelin basic protein and a multiple sclerosis-related MBP-peptide bind to oligonucleotides, molecular therapy, *Nucleic Acids* 3 (2014), e192.
- [102] M.A. Vorobjeva, V.V. Krasitskaya, A.A. Fokina, V.V. Timoshenko, G.A. Nevinsky, A.G. Venyaminova, L.A. Frank, RNA aptamer against autoantibodies associated with multiple sclerosis and bioluminescent detection probe on its basis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 2590–2594.
- [103] M. Neumann, D.M. Sampathu, L.K. Kwong, A.C. Truax, M.C. Micsenyi, T.T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C.M. Clark, L.F. McCluskey, B.L. Miller, E. Masliah, I.R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H.A. Kretzschmar, J.Q. Trojanowski, V.M.Y. Lee, Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis, *Science* 314 (2006) 130–133.
- [104] A.E. Renton, A. Chio, B.J. Traynor, State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics, *Nat. Neurosci.* 17 (2014) 17–23.
- [105] G.D. Rabinovici, B.L. Miller, Frontotemporal lobar degeneration epidemiology, pathophysiology, diagnosis and management, *Cns Drugs* 24 (2010) 375–398.
- [106] A. Ishiguro, N. Kimura, Y. Watanabe, S. Watanabe, A. Ishihama, TDP-43 binds and transports G-quadruplex-containing mRNAs into neurites for local translation, *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 21 (2016) 466–481.
- [107] W. Peelaerts, L. Bousset, A. Van der Perren, A. Moskalyuk, R. Pulizzi, M. Giugliano, C. Van den Haute, R. Melki, V. Baekelandt, alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration, *Nature* 522 (2015) 340–344.
- [108] C. Saraiva, C. Praca, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, L. Bernardino, Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases, *J. Control. Release* 235 (2016) 34–47.
- [109] M.D. Santin, T. Debeir, S.L. Bridal, T. Rooney, M. Dhenain, Fast in vivo imaging of amyloid plaques using mu-MRI Gd-staining combined with ultrasound-induced blood-brain barrier opening, *NeuroImage* 79 (2013) 288–294.
- [110] C. Cheng, Y.H. Chen, K.A. Lennox, M.A. Behlke, B.L. Davidson, In vivo SELEX for identification of brain-penetrating aptamers, molecular therapy, *Nucleic Acids* 2 (2013) e67.
- [111] L.Y. Jiao, G.J. Lu, C.X. Zhang, Y. Yuan, J.X. Wang, Q.M. Zhang, P.F. Li, Aptamer and graphene-based electrochemical biosensor for dopamine determination with high sensitivity and selectivity, *Micro Nano Lett.* 8 (2013) 903–905.
- [112] I. Alvarez-Martos, R. Campos, E.E. Ferapontova, Surface state of the dopamine RNA aptamer affects specific recognition and binding of dopamine by the aptamer-modified electrodes, *Analysis* 140 (2015) 4089–4096.
- [113] Y. Zhang, S. Qi, Z. Liu, Y. Shi, W. Yue, C. Yi, Rapid determination of dopamine in human plasma using a gold nanoparticle-based dual-mode sensing system, *Mater. Sci. Eng. C, Mater. Biol. Appl.* 61 (2016) 207–213.
- [114] R.P. Talemi, S.M. Mousavi, H. Afruzi, Using gold nanostars modified pencil graphite electrode as a novel substrate for design a sensitive and selective dopamine aptasensor, *Mol. Pharm.* 73 (2017) 700–708.
- [115] H. Park, I.R. Paeng, Development of direct competitive enzyme-linked aptamer assay for determination of dopamine in serum, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 65–73.
- [116] Y. Zheng, Y. Wang, X.R. Yang, Aptamer-based colorimetric biosensing of dopamine using unmodified gold nanoparticles, *Sens. Actuat B-Chem* 156 (2011) 95–99.
- [117] S. Liu, X. Xing, J. Yu, W. Lian, J. Li, M. Cui, J. Huang, A novel label-free electrochemical aptasensor based on graphene-polyaniline composite film for dopamine determination, *Biosens. Bioelectron.* 36 (2012) 186–191.
- [118] B.R. Li, Y.J. Hsieh, Y.X. Chen, Y.T. Chung, C.Y. Pan, Y.T. Chen, An ultrasensitive nanowire-transistor biosensor for detecting dopamine release from living

