



HAL
open science

Formation de pontages covalents entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine

Auriane Guitton

► **To cite this version:**

Auriane Guitton. Formation de pontages covalents entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine. Autre [q-bio.OT]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALV079 . tel-04515326

HAL Id: tel-04515326

<https://theses.hal.science/tel-04515326v1>

Submitted on 21 Mar 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : CSV- Chimie et Sciences du Vivant

Spécialité : Chimie Biologie

Unité de recherche : Systèmes Moléculaires et Nano Matériaux pour l'Énergie et la Santé

Formation de pontages covalents entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine

Formation of covalent crosslinks between an aptamer and its target via specific oxidation of an 8-oxoguanine

Présentée par :

Auriane GUITTON

Direction de thèse :

Jean-luc RAVANAT
CEA

Directeur de thèse

Sandrine PERRIER
Université Grenoble Alpes

Co-encadrante de thèse

Rapporteurs :

Carole CHAIX

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Vincent NOEL

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris Cité

Thèse soutenue publiquement le **25 octobre 2023**, devant le jury composé de :

Jean-Luc RAVANAT

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CEA centre de Grenoble

Directeur de thèse

Nicolas SPINELLI

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Grenoble Alpes

Président

Natacha GILLET

CHARGÉE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Examinatrice

Carole CHAIX

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS délégation Rhône Auvergne

Rapporteuse

Vincent NOEL

PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Paris Cité

Rapporteur

Invités :

Sandrine PERRIER

MAITRE DE CONFERENCES, Université Grenoble Alpes



Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, Carole CHAIX, Vincent NOEL, Natacha GILLET et Nicolas SPINELLI d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime ma gratitude à mon directeur de thèse, Jean-Luc RAVANAT, pour avoir partagé ses connaissances avec moi et pour sa disponibilité tout au long de ce projet. Merci pour les dépannages, parfois à distance, sur le 6500+.

Je tiens à remercier chaleureusement Sandrine PERRIER pour sa patience, sa confiance et ses conseils durant ces trois années de thèse. Je te remercie également de m'avoir permis de découvrir l'enseignement à l'IUT.

Je remercie le Labex Arcane pour le financement de ces travaux de thèse, ainsi que pour les séminaires et conférences auxquels j'ai pu participer.

J'exprime ma reconnaissance à Christine SAINT-PIERRE et Didier GASPARUTTO qui m'ont permis de réaliser les analyses par MALDI-TOF, ainsi qu'à Nicolas SPINELLI pour l'accès spectromètre UV pour les mesures de températures de fusion.

Un grand merci aux membres de l'équipe CIBEST du CEA Grenoble que j'ai côtoyés au sein de ce fameux C5 : Jacques, Jean, Sylvain (merci pour les corrections), Thierry, David, Pascale, Sarah, Marie, Cyril et Cécile et aux non-permanents : Vérane, Maeva, Vincent, Pawel, Axelle, Clément et Lise (vivement le prochain vide-dressing). Merci pour votre bonne humeur et la bonne ambiance (souvent accompagnée de gâteaux et viennoiseries). Je suis ravie d'avoir participé à ajouter une coupe du fair-play à la collection du CIBEST.

Je voudrais également remercier les membres de l'équipe NOVA du DPM avec qui j'ai pu partager de nombreux moments : Pascale (désolée pour ces remboursements de congrès compliqués), Angèle, Annabelle, Luc, Farid, Florence, Véronique (le rougail était très bon), Éric, Corinne, Emmanuelle et Jean-Marc. J'espère que vous profiterez bien de ce super canapé.

Je remercie également les non-permanents pour les moments passés au DPM et en dehors : Blandine (peut-être bientôt associée dans une super entreprise de couture), Jordan (l'expert en milkshakes et responsable plancha), le célèbre duo Juliette (on se souviendra des fameuses photos de Milan) et Pauline (je vais continuer à étudier la théorie du CG). Je garde des supers

souvenirs des cours de cardio danse, des congrès, des diverses planchas et des brunchs (et j'espère peut-être cette fameuse sortie à WALIBI). Merci pour votre soutien pendant la rédaction de ce manuscrit et tout au long de cette thèse.

Merci également à toutes les autres personnes croisées durant ces trois années (les membres de l'équipe COMET, les stagiaires...).

Je terminerais en remerciant mes proches pour leur soutien tout au long de mes études. Merci à Antoine pour ses encouragements pendant ma rédaction, à mon frère de m'avoir préparé et amené des gâteaux pendant la prépa et avec qui je peux discuter de chimie (vive l'analytique), et à mes grands-parents qui ont pu visiter une partie de la France grâce à mes études. Je remercie enfin ma mère, qui est maintenant experte en déménagement et connaît la signification de LC-MS.

*« Je suis de ceux qui pensent que la science
a une grande beauté. »*

Marie CURIE

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations	8
Liste des figures	11
Liste des équations	14
Liste des tableaux	15
Introduction générale.....	17
Chapitre 1 : Étude bibliographique	19
1. Les aptamères	20
1.1. Rappel sur l'ADN et l'ARN	20
1.2. Définition et sélection des aptamères	22
1.2.1. Principe général de la méthode SELEX	22
1.2.2. Les différentes techniques de SELEX	23
1.3. Caractéristiques des aptamères	25
1.3.1. Structure tridimensionnelle.....	25
1.3.2. Affinité	25
1.3.3. Spécificité.....	26
1.4. Les différentes classes de cibles	26
1.5. Avantages des aptamères par rapport aux anticorps.....	27
1.6. Utilisation des aptamères	28
1.6.1. Biocapteurs à base d'aptamères	28
1.6.2. Techniques bio analytiques	32
1.6.3. Applications diagnostiques et thérapeutiques.....	33
2. Les dommages de l'ADN.....	34
2.1. Les différents types de dommages de l'ADN	35
2.1.1. Les erreurs de réplication	35

2.1.2.	Les dommages endogènes à l'ADN	35
2.1.3.	Les dommages à l'ADN exogènes	38
2.2.	Les mécanismes de réparation	41
2.2.1.	La réparation des dommages des bases de l'ADN	41
2.2.2.	La réparation des dommages volumineux des bases de l'ADN	42
2.2.3.	La réparation des cassures de l'ADN	43
2.3.	La base 8-oxo-7,8-dihydroguanine	44
2.3.1.	Formation et caractéristiques	44
2.3.2.	L'oxydation de la 8-oxoguanine.....	46
2.4.	Pontages avec l'ADN à la suite d'une oxydation.....	47
2.4.1.	Avec l'ADN natif.....	47
2.4.2.	Avec la 8-oxoguanine.....	48
3.	Les différents systèmes aptamère-cible étudiés.....	49
3.1.	Le système anti-L-tyrosinamide.....	49
3.2.	Le système anti-L-argininamide.....	51
3.3.	Le système anti-D-adénosine.....	52
Chapitre 2 : Étude de l'affinité des séquences contenant une 8-oxoguanine		55
1.	Dosage direct.....	57
2.	Développement du dosage compétitif assisté par SSB avec l'aptamère anti-L-tyrosinamide.....	59
2.1.	Principe général du dosage classique	60
2.2.	Développement du dosage « inversé »	63
2.3.	Optimisation de la réponse et étude du modèle théorique.....	64
3.	Application du dosage inversé à l'aptamère anti-L-argininamide.....	71
3.1.	Étude sur la séquence de 24 bases	71
3.2.	Étude sur les séquences de 18 bases.....	75

3.2.1.	Tests préliminaires à température ambiante.....	75
3.2.2.	Travail à basse température.....	77
4.	Discussion.....	82
Chapitre 3 : Détection et caractérisation des produits d'oxydation et de pontages à la suite de l'action d'un sel d'iridium.....		
		85
1.	Détection des produits d'oxydation et de pontages.....	86
1.1.	Utilisation du sel d'iridium et produits théoriques.....	86
1.2.	Effet du sel d'iridium sur les aptamères.....	88
1.2.1.	Mise au point et optimisation des conditions d'analyse.....	88
1.2.2.	Détection des produits d'oxydation et de pontage.....	89
2.	Caractérisation des produits d'oxydation et de pontages.....	91
2.1.	Caractérisation des produits formés en absence de cible.....	92
2.2.	Caractérisation des produits formés en présence de cible.....	95
2.3.	Contrôle avec un oligonucléotide « scramble » non susceptible de reconnaître la cible	95
2.4.	Digestion des oligonucléotides pontés.....	96
Chapitre 4 : Stratégies mises en œuvre afin de réduire les interactions non-spécifiques.....		
		98
1.	Modifications des paramètres expérimentaux.....	99
1.1.	Étude préliminaire sur les séquences de 18 bases.....	99
1.2.	Étude sur les séquences de 24 bases.....	100
1.2.1.	Diminution de la concentration de cible.....	100
1.2.2.	Augmentation de la force ionique et du pH du tampon d'incubation.....	101
2.	Ajout de compétiteurs.....	103
2.1.	Compétiteur négatif de l'ADN.....	103
2.2.	Compétiteurs chargés positivement.....	104
2.3.	Étude de l'influence du pH du tampon d'incubation sur l'affinité pour la cible .	106

2.4.	Effet du sel d'iridium sur la conformation de l'aptamère.....	107
Partie expérimentale.....		109
1.	Matériel.....	110
1.1.	Produits.....	110
1.2.	Aptamères.....	110
1.3.	Appareillages.....	111
2.4.1.	Mesures d'anisotropies de fluorescence.....	111
2.4.2.	Électrophorèse capillaire	116
2.4.3.	HPLC-MS	121
2.4.4.	Mesures de températures de fusion	125
2.	Méthodes	125
2.1.	Mesures d'anisotropies de fluorescence.....	125
2.1.1.	Dosage direct.....	126
2.1.2.	Courbe d'interaction aptamère/cible.....	126
2.1.3.	Dosage classique.....	126
2.1.4.	Dosage inversé.....	126
2.1.5.	Manipulations à basse température	127
2.2.	Détection des produits d'oxydation et de pontages par électrophorèse capillaire	127
2.2.1.	Mise au point de conditions d'analyse.....	127
2.2.2.	Effet de $\text{Ir}(\text{Cl})_6^{2-}$ sur les aptamères contenant ou non une OG	128
2.3.	Caractérisation des produits d'oxydation et de pontages par HPLC-MS.....	129
2.3.1.	Préparation des échantillons.....	129
2.3.2.	Types d'analyse par MS	130
2.4.	Mesures de température de fusion	131
Conclusion et perspectives.....		132

Valorisation des résultats.....	134
Bibliographie	135

Liste des abréviations

(6-4) PP	Pyrimidine (6 - 4) pyrimidone
8-oxoguanine	8-oxo-7,8-dihydroguanine
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AP	Site apurinique ou apyrimidique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BER	Réparation par excision de base
C	Cytosine
CPD	Cyclobutane-pyrimidine
CZE	Électrophorèse capillaire de zone
DDR	Réponse aux dommages de l'ADN
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DPC	DNA-protein crosslink
EC	Électrophorèse capillaire
ELAA	Enzyme linked aptamer assay
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELONA	Enzyme linked oligonucleotide assay
ESH	Électrode standard à hydrogène
F	Fluorescéine
FA	Anisotropie de fluorescence
FDA	Food and drug administration
FP	Polarisation de fluorescence
G	Guanine

GG-NER	Réparation globale du génome par excision de nucléotides
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HAS	Haute autorité de santé
HDLBP	High density lipoprotein binding protein
HPLC-MS	Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse
HR	Recombinaison homologue
ICL	Interstrand crosslink
IgE	Immunoglobuline E
K _d	Constante de dissociation
L-R	L-arginine
L-Rm	L-argininamide
L-Y	L-tyrosine
L-Ym	L-tyrosinamide
LIF	Fluorescence induite par laser
MMR	Réparation des mésappariements
MRE	Élément de reconnaissance moléculaire
NHEJ	Jonction d'extrémités non homologue
NER	Réparation par excision de nucléotide
OG	8-oxo-7,8-dihydroguanine
OA	8-oxo-7,8-dihydroadénine
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SELEX	Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SOMAmer	Slow off-rate modified aptamer
SPR	Résonance plasmonique de surface
SSB	Protéine fixant l'ADN simple brin

T	Thymine
TC-NER	Réparation par excision de nucléotide couplée à la transcription
TEAA	Acétate de triéthylammonium
Tm	Température de fusion
TR	Texas Red
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
XPC	Xeroderma pigmentosum, groupe C

Liste des figures

Figure 1 : Principe général de la formation du pontage covalent entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine	17
Figure 2 : Structures des bases puriques, pyrimidiques, du ribose et du 2-désoxyribose, d'un nucléotide (adénosine triphosphate) et d'une chaîne d'ADN	21
Figure 3 : Appariements des paires de bases de type « Watson – Crick » dans l'ADN.....	21
Figure 4 : Principales étapes du protocole de SELEX	22
Figure 5 : Motifs structuraux adoptés par les aptamères.....	25
Figure 6 : Structure d'un biocapteur et activation du transducteur lors de la reconnaissance de l'analyte.....	28
Figure 7 : Principe d'un biocapteur utilisant un aptamère marqué par un fluorophore.....	30
Figure 8 : Principe d'un biocapteur utilisant un couple de marqueurs fluorophore-quencher	31
Figure 9 : Erreurs dues à la réplication de l'ADN	35
Figure 10 : Lésion de l'ADN	36
Figure 11 : Structures de lésions de méthylation de l'ADN	36
Figure 12 : Structures de lésions de l'ADN issues de désaminations spontanées	37
Figure 13 : Structures de lésions oxydatives de l'ADN.....	37
Figure 14 : Structures de photoproduits générés par les UV.....	39
Figure 15 : Structures des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) courants et des isomères du benzo[a]pyrène diol époxyde (BPDE).....	40
Figure 16 : Structures de paires de bases Watson-Crick (à gauche) et de Hoogsteen (à droite) impliquant une OG	45
Figure 17 : Structures des produits d'oxydation de la 8-oxoguanine générés par un oxydant à un électron	46
Figure 18 : Structures proposées pour les pontages entre une lysine et une 8-oxoguanine ..	49
Figure 19 : Structures de la L-tyrosine, de la L-tyrosinamide et de la L-phénylalaninamide à pH physiologique	49
Figure 20 : Structures de la L-arginine, de la L-argininamide et de l'agmatine à pH physiologique	51
Figure 21 : Structures de l'aptamère anti-argininamide.....	52

Figure 22 : Structures de la D-adénosine, de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP	53
Figure 23 : Structures de l'aptamère anti-adénosine	54
Figure 24 : Séquences des aptamères 24-mer utilisés au cours du projet	56
Figure 25 : Dosage direct par FA des séquences F24-1, F24Scramble3, F23 et F25DA en présence de L-Rm.....	58
Figure 26 : Principe général du dosage classique par anisotropie de fluorescence assisté par SSB.....	61
Figure 27 : Courbe théorique de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la concentration de cible pour le dosage compétitif assisté par SSB.....	61
Figure 28 : Courbe d'interaction entre l'aptamère F23 et la SSB à température ambiante....	62
Figure 29 : Principe général du dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB	64
Figure 30 : Dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB pour les aptamères F23, 23F, TR23 et 23TR.....	65
Figure 31 : Évolution de f_{SSB} en fonction de la concentration de SSB pour TR23 superposée avec la courbe théorique.....	67
Figure 32 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du titrage assisté par 18 nM de SSB de la séquence TR23	69
Figure 33 : Évolution de f_{SSB} en fonction de $[SSB]_{tot}$ pour F24-1.....	72
Figure 34 : Dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB de l'aptamère F24-1 dans un tampon contenant 10 ou 100 mM de Tris-HCl.....	73
Figure 35 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du titrage assisté par 13,5 nM de SSB de la séquence F24-1 à température ambiante	74
Figure 36 : Structures des aptamères 24 ou 18-mer utilisés au cours du projet.....	75
Figure 37 : Dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB pour les aptamères F24-1 et F18-1 à température ambiante avec la L-Rm ou la L-R.....	76
Figure 38 : Courbes d'interaction des aptamères F18-1, F18-2, F18-3, F18-4 et de la séquence F18Scramble1 avec la SSB à basse température.....	78
Figure 39 : Dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB des oligonucléotides de 18 bases avec 9 nM de SSB pour F18-1, F18-2 et F18Scramble1 et 13,5 nM de SSB	79
Figure 40 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du dosage assisté par SSB de la séquence F18-2 à basse température	80

Figure 41 : Structures des produits majoritaires de l'oxydation de la 8-oxoguanine par un sel d'iridium (IV).....	87
Figure 42 : Structures des produits théoriques issus du pontage covalent entre la L-Rm et une OG via l'oxydation de cette base.....	88
Figure 43 : Électrophérogrammes obtenus pour l'analyse des échantillons A, B et C pour la séquence 18-2	90
Figure 44 : Spectre de masse en mode scan de la séquence 18-1 non traitée par le sel d'iridium	93
Figure 45 : Spectres de masse des échantillons A, B et C pour la séquence 18-2	94
Figure 46 : Spectre de masse MALDI-TOF de la séquence 18-2 pontée à la L-Rm et digérée par la phosphodiesterase II	97
Figure 47 : Structures des polyamines envisagées à pH physiologique.....	104
Figure 48 : Structure de la L-alaninamide à pH physiologique	105
Figure 49 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et présence de putrescine et de L-alaninamide ...	106
Figure 50 : Principe simplifié d'une analyse par anisotropie de fluorescence.....	112
Figure 51 : Émission de lumière polarisée pour une petite molécule (à gauche) et pour une molécule de taille plus importante (à droite)	114
Figure 52 : Principe du lecteur de microplaques Infinite® F500	114
Figure 53 : Principe de l'électrophorèse capillaire.....	116
Figure 54 : Principe de séparation d'espèces chargées ou non par électrophorèse de zone CZE	120
Figure 55 : Système classique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC)....	121
Figure 56 : Schéma d'un quadripôle	124

Liste des équations

Équation 1 : Expression des constantes de dissociation K_d et d'affinité K_A	26
Équation 2 : Expression de la constante de dissociation du complexe aptamère/SSB K_{dSSB} et équilibre associé.....	65
Équation 3 : Expression de la constante de dissociation du complexe aptamère/L-Ym K_{dL-Ym} et équilibre associé.....	66
Équation 4 : Expression de l'anisotropie r d'un mélange aptamère - SSB.....	66
Équation 5 : Expression de la fraction d'aptamère lié à la SSB f_{SSB}	67
Équation 6 : Équation de Boltzmann utilisée pour la modélisation des courbes d'évolution de f_{SSB} en fonction de la concentration de SSB	68
Équation 7 : Modèle de Scatchard appliqué pour la détermination des K_{dL-Ym}	69
Équation 8 : Expression de la concentration de cible à l'équilibre $[Cible]_{eq}$	69
Équation 9 : Expression de la fraction d'aptamère lié à la cible f_c	69
Équation 10 : Expression de l'anisotropie de fluorescence r	112
Équation 11 : Expression de la polarisation de fluorescence p	112
Équation 12 : Relation entre la polarisation p et l'anisotropie r de fluorescence	112
Équation 13 : Expression de l'anisotropie de fluorescence d'un mélange contenant plusieurs espèces fluorescentes	113
Équation 14 : Formule de Perrin modifiée pour l'expression de l'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire	113
Équation 15 : Expression du temps de corrélation rotationnelle Θ	113
Équation 16 : Expression de la mobilité électrophorétique μ_{ep}	117
Équation 17 : Expression de la vitesse électrophorétique v_{ep}	117
Équation 18 : Expression de la mobilité électroosmotique μ_{eo}	118
Équation 19 : Expression de la vitesse électroosmotique v_{eo}	118
Équation 20 : Expression de la vitesse apparente d'un composé v_{app}	119

Liste des tableaux

Tableau 1 : Constantes de dissociation apparentes K_{dSSB} des complexes aptamère/SSB pour les 4 sondes étudiées.....	68
Tableau 2 : Constantes de dissociation apparentes K_{dL-Ym} des complexes aptamère/L-Ym pour les 4 sondes étudiées	70
Tableau 3 : Valeurs du facteur g traduisant le quenching dû à la protéine SSB	70
Tableau 4 : Constantes apparentes de dissociation des complexes F18-X/L-Rm, facteurs g' et $r_{SSB} - r_f$ obtenus par l'application du modèle de Scatchard aux courbes de la Figure 39.....	80
Tableau 5 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ et de ses états de charge $[M-3H]^{3-}$ et $[M-4H]^{4-}$ pour la séquence 18-1	93
Tableau 6 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ, des produits d'oxydation, de pontages avec la L-Rm et de leurs états de charge 3^- et 4^- pour les aptamères 18-2, 18-3 et 18-4.....	94
Tableau 7 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ, des produits d'oxydation, de pontages avec la L-Rm et de leurs états de charge 4^- et 5^- pour les aptamères 24-1, 24-2, 24-3 et 24-4	100
Tableau 8 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en fonction de la concentration de cible	101
Tableau 9 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse.....	102
Tableau 10 : Proportions de pontages (%) avec le tris ou la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et présence de L-Rm	103
Tableau 11 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et présence de 25DA.....	104
Tableau 12 : Paramètres utilisés pour les mesures d'anisotropie de fluorescence en fonction du fluorophore	115
Tableau 13 : Gradient utilisé pour les analyses par HPLC-MS	124
Tableau 14 : Compositions finales des échantillons A, B, C et D	128
Tableau 15 : Masses (Da) des états de charge 4^- des espèces d'intérêt mesurées avec la méthode 1	130

Tableau 16 : Masses (Da) des états de charge 4⁻ des pontages Sp avec le tris et la putrescine
..... 131

Introduction générale

Ce projet vise à combiner deux domaines d'étude. Le premier se rapporte à la possibilité de générer des pontages covalents entre la molécule d'ADN et un large type de molécules à la suite d'une oxydation d'une des bases. Il a été montré qu'une attaque nucléophile peut avoir lieu sur le radical cation de la 8-oxoguanine (OG), un produit d'oxydation de la guanine, à la suite d'une oxydation à un électron de cette base oxydée. La 8-oxoguanine, possède un potentiel d'oxydation beaucoup plus bas que les bases normales et son oxydation peut ainsi se faire de manière spécifique au sein d'un oligonucléotide.¹

Le deuxième domaine d'étude concerne les aptamères. Ces oligonucléotides simple brin en série ADN ou ARN développent de fortes affinités et spécificités pour des cibles variées telles que des protéines, des petites molécules ou des drogues.² Considérés comme des « anticorps synthétiques », ces éléments de reconnaissance sont de plus en plus étudiés grâce à leur nombreuses propriétés et avantages par rapport aux anticorps traditionnels.³ La synthèse chimique des aptamères permet notamment d'introduire facilement et à des positions définies des modifications, telles que les 8-oxoguanines.

L'objectif de cette thèse est donc d'étudier la possibilité de former des pontages covalents entre un aptamère et sa cible, via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine introduite dans la séquence. La première étape du processus consiste en la complexation de la cible par l'aptamère contenant une OG. Ensuite, une fois la cible complexée (1, Figure 1) et après l'ajout d'un oxydant spécifique de la 8-oxoguanine, il est attendu que l'attaque nucléophile de la cible sur le radical issu de l'oxydation de cette base puisse générer un pontage covalent entre l'aptamère et sa cible (2, Figure 1).

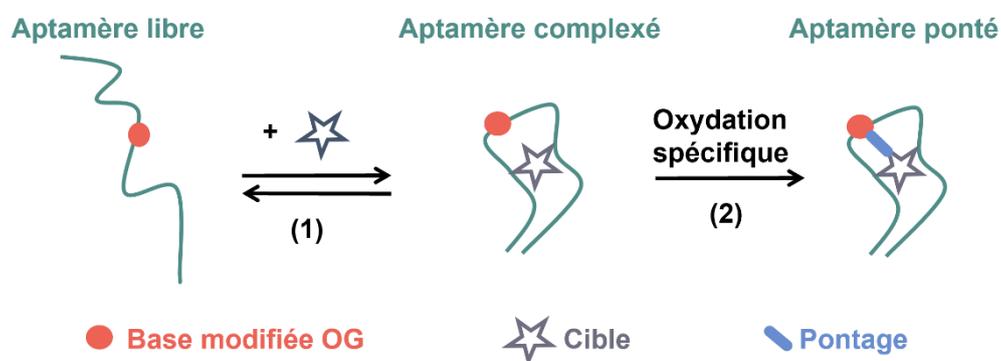


Figure 1 : Principe général de la formation du pontage covalent entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine

Cette stratégie pourrait avoir des applications intéressantes en augmentant la spécificité des aptamères, et pourrait être notamment utilisée dans le domaine du traitement d'échantillons (par exemple dans des cartouches d'extraction en phase solide SPE).

Le système modèle choisi est un aptamère de 24 bases en série ADN reconnaissant la L-argininamide.⁴ Il adopte une conformation tige-boucle et son site de reconnaissance, localisé dans la boucle, contient trois guanines qui peuvent être remplacées par des 8-oxoguanines. Il est assez court pour être analysé avec les techniques analytiques choisies (notamment la spectrométrie de masse). La cible possède plusieurs sites nucléophiles susceptibles d'initier la formation du pontage covalent. Des structures 3D ont été proposées pour ce complexe aptamère-cible⁵, montrant notamment la proximité de la cible et des 3 guanines localisées dans la boucle de reconnaissance de l'aptamère.

Cette thèse a donc eu pour objectif d'établir la preuve de concept de la possibilité de former des pontages covalents entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une base 8-oxoguanine à l'aide de l'aptamère reconnaissant la L-argininamide. Ce manuscrit, divisé en quatre chapitres, décrit les différentes étapes mises en œuvre au cours de ce projet. Le premier chapitre constitue une étude bibliographique sur les aptamères et leurs propriétés, les dommages de l'ADN et plus particulièrement la 8-oxoguanine, et sur les conditions de sélection des aptamères utilisés tout au long de ce projet. Le second chapitre présente l'étude de l'influence de la présence et de la position d'une base 8-oxoguanine sur l'affinité de l'aptamère pour la L-argininamide. Le troisième chapitre aborde la détection et la caractérisation des produits d'oxydation et de pontages par électrophorèse capillaire et chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. Le quatrième chapitre décrit les différentes stratégies mises en œuvre afin de tenter de minimiser les interactions non-spécifiques entre l'aptamère et sa cible. Enfin, une conclusion résume les principales avancées obtenues au cours de ce travail de thèse et présente les perspectives de ce projet.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1. Les aptamères

Une nouvelle catégorie d'acides nucléiques possédant des propriétés de reconnaissance intéressantes a été découverte dans les années 1990. Sélectionnées *in vitro* grâce à la méthode SELEX puis synthétisées chimiquement, ces molécules sont composées d'un simple brin d'ARN ou d'ADN. Elles montrent de fortes affinités et spécificités pour des cibles variées telles que des petites molécules⁶, des protéines⁷ ou des drogues⁸. Les aptamères sont utilisés dans de nombreux domaines comme le développement de biocapteurs⁹, les techniques de bioanalyse¹⁰, ou pour certains dans le cadre thérapeutique¹¹ et peuvent être assimilés à des *anticorps synthétiques*. Les aptamères présentent des avantages par rapport aux anticorps naturels protéiques, parmi lesquels une meilleure stabilité thermique et une synthèse chimique peu coûteuse permettant d'introduire facilement des modifications et de s'affranchir d'organismes vivants.

1.1. Rappel sur l'ADN et l'ARN

L'ADN (acide désoxyribonucléique) et l'ARN (acide ribonucléique) sont des macromolécules présentes chez la quasi-totalité des êtres vivants. L'ADN et l'ARN sont des polymères de nucléotides. Chaque unité nucléotidique est composée d'une base nucléique (ou base azotée), d'un ose à cinq atomes de carbone (pentose) et d'un groupement phosphate (Figure 2). Les bases azotées présentes dans l'ADN sont au nombre de quatre : la guanine (G), l'adénine (A), la cytosine (C) et la thymine (T). Dans le cas de l'ARN, la base thymine est remplacée par l'uracile (U). Les bases A et G sont appelées puriques car leur structure est dérivée de celle de la purine. Les bases pyrimidiques (C, T et U) sont quant à elles dérivées de la pyrimidine. Le pentose de l'ARN est hydroxylé en position 2' (ribose), contrairement à celui de l'ADN (2-désoxyribose). Les bases azotées sont liées au sucre grâce à des liaisons N-glycosidiques. Des liaisons phosphodiester entre l'hydroxyle en 3' d'un nucléotide « n » et le phosphate en 5' du nucléotide suivant « n+1 » permettent de former des séquences d'acides nucléiques. Il est ainsi possible de distinguer les deux extrémités d'une séquence : 3'-OH et 5'-phosphate.

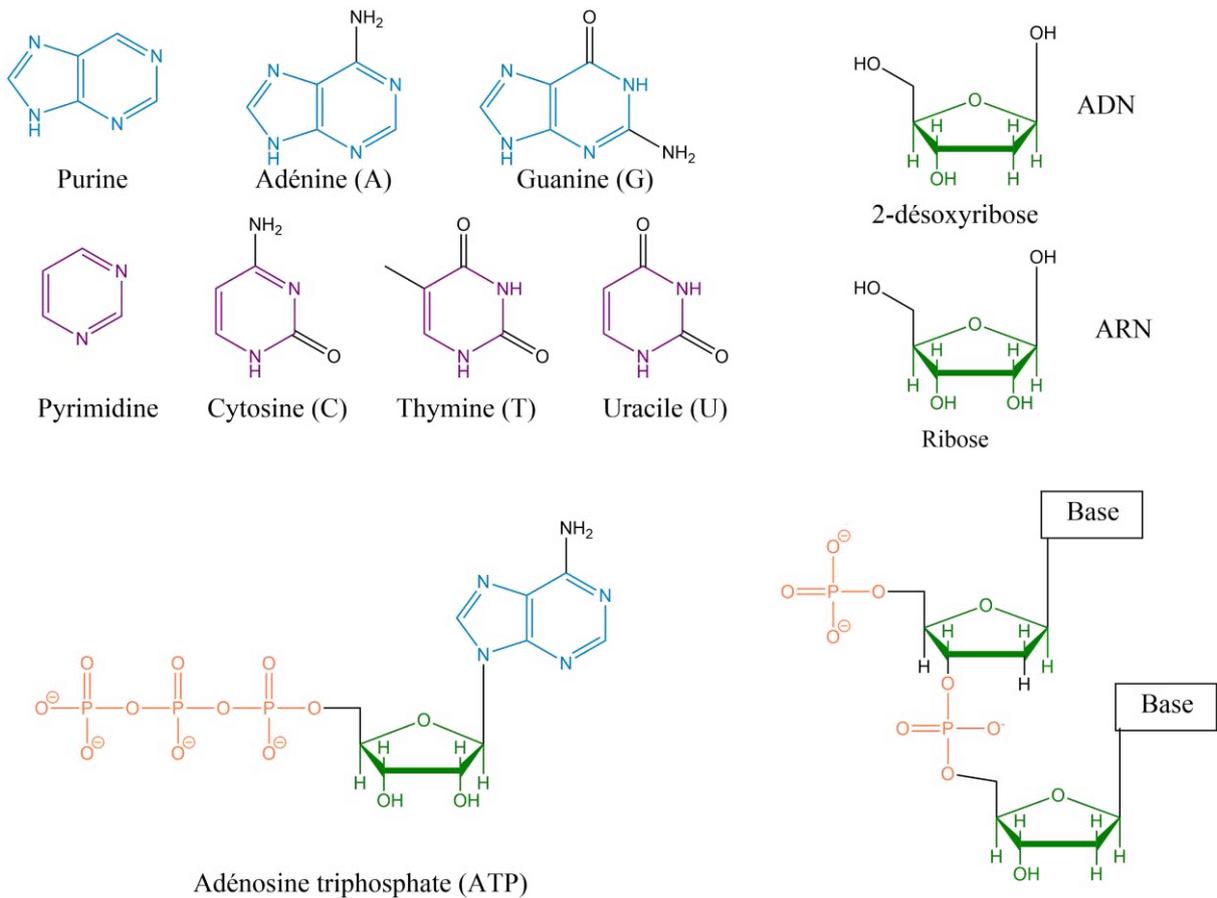


Figure 2 : Structures des bases puriques, pyrimidiques, du ribose et du 2-désoxyribose, d'un nucléotide (adénosine triphosphate) et d'une chaîne d'ADN

Les bases nucléiques peuvent former des paires de bases grâce à l'existence de liaisons hydrogène entre elles. Les appariements classiques, dits de type « Watson – Crick » ont lieu entre les bases G et C ou A et T dans l'ADN et A et U dans l'ARN. Deux liaisons hydrogène sont impliquées dans les appariements A:T alors que les paires de bases G:C en présentent trois (Figure 3).¹²

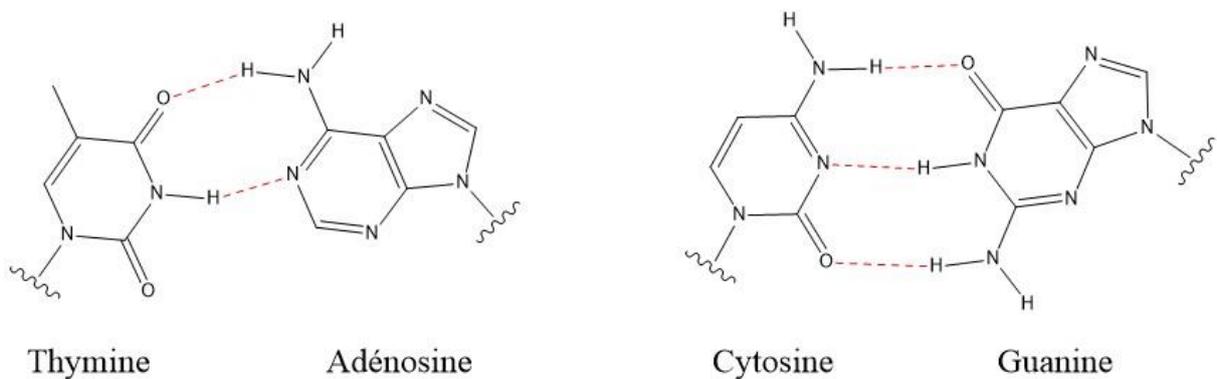


Figure 3 : Appariements des paires de bases de type « Watson – Crick » dans l'ADN

Les travaux de Watson et Crick¹³ ont mis en lumière en 1953 la structure bicaténaire de l'ADN. Ces appariements deux à deux de bases nucléiques entre deux brins d'ADN antiparallèles conduisent à la formation d'une structure en double hélice.

1.2. Définition et sélection des aptamères

Les aptamères sont des oligonucléotides en série ADN ou ARN démontrant une aptitude à reconnaître une ou plusieurs molécules cibles. Le néologisme « aptamère » vient du latin *aptus*, signifiant « adapté à, qui se lie à », et du suffixe « mère » qui se rapporte au motif élémentaire d'un polymère.¹⁴ Un aptamère de X bases est appelé un X-mer.

1.2.1. Principe général de la méthode SELEX

La méthode Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX), aussi appelée sélection *in vitro*, est utilisée afin de sélectionner des aptamères dirigés contre des molécules d'intérêt.^{14,15} Elle s'appuie sur plusieurs étapes majeures : la synthèse aléatoire d'une banque d'oligonucléotides, leur criblage afin de sélectionner les séquences possédant les propriétés recherchées, l'amplification par réaction en chaîne par polymérase (PCR) et l'identification de ces séquences (Figure 4).¹⁶⁻¹⁸ La qualité de la sélection est liée à la diversité de séquences de la banque, la finesse du criblage et la sensibilité des méthodes analytiques utilisées.¹⁹ Une banque de taille importante a une plus grande probabilité de contenir des séquences affines. Un criblage efficace permet de les sélectionner avant de les analyser.

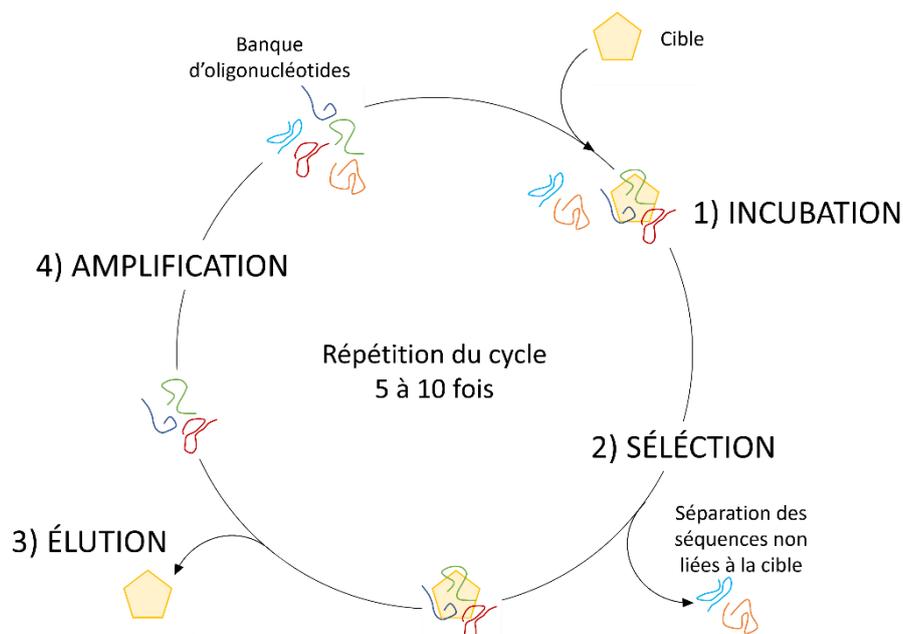


Figure 4 : Principales étapes du protocole de SELEX

La première étape consiste en la composition d'une banque d'oligonucléotides par synthèse chimique. Ces séquences possèdent une partie aléatoire longue de n nucléotides, encadrée par deux séquences constantes qui serviront ensuite d'amorces d'amplification. La longueur de la région variable impose la diversité de la banque. Le nombre de possibilités s'élève à 4^n car chaque position peut être occupée par l'un des quatre nucléotides. La limite expérimentale est de l'ordre de 10^{15} séquences, ce qui correspond à une région variable de 25 nucléotides ($4^{25} = 10^{15}$). Pour la sélection d'aptamères en série ARN, une banque d'ARN peut être directement utilisée, ou une banque d'ADN peut être transcrite en ARN. Dans ce deuxième cas, une étape de transcription inverse doit être effectuée avant l'amplification par PCR. La banque est ensuite incubée avec la molécule cible. Une partie des séquences, les aptamères, se fixe alors à cette molécule d'intérêt et les oligonucléotides non affins sont séparés le plus souvent par chromatographie d'affinité¹⁴, rétention sur filtre¹⁵ ou électrophorèse capillaire^{20,21}. Les séquences liées à la cible sont ensuite amplifiées grâce à la méthode PCR.

Ce cycle est répété la plupart du temps entre cinq et dix fois. La succession des étapes de sélection et d'amplification dirige l'évolution de la population des oligonucléotides vers la sélection de séquences aptes à la reconnaissance de la cible selon un mode darwinien.^{18,19,22}

1.2.2. Les différentes techniques de SELEX

La méthode SELEX traditionnelle présentée précédemment possède différents inconvénients. Celle-ci pouvait se révéler très longue, durant des semaines et parfois des mois.²³ L'automatisation de la méthode a donc été déployée.²⁴

Les différentes techniques employées lors de l'étape de sélection (Figure 4) possèdent de même chacune quelques défauts. Si la sélection est effectuée par chromatographie d'affinité, il est nécessaire d'éliminer les séquences liées non-spécifiquement au support. Pour cela, une sélection négative est réalisée, généralement en incubant la banque d'oligonucléotides avec le support en absence de cible.²⁵ Une contre sélection, au cours de laquelle les séquences se liant à des molécules de structure proche de celle de la cible sont éliminées, peut aussi être réalisée.²⁶ Ces étapes engendrent cependant une contrainte de temps supplémentaire. Certaines techniques de sélection utilisent un support sur lequel la molécule d'intérêt est immobilisée à l'aide d'un bras espaceur. L'analyte n'est donc pas entièrement disponible pour

la complexation avec les oligonucléotides, ce qui peut exclure des séquences affines qui reconnaîtraient en particulier la région indisponible.²⁰

De nombreux protocoles dérivés de la méthode traditionnelle ont été envisagés depuis sa conceptualisation.²⁷ Un gain de temps a été réalisé grâce à la technique du one-step SELEX, au cours de laquelle un seul cycle de sélection est effectué.²⁸

Afin d'améliorer la sélection d'aptamères reconnaissant des petites molécules, la capture-SELEX a été proposée. Elle permet de résoudre certains problèmes liés à l'immobilisation des petites cibles en SELEX traditionnelle, comme la difficulté de les greffer en raison de leur faible nombre de groupements fonctionnels. La banque d'ARN ou d'ADN est immobilisée par hybridation à une matrice solide à l'aide de portions d'ancrage présentes dans les séquences. Les séquences reconnaissant l'analyte subissent un changement conformationnel et se séparent de la matrice, ce qui permet de les récupérer ou de les isoler des séquences non affines.²⁹

La Cell-SELEX est très utilisée pour la sélection des aptamères en vue du diagnostic et de la thérapie de nombreuses maladies, notamment le cancer. Cette méthode permet de sélectionner des séquences reconnaissant des cellules entières, ce qui laisse les régions ciblées à la surface des cellules dans leur état natif et de repliement naturel. Elle présente aussi l'avantage de ne pas nécessiter de connaissances préalables sur la structure des protéines ciblées.^{30,31} Cette méthode a par exemple été utilisée afin de sélectionner des aptamères en série ADN contre le rétinoblastome, qui est la tumeur intraoculaire pédiatrique la plus fréquente.³²

Enfin, une autre variante très étudiée de la SELEX est la CE-SELEX (Capillary Electrophoresis-SELEX). L'étape de sélection se fait en solution libre, ce qui permet de s'affranchir des biais non-spécifiques liés au support et au linker. Les séquences affines subissent un changement de mobilité lors de la complexation de la cible et peuvent ainsi être séparées des non affines et collectées dans des fractions différentes. Cette technique est surtout utilisée pour la sélection de macromolécules. Bowser et ses collaborateurs ont par exemple utilisé la CE-SELEX pour sélectionner un aptamère reconnaissant l'immunoglobuline E humaine (IgE). Les séquences sélectionnées ont montré une bonne sélectivité pour cette protéine par rapport à l'IgE de souris ou l'immunoglobuline G humaine.²⁰

1.3. Caractéristiques des aptamères

1.3.1. Structure tridimensionnelle

Les aptamères sont poly anioniques. Ils sont tout d'abord caractérisés par leur structure primaire, c'est-à-dire par l'enchaînement de leurs nucléotides. Chaque nucléotide possède des sites accepteurs et/ou donneurs de liaisons hydrogène (Figure 3), une charge négative à pH neutre au niveau du groupement phosphate et un hétérocycle aromatique pouvant générer des interactions d'empilement. Certains aptamères adoptent donc une structure secondaire. Les motifs les plus répandus sont la tige-boucle (ou épingle à cheveux, *hairpin* en anglais)⁴ ou le pseudo-nœud³³(Figure 5). Une structure plus complexe, appelée G-quartet ou tétrade de guanines, et formée grâce à des liaisons hydrogène entre quatre guanines placées dans le même plan peut également être observée. La superposition de plusieurs tétrades peut être stabilisée par des interactions de π -stacking et former alors des G-quadruplexes.³⁴ Une partie d'un aptamère reconnaissant la thrombine forme par exemple cette structure.⁷

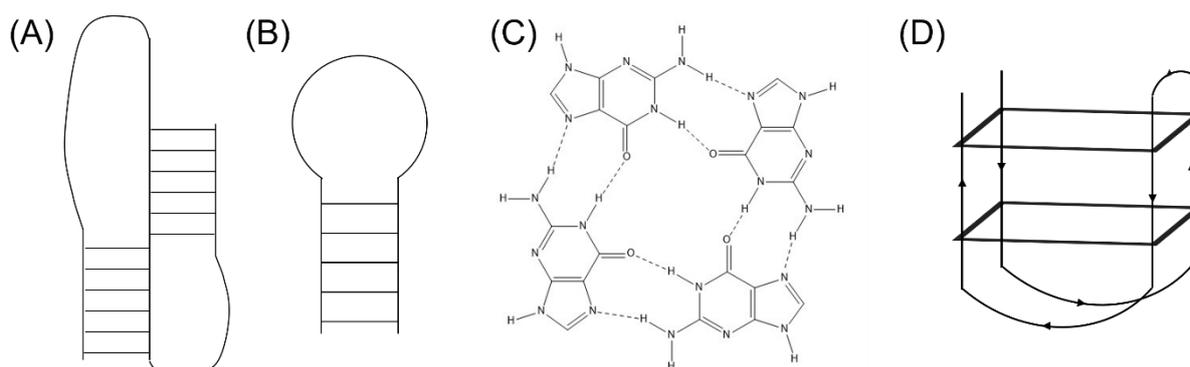
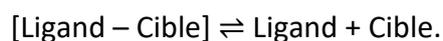


Figure 5 : Motifs structuraux adoptés par les aptamères avec (A) le pseudo-nœud, (B) la tige-boucle, (C) le G-quartet et (D) un exemple de G-quadruplexe intramoléculaire formé par un aptamère anti-thrombine⁷

1.3.2. Affinité

La qualité de la reconnaissance moléculaire peut être évaluée par l'affinité du ligand pour sa cible (K_A). Elle est estimée grâce à la constante de dissociation K_d du complexe aptamère/cible qui est associée à l'équilibre :



La loi d'action des masses donne alors une définition de ces constantes :

Équation 1 : Expression des constantes de dissociation K_d et d'affinité K_A

$$K_d = \frac{[Ligand] \times [Cible]}{[Ligand - Cible]} = \frac{1}{K_A}$$

Une valeur de K_d élevée traduit une affinité faible de l'aptamère pour sa molécule cible. Des constantes de dissociation du complexe aptamère/cible de l'ordre du micro molaire sont généralement obtenues pour la reconnaissance des petites molécules^{35,36}, alors qu'elles peuvent atteindre l'échelle du nano molaire (voire pico molaire) pour des cibles protéiques^{37,38}.

Cette affinité ne dépend pas de la taille, de la quantité ou de la complexité de la molécule cible, mais plutôt de ses propriétés, comme les groupements fonctionnels dont elle est composée. En effet, la formation du complexe aptamère/cible est régie par des interactions intermoléculaires : les liaisons hydrogène, l'empilement de cycles aromatiques, les forces de Van der Waals, ou les effets hydrophobes. Une adéquation de forme entre le ligand et l'oligonucléotide aide également à la reconnaissance.^{4,39,40}

1.3.3. Spécificité

La spécificité est souvent la propriété des aptamères la plus connue. Cette capacité à discriminer des molécules en compétition pour le même ligand est particulièrement intéressante pour ces éléments de reconnaissance. De nombreux aptamères développant une grande spécificité sont présentés dans la littérature. L'exemple le plus démonstratif est sûrement celui de l'aptamère anti-théophylline. En effet, il possède une affinité 10000 fois plus faible pour la caféine alors que les structures de ces deux molécules ne diffèrent que par un groupement méthyle.⁴¹

Les aptamères sont également connus pour leur capacité à discriminer les énantiomères d'une même molécule. Geiger et son équipe ont sélectionné un aptamère dont le K_d est 12000 fois inférieur pour le complexe avec la L-arginine, par rapport à celui avec la D-arginine.^{42,43}

1.4. Les différentes classes de cibles

Même si la plupart des aptamères identifiés sont dirigés vers des petites molécules ou des protéines, des aptamères reconnaissant des classes de ligands très variées ont été décrits.^{2,44}

Les petites molécules cibles peuvent être des espèces inorganiques, comme l'ion métallique Zn^{2+} ⁶ ou des espèces organiques avec l'éthanolamine⁴⁵. Des acides aminés (arginine^{42,46}), des acides nucléiques (adénosine triphosphate^{36,47}), des antibiotiques (kanamycine⁴⁸), des drogues (cocaïne⁸), des polluants ou encore des toxines (ochratoxine A⁴⁹) peuvent également être reconnues.

Des aptamères dirigés contre des cibles protéiques ont été décrits, par exemple contre la thrombine⁷, l'immunoglobuline E³⁸ ou encore contre des facteurs de croissance comme le VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)⁵⁰.

Des structures plus complexes peuvent également être reconnues par des aptamères : des bactéries telles qu'*Escherichia Coli*⁵¹, le virus Ebola⁵² ou encore des cellules de la leucémie⁵³.

1.5. Avantages des aptamères par rapport aux anticorps

Pendant de nombreuses années, les anticorps sont restés des éléments de reconnaissance moléculaire très populaires. Cependant, les aptamères, régulièrement désignés comme des *anticorps synthétiques*, sont de plus en plus étudiés en raison leurs propriétés très intéressantes qui peuvent palier aux limites des anticorps.

Leur synthèse chimique est rapide, peu coûteuse, à la demande et peut être automatisée. Cette voie de synthèse permet également l'introduction facile de modifications à des positions précises dans la séquence (fluorophore, biotine...). Cette production permet de s'affranchir d'animaux ou de cellules contrairement à celle des anticorps. Cela permet ainsi de limiter grandement la variabilité d'un lot à l'autre. De plus, les conditions de sélection peuvent être modifiées afin d'obtenir des aptamères ayant les propriétés désirées. Il est par exemple possible de choisir une température ou un tampon non physiologiques lors de la SELEX afin de sélectionner des séquences reconnaissant la cible dans de telles conditions.

Les aptamères sont plus stables au stockage à long terme que les anticorps. Lorsqu'ils sont lyophilisés, les aptamères peuvent être conservés à température ambiante sur de longues périodes (jusqu'à dix-huit mois d'après le fournisseur). Lorsqu'ils sont repris en solution, ils peuvent être conservés au congélateur à -20 °C. Ils peuvent être régénérés en quelques minutes après leur dénaturation, qui peut être réalisée plusieurs fois.

L'utilisation des aptamères présentent cependant quelques limites. Il existe un manque d'informations quant à leurs mécanismes de reconnaissance.⁵⁴ Leur clairance sanguine, c'est-à-dire leur élimination *via* le système sanguin, peut être rapide en raison de leur faible taille. Ils peuvent également être dégradés par des nucléases (enzymes capables de couper les liaisons phosphodiester des acides nucléiques). Le temps de demi-vie *in vitro* dans le plasma humain d'un oligonucléotide ARN classique est de quelques secondes, et il atteint 30 à 60 minutes pour un aptamère en série ADN.⁵⁵ Des modifications chimiques peuvent toutefois pallier à certains de ces problèmes. La conjugaison de polymères, tels que des lipides, aux aptamères permet d'augmenter le temps au bout duquel ils seront éliminés. L'utilisation de nucléotides modifiés au niveau de la base, du sucre ou du groupement phosphate lors de la synthèse d'un aptamère peut le rendre résistant à ces enzymes.^{3,26,56,57}

1.6. Utilisation des aptamères

Les multiples avantages des aptamères expliquent leur large éventail d'applications.^{56,58}

1.6.1. Biocapteurs à base d'aptamères

De nombreux aptamères sont utilisés dans le développement de biocapteurs. Un biocapteur est généralement défini comme un outil ou un système analytique fait de deux parties (Figure 6). La première, souvent constituée d'un composé biologique immobilisé (cellule entière, anticorps...) est l'élément de reconnaissance moléculaire (MRE). La deuxième, reliée par un *linker*, est un transducteur qui permet de convertir l'interaction entre l'analyte et le MRE en signal optique, acoustique, mécanique ou électrique, qui sera détectable et donc exploitable.^{12,59}

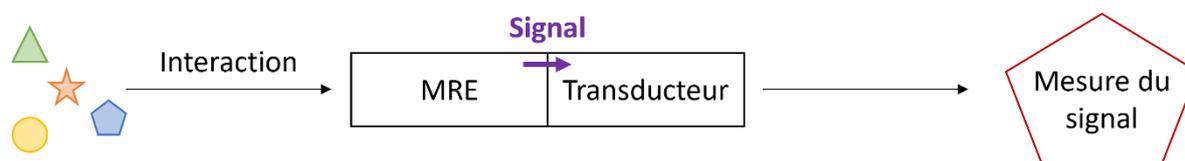


Figure 6 : Structure d'un biocapteur et activation du transducteur lors de la reconnaissance de l'analyte

L'emploi des aptamères dans le domaine des biocapteurs tire notamment parti de leur forte affinité envers leur cible.⁵⁸ Les biocapteurs utilisant les aptamères, plus spécifiquement appelés aptacapteurs, s'appuient sur la possibilité de les régénérer lorsqu'ils sont immobilisés grâce à leur capacité à subir plusieurs cycles de dénaturation/renaturation. Le transducteur

influence quant à lui la sensibilité de la détection. Différents types de transducteurs sont employés dans la conception d'aptacapteurs et peuvent être employés pour classer ces derniers : les transducteurs électroniques, optiques, les cantilevers et les transducteurs optiques.

1.6.1.1. Transducteurs électrochimiques

Des aptacapteurs électrochimiques ont été introduits en 2004⁶⁰ et de nombreux développements ont eu lieu depuis, notamment pour la détection de la thrombine.⁶¹ La mise en évidence de la complexation de la cible par le MRE est possible grâce à une variation de courant, d'impédance ou de potentiel au niveau du transducteur. Un aptacapteur électrochimique pour la détection du cadmium Cd^{2+} dans des échantillons d'eau a notamment été développé par l'équipe de Rhouati.⁶²

1.6.1.2. Microcantilevers

Les aptamères peuvent ensuite être utilisés à la surface d'un type particulier de biocapteurs : les microcantilevers. Ils sont constitués de petites lames alignées sous la forme d'un peigne, et sur lesquelles il est possible de greffer un aptamère spécifique d'une molécule d'intérêt. Lors de la complexation, une contrainte de surface apparaît, ce qui va entraîner une légère courbure des lames. La courbure peut alors être détectée par différentes méthodes comme l'interférométrie.⁶³ La détection de la microcystine-leucine-arginine, une des toxines hépatiques les plus préoccupantes, a été réalisée à l'aide de microcantilevers.⁶⁴ Une mesure différentielle est souvent employée afin de limiter les paramètres non spécifiques auxquels sont particulièrement sensibles les microcantilevers. Pour cela, une partie des lames est greffée avec un aptamère spécifique de la cible d'intérêt, et l'autre avec une séquence contrôle.⁶⁵

1.6.1.3. Transducteurs optiques

Les transducteurs optiques sont très répandus pour les aptacapteurs. Un grand nombre de ces capteurs utilise des fluorophores comme transducteurs de signal. En effet, leur conjugaison à une séquence d'aptamère et la détection de signaux de fluorescence sont relativement faciles. Différentes stratégies utilisant des aptacapteurs optiques ont été mises en œuvre.^{9,12,66}

La plus simple utilise un fluorophore lié covalamment à l'aptamère à une position susceptible de subir un réarrangement structurel lors de la reconnaissance de la cible (Figure 7). La

modification de l'environnement électronique autour du fluorophore lors de la complexation entraîne alors une augmentation ou une diminution de l'intensité de fluorescence.

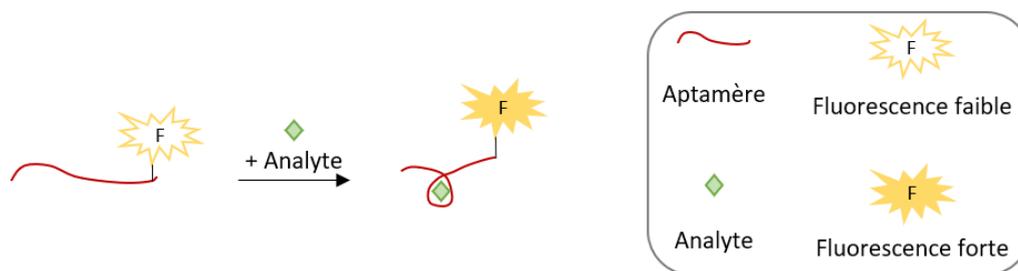


Figure 7 : Principe d'un biocapteur utilisant un aptamère marqué par un fluorophore

Des mesures d'anisotropie de fluorescence (FA) peuvent également être réalisées avec ce type de biocapteur. Ruta et *al.* ont par exemple utilisé cette technique avec un aptamère anti-L-tyrosinamide et un aptamère anti-L-argininamide. L'effet de la nature du fluorophore, de sa position et de la longueur du linker le reliant à l'aptamère ont été étudiés.⁶⁷ Une augmentation de l'anisotropie de fluorescence a été observée pour les deux systèmes lors de la reconnaissance des molécules d'intérêt. Les masses des cibles étant négligeable par rapport à celles des acides nucléiques, cette augmentation de signal n'a pas été attribuée à l'augmentation de la masse globale du système lors de la complexation. L'équipe a suggéré que d'autres paramètres en étaient responsables : le changement de conformation lors de la complexation de la cible peut restreindre la mobilité locale du fluorophore et/ou augmenter le volume (ou la forme) de l'aptamère.