- PC12 cells under hypoxic stimulation, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 16034–16037.
- [119] S. Banerjee, Y.J. Hsieh, C.R. Liu, N.H. Yeh, H.H. Hung, Y.S. Lai, A.C. Chou, Y.T. Chen, C.Y. Pan, Differential releases of dopamine and neuropeptide Y from histamine-stimulated PC12 cells detected by an aptamer-modified nanowire transistor, *Small (Weinheim der Bergstrasse, Ger.)* 12 (2016) 5524–5529.
- [120] D. Daems, K. De Wael, K. Vissenberg, G. Van Camp, L. Nagels, Potentiometric sensors doped with biomolecules as a new approach to small molecule/biomolecule binding kinetics analysis, *Biosens. Bioelectron.* 54 (2014) 515–520.
- [121] J.W. Zhou, W.Y. Wang, P. Yu, E.H. Xiong, X.H. Zhang, J.H. Chen, A simple label-free electrochemical aptasensor for dopamine detection, *Rsc Adv.* 4 (2014) 52250–52255.
- [122] D.G. Gorenstein, M. Cristofanilli, H. Rui, T. Tanaka, J. Kim, Y.S. Rim, H. Chen, H.H. Cao, N. Nakatsuka, H.L. Hinton, C. Zhao, A.M. Andrews, Y. Yang, P.S. Weiss, Fabrication of high-performance ultrathin In₂O₃ film field-effect transistors and biosensors using chemical lift-off lithography, *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 9 (2015) 4572–4582.
- [123] L. Tang, S. Li, F. Han, L. Liu, L. Xu, W. Ma, H. Kuang, A. Li, L. Wang, C. Xu, SERS-active Au@Ag nanorod dimers for ultrasensitive dopamine detection, *Biosens. Bioelectron.* 71 (2015) 7–12.
- [124] A. Azadbakht, M. Roushani, A.R. Abbasi, Z. Derikvand, Design and characterization of electrochemical dopamine-aptamer as convenient and integrated sensing platform, *Anal. Biochem.* 507 (2016) 47–57.
- [125] S. Bahrami, A.R. Abbasi, M. Roushani, Z. Derikvand, A. Azadbakht, An electrochemical dopamine aptasensor incorporating silver nanoparticle, functionalized carbon nanotubes and graphene oxide for signal amplification, *Talanta* 159 (2016) 307–316.
- [126] H. Huang, S. Shi, X. Gao, R. Gao, Y. Zhu, X. Wu, R. Zang, T. Yao, A universal label-free fluorescent aptasensor based on Ru complex and quantum dots for adenosine, dopamine and 17β-estradiol detection, *Biosens. Bioelectron.* 79 (2016) 198–204.

Titre : Identification de nouvelles sondes moléculaires contre des biomarqueurs des maladies neurodégénératives.

Mots clés : Evolution moléculaire dirigée, Aptamères, Maladies neurodégénératives, Imagerie moléculaire.

Résumé : Les aptamères sont des oligonucléotides dont la structure tridimensionnelle leur permet d'interagir avec une molécule-cible. Ils sont isolés par une méthode d'évolution dirigée appelée « SELEX » permettant de sélectionner un oligonucléotide capable de se lier à la molécule-cible, parmi une banque comportant un grand nombre de séquences différentes.

Les protéine α -synucléine (α -syn) sous forme agrégées sont retrouvées accumulées au sein d'agrégats dans le cerveau des patients pour plusieurs maladies neurodégénératives regroupées sous le nom de « synucléinopathies ».

Le but de ma thèse était de sélectionner des aptamères reconnaissant de manière spécifique différentes isoformes de la protéine α -syn. Nous avons, en utilisant la technique du SELEX, réussi à isoler

plusieurs aptamères capables de reconnaître une isoforme de la protéine α -syn avec une bonne affinité et une bonne spécificité. Ce travail est une preuve de concept qu'il est bien possible d'isoler des aptamères reconnaissant spécifiquement une isoforme particulière de la protéine α -syn.

Ces aptamères « spécifiques » pourraient être utilisés au sein de biocapteurs pour la détection d'isoformes particulières d' α -syn. Ceux-ci pourraient alors permettre à la communauté scientifique de mieux étudier et comprendre le rôle des différentes isoformes de la protéine α -syn dans les synucléinopathies. Ces biocapteurs pourraient également être utilisés comme outil de diagnostic, en permettant la détection des différentes isoformes d' α -syn dans des échantillons de patients

Title : Identification of new molecular probes against biomarkers of neurodegenerative diseases.

Keywords : Directed Molecular Evolution, Aptamer, Neurodegenerative diseases, Molecular Imaging.

Abstract : Aptamers are oligonucleotides whose three-dimensional structure allows them to interact with a target molecule. They are isolated by a directed evolution method named "SELEX" making possible to select an oligonucleotide able to bind to a target molecule, from a library comprising a large number of different sequences.

Aggregated α -synuclein (α -syn) proteins are found accumulated inside aggregates in the brains of patients for several neurodegenerative diseases grouped under the name "synucleinopathies".

The aim of my thesis was to select aptamers that specifically recognize different isoforms of the α -syn protein. Using the SELEX technique, we have

succeeded in isolating several aptamers capable of recognizing a particular isoform of the α -syn protein with good affinity and good specificity. This work is a proof of concept that it is indeed possible to isolate aptamers that specifically recognize a particular isoform of the α -syn protein.

These "specific" aptamers could be used in biosensors for the detection of particular α -syn isoforms. These could then allow the scientific community to better study and understand the role of the different α -syn protein isoforms in synucleinopathies. These biosensors could also be used as a diagnostic tool, allowing the detection of different α -syn isoforms in patient samples.