Une autre stratégie assez répandue consiste à employer un aptamère dont l'une des extrémités est liée covalamment à un fluorophore, et l'autre à un quencher (Figure 8). Ce concept est appelé *molecular aptamer beacon*.^{68,69} En absence de molécule cible ou de séquence complémentaire⁷⁰, l'aptamère adopte une conformation fermée amenant à une proximité spatiale du fluorophore et du quencher et donc à l'extinction du signal de fluorescence. Lors de la complexation de l'analyte ou du brin complémentaire, la conformation de l'aptamère est modifiée et la distance entre ces deux marqueurs augmente. Le signal de fluorescence s'intensifie alors.

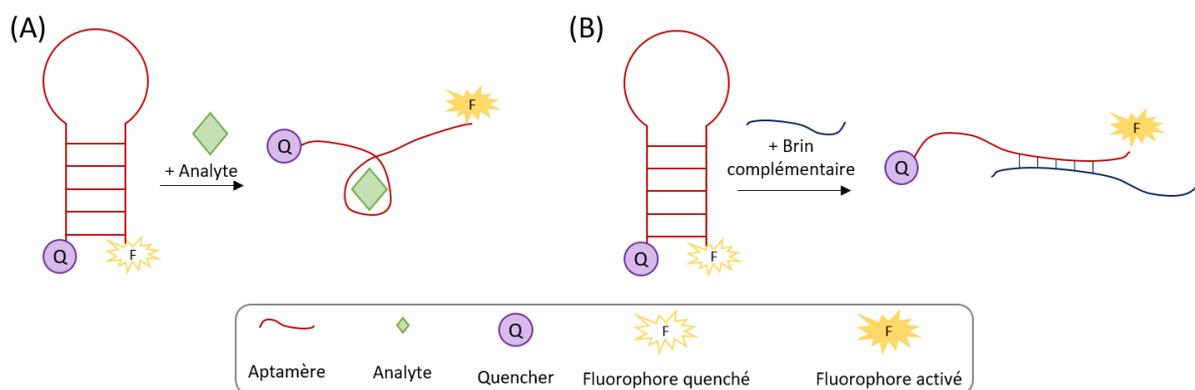


Figure 8 : Principe d'un biocapteur utilisant un couple de marqueurs fluorophore-quencher lors de la reconnaissance (A) d'un analyte ou (B) d'un brin complémentaire

Il est également possible de trouver des travaux dans lesquels les deux marqueurs sont éloignés lorsque l'aptamère est libre, mais se retrouvent à proximité lors de la complexation de l'analyte grâce à la structuration de l'aptamère. Lerga et O'Sullivan ont développé ce type d'essai utilisant un oligonucléotide synthétique doublement marqué pour la détermination de la dureté totale des eaux du robinet et des eaux embouteillées *via* le suivi des cations Mg^{2+} et Ca^{2+} .⁷¹

Des aptacapteurs colorimétriques, c'est-à-dire pour lesquels l'interaction entre l'aptamère et la cible se traduit par un changement de couleur, existent aussi. Les propriétés colorimétriques des nanoparticules d'or sont fréquemment utilisées.⁴⁸ Les capteurs les utilisant exploitent les différences de propriétés électrostatiques existant entre les simples brins et les doubles brins d'ADN. La conformation plus libre du simple brin lui permet d'exposer ses bases azotées au milieu dans lequel il est. La double hélice du double brin étant plus stable, il expose quant à lui ses groupements phosphate chargés négativement. En solution, des anions stabilisent généralement les nanoparticules d'or en s'adsorbant à leur surface. La répulsion entre ces ions empêche alors l'agrégation des nanoparticules et la solution apparaît rouge. Dans ces conditions, seul un simple brin d'ADN peut s'adsorber à la surface des nanoparticules grâce aux interactions entre ses bases exposées et les ions négatifs adsorbés. La répulsion entre ces anions et les groupements phosphate de l'ADN est trop importante dans le cas d'un double brin.⁷² Ce principe a été utilisé avec un aptamère dirigé contre la thrombine. Des nanoparticules d'or sont mises en présence de l'aptamère, qui s'adsorbent alors à leur surface. Lors de la reconnaissance de la cible, une structure composée d'une zone duplex et d'un G-quadruplex est formée, entraînant la désorption de séquences d'ADN. Des sels sont alors

ajoutés à la solution et vont provoquer une agrégation des nanoparticules, qui ne sont plus stabilisées par les oligonucléotides. Elles vont alors s'agréger et la solution devient bleu.⁷³

La résonance plasmonique de surface (SPR) est également utilisée comme transducteur. Cette méthode de détection mesure les variations de l'indice de réfraction au voisinage d'une interface entre un métal et le milieu étudié. La complexation de la molécule d'intérêt induit un changement de masse et donc de l'indice de réfraction. La détection de tétracyclines dans du miel a par exemple été réalisée à l'aide de cette méthode.⁷⁴

1.6.2. Techniques bio analytiques

La forte spécificité, la facilité de synthèse et de modification des aptamères sont à l'origine de leur attractivité pour des applications analytiques.

Les aptamères ont été utilisés avec différentes méthodes de séparation. De nombreuses publications évoquent de la chromatographie basée sur ces éléments de reconnaissance en tant que ligands immobilisés. Huy et *al.* ont par exemple utilisé un aptamère anti-17 β -estradiol greffé sur des billes de verre via un lien isothiocyanate afin de préconcentrer des échantillons d'eau avant une analyse par chromatographie liquide à haute performance couplée à un détecteur ultraviolet (HPLC-UV).¹⁰ Des phases stationnaires chirales composées d'aptamères immobilisés ont aussi permis la séparation d'énantiomères de l'adénosine et de la tyrosinamide par HPLC. Des aptamères sélectifs de la D-adénosine ou de la L-tyrosinamide et dont l'extrémité 5' avait été greffée avec une biotine ont été mis en présence de billes de polystyrène modifiées avec de la streptavidine. Cette dernière protéine est connue pour développer une très forte affinité pour la biotine, ce qui a permis d'immobiliser les aptamères sur les billes. Elles ont ensuite été introduites dans une colonne d'HPLC pour constituer la phase stationnaire chirale.⁷⁵

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique analytique qui exploite également les propriétés des aptamères. Cette technique permet des analyses rapides, un pouvoir de séparation important et une faible consommation de l'échantillon. De nombreuses analyses par EC utilisent une détection par fluorescence induite par laser (LIF).^{76,77} German et *al.* ont par exemple utilisé un aptamère en série ADN marqué par un fluorophore afin de quantifier l'immunoglobuline E (IgE) humaine à l'aide de cette technique. La séparation des séquences

liées ou non à l'IgE a été réalisée en moins de soixante secondes et une limite de détection de 46 pM a été atteinte.⁷⁸

Les aptamères peuvent aussi être utilisés en remplacement d'anticorps dans un test immunologique très répandu : le test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay). Ce test, conceptualisé en 1971, a pour objectif de détecter et/ou doser une protéine dans un liquide biologique. L'approche *sandwich*, qui est très répandue, fait intervenir simultanément deux anticorps se liant à l'analyte. Les puits d'une microplaque sont tapissés d'un anticorps capable de se lier spécifiquement à l'antigène d'intérêt. L'échantillon est alors déposé dans les puits et la capture spécifique de l'analyte par l'anticorps a lieu. Un anticorps de détection est alors ajouté et va se fixer à l'antigène. Un dernier anticorps, appelé traceur et capable de reconnaître l'anticorps de détection est couplé à une enzyme qui va catalyser la formation d'un produit fluorescent ou coloré permettant une détection. La quantification est alors réalisée à l'aide d'un instrument optique.⁷⁹ Des tests adaptés utilisant les aptamères et appelés ELONA (enzyme linked oligonucleotide assay) ou ELAA (enzyme linked aptamer assay) ont ensuite été développés. Drolet et *al.* ont introduits le concept d'ELONA en 1996 en utilisant un aptamère ARN marqué à la fluorescéine pour la détection de VEGF.⁸⁰

1.6.3. Applications diagnostiques et thérapeutiques

Le développement d'outils diagnostiques et thérapeutiques issus de technologies innovantes est crucial. La haute affinité et la spécificité des aptamères leur ont permis de s'imposer dans le domaine du diagnostic.^{27,57,77}

La méthode ELONA précédemment évoquée a été utilisée par Ban et son équipe afin de mettre au point un test utilisant une paire d'aptamères pour le diagnostic de la fièvre jaune.⁸¹

Les recherches dans le cadre du cancer sont nombreuses.³⁰ L'utilisation de la cell-SELEX, qui permet de sélectionner des séquences dirigées contre des cellules entières, a permis en 2019 d'identifier un nouveau biomarqueur protéique du cancer du poumon à petites cellules (SCLC) : la protéine HDLBP (high density lipoprotein binding protein). Ce cancer est récalcitrant et peu d'avancées ont lieu quant à son traitement. Une fois le biomarqueur identifié grâce à un aptamère sélectionné par cell-SELEX, des tests ont montré qu'il était possible d'inhiber la prolifération et la métastase des cellules du SCLC *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* en

atténuant son expression. Cette méthode de sélection a donc permis d'identifier un biomarqueur d'intérêt dans le traitement de cette maladie.⁸²

Avec le développement de la cell-SELEX, de plus en plus d'aptamères sont également étudiés comme agents thérapeutiques dans le traitement de certaines maladies et pour les immunothérapies.⁸³ Un médicament utilisant un aptamère a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) par la FDA (Food and Drug Administration) en 2004⁸⁴ et par la Haute Autorité de Santé (HAS) en 2006¹¹. Le Pegaptanib est composé d'un oligonucléotide dirigé contre le facteur de croissance VEGF est impliqué dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Sa forme pharmaceutique, le MACUGEN[®], a cependant reçu depuis un avis défavorable au remboursement en 2013 car le service médical rendu a été jugé insuffisant par rapport aux autres traitements disponibles pour le traitement de cette maladie.¹¹

Plusieurs traitements à base d'aptamères sont toujours en essai clinique, comme le Fovista[®] (E10030) qui est en phase trois et aussi destiné au traitement de la DMLA.^{83,85}

2. Les dommages de l'ADN

Les acides désoxyribonucléiques en conditions physiologiques sont intrinsèquement réactifs et sensibles aux modifications chimiques apportées par des agents mutagènes exogènes ou endogènes. Les études tendent à montrer que les dommages dus à des espèces endogènes sont les plus importants et en représentent environ 75 %. De plus, les enzymes responsables de la réplication et de la réparation de l'ADN (ADN polymérase), peuvent commettre des erreurs et introduire des mutations au sein du matériel génétique.

Les dommages de l'ADN peuvent prendre différentes formes comme la cassure de l'un ou des deux brins de l'ADN, l'altération d'une base, la rupture de la liaison entre la base azotée et le sucre (site abasique), ou des mésappariements de bases. Leur accumulation est fortement soupçonnée d'être liée au vieillissement.⁸⁶ Des estimations montrent que les 10^{13} cellules du corps humain subissent chaque jour des dizaines de milliers de dommages.⁸⁷

Les lésions de l'ADN qui ne sont pas réparées à temps ou qui sont trop importantes pour l'être induisent des événements de signalisation pouvant conduire à la sénescence (dégradation progressive des fonctions de la cellule), mise en cause dans le vieillissement. Elles peuvent aussi donner lieu à une instabilité du génome *via* des épimutations pouvant mener à des cancers ou à un vieillissement prématuré.⁸⁸ Or, la préservation de l'information génomique

des êtres vivants est importante pour la survie des espèces. Les cellules disposent cependant de systèmes complexes et sophistiqués permettant de réduire l'impact des conséquences désavantageuses des dommages de l'ADN.^{89,90}

2.1. Les différents types de dommages de l'ADN

La variabilité de l'ADN peut être due à différents phénomènes : des erreurs lors de la réplication de l'ADN ou l'apparition de lésions induites par des réactions chimiques. Dans ce deuxième cas, les dommages induits sont souvent classés selon leur origine : endogène ou exogène.

2.1.1. Les erreurs de réplication

Un certain nombre d'erreurs peuvent apparaître au sein d'une séquence d'ADN lors de la réplication. Des substitutions d'une base par une autre, l'insertion d'une base ou sa délétion ont lieu avec une fréquence de 10^{-6} à 10^{-8} par cellule et par génération lors de la réplication des cellules (Figure 9). En effet, des polymérases (enzymes synthétisant des chaînes de nucléotides) répliquatives de haute-fidélité (δ et ϵ) assurent la synthèse de l'ADN *via* l'insertion d'un désoxynucléotide complémentaire correct en face de la base de la matrice répliquée. Cependant, d'autres ADN polymérases peuvent effectuer cette synthèse, mais avec moins de fidélité au cours des étapes de réplication ou de réparation de l'ADN et entraîner des erreurs. Le glissement des brins peut également provoquer l'insertion ou la délétion de bases.^{89,90}

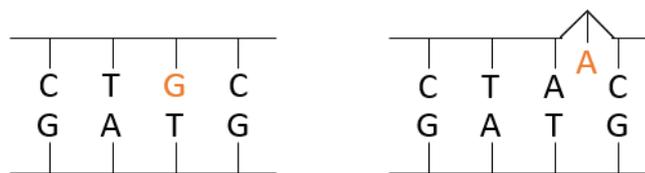


Figure 9 : Erreurs dues à la réplication de l'ADN : substitution d'une base à gauche et insertion d'une base à droite

2.1.2. Les dommages endogènes à l'ADN

Les dommages endogènes sont en grande partie dus à l'engagement de l'ADN chimiquement actif dans des réactions hydrolytiques et oxydatives avec l'eau ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS) présentes dans les cellules.

2.1.2.1. Les sites abasiques

Les sites abasiques (apuriniques ou apyrimidiques, notés AP) sont issus de l'hydrolyse spontanée ou du clivage par une ADN glycolase (lors d'un des processus de réparations des

dommages) de la liaison entre la base azotée et le sucre. Les fréquences de dépyrimidination et de dépurination sont estimées respectivement à 10^2 et 10^4 par cellule et par jour.⁸⁶ Ces lésions sont intrinsèquement instables et sont facilement transformées en coupure d'un simple brin à la suite d'une β -élimination éliminant la liaison phosphodiester restante (Figure 10).⁸⁹

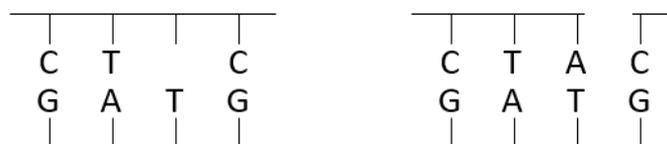


Figure 10 : Lésion de l'ADN : un site abasique à gauche et une cassure du simple brin à droite

2.1.2.2. Les dommages dus à la méthylation

Des résidus méthylés peuvent être générés spontanément par la S-adenosylméthionine (SAM), qui est normalement impliquée comme donneur de groupements méthyles dans d'autres réactions de méthylation dans les cellules. Jusqu'à 4000 résidus de N7-méthylguanine, 600 résidus de N3-méthyladénine et 10-30 résidus de O6-méthylguanine par cellule et par jour peuvent être observés chez les mammifères (Figure 11). D'autres agents endogènes (la choline ou la triméthylglycine) peuvent aussi générer des résidus méthylés.⁸⁹

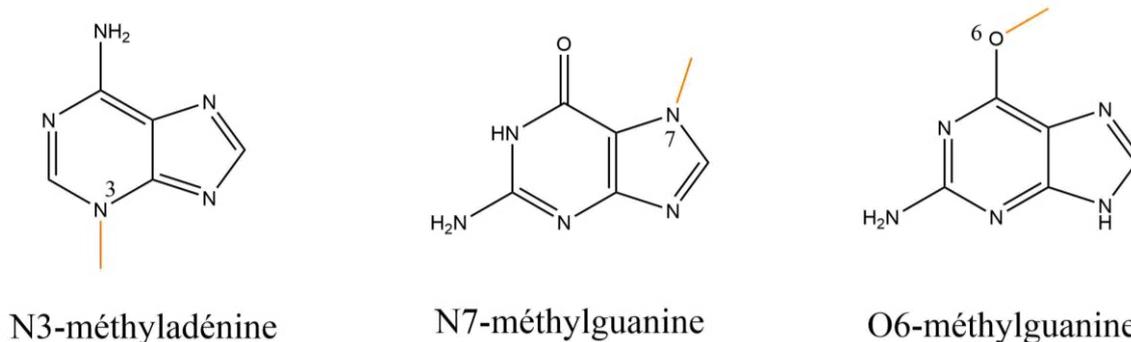


Figure 11 : Structures de lésions de méthylation de l'ADN

2.1.2.3. Les dommages dus à la désamination spontanée

Des désaminations spontanées des bases azotées de l'ADN peuvent également avoir lieu. Les cytosines, adénines et guanines peuvent spontanément perdre leur amine exocyclique et former respectivement l'uracile, l'hypoxanthine et la xanthine (Figure 12). Ces désaminations sont plus fréquentes dans l'ADN simple brin que dans le double brin, et ont donc particulièrement lieu lors des étapes de réplication, transcription ou recombinaison de l'ADN.^{86,89}

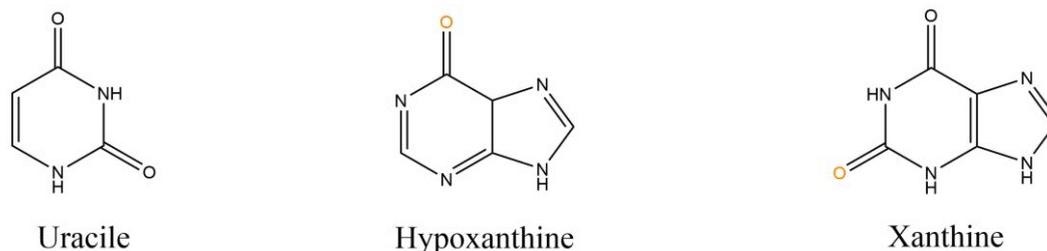


Figure 12 : Structures de lésions de l'ADN issues de désaminations spontanées

2.1.2.4. Les lésions oxydantes

L'oxydation de l'ADN est un phénomène fréquent qui mène à l'apparition de nombreuses lésions. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont notamment des sous-produits classiques de la chaîne de transport des électrons lors de la respiration cellulaire des espèces aérobies. Elles assurent des fonctions importantes comme messagers cellulaires et jouent un rôle de défense lors de l'invasion du système immunitaire par des pathogènes. Lorsque leur nombre devient trop élevé, les ROS peuvent causer jusqu'à environ cent types de lésions oxydantes des bases et du 2'-désoxyribose.⁸⁹

Les ROS les plus courantes sont le radical superoxyde $O_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle HO^{\bullet} . Ce dernier est le plus réactif et capable d'endommager l'ADN, les lipides ou les protéines en s'ajoutant notamment sur les doubles liaisons ou en attaquant les sucres à proximité. Cette espèce peut par exemple entraîner l'ouverture du cycle imidazole d'une purine et former une structure formamidopyrimidine ou attaquer les positions C5 et C6 de la thymine et former un glycol de thymine (Figure 13).

L'hydroxylation du carbone en position 8 de la guanine forme la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoguanine ou OG) (Figure 13). Cette lésion oxydative de l'ADN est biologiquement significative avec une fréquence de formation d'environ 10^3 par cellule et par jour.^{86,91} Elle peut ensuite être à nouveau oxydée car elle possède un potentiel d'oxydation faible (voir page 46).

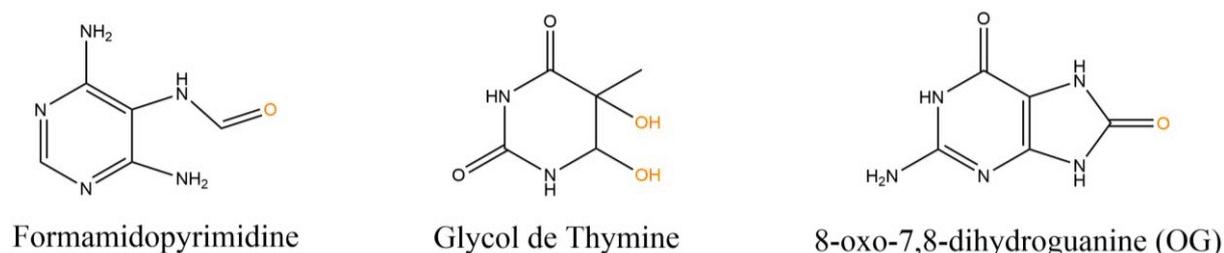


Figure 13 : Structures de lésions oxydatives de l'ADN

Enfin, les ROS peuvent provoquer la cassure du simple brin d'ADN avec une fréquence d'environ 2300 cassures par cellule et par heure chez les mammifères. Cette lésion fragilise le squelette sucre-phosphate de l'ADN.

Le développement de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer, les maladies d'Alzheimer ou de Parkinson a été lié à l'accumulation de ROS.^{87,89}

2.1.3. Les dommages à l'ADN exogènes

Différentes sources exogènes peuvent aussi être responsables de lésions de l'ADN.

2.1.3.1. Les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants, constitués des rayons alpha, bêta, gamma, neutrons et X représentent une source exogène de lésions particulièrement présente dans notre environnement car leurs sources sont multiples (roches, rayonnement cosmique ou matériel médical).⁸⁹

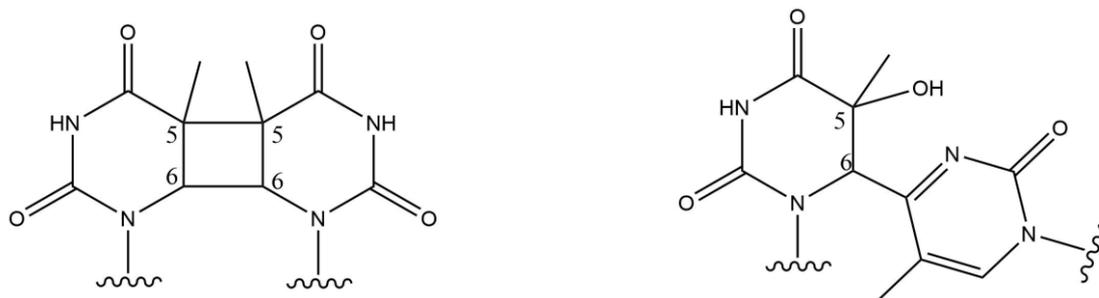
L'ADN peut être endommagé par l'action de ces rayonnements ionisants de façon directe ou indirecte car ils favorisent la formation de radicaux réactifs tels que HO[•]. Le spectre des dommages causés par ces rayonnements s'apparente à celui des espèces ROS avec notamment la formation de glycols de thymine ou d'OG (Figure 13), mais également de cassures du simple brin et du double brin.

2.1.3.2. Les ultraviolets

Un autre type de rayonnement peut causer de lésions de l'acide désoxyribonucléique : le rayonnement ultraviolet (UV). Classés en trois catégories (UV-A de 320 à 400 nm, UV-B de 290 à 320 nm et UV-C de 190 à 290 nm), ces rayonnements peuvent être absorbés directement ou indirectement par les bases de l'ADN. L'absorption maximale se fait à 260 nm, donc dans les UV-C. Elle peut être directe ou indirecte. Dans le cas indirect, des photosensibilisateurs endogènes (flavines) ou exogènes (psoralène) peuvent être excités par des UV et réagir avec l'ADN, ou leur retour à un état énergétique stable peut être accompagné de formation de ROS.

Les UV-C provoquent le plus souvent des liaisons covalentes entre deux pyrimidines adjacentes, menant à la formation de deux photoproduits majoritaires : les dimères cyclobutane-pyrimidine (CPD) et les pyrimidines (6 - 4) pyrimidones ((6 - 4) PP) (Figure 14).^{87,92}

Ces dimères, notamment les (6-4)PP, ont tendance à déformer la double hélice en raison de leur volume important.



Dimère cyclobutane-pyrimidine (CPD)

Pyrimidine (6 - 4) pyrimidone

Figure 14 : Structures de photoproduits générés par les UV dans le cas de deux thymines adjacentes

La formation de dimères de pyrimidine peut également avoir lieu à la suite de l'exposition à des UV-B, mais moins efficacement qu'avec les UV-C.

Les UV-A peuvent quant à eux induire la formation d'adduits à l'ADN, d'OG, de dimères de pyrimidine ou encore de cassures de brins d'ADN.^{89,93} Un traitement associant une exposition aux UV-A et l'ingestion du photosensibilisateur psoralène est indiqué dans le traitement de certaines maladies dermatologiques comme le psoriasis ou l'eczéma. Cette molécule est capable de s'intercaler de façon non covalente entre les paires de bases de l'ADN et induire après exposition aux UV-A des liaisons transversales entre brins (ICL) au sein de l'hélice provoquant une apoptose (mort programmée de la cellule).⁹⁴

2.1.3.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés carcinogènes largement répandus dans l'environnement. Ils sont principalement issus des gaz d'échappement des voitures, de la combustion des énergies fossiles ou de la fumée du tabac. Les principaux HAP sont le naphthalène, l'anthracène, le pyrène et ses dérivés (Figure 15). Le benzo(a)pyrène peut être activé à la suite de sa métabolisation principalement dans le foie et générer un cancérigène puissant : le BPDE (benzo[a]pyrène diol époxyde). Ses isomères appelés (+)-anti-BPDE et (-)-anti-BPDE sont capables de s'intercaler dans l'ADN, puis de former des adduits à l'ADN *via* une liaison entre leur carbone en position 10 et la position N2 exocyclique d'une guanine.^{87,89,95}

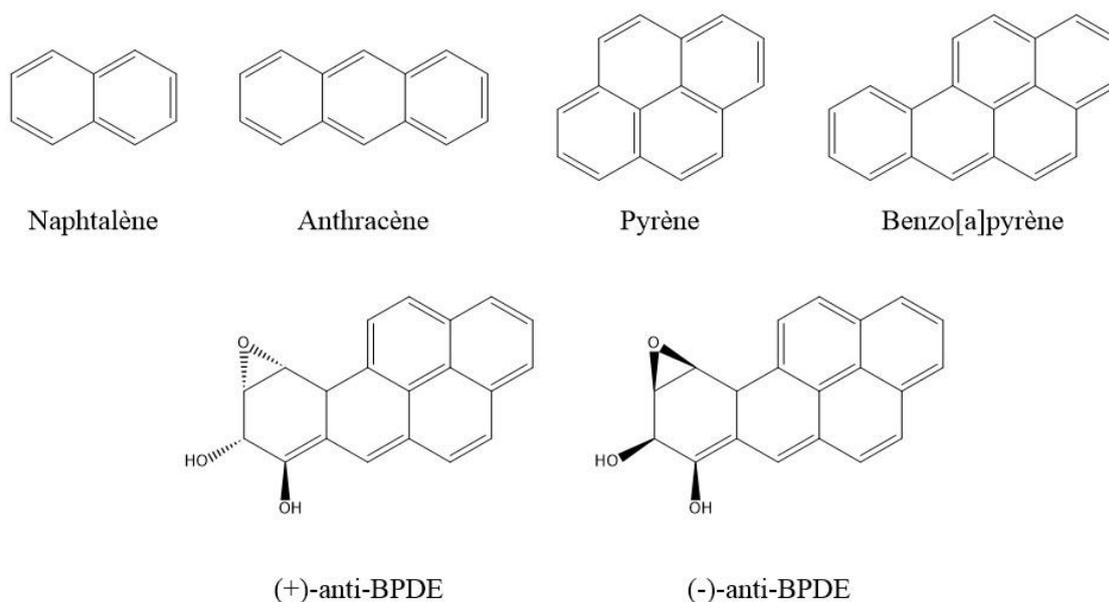


Figure 15 : Structures des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) courants et des isomères du benzo[a]pyrène diol époxyde (BPDE)

2.1.3.4. Les amines aromatiques

Des amines aromatiques comme le 2-aminofluorène sont des causes exogènes de lésions de l'ADN. Elles sont produites par la fumée de cigarette, certains colorants ou encore des pesticides et peuvent s'attaquer au carbone en position huit de la guanine après leur conversion en agent alkylant par le système P450. Ces lésions peuvent être à l'origine de substitutions de bases et de mutation en raison de leur forte persistance.⁸⁹

2.1.3.5. Les toxines

L'homme peut être exposé à des toxines par son alimentation notamment lors de l'ingestion de fruits à coque, de lait ou de céréales. L'aflatoxine B1, qui est produite par certains moisissures, est un cancérigène hépatique très puissant. Après avoir été métabolisée, elle peut se lier au N7 de guanines et former un dérivé capable d'affaiblir la liaison glycosidique et donc d'entraîner une dépurination.^{87,89}

2.1.3.6. Les agents alkylants

Des agents alkylants peuvent être employés dans le traitement de certaines maladies. Le témozolomide, utilisé pour le traitement de certains cancers cérébraux, est considéré comme un agent alkylant. Il perturbe la croissance rapide des cellules cancéreuses en alkylant les positions O6 et N7 des guanines.⁹⁶

2.2. Les mécanismes de réparation

Des dommages de l'ADN sont produits en permanence et les cellules ont donc développé des mécanismes de signalement, réparation et/ou de contournement des dommages. Ces mécanismes sont souvent désignés sous l'appellation de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et jouent un rôle fondamental dans le maintien de la viabilité cellulaire et dans la conservation de l'information génétique. Ils permettent, selon les cas, une réparation des cellules endommagées ou leur apoptose. Le dysfonctionnement des voies de la DDR peut entraîner des conséquences néfastes sur la santé, comme un vieillissement prématuré, une prédisposition au cancer ou une déficience immunitaire.^{89,90,97} L'étude et la compréhension de ces mécanismes sont donc essentiels et ont fait l'objet d'un prix Nobel de chimie obtenu en 2015 par Tomas LINDHAL, Paul MODRICH et Aziz SANCAR.⁹⁸

2.2.1. La réparation des dommages des bases de l'ADN

2.2.1.1. La réparation par réversion

Certaines lésions de l'ADN comme les bases alkylées peuvent être réparées par inversion lors d'un mécanisme à une étape. Cette réparation est par exemple possible grâce à la O6-méthylguanine méthyltransférase qui répare les lésions alkylées sur l'oxygène des bases de l'ADN en transférant leur groupement alkyle à son résidu cystéine. L'absence d'expression de cette enzyme a par ailleurs été associée à certains cancers.^{89,99,100}

2.2.1.2. La réparation par excision de base

D'autres mécanismes de réparation plus complexes ont aussi été identifiés. La réparation par excision de base (BER) intervient dans la correction de dommages oxydatifs ne menant pas à une distorsion importante de la structure de l'ADN comme l'OG, la désamination, l'alkylation et les sites abasiques. Le mécanisme se déroule en plusieurs étapes. Une ADN glycolase élimine tout d'abord la base endommagée en clivant la liaison N-glycosidique qui la lie au désoxyribose et crée un site abasique. Différentes glycolases sont impliquées selon le type de dommages à réparer et au moins onze ont été identifiées dans le cas des mammifères. L'action d'une endonucléase (enzyme capable de couper un acide nucléique au milieu de la chaîne) mène ensuite à l'élimination du site abasique en clivant la liaison phosphodiester en 5'. Les fonctions restant aux extrémités 3' et 5' après la suppression du site AP dépendent de l'endonucléase impliquée. L'espace libre est alors rempli par une ADN polymérase qui se sert

de la base du brin opposé comme matrice. Enfin, le brin est scellé à l'aide d'une ADN ligase (enzyme capable de catalyser la liaison entre deux molécules).^{89,101,102}

2.2.2. La réparation des dommages volumineux des bases de l'ADN

2.2.2.1. La réparation par excision de nucléotide

Les lésions plus volumineuses qui ont tendance à distordre significativement l'hélice de l'ADN, telles que les (6-4)PP, les CPD ou les adduits du benzo[a]pyrène sont quant à elles éliminées par la voie de réparation par excision de nucléotide (NER). Ce processus multiprotéique possède deux variantes : la NER globale du génome (GG-NER) et la NER couplée à la transcription (TC-NER).

La reconnaissance de la zone à éliminer n'est pas effectuée par les mêmes protéines selon le mécanisme. Pour la GG-NER, la protéine XPC (xeroderma pigmentosum, groupe C) complexée avec la protéine hHR23/RAD23B et le complexe UV-DDB (ultraviolet-damaged DNA damage-binding protein) permettent la reconnaissance de la portion d'ADN problématique en détectant la présence d'un simple brin d'ADN apparu à cause de la distorsion de l'hélice. Cette étape est effectuée par une ARN polymérase bloquée par la lésion dans le cas de la TC-NER. Les deux voies convergent ensuite vers le même mécanisme au cours duquel une hélicase (enzyme capable d'ouvrir le double brin de l'ADN) bidirectionnelle permet le déroulement et l'ouverture de la région d'ADN à éliminer. Le brin est ensuite incisé sur une portion d'environ 25 à 30 nucléotides et l'espace résultant est comblé grâce à une réplication classique de l'ADN utilisant le brin non endommagé comme matrice. Le brin est finalement scellé à l'aide d'une ADN ligase.

Un dysfonctionnement de ce mécanisme de réparation de l'ADN a été associé à plusieurs syndromes humains tels que le Xeroderma Pigmentosum ou maladie des enfants de la Lune (prédisposition aux cancers de la peau et sensibilité excessive de la peau aux UV).^{87,89,90,103}

2.2.2.2. La réparation des mésappariements de l'ADN

La voie de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR) permet la correction des mésappariements consécutifs à des substitutions, des insertions ou des délétions de bases survenues au cours de la réplication. De nombreuses protéines interviennent au cours du processus de réparation. Le dérèglement de cette voie de réparation des mésappariements peut être lié au cancer du côlon héréditaire sans polypose.^{89,104,105}

2.2.2.3. La réparation des liaisons transversales entre brins

Les liaisons transversales entre brins (ICL) sont des lésions cytotoxiques liant covalamment deux bases de brins complémentaires d'ADN. Elles peuvent empêcher la transcription et la réplication en bloquant la séparation des brins d'ADN et être causées par des agents de réticulation ou alkylants et par certaines chimiothérapies.

La reconnaissance et la réparation de ces lésions sont assurées par les protéines de l'anémie de Fanconi. Une défaillance de ce mécanisme peut entraîner cette maladie autosomique récessive dont les symptômes principaux sont une fréquence élevée d'anomalies hématologiques et congénitales et une prédisposition générale aux cancers. La réparation de ces ICL est étudiée afin de tenter de guérir cette maladie, mais également car de nombreuses chimiothérapies utilisent des agents induisant des liaisons transversales entre brins. Or, l'augmentation de la résistance des cellules cancéreuses à ces traitements pourrait être contrée par l'utilisation de nouveaux inhibiteurs de réparation.

Au cours de la voie principale de réparation, l'ICL bloque la réplication de l'ADN en cours. Des nucléases entraînent des incisions de part et d'autre de la lésion, son décrochement et donc la présence d'une lacune sur un des brins. Des polymérases vont ensuite assurer la nouvelle synthèse d'ADN en contournant la lésion et en utilisant l'autre brin comme matrice.^{89,106,107}

2.2.3. La réparation des cassures de l'ADN

2.2.3.1. La réparation des cassures du simple brin

Les cassures du simple brin entraînent des conséquences délétères comme l'interruption de la réplication de l'ADN ou l'activation d'un facteur d'induction de l'apoptose dans les cellules. Le mécanisme de réparation de ces dommages existe sous deux formes : la voie courte et la voie longue. Pour la voie longue, ces cassures sont détectées par la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1). Les lambeaux sont alors éliminés par l'endonucléase, FEN1 (flap endonucléase 1) à l'aide de diverses protéines. Les polymérases δ , ϵ ou β incorporent alors 2 à 12 nucléotides afin de réparer la cassure. Dans le cas de la voie courte, les cassures du simple brin générées au cours du mécanisme BER sont reconnues par l'APE1 (endonucléase apurinique-apyrimidique 1). La polymérase POL β permet ensuite l'incorporation d'un seul nucléotide. Des ligases permettent enfin de sceller les brins.^{89,91,108}

2.2.3.2. La réparation des cassures du double brin

Les cassures double-brin de l'ADN sont des dommages cytotoxiques menaçant l'intégrité du génome. Leur réparation est assurée par un mécanisme complexe qui se décline en deux voies principales : la recombinaison homologue (HR) et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).

Dans le mécanisme NHEJ, la cassure du double-brin est réparée de façon non conservative. Cela signifie que la continuité de l'ADN est rétablie, mais pas selon la séquence initiale, ce qui peut conduire à un changement de l'information génétique.^{89,109}

Au cours de la recombinaison homologue, la molécule d'ADN complémentaire provenant de la chromatine sœur non lésée est utilisée pour la réparation. Ce processus est quant à lui considéré comme exempt d'erreurs.

Une mauvaise réparation des cassures double-brin peut être à l'origine de jonctions inappropriées des brins d'ADN, qui conduisent à des translocations chromosomiques et des cancers.¹¹⁰

2.3. La base 8-oxo-7,8-dihydroguanine

2.3.1. Formation et caractéristiques

Ce projet est centré sur un des dommages oxydatifs de l'ADN : la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (OG). Cette lésion découle le plus souvent de l'action de ROS telles que $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} ou d'oxydants à un électron sur une guanine. Ces espèces peuvent être formées par des sources endogènes ou exogènes comme l'exposition à des radiations ionisantes, à la fumée de cigarette ou encore à certaines toxines. L'oxydation des bases de l'ADN peut avoir lieu directement au sein des brins d'ADN, ou indirectement dans le pool de nucléotides qui seront introduits dans le génome durant les étapes de réplication ou de réparation de l'ADN. La guanine est la base la plus facilement oxydable des quatre bases de l'ADN. L'OG est une lésion mutagène en raison de sa capacité à former en plus des paires de bases de type Watson-Crick avec une cytosine, des paires de bases de type Hoogsteen avec une adénosine (Figure 16). Ces appariements peuvent induire des transversions G:C → T:A à la suite de l'incorporation d'une base A en face d'une OG au cours de la réplication. Cette mutation est très fréquente dans les carcinomes humains.^{111,112}

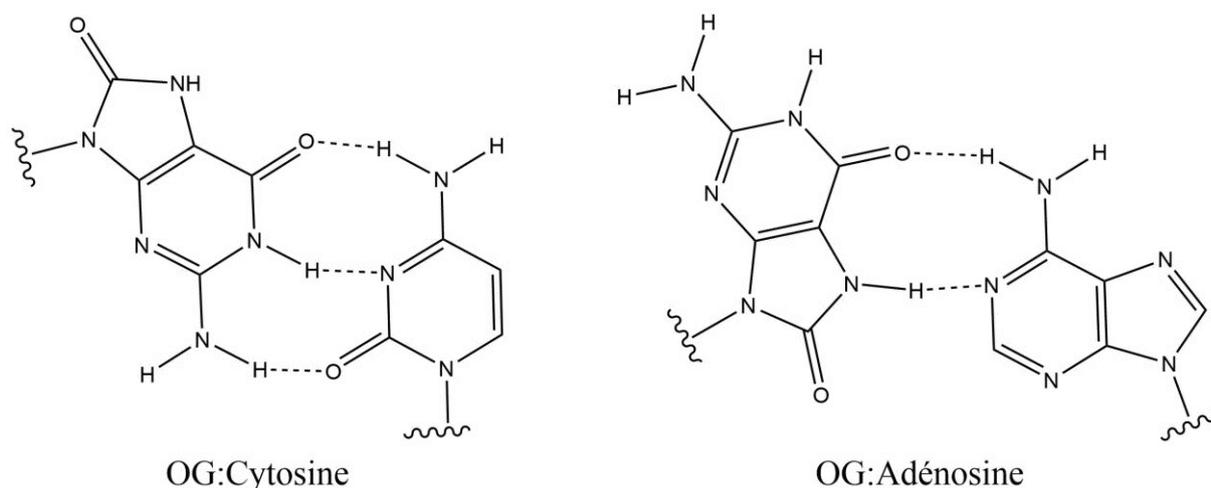


Figure 16 : Structures de paires de bases Watson-Crick (à gauche) et de Hoogsteen (à droite) impliquant une OG

Lorsque l'OG est localisée dans un brin d'ADN, la réparation peut être effectuée grâce au mécanisme BER. Les paires de bases OG:C peuvent être repérées et éliminées grâce à une ADN glycosylase spécifique : OGG1. Cette enzyme détecte et évince la lésion qui est ensuite excrétée dans les urines. La glycolase MYH excise les résidus A incorporés par erreur en face des OG au cours des réplifications afin d'éviter les mutations. Le pool de nucléotides utilisé pour les réplifications peut quant à lui être assaini grâce à la glycolase MTH qui hydrolyse les 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosines triphosphate (8-oxodGTP) en 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosines monophosphate (8-oxodGMP) qui seront ensuite éliminés via les urines.

L'intérêt de quantifier l'OG est croissant. En effet, elle est considérée comme un biomarqueur des dommages oxydatifs de l'ADN et est utilisée afin d'étudier le stress oxydatif subi par un organisme. Elle peut également aider à évaluer le risque, diagnostiquer ou prédire l'impact du traitement de diverses maladies. La quantification peut être faite dans l'urine, le sang, les tissus et la salive.

Les techniques analytiques couramment employées pour quantifier l'OG dans les matrices biologiques sont la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à une détection électrochimique (ECD), ou avec la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC-MS), la chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), le dosage immuno-enzymatique (ELISA) et plus récemment les capteurs électrochimiques.^{87,111,113}

2.3.2. L'oxydation de la 8-oxoguanine

La lésion 8-oxoguanine peut à son tour subir une oxydation car son potentiel d'oxydation, estimé à 0,58 V (vs l'électrode standard à hydrogène, ESH), est bien inférieur aux potentiels des bases normales de l'ADN supérieurs à 1V/ESH.^{87,114} Cette réaction d'oxydation a été mise en évidence suite à l'action de différents oxydants à un électron¹¹⁴, de l'oxygène singulet, de mécanismes photochimiques ou du peroxydant.¹¹⁵ Les produits formés dépendent de la méthode d'oxydation employée. L'oxydation de l'OG dans des duplexes d'ADN par le sel d'iridium Na_2IrCl_6 , dont le potentiel d'oxydation est estimé à 0,9 V (vs ESH) a été observée par Burrows et son équipe.¹¹⁴ Ces chercheurs ont aussi montré que l'oxydation d'oligonucléotides contenant une 8-oxoguanine par Na_2IrCl_6 menait à deux produits majoritaires dont les masses correspondaient à une perte de 10 Da ou un gain de 16 Da.¹¹⁶ Un mécanisme en accord avec ces masses et au cours duquel un intermédiaire 5-OH-OG peut s'hydrater et se décarboxyler en guanidinohydantoïne (Gh), ou s'isomériser en spiroiminodihydantoïne (Sp), a été proposé (Figure 17).¹¹⁷ L'isomérisation de Gh en iminoallantoïne (Ia) a pu être observée.¹¹⁸ L'utilisation d'eau contenant un isotope de l'oxygène H_2^{18}O comme solvant a montré l'incorporation quantitative de cet atome ^{18}O au sein du produit Sp d'oxydation de nucléoside triacétate, et a ainsi aidé à confirmer sa structure.¹¹⁷

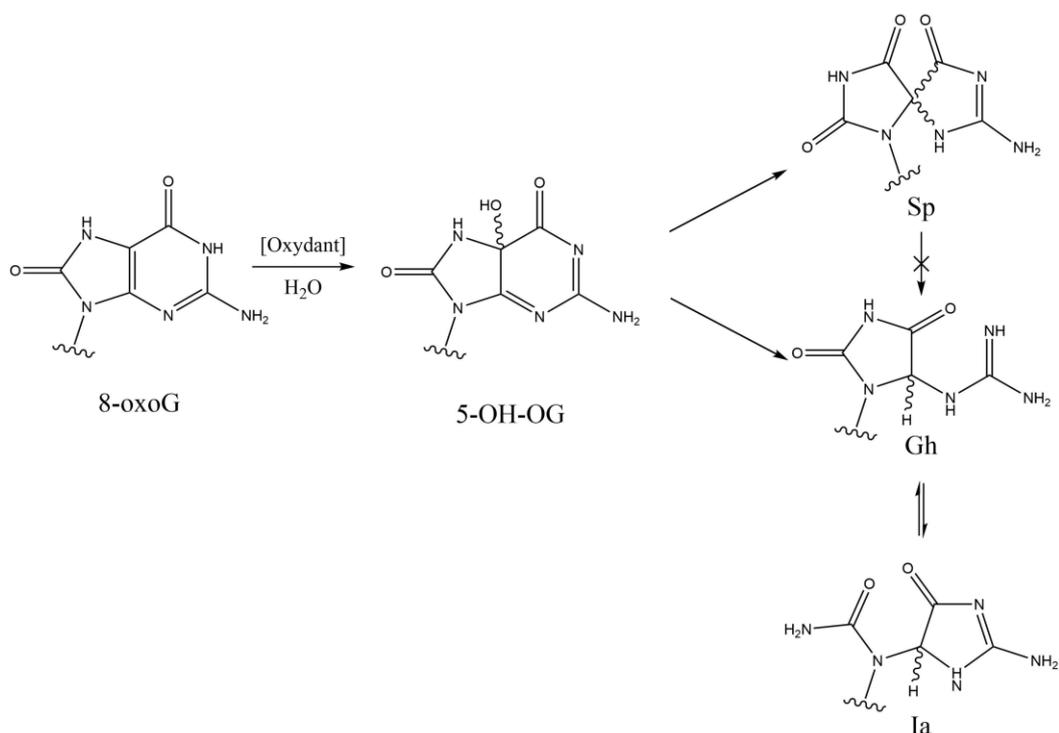


Figure 17 : Structures des produits d'oxydation de la 8-oxoguanine générés par un oxydant à un électron¹¹⁹

La répartition de la proportion des produits d'oxydation de la 8-oxoguanine peut être délicate à prévoir car elle est influencée par différents paramètres comme le type de substrat, la température ou le pH.¹¹⁹ L'oxydation d'un nucléoside à pH 7 et 22 °C mène à la formation quantitative d'un produit majoritaire : le produit spirocyclique Sp.¹¹⁷ Ce produit est également majoritaire lors de l'oxydation d'un oligonucléotide simple brin à 50°C et pH 7.¹¹⁸ Des proportions de 55 % et 45 % sont attendues pour la formation de Gh/Ia et Sp respectivement dans le cas d'un simple brin à 22 °C et pH 7.¹¹⁹

2.4. Pontages avec l'ADN à la suite d'une oxydation

Comme cela a été évoqué précédemment, des pontages covalents entre la molécule d'ADN et un large type de molécules peuvent se produire à la suite d'une oxydation. Le pontage peut être initié à la suite de l'oxydation au niveau de la protéine qui sera ensuite attaquée par un groupement nucléophile de l'ADN. Il est également possible qu'un résidu protéique réagisse avec une base de l'ADN ayant subi l'oxydation.¹²⁰ La formation de pontages peut se faire sur la molécule d'ADN native¹²¹, la guanine étant un site privilégié, ou sur des lésions comme la 8-oxoguanine.

2.4.1. Avec l'ADN natif

Des pontages covalents formés entre l'ADN et des protéines, communément appelés DPC pour *DNA-protein crosslinks*, ont été mis en évidence à de multiples reprises. Les DPCs sont le plus souvent formés à la suite de l'exposition à des agents endogènes, exogènes ou thérapeutiques. Ils peuvent posséder des caractéristiques assez différentes suivant la taille, la fonction biologique ou les propriétés physicochimiques des protéines piégées. Les protéines peuvent être liées à une base ou à la partie osidique. Selon le mécanisme de formation, la nature du pontage peut varier. Il est cependant possible de les classer selon la façon dont la protéine est liée à l'ADN et selon le type de cassure du brin au niveau du pontage. Quatre groupes sont généralement identifiés.

Le type 1 correspond à la liaison covalente entre une protéine et un brin d'ADN ininterrompu ne comportant pas de cassure. Ce type représente la forme la plus courante de DPCs formés en conditions physiologiques et peut être produit par des agents physiques tels que les UV ou les radiations ionisantes, ou chimiques (aldéhydes...).^{122,123} Une ou plusieurs enzymes sont liées à l'ADN dans les DPCs de types 2, 3 et 4. Les pontages de type 2 sont constitués d'une

topoisomérase I liée à l'extrémité 3' d'une cassure simple brin de l'ADN. Le type 3 implique quant à lui deux topoisomérases II, chacune étant fixée à une extrémité 5' d'une cassure du double brin. Les liaisons formées sont de type tyrosinyl-phosphodiester. L'ADN polymérase β impliquée dans la voie de réparation BER est liée en position 5' d'une cassure simple brin dans le type 4.

Des radicaux hydroxyles générés par les radiations ionisantes ont permis la formation d'adduits entre la thymine et la tyrosine en solution aqueuse.¹²⁴ Des pontages entre un oligonucléotide TGT et une lysine d'un tripeptide KKK ont été détectés et caractérisés à la suite de la photooxydation par la riboflavine de la guanine.¹²⁵ L'étude de l'impact des DPCs dans les cellules est délicate car les agents couramment utilisés afin de les générer induisent le plus souvent d'autres dommages et compliquent ainsi leur identification. Elle est cependant nécessaire car les DPCs sont des lésions de l'ADN particulièrement volumineuses pouvant donc altérer sa réplication, sa transcription ou sa réparation en raison de la gêne stérique provoquée.

2.4.2. Avec la 8-oxoguanine

Burrows et son équipe ont réussi à générer des pontages covalents entre l'enzyme de réparation MutY d'*Escherichia coli* et des oligomères duplexes contenant une base 8-oxoguanine.^{123,126} L'utilisation du complexe $[\text{IrCl}_6]^{2-}$, oxydant à un électron, a entraîné la formation de DPCs pour les duplexes contenant une base 8-oxoguanine, mais pas pour ceux n'en contenant pas. L'addition d'une lysine K de cette enzyme est supposée se faire au niveau de la position C5 de la base oxydée.

D'autres travaux de cette équipe ont mis en évidence la formation de DPCs entre des oligonucléotides contenant des OG et la protéine fixant l'ADN simple brin (SSB) d'*Escherichia coli* via une suroxydation de bases 8-oxopurines.¹ Différents oxydants ont été utilisés, dont Na_2IrCl_6 qui s'est révélé particulièrement efficace. Les structures proposées pour les produits formés sont représentées en Figure 18 et ont été déterminées à l'aide d'un modèle de pontages avec des acides aminés, et notamment une lysine.

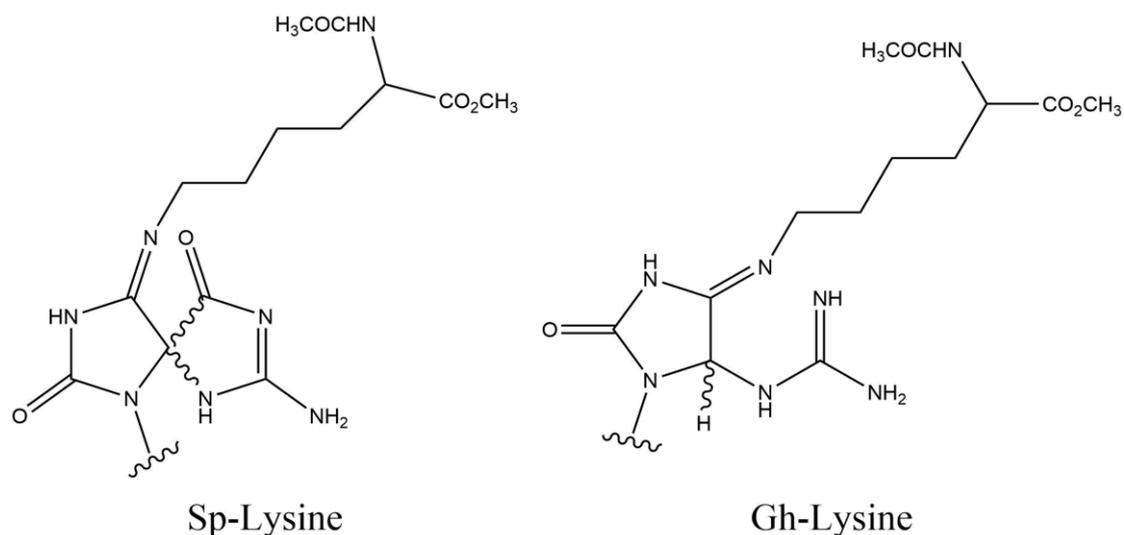


Figure 18 : Structures proposées pour les pontages entre une lysine et une 8-oxoguanine (adaptées de¹²⁶)

Une structure tricyclique a également été mise en évidence à la suite de l'addition nucléophile en position C5 puis C4 du motif phénol d'une tyrosine sur une 8-oxoguanine suroxydée.¹²⁷

3. Les différents systèmes aptamère-cible étudiés

Différents aptamères ont été utilisés au cours de ce projet.

3.1. Le système anti-L-tyrosinamide

La L-tyrosine (L-Y) un acide aminé protéinogène impliqué dans la synthèse de différents neurotransmetteurs.¹²⁸ La L-tyrosinamide (L-Ym) est un dérivé de cette molécule (Figure 19) :

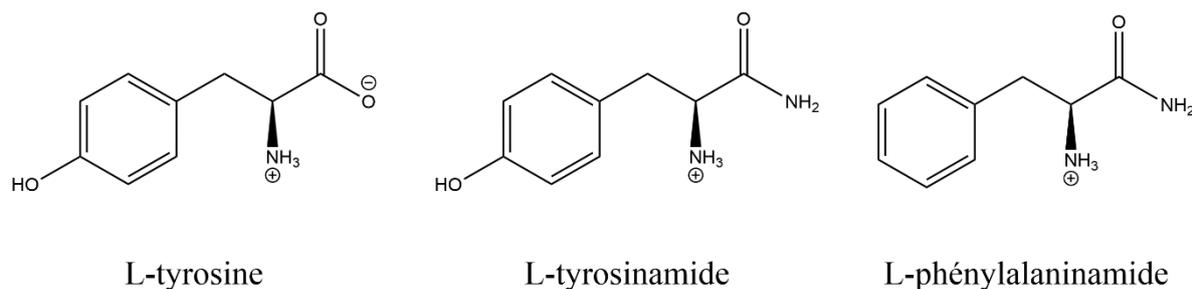


Figure 19 : Structures de la L-tyrosine, de la L-tyrosinamide et de la L-phénylalaninamide à pH physiologique

Vianini *et al.* ont identifié un aptamère en série ADN capable de reconnaître la L-tyrosinamide.¹²⁹ La sélection a été réalisée avec une banque d'environ 10^{14} oligonucléotides en série ADN constitués de quatre-vingt-seize bases. La partie aléatoire centrale contenait soixante nucléotides. Une colonne de chromatographie d'affinité contenant de la L-Ym greffée par son amine primaire au groupement époxyde d'une résine d'agarose a été utilisée. Après

une étape de sélection négative permettant d'éliminer les séquences affines développant une affinité pour la résine, la banque d'oligonucléotides a été incubée dans la colonne. L'élution des séquences affines pour la cible d'intérêt a été faite à l'aide de L-Ym libre. Une contre sélection a été réalisée avec la L-phénylalaninamide. Quinze cycles de SELEX ont été réalisés et ont permis d'obtenir vingt-deux clones. Il a été possible d'identifier deux motifs conservés et des alignements ont amenés à une classification des clones : la première famille s'appuie sur la répétition d'un motif de trente-huit bases, la deuxième sur un motif de cinquante nucléotides et la troisième ne contient pas de motif répété. Les motifs se sont avérés complémentaires et deux séquences contenant les trente-huit bases d'intérêt ont été utilisées pour une détermination de constante de dissociation du complexe avec la cible par dialyse à l'équilibre ($45 \pm 4 \mu\text{M}$ pour le meilleur clone).

Une étude a ensuite été réalisée par Challier *et al.*¹³⁰ afin d'obtenir des informations complémentaires sur le processus de complexation de la L-Ym. Cette étude multianalytique a permis d'identifier une séquence minimale pour la reconnaissance de la cible. Une séquence de quarante-neuf nucléotides dérivée de celle sélectionnée par Vianini *et al.* a été tronquée aux extrémités 5' et 3', ce qui a montré que la suppression de la base cytosine terminale en 3' suffisait à perdre totalement l'affinité. L'extrémité 5' a pu être réduite de façon plus importante, jusqu'à obtenir un aptamère de vingt-trois bases (5'- TGT GGT GTG TGA GTG CGG TGC CC-3'). Cette séquence possède une constante de dissociation plus faible que celle de l'aptamère non raccourci, sûrement car l'extrémité 5' non essentielle à la reconnaissance entraînait une gêne stérique. Des analyses par titrage calorimétrique isotherme (ITC) à 15 °C sur des séquences non marquées ont donné un K_d de $0,63 \pm 0,06 \mu\text{M}$ pour le complexe aptamère/L-Ym pour la séquence de quarante-neuf bases, et de $0,19 \pm 0,02 \mu\text{M}$ pour celle de vingt-trois bases. Le reste de l'étude a montré une dissymétrie entre les deux extrémités dans leur implication pour la reconnaissance. Les résultats obtenus semblent indiquer que le complexe L-Ym-aptamère se forme par un mécanisme d'ajustement induit (induced-fit mechanism) initié à l'extrémité 5'. Cet aptamère est énantiométrique car la D-tyrosinamide n'est pas reconnue.⁶⁷ Il n'est pas structuré en absence de cible mais adopte une structure qui n'a pas été identifiée en présence de L-Ym.¹³¹

3.2. Le système anti-L-argininamide

La L-arginine (L-R) est l'un des acides aminés composant les protéines. Elle est souvent employée comme additif afin d'éviter leur agrégation et augmenter leur rendement de repliement.¹³²

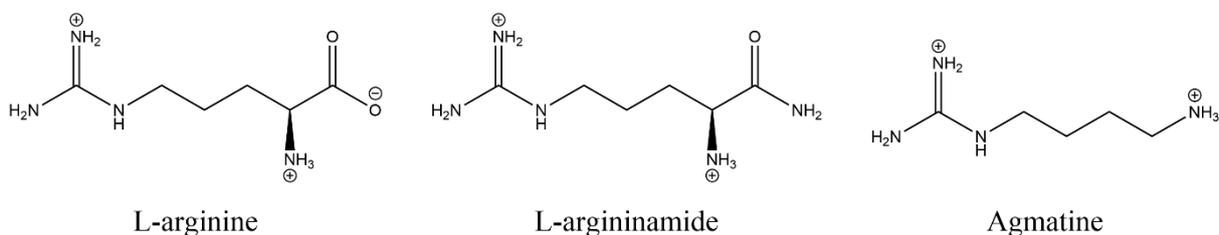


Figure 20 : Structures de la L-arginine, de la L-argininamide et de l'agmatine à pH physiologique

Harada et Frankel ont réussi à sélectionner deux oligonucléotides en série ADN capables de reconnaître l'arginine.⁴ La banque utilisée lors de la sélection était composée de 2×10^{11} séquences d'ADN différentes de soixante-cinq bases, chacune ayant une partie aléatoire centrale de trente nucléotides. Une colonne contenant de l'arginine immobilisée par l'intermédiaire du groupe α -amino à une résine d'agarose (activée par du bromure de cyanogène CNBr) a été utilisée pour la sélection. Un gradient de NaCl a permis d'éluer à des concentrations différentes les séquences affines ou non affines. Quarante-huit séquences ont été séquencées et vingt étaient uniques. Une part importante des clones était composée d'un repliement en épingle à cheveux comportant une boucle de dix nucléotides et sept nucléotides conservés au sein de la séquence. Un autre motif commun riche en purines, et notamment en guanines a également été repéré. La modification de certains nucléotides conservés au sein et en dessous de la boucle de deux clones en conformation hairpin a montré l'importance de ceux-ci dans la reconnaissance de l'arginine. Le raccourcissement des séquences a permis d'identifier la région de l'aptamère nécessaire à la complexation. Le clone en hairpin composé de vingt-quatre bases a été sélectionné dans le cadre du projet de cette thèse et il a été montré qu'il subit un changement de conformation lors de la fixation de la cible.¹³³ Des constantes de dissociation apparentes ont pu être calculées par dichroïsme circulaire. Le K_d est estimé à 2,5 mM pour la L-arginine et la D-arginine montrant que cet aptamère n'est pas énantiosélectif. L'aptamère a démontré une affinité environ vingt fois plus importante pour deux analogues de la cible : la L-argininamide (L-Rm) et l'agmatine (Figure 20). Le pKa du groupement amino de la L-Rm est estimé à 7,4.¹³⁴

La RMN a permis de proposer des structures du complexe aptamère/L-Rm avec la séquence composée de 24 bases.⁵

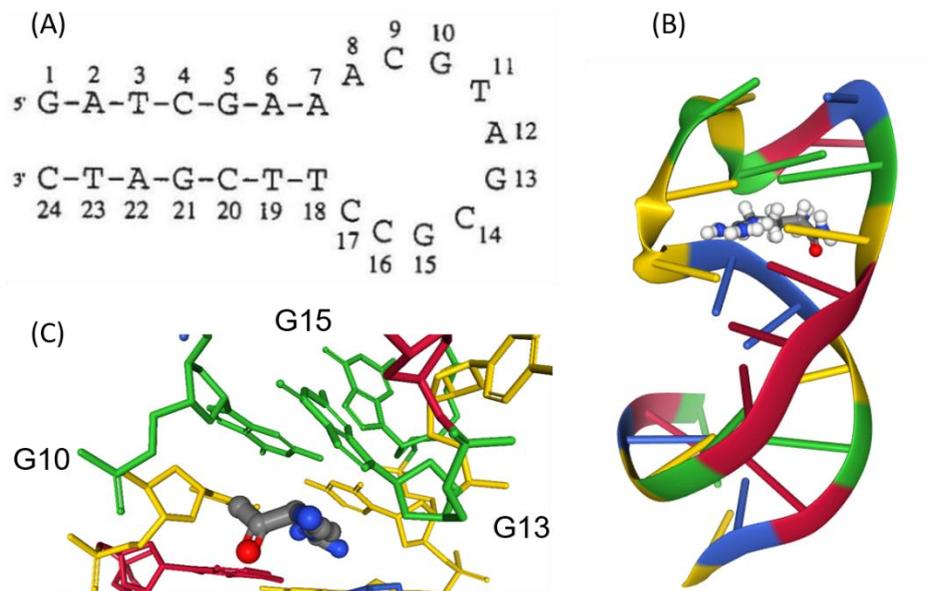


Figure 21 : Structures de l'aptamère anti-argininamide avec : (A) structure secondaire de l'aptamère anti-argininamide en absence de cible, (B) structure 3D en ruban de l'aptamère en présence de cible (PDB 1OLD⁵), les bases guanines en vert, les adénines en rouge, les cytosines en jaune et les thymines en bleu, (C) zoom sur les bases guanines proches de la cible utilisant les mêmes couleurs que précédemment

L'argininamide se retrouve encapsulée dans la cavité nucléotidique interne au niveau de la boucle à l'aide d'interactions de type van der Waals, de liaisons hydrogène et de π -stacking.¹³³ Trois guanines sont donc présentes dans le site de reconnaissance.

3.3. Le système anti-D-adénosine

L'aptamère anti-D-adénosine est très utilisé en bioanalyse. L'adénosine triphosphate (ATP, Figure 22) est une molécule biologique de grande importance. L'énergie stockée dans sa liaison phosphoanhydride est utilisée dans de nombreux processus biologiques tels que la synthèse de l'ADN, la propagation de l'influx nerveux ou la contraction musculaire. La très grande variété de réactions l'utilisant lui vaut le surnom de *monnaie énergétique universelle*.¹³⁵

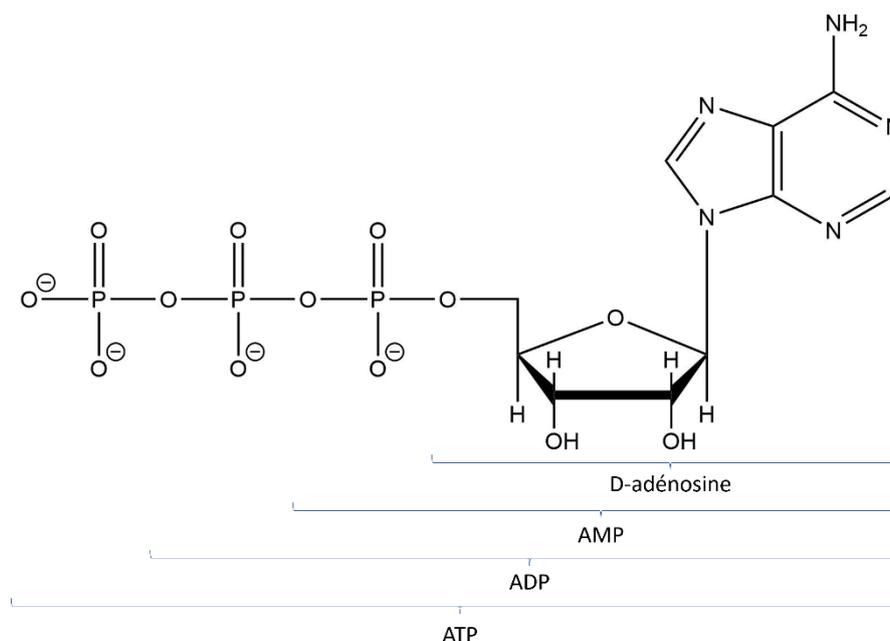


Figure 22 : Structures de la D-adénosine, de l'AMP, de l'ADP et de l'ATP

L'aptamère anti-D-adénosine sélectionné par Huizenga et Szostak³⁶ en 1995 reconnaît, avec des affinités proches, la D-adénosine et ses dérivés phosphorylés : l'adénosine monophosphate (AMP) et l'ATP. Cet aptamère est peu énantiosélectif vis-à-vis de la L-adénosine.¹³⁶ La banque utilisée pour sa sélection était composée de 2×10^{14} séquences d'ADN différentes, chacune ayant une partie aléatoire composée de soixante-douze nucléotides. L'étape de séparation des séquences non liées à la cible est assurée en chromatographie d'affinité. La colonne utilisée était composée de molécules d'ATP immobilisées sur une phase stationnaire en saccharose. Un tampon contenant de l'ATP a permis l'éluion des séquences affines. L'amplification de ces séquences a ensuite été réalisée par PCR. Après 8 cycles, dix-sept séquences ont été sélectionnées. Un des clones a ensuite été choisi pour la suite de l'étude. Une série d'oligonucléotides contenant des portions de plus en plus courtes de ce clone a été synthétisée et a permis de mettre en évidence une zone de quarante-deux nucléotides essentielle dans la reconnaissance de l'ATP. Une deuxième sélection a été réalisée avec une nouvelle banque créée à partir de cette séquence réduite. Le cycle a été répété quatre fois et a permis d'obtenir quarante-quatre séquences uniques. L'alignement des séquences a révélé deux régions conservées de six bases de long chacune. Un aptamère de vingt-cinq nucléotides contenant ces deux régions a été synthétisé (Figure 23) et son K_d a été estimé à $6 \pm 3 \mu\text{M}$ contre la D-adénosine par ultrafiltration (avec des affinités similaires pour l'AMP et l'ATP).³⁶ Des mesures de polarisation de fluorescence

réalisées sur la séquence raccourcie de deux bases ont permis de confirmer cette valeur. Elles ont également permis d'estimer un K_d de $10 \pm 3 \mu\text{M}$ pour la reconnaissance de la D-AMP.¹³⁶

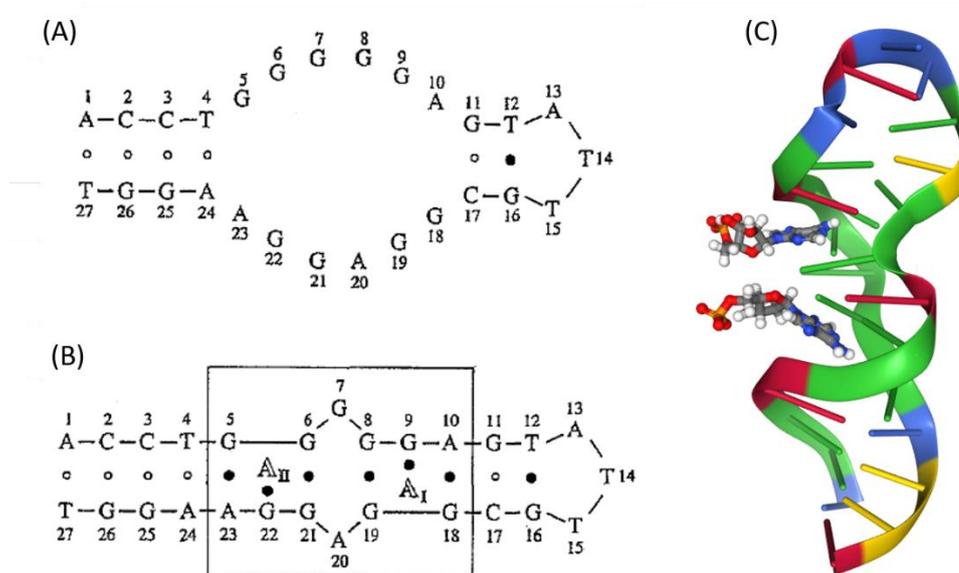


Figure 23 : Structures de l'aptamère anti-adénosine : (A) en absence de cible, (B) complexé à deux D-adénosines monophosphates (A_I et A_{II}), les paires de type Watson-Crick sont indiquées par (○) et les paires de bases non canoniques par (●), (C) structure 3D en ruban de l'aptamère en présence de deux AMP (PDB 1AW4), les bases guanines en vert, les adénines en rouge, les cytosines en jaune et les thymines en bleu^{137,138}

Lin et Patel ont résolu la structure de cet aptamère complexé par résonance magnétique nucléaire (RMN).¹³⁷ Ils ont montré que l'aptamère complexé adopte une structure en « tige-boucle » et que, contrairement à la plupart des aptamères, celui-ci complexe deux molécules cible à la fois. Les deux sites de reconnaissance sont non équivalents, proches et situés dans la tige de l'aptamère. La formation du complexe entre l'aptamère et les deux molécules d'AMP a lieu grâce à la formation de paires de bases entre les cibles et les bases guanines de l'oligonucléotide. Des mésappariements GG et GA stabilisent également le complexe.¹³⁷

Chapitre 2 : Étude de l'affinité des séquences contenant une 8-oxoguanine

Comme expliqué précédemment, trois guanines sont présentes dans le site de reconnaissance (situé au niveau de la boucle) de l'aptamère anti-L-argininamide. Elles peuvent être remplacées par une base 8-oxoguanine afin de permettre leur oxydation spécifique comme souhaité dans ce projet. Le choix a été fait de ne travailler que sur des séquences contenant une seule 8-oxoguanine à la fois afin de tenter de comprendre l'impact de la présence et de la position de la base oxydée sur l'affinité de l'aptamère et sur l'efficacité de la réaction de pontage avec la cible.

L'aptamère original de 24 bases est appelé 24-1. Trois séquences contenant chacune une base 8-oxoguanine à la place d'une guanine dans le site de reconnaissance ont été générées et utilisées (Figure 24). L'aptamère 24-2 est composé d'une 8-oxoguanine en position 10. La base oxydée est placée respectivement en position 13 ou 15 pour les séquences 24-3 et 24-4.

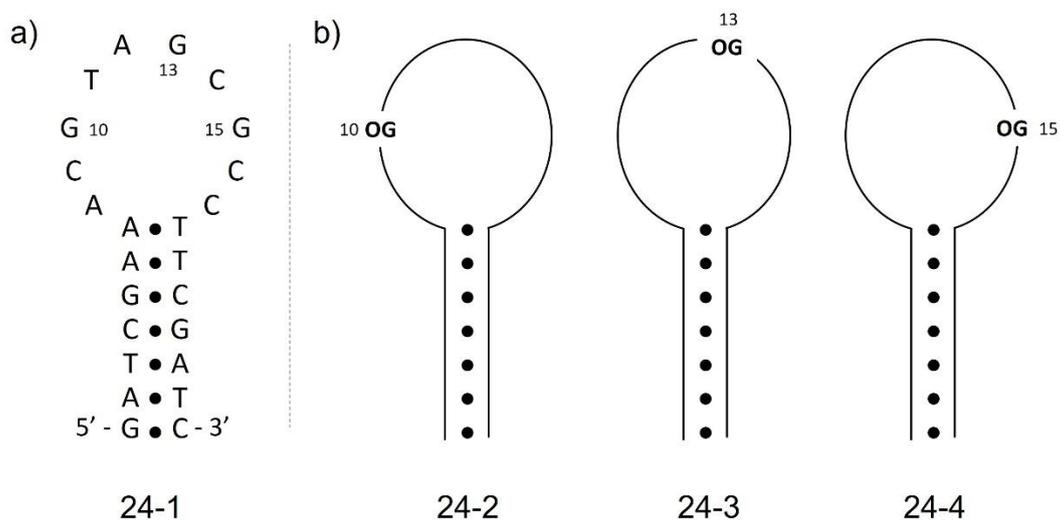


Figure 24 : Séquences des aptamères 24-mer utilisés au cours du projet : a) aptamère anti-L-Rm original et b) aptamères dont l'une des guanines de la boucle a été remplacée par une base 8-oxo guanine

La première étape du projet a donc consisté à évaluer l'impact de l'introduction et de la position de la base 8-oxoguanine sur l'affinité de l'aptamère anti-L-argininamide pour sa cible.

Les mesures d'anisotropie de fluorescence ont été utilisées (principe expliqué page 111). Cette donnée traduit le degré de dépolarisation de la lumière réémise à la suite de l'exposition d'un analyte marqué par un fluorophore à une lumière excitatrice polarisée. Cette technique se base sur le fait que les fluorophores possèdent des directions préférentielles pour l'absorption et l'émission de lumière le long de directions spécifiques à l'intérieur de la structure du fluorophore.

1. Dosage direct

Une première méthode a été mise en œuvre pour déterminer l'affinité des aptamères utilisant des séquences marquées par un fluorophore et des mesures d'anisotropie de fluorescence (FA). Cette approche non compétitive directe exploite la modification de conformation que les aptamères peuvent subir lors de la liaison avec la cible et qui peut donner lieu à un changement d'anisotropie de fluorescence (Figure 7).^{12,67} Cette technique a déjà été utilisée avec des aptamères reconnaissant l'ATP¹³⁶ (Figure 23), la L-tyrosinamide (page 49) ou avec l'aptamère anti-L-Rm d'intérêt (Figure 21)⁶⁷.

Le dosage direct a été réalisé avec l'aptamère 24-1 ne contenant pas d'OG marqué par une fluorescéine (F) à son extrémité 5' (noté F24-1) et dans un tampon phosphate de sodium 5 mM à pH 7,5. Après avoir été dénaturée à 80 °C pendant 5 minutes puis laissée 30 minutes à température ambiante, la solution d'aptamère est incubée avec des concentrations croissantes de cible L-Rm. Après environ 5 minutes, elle est transférée dans une plaque 96 puits pour analyse d'anisotropie de fluorescence par un lecteur de microplaques. Les échantillons contiennent alors 30 nM d'aptamère et la L-Rm en concentration croissante, de 0,01 à 1 mM. La différence d'anisotropie de fluorescence $\Delta r = r - r_0$ (avec r l'anisotropie en présence de cible et r_0 l'anisotropie en l'absence de cible) est calculée et tracée en fonction de la quantité de cible. Le Δr maximal atteint est de 0,016 à 1 mM de cible pour 24-1 (Figure 25).

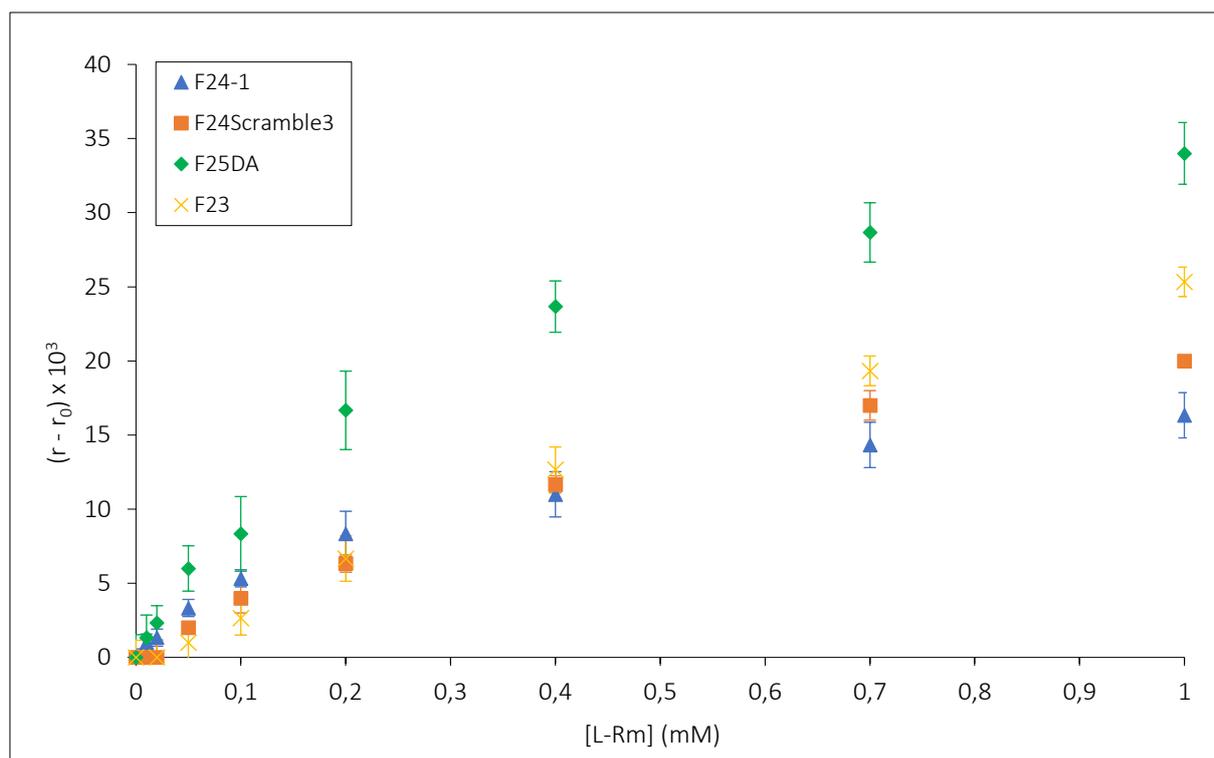


Figure 25 : Dosage direct par FA des séquences F24-1, F24Scramble3, F23 et F25DA en présence de L-Rm dans un tampon 5 mM phosphate de sodium à pH 7,5 ; [Fséquence] = 30 nM ; Température ambiante

Des contrôles ont été réalisés dans les mêmes conditions à l'aide de 3 autres oligonucléotides marqués avec une fluorescéine à leur extrémité 5' : une séquence de 24 bases scramble de l'aptamère original anti-L-Rm (F24Scramble3), un aptamère de 23 bases reconnaissant la L-tyrosinamide (F23) et un 25-mer dirigé contre l'ATP et la D-adénosine (F25DA). Une séquence scramble possède la même composition en bases que l'aptamère considéré, mais dans un ordre différent. Elle n'est donc pas censée pouvoir reconnaître la cible. Les résultats obtenus sont également montrés en Figure 25 et révèlent une variation de signal Δr importante pour F24-1 mais aussi pour les 3 séquences contrôles. La réponse de l'aptamère F25DA en particulier est environ 2 fois plus élevée que celle de l'aptamère reconnaissant la L-Rm. Celles pour le scramble et F23 en sont plus proches mais semblent cependant supérieures aux plus fortes concentrations de cible. Ces analyses montrent que des interactions non-spécifiques entre les oligonucléotides anioniques et la L-argininamide cationique ont lieu, comme cela avait été constaté par Guo *et al.*¹³⁹ et que ce dosage direct par anisotropie de fluorescence ne pourra pas être utilisé dans la suite de l'étude pour comparer les affinités des séquences contenant une OG.

Ce dosage a également été effectué à des pHs plus basiques (8,5 et 9) pour les séquences F24-1 et F24Scramble3. Une augmentation du pH permet en effet de limiter la proportion de cible

dicationique car le pKa du groupement amino de la L-Rm est estimé à 7,4¹³⁴ (Figure 20). Les résultats obtenus n'ont pas montré de diminution significative de la variation de signal mesuré pour la séquence scramble par rapport à celle de la séquence reconnaissant la L-Rm.

2. Développement du dosage compétitif assisté par SSB avec l'aptamère anti-L-tyrosinamide

Un autre type de dosage permettant de générer un signal peu influencé par les interactions non-spécifiques a donc dû être mis en œuvre.

Des dosages utilisant l'aptamère comme élément de signalisation et se basant sur une différence de masse importante entre ses états libre et lié à l'aide de protéines^{140,141} ou de nanomatériaux¹⁴² ont déjà été développés. Cui *et al.* ont par exemple conçu des sondes à amplification de masse ayant la capacité de se lier à un amplificateur d'anisotropie protéique uniquement lors de la complexation de l'aptamère à sa cible.¹⁴⁰ Une méthode compétitive utilisant la protéine fixant l'ADN simple brin d'*Escherichia coli* (SSB, single-stranded DNA binding protein)¹⁴³ a été établie par le département de pharmacologie moléculaire de Grenoble (DPM) et appliquée à 2 aptamères préstructurés : un reconnaissant la D-adénosine³⁶ et l'autre la L-argininamide⁴. La protéine SSB est régulièrement utilisée comme outil d'amélioration du signal en raison de sa capacité à se lier à l'ADN simple brin mais pas à l'ADN double brin ou à des conformations stables d'ADN simple brin replié. Au cours de ce dosage, un aptamère marqué par un fluorophore a été incubé avec la protéine SSB afin de former un complexe aptamère/SSB dont l'anisotropie de fluorescence est élevée. La cible a alors été ajoutée et la complexation de l'aptamère avec la cible a déplacé l'équilibre de formation du complexe aptamère/protéine et a donné lieu à une réduction importante de l'anisotropie de fluorescence qui a été mesurée. Huang et ses collaborateurs, ont adapté ce concept en employant un nanomatériau de carbone de volume et de masse importants (un oxyde de graphène) comme amplificateur de masse.¹⁴² L'affinité des nanomatériaux de carbone est en effet plus importante pour l'ADN simple brin que pour le complexe aptamère/cible.

D'autres méthodes ont été employées au cours de dosages assistés par SSB afin de distinguer les aptamères libres de ceux liés à la cible. L'électrophorèse a par exemple permis cette séparation dans les travaux de Berezovski et Krylov.¹⁴⁴ La SSB liée aux aptamères simple-brin

non complexés à la cible induit un changement de mobilité électrophorétique influençant ainsi leur temps de migration.

Le dosage compétitif classique utilisant la SSB comme outil d'amélioration du signal précédemment développé par Zhu *et al.*¹⁴³ a été étendu au cours de ce projet afin de l'appliquer à un aptamère non structuré en l'absence de cible : l'aptamère anti-L-tyrosinamide sélectionné par Vianini *et al.*¹²⁹ et raccourci par Challier *et al.*¹³⁰ afin d'atteindre 23 bases. Des analyses par RMN ont en effet révélé que cet aptamère ne présente pas de structure stable lorsqu'il est libre, contrairement à son état lié.¹³¹

Cette partie est consacrée au développement d'un dosage assisté par SSB sur l'aptamère anti-L-Ym, qui sera ensuite appliqué à l'aptamère anti-L-Rm utilisé dans le projet principal.

2.1. Principe général du dosage classique

Le principe du dosage compétitif classique par anisotropie de fluorescence utilisant la SSB¹⁴³ est résumé sur la Figure 26. L'aptamère libre marqué par un fluorophore à son extrémité et ayant une anisotropie de fluorescence r_f est dans un premier temps incubé avec la protéine SSB (voie a). Celle-ci forme des tétramères. La formation du complexe aptamère/SSB entraîne alors une augmentation significative de l'anisotropie de fluorescence. Cela peut s'expliquer par la contribution globale de la masse importante du tétramère de protéine (environ 76 000 Da¹⁴³) à l'anisotropie, ainsi que par une restriction locale du mouvement du fluorophore en raison de l'enroulement des oligonucléotides simple-brin autour de la protéine.¹⁴⁵ En l'absence de cible (voie b), l'anisotropie attendue pour le complexe aptamère/SSB (r_{SSB}) est élevée. Dans le cas où tout l'aptamère est complexé par la SSB, l'anisotropie mesurée atteint un maximum noté $r_{SSB,max}$. La formation du complexe aptamère/cible lors de l'ajout de cible provoque une diminution de la FA (voie c). La valeur de FA alors mesurée, r_b , peut résulter de l'augmentation du mouvement local du fluorophore et de la diminution du poids moléculaire de la sonde.

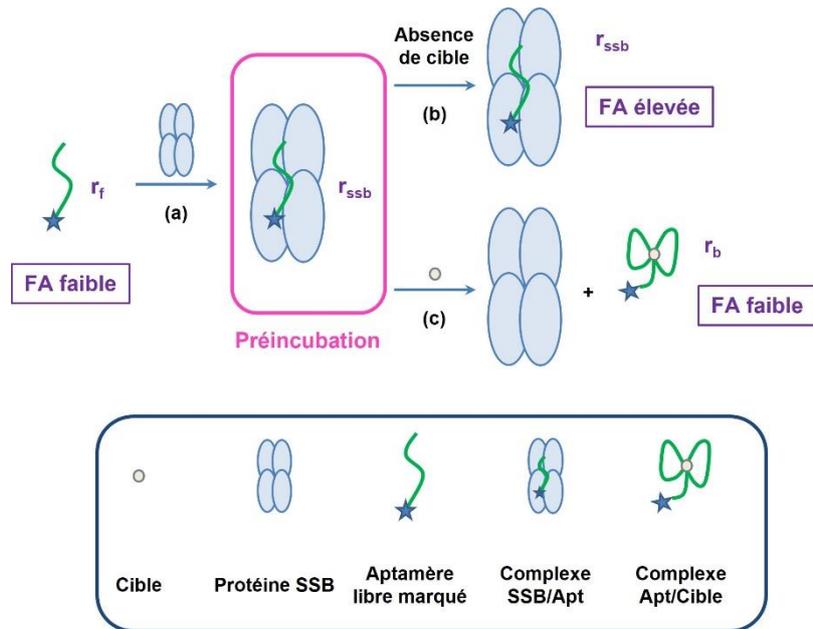


Figure 26 : Principe général du dosage classique par anisotropie de fluorescence assisté par SSB

La Figure 27 présente l'évolution de r en fonction de la concentration de cible attendue pour le dosage compétitif assisté par la SSB. La valeur de FA maximale $r_{SSB,max}$ correspond à la situation dans laquelle tout l'aptamère est complexé à la SSB. La valeur r_{SSB} correspond à l'anisotropie mesurée dans les conditions utilisées pour un échantillon contenant seulement l'oligonucléotide en présence de SSB. La valeur asymptotique atteinte lorsque la cible augmente est r_b . Celle-ci peut être légèrement supérieure à la valeur minimale r_f correspondant à l'anisotropie de l'aptamère libre.

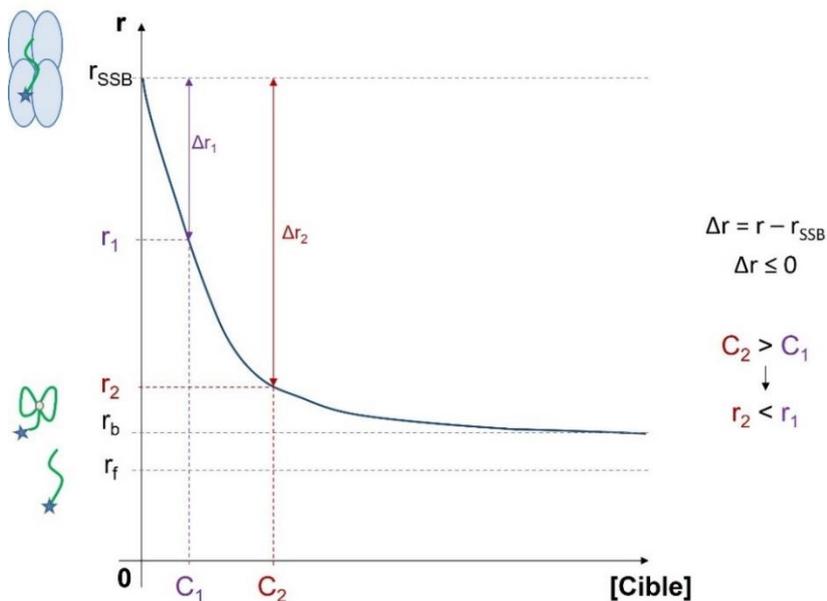


Figure 27 : Courbe théorique de l'anisotropie de fluorescence en fonction de la concentration de cible pour le dosage compétitif assisté par SSB

Dans cet exemple, 2 concentrations de cible C_1 et C_2 sont considérées avec C_1 inférieure à C_2 . Lorsque la concentration de cible augmente, la proportion d'oligonucléotides non liés à la cible diminue et la FA mesurée est donc de moins en moins élevée. Cela explique que r_1 soit supérieure à r_2 . Au cours de ce dosage, le raisonnement sera effectué en considérant la valeur de $\Delta r = r - r_{SSB}$. Cette donnée est négative puisque r est inférieure à r_{SSB} . La SSB permet ainsi d'amplifier le signal et de révéler la proportion d'aptamères non complexés à la cible.

Afin de vérifier l'applicabilité de ce dosage à l'aptamère reconnaissant la L-Ym, une première séquence notée F23 composée de 23 bases¹³⁰ et marquée par une fluorescéine à son extrémité 5' a été étudiée. Dans un premier temps, la courbe d'interaction entre l'aptamère et la SSB est tracée à température ambiante. Pour cela, l'aptamère (de concentration finale égale à 10 nM) est incubé pendant 5 minutes avec des concentrations croissantes de SSB (0 à 22,5 nM) dans un tampon 20 mM tris(hydroxyméthyl)aminométhane-HCl (Tris-HCl) pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM MgCl₂. L'évolution de la différence $r - r_0$ (avec r l'anisotropie mesurée en présence de SSB et r_0 en absence de protéine) est représentée en Figure 28. Les concentrations en SSB évoquées correspondront à celle du tétramère tout au cours de l'étude.

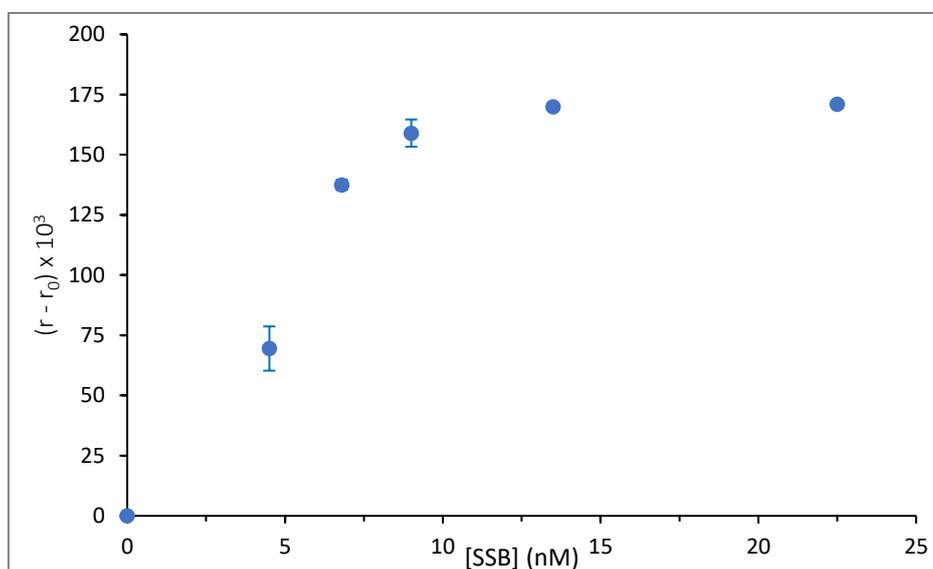


Figure 28 : Courbe d'interaction entre l'aptamère F23 et la SSB à température ambiante en tampon 20 mM tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM MgCl₂; [F23] = 10 nM

Les résultats obtenus permettent de constater que l'augmentation de la concentration de protéine amène à la hausse de l'anisotropie de fluorescence, comme espéré, et semble atteindre une saturation.

La courbe de dosage classique par compétition en présence de cible a ensuite été construite. L'aptamère F23 (10 nM au final) a tout d'abord été mélangé dans le même tampon avec 6,8 nM de SSB correspondant à 88 % de complexation aptamère/SSB. Après 5 minutes d'incubation, la cible est ajoutée en concentration croissante et l'anisotropie de fluorescence r est mesurée. Les données relevées (non montrées) confirment la réduction de r avec l'augmentation de la concentration de L-Ym pour toutes les valeurs testées (de 0 à 99,9 μ M), démontrant la capacité de la cible à déplacer l'aptamère de la protéine. Des essais ont également été réalisés avec 11,3 nM de protéine en raison d'une faible répétabilité inter-journalière lors des tests avec 6,8 nM de SSB (coefficients de variation compris entre 3 et 11 %). La hausse de la concentration de protéine entraîne alors une baisse des coefficients de variation, mais la réduction du signal de FA lors de l'ajout de cible se révèle inférieure. La formation du complexe aptamère/cible pourrait être diminuée à cause d'une compétition de la SSB.

Ces premiers résultats semblent encourageants mais témoignent de la nécessité d'optimiser ce dosage dans le cas de l'aptamère anti-L-Ym. D'autres dosages sont donc réalisés en augmentant le temps d'incubation entre l'aptamère complexé à la SSB et la cible, avant la lecture d'anisotropie. Ceux-ci ne permettent cependant pas d'améliorer significativement la réduction du signal d'anisotropie, ce qui peut traduire une cinétique de relargage de l'aptamère par la SSB plutôt lente.

2.2. Développement du dosage « inversé »

Un dosage compétitif assisté par SSB dit « inversé » a alors été considéré et mis en œuvre (Figure 29) afin de tenter d'améliorer la réponse de l'essai, tout en limitant les temps d'incubation. L'aptamère est tout d'abord préincubé avec la cible, menant à la formation d'un complexe entre ces 2 espèces (voie f). Lors de l'ajout de la protéine, celle-ci va se lier aux oligonucléotides n'étant pas complexés avec la cible (voies d et e). Ces aptamères libres sont peu nombreux en présence de cible et l'anisotropie mesurée reste alors faible.

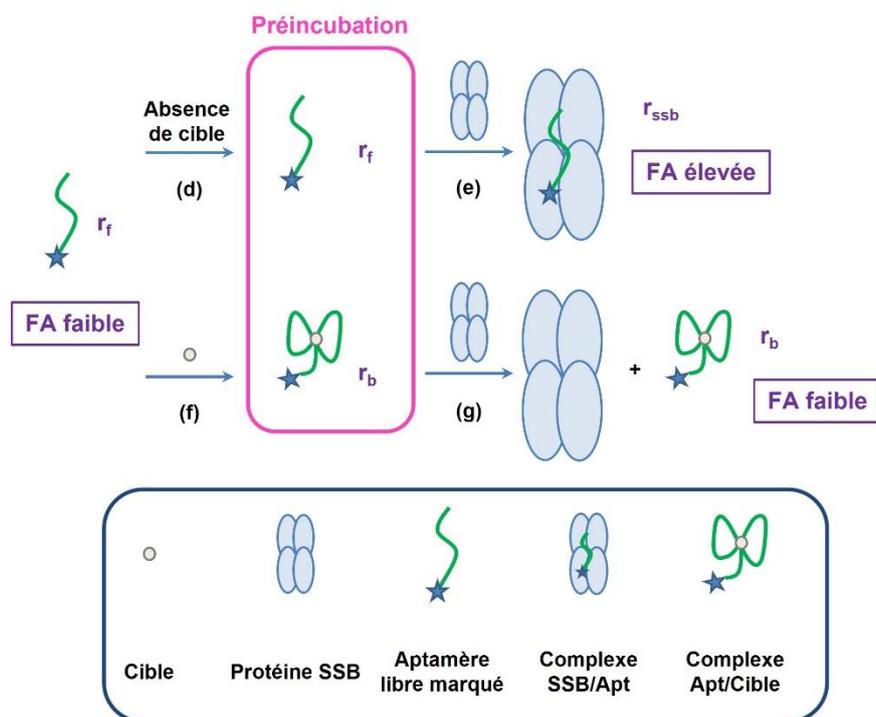


Figure 29 : Principe général du dosage inverse par anisotropie de fluorescence assisté par SSB

Cette stratégie a été appliquée à l'aptamère F23 (10 nM au final) avec 9 et 18 nM de SSB dans le même tampon que pour l'essai classique. Une réduction significative du signal r avec l'augmentation de la concentration en cible a été constatée pour les 2 concentrations de protéines testées (résultats non montrés). Les coefficients de variation se sont cependant révélés plus élevés avec 9 nM de SSB.

2.3. Optimisation de la réponse et étude du modèle théorique

Diverses optimisations de ce dosage ont ensuite été effectuées. Trois sondes de 23 bases obtenues en faisant varier la position et la nature du fluorophore ont été testées afin d'étudier l'influence de ces 2 paramètres sur la réponse du dosage. La sonde marquée par une fluorescéine à l'extrémité 3' est notée 23F et les 2 marquées par un Texas Red (TR) sont notées TR23 ou 23TR selon la position du fluorophore (respectivement en 5' ou 3'). Les oligonucléotides ont été marqués aux extrémités afin de ne pas perturber la reconnaissance de la cible comme cela a déjà été rapporté.^{143,146}

Le dosage inverse est appliqué à ces 3 sondes à 10 nM avec 18 nM de protéine dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM MgCl₂ (Figure 30). La concentration de L-Ym varie de 0 à 2,5 μ M et la mesure de r est effectuée 90 secondes après l'ajout de la protéine.

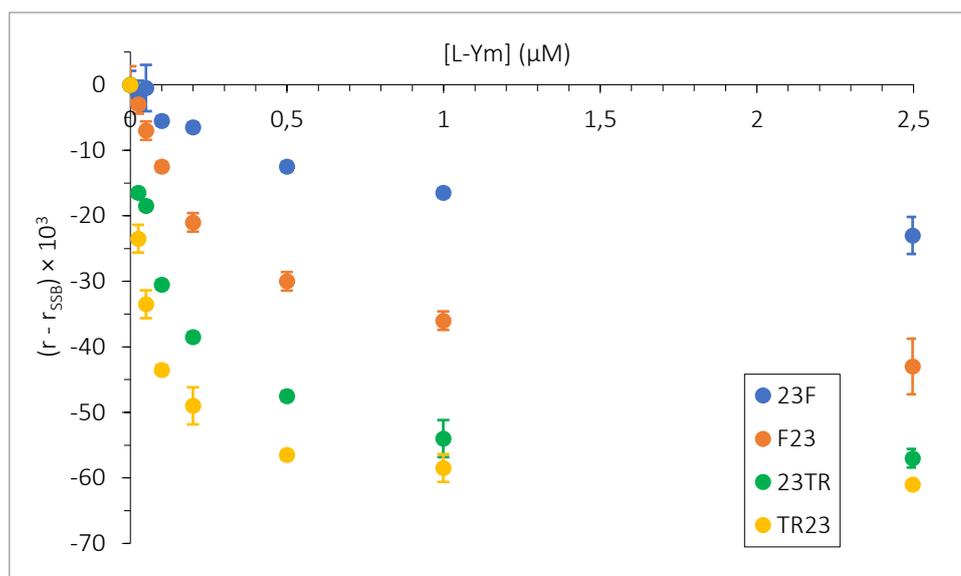


Figure 30 : Dosage inverse par anisotropie de fluorescence assisté par SSB pour les aptamères F23, 23F, TR23 et 23TR ; [Aptamère marqué] = 10 nM ; Tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM MgCl₂ ; [SSB] = 18 nM ; Température ambiante ; Lecture 90 sec après l'ajout de SSB

Les résultats permettent de confirmer la possibilité de détecter de faibles concentrations de L-Ym (jusqu'à 25 nM) à l'aide des sondes marquées avec un Texas Red. Il est également possible de noter que la sensibilité du dosage, c'est-à-dire la concentration de cible minimale générant une variation de signal détectable, varie en fonction du marqueur fluorescent et de sa position. La meilleure sensibilité est atteinte avec les sondes marquées à l'extrémité 5' et avec celles marquées par un Texas Red.

Afin de tenter de comprendre les différences de sensibilité observées entre les 4 sondes, une étude approfondie du modèle théorique développé par Zhu *et al.* pour l'essai classique de déplacement compétitif assisté par la protéine SSB est réalisée.¹⁴³

Selon ce modèle, 4 paramètres sont responsables des changements d'anisotropie de fluorescence observés au cours du dosage : la différence d'anisotropie ($r_{SSB} - r_f$), les constantes de dissociation apparentes entre l'aptamère et la protéine K_{dSSB} (Équation 2) et entre l'aptamère et la cible K_{dL-Ym} (Équation 3) et le degré d'extinction de fluorescence de la sonde lors de la liaison à la protéine (quenching).

Équation 2 : Expression de la constante de dissociation du complexe aptamère/SSB K_{dSSB} et équilibre associé



Équation 3 : Expression de la constante de dissociation du complexe aptamère/L-Ym K_{dL-Ym} et équilibre associé



- **Premier paramètre : différence d'anisotropie $r_{SSB} - r_f$**

La différence entre l'anisotropie de l'aptamère en présence de SSB r_{SSB} et l'anisotropie de l'aptamère libre r_f peut être assimilée à la fenêtre analytique de l'essai (Figure 27). Il est important de noter que le TR est zwitterionique et est composé de nombreux cycles accolés. Ce fluorophore peut donc établir des contacts étroits avec les bases voisines, et des interactions peuvent avoir lieu avec le squelette phosphate chargé négativement de l'oligonucléotide. La fluorescéine est quant à elle anionique et est donc repoussée électrostatiquement par les groupements phosphate de l'ADN.^{147,148} Cela est cohérent avec les anisotropies mesurées pour les aptamères libres : r_f est plus élevée pour les séquences marquées par un TR (environ 0,15) que par une fluorescéine (environ 0,08). Les valeurs de r_{SSB} sont également supérieures pour les TR-ADN. Les fenêtres analytiques obtenues avec 18 nM de protéine sont d'environ 0,17 pour F23, et 0,16 pour 23F, TR23 et 23TR, ce qui permet de considérer que ce paramètre n'a pas d'influence majeure sur les différences observées dans les réponses au dosage (Figure 30).

- **Deuxième paramètre : constante de dissociation du complexe aptamère/SSB K_{dSSB}**

L'influence de ce paramètre peut être étudiée à l'aide des courbes d'interaction entre les aptamères et la protéine. Ces courbes sont donc tracées avec 10 nM d'aptamère marqué dans le tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM MgCl₂. Les valeurs de K_{dSSB} sont déterminées pour les 4 sondes grâce à une modélisation des courbes représentant la fraction d'aptamères liés à la protéine f_{SSB} (Équation 5) en fonction de la concentration de SSB à l'aide d'une équation de Boltzmann. L'anisotropie du mélange aptamère – SSB peut être décrite comme la somme des anisotropies de chaque espèce pondérée par sa contribution fractionnelle à la fluorescence totale :

Équation 4 : Expression de l'anisotropie r d'un mélange aptamère - SSB

$$r = f_f \times r_f + f_{SSB} \times r_{SSB}$$

avec r_f et r_{SSB} les anisotropies de l'aptamère libre et lié à la SSB, f_f et f_{SSB} les fractions d'aptamère libre et lié à la protéine respectivement. La fraction d'aptamères liés à la protéine peut être calculée à partir des mesures d'anisotropies :

Équation 5 : Expression de la fraction d'aptamère lié à la SSB f_{SSB}

$$f_{SSB} = \frac{(r - r_f)}{g \times (r_{SSB \max} - r) + (r - r_f)}$$

Le facteur g correspond au ratio de l'intensité de fluorescence totale maximale de l'aptamère complexé à la SSB $I_{SSB, \max}$ sur l'intensité de fluorescence de l'aptamère libre I_f . Ce paramètre permet de prendre en compte les éventuels changements de rendement quantique de fluorescence de l'aptamère entre les états non lié et lié à la protéine, correspondant au quenching.¹⁴⁹ Les valeurs de $r_{SSB, \max}$ et $I_{SSB, \max}$ sont estimées par extrapolation des courbes d'anisotropie en fonction de la concentration en SSB.

Les courbes de f_{SSB} en fonction de la concentration en protéine adoptent une forme sigmoïde pour les 4 sondes. L'exemple de celle obtenue pour la séquence TR23 est présentée en Figure 31.

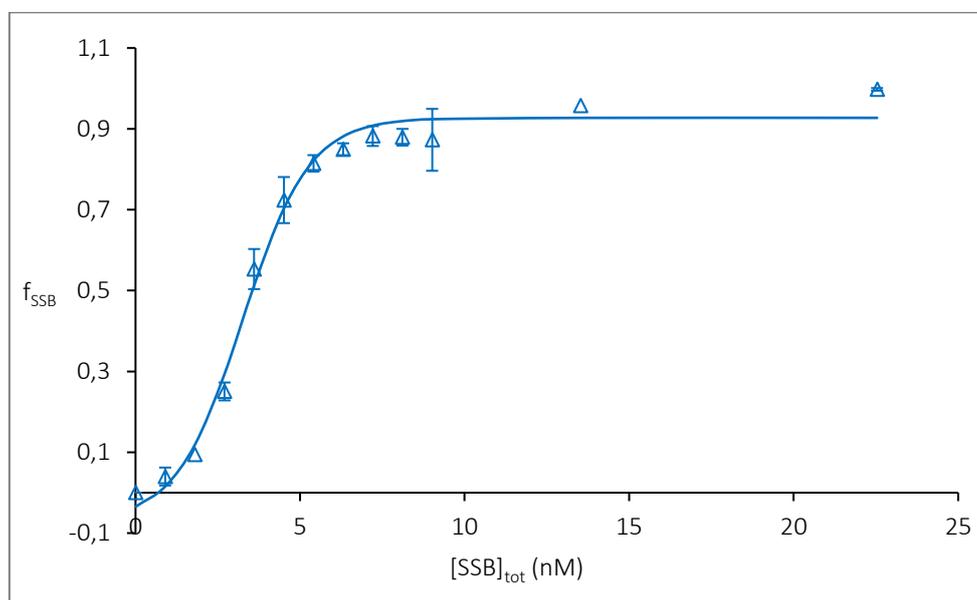


Figure 31 : Évolution de f_{SSB} en fonction de la concentration de SSB pour TR23 superposée avec la courbe théorique (trait plein) obtenue avec une équation de Boltzmann ; [TR23] = 10 nM ; Tampon 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM NaCl et 20 mM $MgCl_2$ à température ambiante

Les courbes ont ensuite été modélisées avec une équation de type Boltzmann (Équation 6). Les valeurs de K_{dSSB} sont alors estimées pour $f_{SSB} = 0,5$.

Équation 6 : Équation de Boltzmann utilisée pour la modélisation des courbes d'évolution de f_{SSB} en fonction de la concentration de SSB

$$f_{SSB} = A - \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{[SSB]_{tot} - B}{C}\right)}$$

avec A, B et C des paramètres libres et $[SSB]_{tot}$ la concentration totale en protéine. Les résultats obtenus révèlent que les 4 sondes développent des affinités très proches envers la protéine (Tableau 1).

Tableau 1 : Constantes de dissociation apparentes K_{dSSB} des complexes aptamère/SSB pour les 4 sondes étudiées

Aptamère	F23	23F	TR23	23TR
K_{dSSB} (nM)	$3,1 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,5$

Ces résultats sont cohérents avec ceux rapportés par Krauss *et al.*, qui avait calculé des constantes d'environ 3,3 nM pour l'interaction entre un polynucléotide d'environ 30 à 40 thymines et la SSB.¹⁵⁰ Des valeurs plus élevées (55 et 91 nM) avaient été obtenues lors de travaux avec l'aptamère anti-adénosine de 25 bases marqué par une fluorescéine ou un Texas Red. L'affinité de la SSB pour cet aptamère préstructuré est moins importante.¹⁴³

Les valeurs de K_{dSSB} des 4 aptamères permettent donc de considérer que ce paramètre n'a pas d'impact majeur sur le changement de FA induit par la cible au cours du dosage inversé.

Les 2 derniers paramètres à étudier afin d'expliquer les différentes réponses observées entre les 4 sondes (Figure 30) sont la constante de dissociation du complexe aptamère/cible K_{dL-Ym} et le facteur g traduisant le potentiel quenching dû à la protéine (Équation 5). Une diminution du facteur g et de K_{dL-Ym} est associée à une hausse de la sensibilité de l'essai.

- **Troisième paramètre : constante de dissociation du complexe aptamère/L-Ym K_{dL-Ym}**

L'application d'un modèle de Scatchard aux courbes de dosage de l'aptamère en fonction de la concentration de cible permet d'évaluer les constantes apparentes K_{dL-Ym} des complexes formés entre les 4 sondes et la cible.

Le modèle permet d'estimer la valeur de K_{dL-Ym} en traçant $\frac{R}{[Cible]_{eq}}$ en fonction de R avec R égal au rapport de la concentration de complexe aptamère/cible à l'équilibre sur la concentration

totale en aptamère : $R = \frac{[C]_{eq}}{[Apt]_{tot}}$. Le coefficient directeur de la droite obtenue est alors égal à $-\frac{1}{K_{dL-\gamma m}}$.

Équation 7 : Modèle de Scatchard appliqué pour la détermination des $K_{dL-\gamma m}$

$$\frac{R}{[Cible]_{eq}} = \frac{1}{K_{dL-\gamma m}} - \frac{1}{K_{dL-\gamma m}} \times R$$

avec $[Cible]_{eq}$ la concentration de cible telle que :

Équation 8 : Expression de la concentration de cible à l'équilibre $[Cible]_{eq}$

$$[Cible]_{eq} = [Cible]_{tot} - (f_c \times [Apt]_{tot})$$

La fraction d'aptamère lié à la cible f_c peut être calculée à partir des mesures d'anisotropie grâce à l'expression suivante :

Équation 9 : Expression de la fraction d'aptamère lié à la cible f_c

$$f_c = \frac{(r_{SSB} - r)}{(r_{SSB} - r) + \frac{1}{g}(r - r_f)}$$

avec r_f et r_{SSB} les anisotropies de l'aptamère libre ou lié à la SSB, g le rapport de l'intensité maximale de fluorescence de l'aptamère lié à la SSB $I_{SSB,max}$ sur l'intensité de l'aptamère libre I_f . L'expression est valable si les anisotropies r_f et r_b sont environ égales, ce qui est vérifié pour ce dosage. La droite obtenue pour l'aptamère TR23 est présentée en Figure 32.

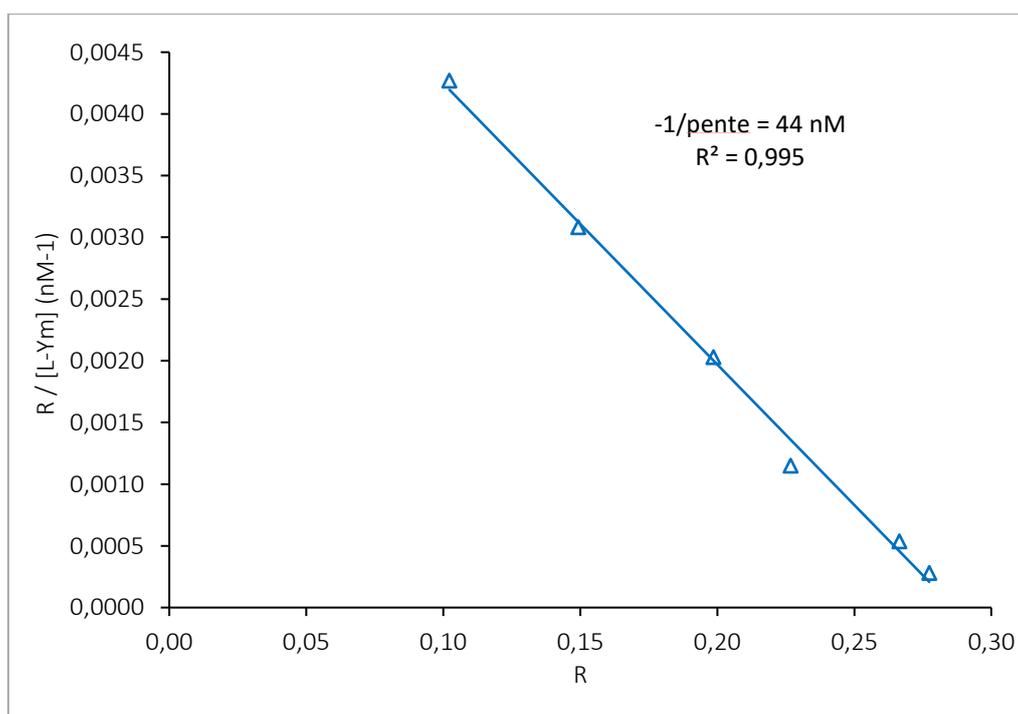


Figure 32 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du titrage assisté par 18 nM de SSB de la séquence TR23

Les valeurs de K_{dL-Ym} calculées pour les 4 aptamères sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Constantes de dissociation apparentes K_{dL-Ym} des complexes aptamère/L-Ym pour les 4 sondes étudiées

Aptamère	F23	23F	TR23	23TR
K_{dL-Ym} (nM)	330 ± 21	340 ± 30	49 ± 7	135 ± 21

Les valeurs obtenues sont en accord avec les études précédemment réalisées. Les K_{dL-Ym} correspondant aux complexes entre la cible L-Ym et les aptamères marqués par une fluorescéine se révèlent très proches de la constante déterminée avec un aptamère non marqué par Challier *et al.* (320 ± 30 nM), montrant que la reconnaissance de la cible par l'aptamère ne semble pas affectée par ce type de marquage. Cela paraît cohérent car ce fluorophore est anionique et donc repoussé électrostatiquement par le squelette du brin d'ADN. La valeur obtenue pour 23F est également en accord avec celle obtenue par mesure de polarisation de fluorescence dans cette même étude (440 ± 140 nM).¹³⁰

Les K_{dL-Ym} calculées pour les complexes TR-ADN/L-Ym sont inférieures à celles pour les marquages à la fluorescéine montrant que ce fluorophore (zwitterionique au pH de travail) est capable de stabiliser le complexe aptamère-L-Ym en interagissant fortement avec l'hélice d'ADN *via* des interactions de van der Waals et électrostatiques.

- **Quatrième paramètre : quenching dû à l'ajout de la protéine SSB**

La différence de sensibilité entre F23 et 23F observable sur la Figure 30 ne semble pas pouvoir être expliquée par les valeurs des constantes K_{dL-Ym} qui sont très proches pour ces 2 séquences. Le facteur g de 23F étant presque 2 fois plus élevé que celui de F23, il peut expliquer la plus faible sensibilité observée pour cette première séquence.

Tableau 3 : Valeurs du facteur g traduisant le quenching dû à la protéine SSB

Aptamère	F23	23F	TR23	23TR
Facteur g	0,39 ± 0,01	0,78 ± 0,08	0,58 ± 0,08	0,65 ± 0,02

Cette étude a donc permis de démontrer la possibilité d'appliquer le dosage par mesure de FA assisté par SSB à la détection de la L-tyrosinamide, mais nécessairement sous le format inversé. L'influence de la position et du type de fluorophore sur la sensibilité de la réponse a été examinée et expliquée. Les constantes de dissociation des complexes aptamère/L-Ym ont été déterminées à l'aide du modèle de Scatchard, et sont en accord avec la littérature.

D'autres manipulations, qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit, ont été effectuées avec la sonde TR23 afin d'évaluer les performances analytiques du dosage inversé assisté par SSB. La réponse du dosage n'a notamment pas semblé affectée par la présence d'analogues de la cible (L-tyrosine et L-phénylalanine), confirmant sa sélectivité. Le dosage a également été réalisé à basse température (entre 2 et 4 °C), ce qui a montré que l'affinité de TR23 pour L-Ym est améliorée d'un facteur 22 à basse température.

3. Application du dosage inversé à l'aptamère anti-L-argininamide

Une fois le dosage inversé développé et validé avec le système anti-L-Ym, celui-ci a été appliqué au système anti-L-Rm afin d'étudier l'influence de la présence et de la position d'une base 8-oxoguanine dans la séquence de l'aptamère sur l'affinité sur la cible L-Rm. Le dosage classique assisté par SSB a déjà été appliqué à cet aptamère mais les temps d'incubation nécessaires à l'obtention d'un signal suffisant et répétable étaient d'environ 30 minutes, soit bien plus long que ceux appliqués lors du dosage inversé avec l'aptamère anti-L-Ym.¹⁴³

Les manipulations ont tout d'abord été réalisées à température ambiante en ajustant les protocoles développés précédemment. Les concentrations de cible L-Rm ont été ajustées afin de s'adapter à l'affinité moins élevée de l'aptamère anti-L-Rm.

3.1. Étude sur la séquence de 24 bases

Une étude préliminaire a été réalisée sur l'aptamère de 24 bases ne contenant pas d'OG afin d'optimiser les conditions de réaction. La courbe d'interaction entre l'aptamère F24-1 (10 nM) et la protéine SSB est tracée dans un tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl correspondant au tampon de sélection de l'aptamère (Figure 33). Les concentrations de protéine testées sont comprises entre 0 et 22,5 nM.

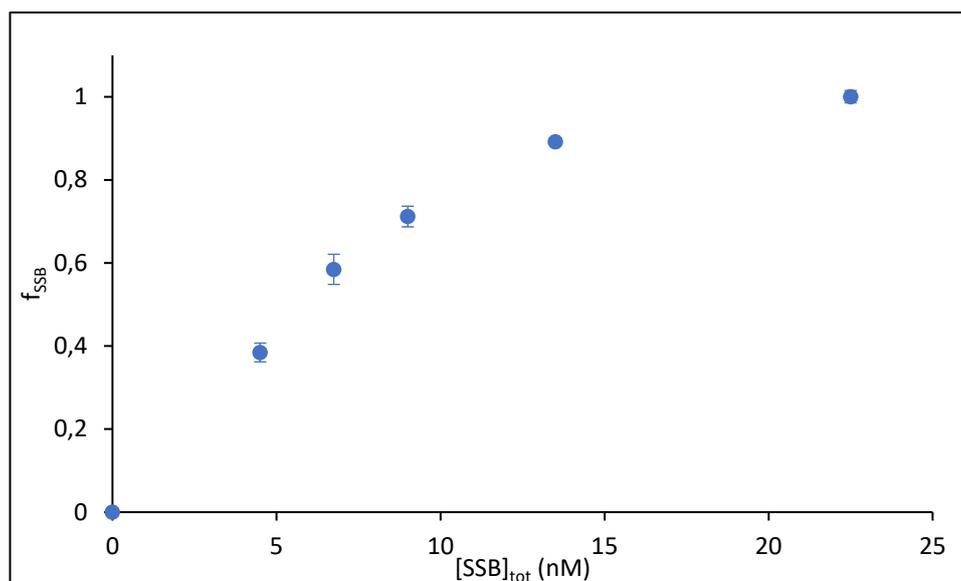


Figure 33 : Évolution de f_{SSB} en fonction de $[SSB]_{tot}$ pour F24-1

D'après ces résultats, une concentration de SSB comprise entre 9 et 13,5 nM est nécessaire pour qu'au moins 80 % de l'aptamère soit complexé à la protéine ($f_{SSB} = 0,8$ sur la Figure 33).

Le dosage inversé est ensuite mis en œuvre dans les mêmes conditions de tampon et de température que celles utilisées pour la construction de la courbe d'interaction aptamère/SSB. Deux concentrations de protéines sont testées : 9 et 13,5 nM (Figure 34). Les signaux mesurés sont proches pour les 2 concentrations testées mais la meilleure répétabilité est obtenue avec 13,5 nM de SSB.

La composition du tampon a également été modifiée afin d'étudier son influence sur le signal d'anisotropie de fluorescence mesuré et d'optimiser les conditions expérimentales. Le dosage a été effectué dans un tampon 100 mM Tris-HCl à pH 7,5, 100 mM NaCl avec 9 ou 13,5 nM de SSB (Figure 34).

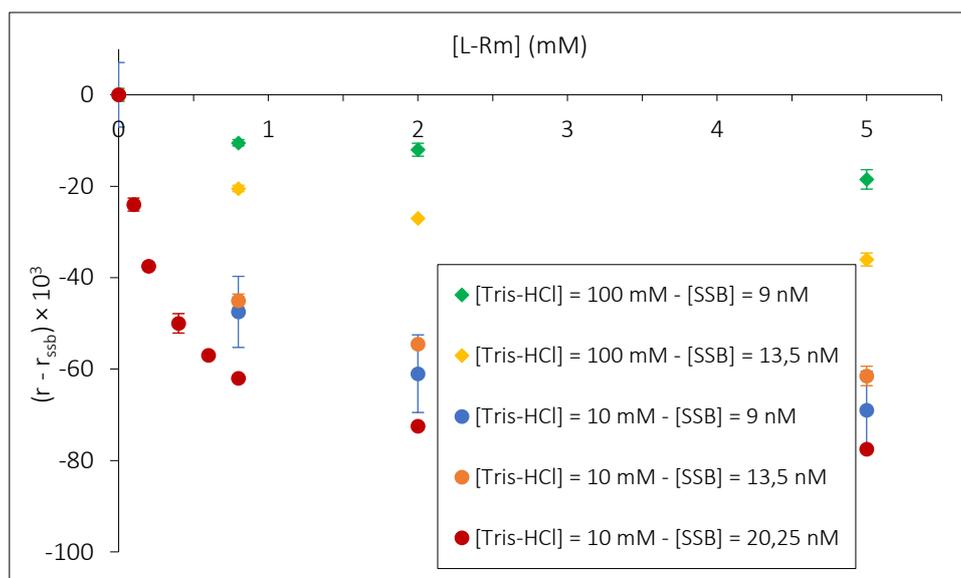


Figure 34 : Dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB de l'aptamère F24-1 dans un tampon contenant 10 ou 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl ; [F24-1] = 10 nM ; Tampon 10 mM ou 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl ; [SSB] = 9, 13,5 ou 20,25 nM ; Température ambiante ; Lecture 120 sec après l'ajout de SSB

La Figure 34 permet de constater que l'augmentation de la concentration de Tris-HCl à 100 mM dans le tampon réduit l'amplitude de la réponse de l'essai. Elle entraîne une diminution de l'amplitude du signal $|r - r_{ssb}|$ pour les 2 concentrations de protéine testées par rapport au tampon contenant 10 mM de Tris-HCl qui a donc été conservé pour la suite de l'étude.

Le modèle de Scatchard (Équation 7) a été appliqué aux résultats du dosage F24-1 dans le tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl avec 20,25 nM de SSB (permettant d'obtenir un signal d'amplitude importante avec de faibles écart-types) sur une gamme plus complète de concentrations de cible (Figure 35).

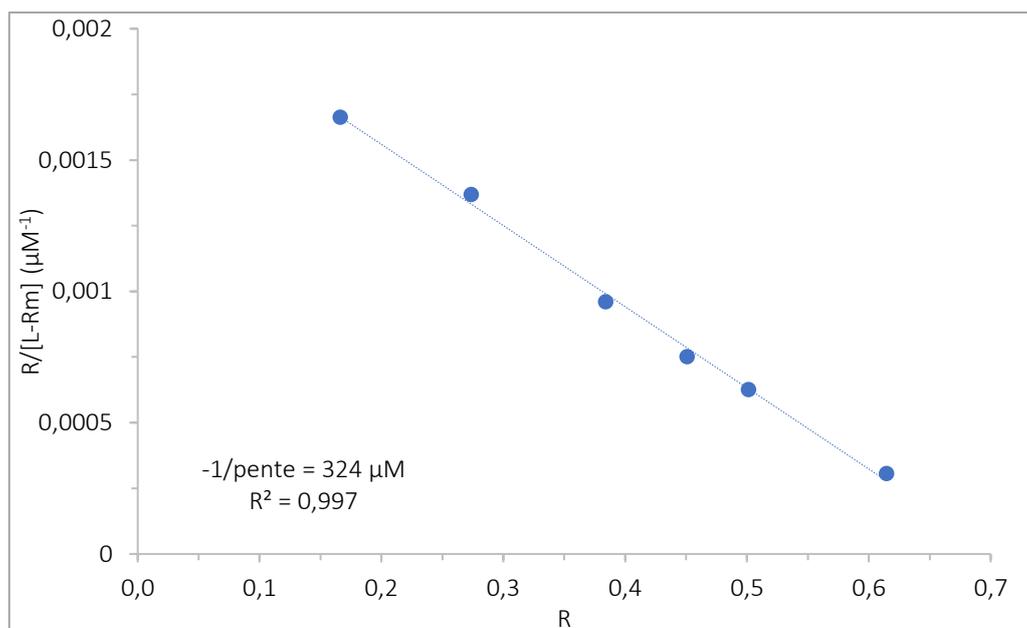


Figure 35 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du titrage assisté par 13,5 nM de SSB de la séquence F24-1 à température ambiante

La Figure 35 permet de constater un bon alignement des points pour la représentation de $R/[L-R_m]$ en fonction de R (Équation 7). La constante K_{dL-R_m} extraite de la pente de la droite est égale à 324 μM . Cette valeur est cohérente avec les données présentes dans la littérature : 125 μM déterminés à 4 °C par dichroïsme circulaire⁴ et environ 165 μM à 20 °C également par dichroïsme circulaire et par ITC¹⁵¹.

Le dosage inversé est ensuite réalisé pour la séquence F24Scramble3 dans le même tampon et avec 13,5 nM de protéine (courbe non montrée). Cet essai a révélé que, dans les conditions utilisées, le scramble génère un signal non négligeable (0,016 avec 5 mM de L-Rm). Cela traduit le fait qu'une partie du signal mesuré est due à des interactions non-spécifiques entre la cible cationique et l'aptamère anionique, comme constaté précédemment au cours du dosage direct.

À la suite de ces observations, il a été décidé de travailler avec des séquences raccourcies de 3 paires de bases au niveau de la tige de l'aptamère afin de tenter de limiter ces interactions non-spécifiques. Les séquences sont nommées 18-1, 18-2, 18-3 et 18-4 avec la même logique que celle utilisée pour les séquences de 24 bases (Figure 36). Elles présentent alors une base 8-oxoguanine en position 7, 10 ou 12 respectivement :

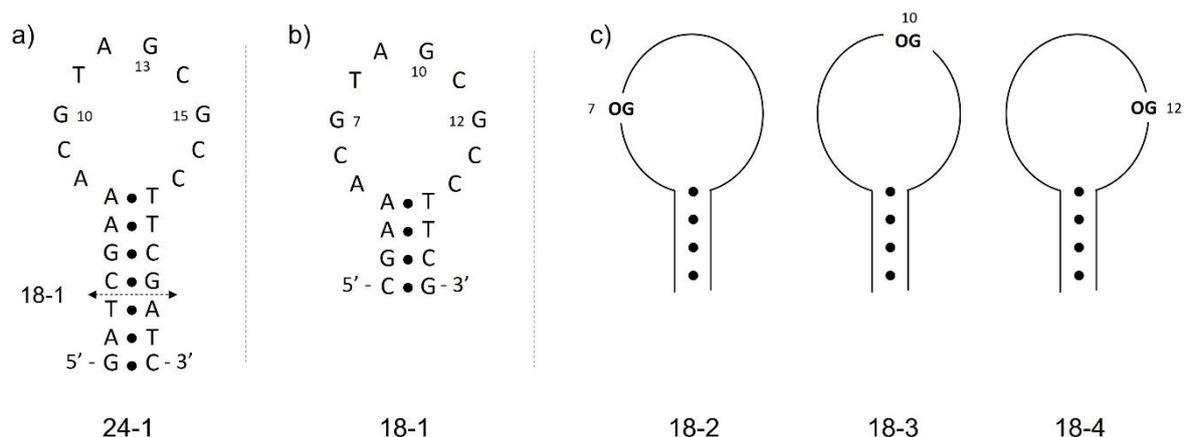


Figure 36 : Structures des aptamères 24 ou 18-mer utilisés au cours du projet : a) aptamère anti-L-Rm original de 24 bases, b) et c) : aptamères de 18 bases contenant ou non une base 8-oxo guanine dans leur boucle

Les séquences marquées par une fluorescéine à l'extrémité 5' sont notées F18-X avec X allant de 1 à 4.

3.2. Étude sur les séquences de 18 bases

3.2.1. Tests préliminaires à température ambiante

Les conditions expérimentales sont tout d'abord ajustées pour le dosage des séquences raccourcies. Le raccourcissement de 3 paires de bases au niveau de la tige peut en effet être responsable d'une déstabilisation de la conformation tige-boucle de l'aptamère. Un équilibre entre les formes tige-boucle fermée et ouverte existe alors.

La courbe d'interaction aptamère/SSB a tout d'abord été tracée pour l'aptamère F18-1 dans le tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl. La concentration de SSB correspondant à au moins 80 % de complexation aptamère/SSB semble être comprise entre 6,75 et 9 nM. Le dosage compétitif est donc réalisé avec ces 2 concentrations et les résultats montrent que l'amplitude de $|r - r_{SSB}|$ est plus importante pour 9 nM que pour 6,75 nM de protéine. De plus, les écarts-types obtenus avec la plus faible concentration de protéine sont plus importants et traduisent une plus grande variabilité de l'anisotropie mesurée. Le dosage est également effectué pour une concentration de 13,5 nM de SSB (concentration utilisée pour le dosage avec la séquence F24-1) et montre que celle-ci permet d'obtenir un signal d'amplitude équivalente à celui mesuré avec 9 nM de protéine.

Le dosage a alors été effectué avec les 3 aptamères de 18 bases contenant une 8-oxoguanine avec 13,5 nM de SSB. Les résultats (non montrés ici) révèlent que l'amplitude des signaux

mesurés reste moins importante qu'avec la séquence F24-1, particulièrement aux basses concentrations de cible : en dessous de 0,017 en valeur absolue pour 2 des 3 séquences à 0,8 mM de L-Rm. Afin de vérifier si cela est dû à la présence d'une OG ou au raccourcissement de la tige de l'aptamère, des conditions de dosage permettant de comparer les courbes obtenues pour les séquences F24-1 et F18-1 sont mises au point. Les concentrations de SSB nécessaires pour atteindre des différences d'anisotropie $r_{SSB} - r_f$ proches pour ces 2 séquences et d'environ 0,150 ont été déterminées : 20,25 nM pour F24-1 et 9 nM F18-1. Les courbes des courbes sont présentées en Figure 37.

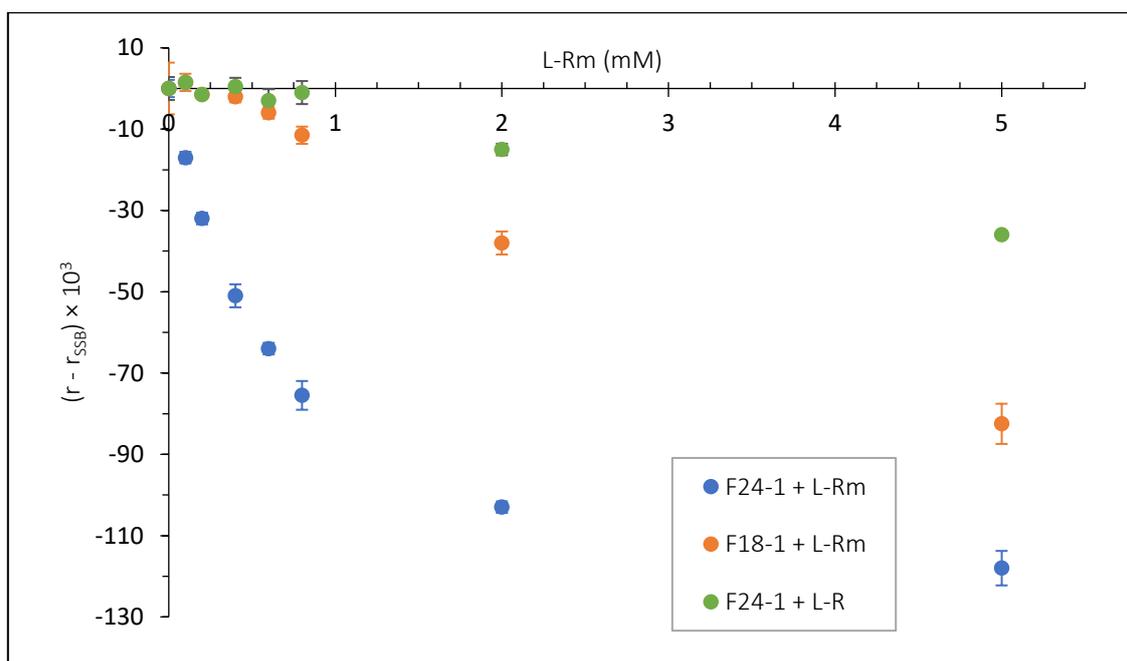


Figure 37 : Dosage inverse par anisotropie de fluorescence assisté par SSB pour les aptamères F24-1 et F18-1 à température ambiante avec la L-Rm ou la L-R; [Faptamère] = 10 nM ; Tampon 10 mM Tris pH 7,5, 100 mM NaCl ; [SSB] = 20,25 nM pour F24-1 et [SSB] = 9 nM pour F18-1 ; Température ambiante

La différence $r_{SSB} - r_f$ atteint 0,148 pour F24-1 et 0,152 pour F18-1 avec les concentrations de protéine utilisées. L'affinité de la SSB pour l'aptamère raccourci est légèrement meilleure que pour la séquence de 24 bases, les K_{dSSB} étant égaux à 5,5 nM pour F24-1 et à 6 nM pour la séquence raccourci. Une analyse qualitative de la pente à l'origine des courbes de la Figure 37 permet cependant d'estimer que la réduction de la longueur de la tige entraîne une baisse de l'affinité pour la cible.

Le dosage inverse a également été appliqué à l'aptamère F24-1 en présence de L-arginine (Figure 37). Cette cible est en effet reconnue avec 20 fois moins d'affinité que la L-Rm.⁴ La comparaison qualitative de la pente à l'origine de cette courbe permet de noter que la perte

d'affinité pour la L-Rm de F18-1 due au raccourcissement de la tige semble inférieure à un facteur 20.

Une autre composition de tampon d'incubation a été testée dans le but de stabiliser la tige raccourcie : 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl. Entre 22,5 nM et 31,5 nM de SSB sont nécessaires afin d'obtenir au moins 80 % de complexation entre l'aptamère et la protéine dans ce tampon. Les résultats du dosage avec 22,5 nM montrent que l'amplitude des $|r - r_{SSB}|$ reste inférieure à celle obtenue avec 13,5 nM de SSB dans un tampon avec 100 mM de NaCl. Cette composition de tampon n'a donc pas été retenue pour la suite de l'étude.

La décision est donc prise de travailler pour la suite de l'étude à basse température, comme cela a été fait à la fin de l'étude sur l'aptamère anti-L-Ym, afin de stabiliser la tige des aptamères raccourcis et de pouvoir obtenir des différences d'anisotropie $r - r_{SSB}$ suffisantes pour pouvoir en extraire des valeurs de constantes de dissociation des complexes aptamère/L-Rm K_{dL-Rm} et les comparer.

3.2.2. Travail à basse température

Les manipulations ont donc été répétées dans une pièce dont la température était maintenue entre 2 et 4 °C. La solution d'aptamère est placée directement dans cette pièce après avoir subi une dénaturation à 80 °C pendant 5 minutes.

Comme expliqué précédemment, 4 paramètres peuvent être responsables des changements d'anisotropie de fluorescence observés au cours du dosage ($r_{SSB} - r_f$), K_{dSSB} (Équation 2), K_{dL-Rm} (adaptée de l'Équation 3) et g . Il est donc nécessaire d'en fixer certains ou de connaître leur influence sur la réponse du dosage afin de pouvoir comparer les K_{dL-Rm} .

- Premier paramètre : différence d'anisotropie $r_{SSB} - r_f$

La différence d'anisotropie $r_{SSB} - r_f$ des différentes séquences de 18 bases, pouvant être assimilée à la fenêtre analytique du dosage (Figure 27), peut être déterminée grâce à l'étude de l'interaction entre l'aptamère et la SSB. Les courbes d'interaction avec la protéine ont donc été tracées à basse température, selon le même protocole qu'à température ambiante, pour les séquences F18-X (X de 1 à 4), ainsi que pour une séquence scramble de 18 bases marquée en 5' par une fluorescéine et notée F18Scramble1 (Figure 38).

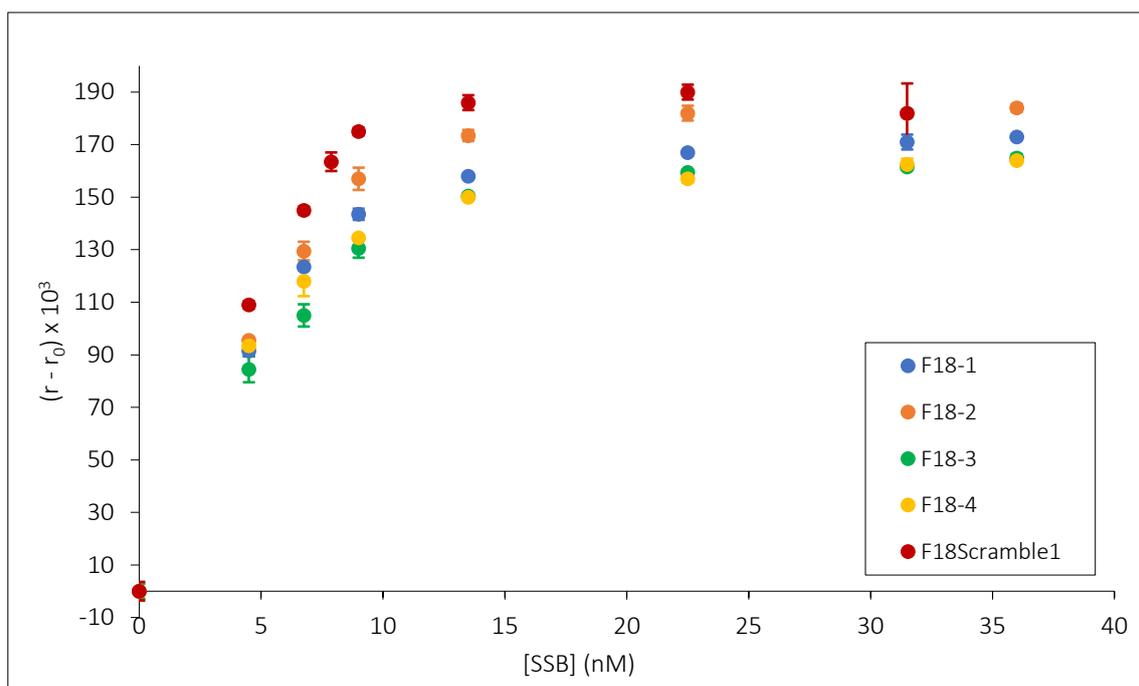


Figure 38 : Courbes d'interaction des aptamères F18-1, F18-2, F18-3, F18-4 et de la séquence F18Scramble1 avec la SSB à basse température en tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl ; $[F_{\text{séquence}}] = 10 \text{ nM}$

Afin de travailler avec une fenêtre analytique d'environ 0,150 pour toutes les séquences, les concentrations de protéine nécessaires ont été fixées à 9 nM pour les séquences F18-1, F18-2 et F18Scramble1, et à 13,5 nM pour F18-3 et F18-4.

- **Deuxième paramètre : constante de dissociation du complexe aptamère/SSB K_{dSSB}**

Les valeurs de K_{dSSB} sont déterminées pour les aptamères F18-1 à F18-4 grâce à une modélisation des courbes représentant la fraction d'aptamère liée à la protéine f_{SSB} (Équation 5) en fonction de la concentration de SSB à l'aide d'une équation de Boltzmann. Les valeurs obtenues montrent que l'affinité de la protéine est similaire à 10 % près pour les 4 séquences avec des valeurs d'environ 4,9 nM.

- **Troisième et quatrième paramètres : constante dissociation du complexe aptamère/L-Rm K_{dL-Rm} et quenching dû à la protéine**

Le dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB a ensuite été appliqué à basse température à ces séquences avec la concentration de protéine adaptée à chacune (Figure 39).

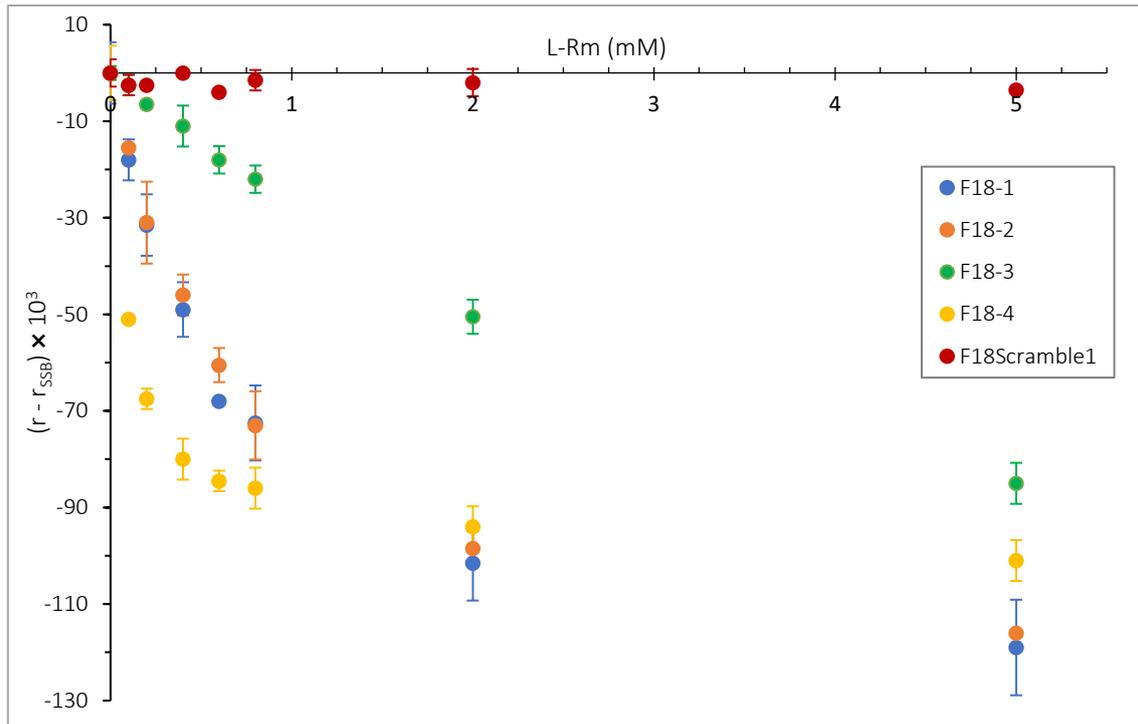


Figure 39 : Dosage inverse par anisotropie de fluorescence assisté par SSB des oligonucléotides de 18 bases avec 9 nM de SSB pour F18-1, F18-2 et F18Scramble1 et 13,5 nM de SSB pour F18-3 et F18-4 ; [Fséquence] = 10 nM ; Tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM NaCl ; [SSB] = 9 ou 13,5 nM ; entre 2 et 4 °C ; Lecture 100 secondes sec après l'ajout de SSB

L'amplitude très faible de la réponse du scramble semble indiquer que la part du signal due aux interactions non-spécifiques reste faible dans les conditions employées.

Le modèle de Scatchard a ensuite été utilisé afin de déterminer les K_{dL-Rm} . L'hypothèse selon laquelle les valeurs de r_f et r_b peuvent être considérées comme égales à 10 % près (comme c'était le cas pour la séquence F24-1) a été faite et sera vérifiée lors de prochaines manipulations. Les anisotropies mesurées ont également permis de vérifier que les valeurs de $I_{SSB,max}$ et $r_{SSB,max}$ sont égales à 10 % près aux valeurs mesurées I_{SSB} et r_{SSB} pour les 4 séquences étudiées. La représentation de $R/[L-Rm]$ en fonction de R est montrée pour la séquence F18-2 ci-dessous :

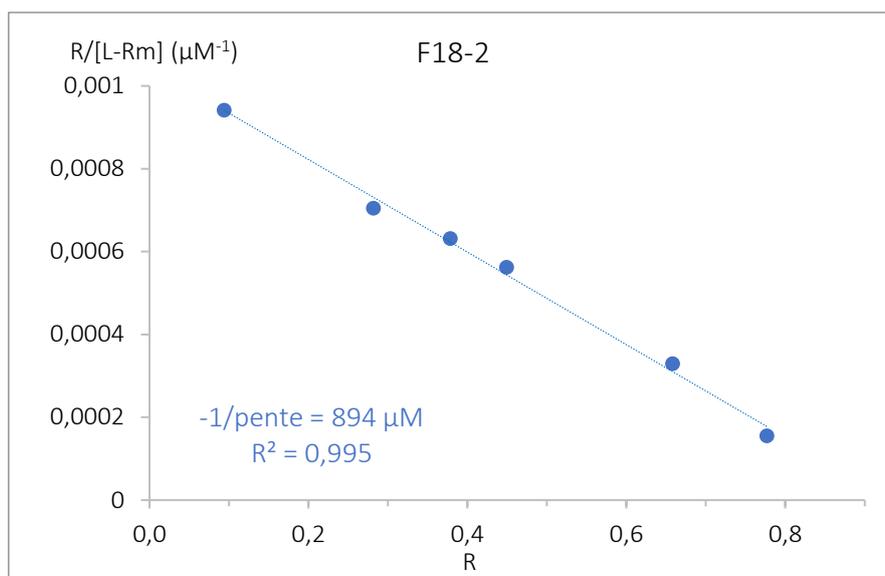


Figure 40 : Courbe de Scatchard obtenue à partir du dosage assisté par SSB de la séquence F18-2 à basse température ; Courbe obtenue à partir des données présentées sur la Figure 39

Le Tableau 4 présente les paramètres issus du modèle de Scatchard appliqué aux résultats de la Figure 39. Il n'a pas été possible d'appliquer le modèle de Scatchard pour des concentrations de cible de 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 2 et 5 mM pour F18-3 car celles-ci ne permettent pas de générer des signaux suffisants. Le dosage est donc réalisé à nouveau à cette séquence en adaptant les concentrations de L-Rm (0,6 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 3 ; 4 et 5 mM).

Tableau 4 : Constantes apparentes de dissociation des complexes F18-X/L-Rm, facteurs g' et $r_{SSB} - r_f$ obtenus par l'application du modèle de Scatchard aux courbes de la Figure 39 ; X=1, 2, 3 ou 4 et *les concentrations de cible ont été adaptées pour pouvoir appliquer le modèle à F18-3

	F18-1	F18-2	F18-3*	F18-4
K_{dL-Rm} (μM)	716 ± 50	832 ± 89	4187 ± 219	97 ± 8
Facteur g	0,87 ± 0,02	1,01 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,97 ± 0,03
$r_{SSB} - r_f$ (x 10 ³)	150 ± 2	153 ± 4	149 ± 2	144 ± 7

Les valeurs de $r_{SSB} - r_f$ mesurées sont très proches pour les 4 séquences et environ égales à 0,150, comme déterminé lors de l'étude des courbes d'interaction aptamère-SSB. Les concentrations de protéine sélectionnées pour chaque séquence semblent donc adaptées. Les facteurs g sont également assez proches, la valeur la plus élevée étant égale à 1,16 fois la plus basse. Il semble donc raisonnable de considérer que ces paramètres n'ont pas un impact majeur sur la réponse du dosage.

La différence d'amplitude de réponse constatée entre les séquences de 18 bases paraît donc pouvoir être majoritairement expliquée par les constantes apparentes de dissociation K_{dL-Rm} répertoriées dans le Tableau 4. La valeur obtenue dans ces conditions pour F18-1 (716 ± 50

μM) est plus élevée que celle déterminée pour F24-1 à température ambiante (environ $324 \mu\text{M}$). Cette augmentation était attendue car le raccourcissement de la tige de l'aptamère entraîne un équilibre entre les formes tige-boucle et ouverte pour le 18-mer, ce qui affecte la reconnaissance de la cible. La séquence F18-2 développe une affinité pour L-Rm très proche de celle de la séquence de référence ne contenant pas d'OG. Le remplacement de la guanine en position 10 par une OG (F18-3) semble cependant diminuer l'affinité de l'aptamère avec un $K_{d\text{-L-Rm}}$ 5,8 fois supérieur à celui de F18-1. La séquence F18-4 présente quant à elle un gain important d'affinité pour la L-Rm d'un facteur 7,4 par rapport à la séquence F18-1.

D'autres manipulations ont été effectuées afin de tenter d'étendre la fenêtre analytique jusqu'à 0,165 et d'améliorer la sensibilité du dosage. Cette valeur peut être atteinte avec 13,5 nM de protéine pour F18-1 et F18-2. Les deux autres séquences nécessitent quant à elles environ 36 nM de SSB d'après la Figure 38. Le dosage effectué avec cette forte concentration de protéine pour F18-3 et F18-4 a révélé une compétition très importante. La SSB parvient à fixer des aptamères initialement complexés avec la cible et le signal mesuré ne traduit alors plus la proportion de séquences non liées à la L-Rm. Les valeurs absolues des $r - r_{\text{SSB}}$ mesurés sont moins élevées qu'avec 13,5 nM. L'étude dans ces conditions n'a donc pas été approfondie.

En conclusion, le dosage inversé par anisotropie de fluorescence assisté par SSB semble adapté pour la comparaison de l'affinité des séquences contenant une base OG. Préalablement développé avec l'aptamère anti-L-tyrosinamide, il a ensuite été appliqué à l'aptamère F24-1 anti-L-Rm. Une part non négligeable du signal étant due aux interactions non-spécifiques entre l'oligonucléotide anionique et la cible cationique, des séquences raccourcies de 3 paires de bases ont été introduites. Le dosage a été appliqué à ces séquences à basse température afin de les stabiliser et a montré que l'affinité de l'aptamère peut être impactée par le remplacement d'une des guanines du site de reconnaissance par une 8-oxoguanine : elle peut être inchangée, diminuée ou améliorée en fonction de la position de la modification. L'étape suivante consiste donc à étudier l'oxydation de la base 8-oxoguanine au sein des séquences d'aptamères, et de mettre au point les conditions de pontages covalents *via* l'oxydation de cette base dans les complexes aptamère/cible.

4. Discussion

Comme évoqué précédemment, de nombreuses modifications chimiques peuvent être appliquées aux aptamères afin d'améliorer leur résistance aux nucléases ou ralentir leur clairance rénale.^{26,57,152} De nombreux travaux ont aussi montré la possibilité de modifier l'affinité d'un aptamère pour sa cible à l'aide de modifications de l'oligonucléotide dans des buts thérapeutiques ou diagnostiques.^{152,153} La synthèse chimique des aptamères permet d'introduire facilement et à positions choisies des modifications, contrairement aux anticorps. L'amélioration de l'affinité peut résulter de 2 phénomènes à la suite de la modification d'aptamères : l'introduction de groupes fonctionnels permet de diversifier et de renforcer les interactions avec la cible, et/ou la stabilisation de la conformation repliée de l'aptamère qui peut être nécessaire à la reconnaissance de la cible.

Les modifications peuvent être introduites avant ou après le processus de SELEX. Les modifications pré-SELEX se font sur la banque utilisée lors de la sélection. Des groupes fonctionnels hydrophobes, hydrophiles ou chargés, souvent disponibles commercialement, peuvent être placés dans les séquences au cours de la synthèse. Il est cependant nécessaire que ces modifications soient compatibles avec les polymérases utilisées pendant l'étape de PCR. Des modifications de la position C5 des pyrimidines ou de la position N7 des purines sont généralement bien tolérées par ces enzymes. Les modifications post-SELEX sont faites sur les séquences sélectionnées au cours du processus. Il n'est donc pas requis qu'elles soient compatibles avec les polymérases. Elles peuvent cependant influencer l'affinité pour la cible puisqu'elles sont introduites à la suite de l'étape de sélection.

De nombreuses modifications sont faites sur les aptamères reconnaissant des cibles de masse importante, telles que les protéines ou les cellules afin d'augmenter leur affinité.^{152,154-156}

Celles-ci peuvent par exemple être appliquées sur les groupements phosphate. Un ou deux atomes d'oxygène peuvent être remplacés par des atomes de soufre afin de former des thiophosphates, comme cela a été fait avec un aptamère reconnaissant la thrombine. Une diminution du K_D de d'un facteur 500 a pu être observée.¹⁵⁷

L'incorporation de nucléobases artificielles peut également être envisagée afin d'améliorer la diversité des banques d'oligonucléotides utilisées lors du processus de SELEX. Cela a été utilisé pour des aptamères reconnaissant le facteur de croissance des cellules endothéliales

vasculaires-165 (VEGF-165) et l'interféron- γ (IFN- γ). Une banque a été générée à partir des 4 nucléotides naturels et d'un nucléotide artificiel hydrophobe : le 7-(2-thiényl)imidazolé[4,5-b]pyridine (Ds). Les séquences de la banque contenaient 1 à 3 Ds, ce qui a permis d'accroître la diversité chimique structurelle des oligonucléotides. Le processus de SELEX a permis de sélectionner des séquences dont les affinités étaient 100 fois supérieures à celles mesurées pour les aptamères ne contenant que des bases naturelles.^{156,158}

Des SOMAmers (slow off-rate modified aptamers), développés par Somalogic, représentent une classe d'aptamères également sélectionnés à partir de bibliothèques dont la diversité est augmentée. Dans ce cas, la banque utilisée au cours de la SELEX est composée de séquences contenant des modifications imitant les chaînes latérales d'acides aminés. Lors des premiers développements, la banque a été synthétisée grâce à 4 dérivés de désoxyuridines triphosphate obtenus par la modification de leur position C5 par des groupements benzyle, naphthyle, tryptamine ou isobutyle. Des aptamères de haute affinité (K_D en dessous du nM) ont été sélectionnés contre 813 protéines humaines.¹⁵⁹

Certaines modifications ont été faites sur des aptamères reconnaissant des petites molécules. Verdonck *et al.* ont par exemple incorporé une thymidine marquée par un imidazole (T^{ImH^+}) dans la tige de l'aptamère anti-L-Rm utilisé dans ce projet de thèse. La base T en position 3 a été remplacée par résidu hydrophile. Cette modification a montré une stabilisation thermique de l'aptamère, tout en conservant l'affinité pour la cible.¹⁶⁰ Des liaisons hydrogène supplémentaires et une stabilisation thermique avaient déjà été constatées lors de l'incorporation de ce type de modifications dans des duplexes d'ADN.¹⁵³

Les modifications d'aptamères sont donc surtout réalisées pour des séquences reconnaissant de grosses cibles et ayant un intérêt thérapeutique ou diagnostiques. Les gains d'affinité peuvent être très importants, ce qui peut s'expliquer par le très grand nombre d'interactions ayant lieu entre la cible et l'oligonucléotide, et sur lesquelles il est possible de travailler. Les modifications réalisées sur les aptamères reconnaissant des petites cibles (masse inférieure à 1000 Da environ) sont plus rares et ne permettent pas forcément un gain d'affinité. Les modulations (gain d'un facteur 7,4 ou perte d'un facteur 5,8) de l'affinité de l'aptamère anti-L-Rm constatées dans ce projet à la suite du remplacement d'une guanine de la boucle par une OG semblent donc intéressantes. Ce type de modification pourrait être appliqué à un autre aptamère reconnaissant des petites cibles, notamment celui reconnaissant l'ATP et la

D-adénosine (Figure 23) afin d'étudier son effet sur la reconnaissance d'une cible neutre ou négativement chargée.

Les différences significatives d'affinité constatées en fonction de la position de l'OG dans la boucle de reconnaissance permettent de penser que l'étape de formation du pontage covalent entre l'aptamère anti-L-Rm et la cible pourrait être plus efficace pour les séquences de forte affinité. Il serait également important de vérifier si la présence de l'OG induit un changement conformationnel significatif de l'aptamère.

Chapitre 3 : Détection et
caractérisation des produits
d'oxydation et de pontages à la
suite de l'action d'un sel
d'iridium

L'application du dosage inversé assisté par la protéine SSB aux séquences F18-1 à F18-4 a montré que le remplacement d'une guanine du site de reconnaissance par une 8-oxoguanine a un impact sur l'affinité de l'aptamère pour la cible L-Rm. Elle peut être inchangée (F18-2), augmentée (F18-4) ou diminuée (F18-3) par rapport à la séquence F18-1 ne contenant pas d'OG selon la position de cette base.

La prochaine étape du projet consiste en l'étude de l'effet de l'oxydation des aptamères en absence ou en présence de cible L-Rm, notamment pour déterminer si l'oxydation du complexe aptamère-cible est capable de générer un pontage covalent lorsque l'aptamère contient une 8-oxoguanine. Dans un premier temps, l'électrophorèse capillaire (principe expliqué page 116) a été employée pour étudier cette oxydation. Cette technique utilise un capillaire de faible diamètre interne rempli d'un électrolyte et au sein duquel la séparation des analytes a lieu sous l'action d'un champ électrique. La séparation des espèces se fait selon leur rapport charge sur taille. Un détecteur UV-visible a été utilisé à la sortie du capillaire car l'ADN absorbe dans cette gamme de longueur d'onde.

1. Détection des produits d'oxydation et de pontages

Le groupe de Burrows a montré que la 8-oxoguanine, présente dans des oligonucléotides en série ADN (duplexe ou simple brin), peut subir une suroxydation par du sel d'iridium (IV).¹¹⁴

Le projet global a pour objectif de former des pontages covalents entre un aptamère et sa cible *via* l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine présente dans le site de reconnaissance de l'oligonucléotide. Il est donc nécessaire de vérifier dans un premier temps que la réaction d'oxydation de cette base est efficace lorsqu'elle est présente au sein d'un aptamère. Il faut également vérifier dans un deuxième temps que l'oxydant est sélectif en contrôlant qu'il ne réagit pas sur l'aptamère ne contenant pas d'OG.

1.1. Utilisation du sel d'iridium et produits théoriques

L'oxydant choisi pour le projet est : $2 \text{NH}_4^+, \text{IrCl}_6^{2-}$. Ce sel d'iridium a un potentiel d'oxydation estimé à 0,90 V (vs ESH) et n'est donc pas capable d'oxyder les bases normales de l'ADN dont les potentiels d'oxydation sont supérieurs à 1V/ESH.^{87,114} Celui de la lésion 8-oxoguanine est quant à lui d'environ 0,58 V (vs ESH)¹¹⁴ et cette base peut donc être oxydée par ce sel d'iridium.

Cet oxydant semble donc adapté au projet qui nécessite que l'oxydation n'ait lieu spécifiquement que sur l'OG.

Plusieurs produits majoritaires de cette oxydation à un électron¹¹⁸ ont été identifiés.¹¹⁶ Ils sont obtenus par addition nucléophile de l'eau sur la position C5 du radical cation de l'OG produit par cette oxydation. Les structures sont rappelées dans la Figure 41. Le composé spiro, noté Sp, possède 2 cycles reliés par un atome de carbone et se caractérise par un gain de 16 Da par rapport à la base 8-oxoguanine. Le produit noté Gh, un guanidino hydantoïne, est en équilibre avec la forme iminoallantoïne notée Ia.¹¹⁸ La formation des produits Gh et Ia s'accompagne d'une perte de 10 Da par rapport à la 8-oxoguanine.⁹

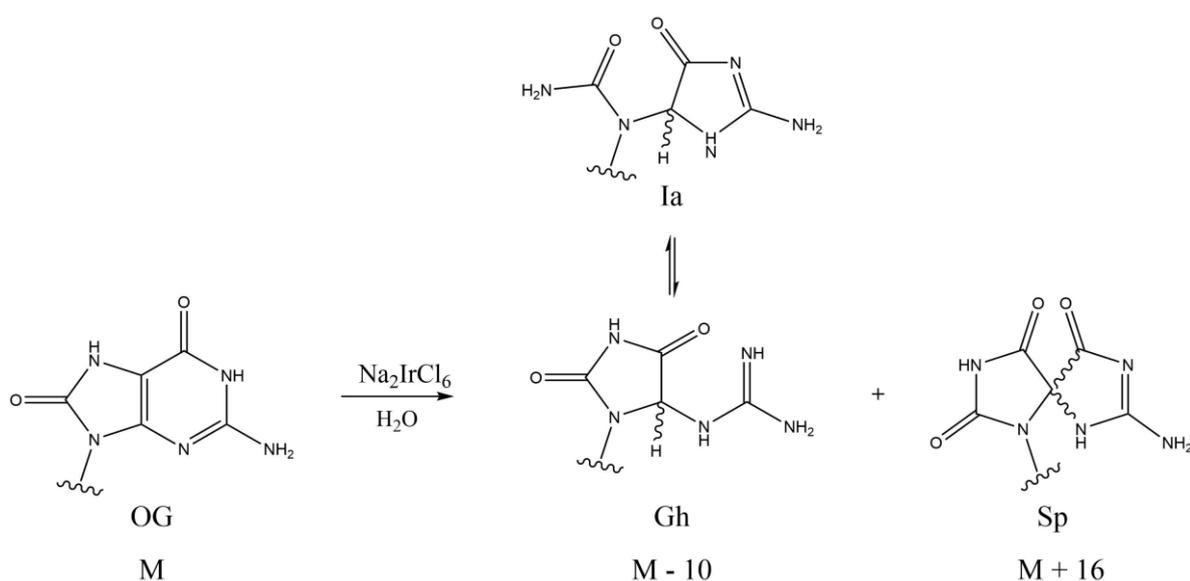


Figure 41 : Structures des produits majoritaires de l'oxydation de la 8-oxoguanine par un sel d'iridium (IV)¹¹⁶

Il a également été montré que lorsque d'autres nucléophiles sont présents dans le milieu, ceux-ci peuvent (et préférentiellement) attaquer le C5 de la 8-oxoguanine et former un pontage covalent avec cette base. Cela a par exemple été observé entre l'enzyme de réparation MutY d'*Escherichia coli* et des oligomères duplexes contenant une base 8-oxoguanine^{123,126}, ainsi qu'avec la SSB d'*Escherichia coli*¹. Les produits théoriques issus du pontage entre la L-Rm et une OG via une attaque par le groupement guanidinium sont notés Gh-Rm et Sp-Rm et présentés en Figure 42.

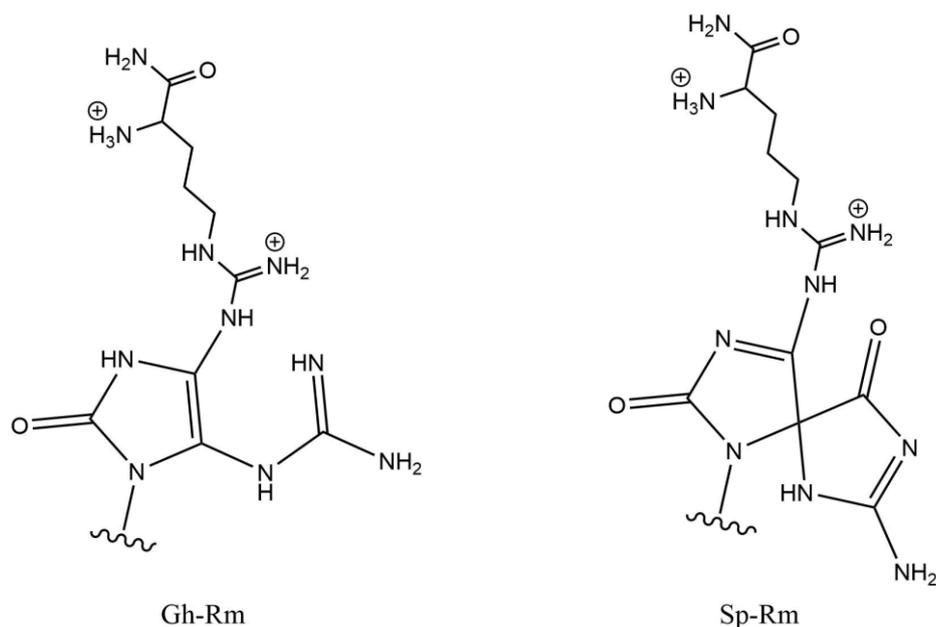


Figure 42 : Structures des produits théoriques issus du pontage covalent entre la L-Rm et une OG via l'oxydation de cette base (adaptées de^{1,126})

1.2. Effet du sel d'iridium sur les aptamères

L'électrophorèse capillaire a été utilisée afin d'étudier l'effet du sel 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} sur les aptamères (contenant ou non une OG) en absence ou en présence de cible.

1.2.1. Mise au point et optimisation des conditions d'analyse

Les analyses sont réalisées avec un capillaire PVA permettant d'éliminer le flux électroosmotique.¹⁶¹

L'injection de l'échantillon est hydrodynamique, c'est-à-dire qu'elle est faite en appliquant une pression à l'une des extrémités du capillaire. Les séquences de 18 bases 18-1, 18-2, 18-3 et 18-4 (Figure 36) sont utilisées. La détection des oligonucléotides est réalisée à 254 nm.

Les conditions d'analyse sont tout d'abord mises au point. Un échantillon contenant l'aptamère 18-4 à 5 μM , 5 mM de L-Rm, 100 μM de 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} et 1 mM EDTA pH 8 (voir page 89) dans 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 est analysé. Le tampon de migration testé dans un premier temps est composé de 20 mM phosphate de sodium, pH 7,5. L'ajout de 50 mM de NaCl dans ce tampon permet d'obtenir des pics plus fins et mieux séparés. Cette composition est donc utilisée pour la suite des analyses.

La composition du tampon d'incubation, correspondant au tampon dans lequel les échantillons sont préparés, est également optimisée. Le choix a été fait de travailler dans un

tampon contenant du phosphate de sodium pour ces premières manipulations afin d'éviter la potentielle formation de pontages entre les aptamères contenant une OG et le tris possédant des groupements nucléophiles. Ce phénomène avait été constaté lors de précédentes analyses réalisées au laboratoire.

Les compositions des tampons d'incubation testés sont :

- T1 : 5 mM phosphate de sodium pH 7,5
- T2 : 20 mM phosphate de sodium pH 7,5
- T3 : 95 mM phosphate de sodium pH 7,5
- T4 : 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 20 mM NaCl
- T5 : 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 100 mM NaCl

Les analyses avec les plus fortes concentrations de phosphate de sodium (T2 et surtout T3) et celles avec le mélange phosphate de sodium/NaCl (T4 et T5) montrent un élargissement des pics et une moins bonne séparation des produits. Le tampon constitué de 5 mM de phosphate de sodium permet de générer les électrophérogrammes les plus résolus et est donc conservé pour la suite de l'étude.

1.2.2. Détection des produits d'oxydation et de pontage

L'effet du complexe $[\text{IrCl}_6]^{2-}$ sur les aptamères contenant ou non une OG a ensuite été analysé. Il a été décidé d'ajouter de l'EDTA aux échantillons afin de complexer le sel d'iridium n'ayant pas réagi et d'arrêter la réaction d'oxydation.

Des essais sont effectués avec les aptamères 18-1 à 18-4 (5 μM) dans 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 en l'absence (échantillons A) et en présence de 100 μM d'oxydant (échantillons B). Des échantillons (C) sont aussi préparés en ajoutant de la cible (1 mM) avant l'oxydant. Les aptamères sont d'abord incubés avec la L-Rm pendant 5 minutes (échantillons C) avant l'ajout de l'oxydant. La réaction d'oxydation est arrêtée après 15 minutes en ajoutant 1 mM d'EDTA.

1.2.2.1. Résultats obtenus en absence de cible

Pour la séquence 18-1 ne contenant pas d'OG, aucun changement n'a été constaté entre les électrophérogrammes des échantillons A et B, ce qui confirme qu'il n'y a pas d'oxydation de cet aptamère.

Pour les 3 séquences contenant une OG (18-2, 18-3 et 18-4), la comparaison des électrophérogrammes obtenus pour les échantillons A et B permet de constater qu'en présence d'oxydant, le pic correspondant à l'aptamère disparaît et de nouveaux pics apparaissent. Les électrophérogrammes obtenus pour la séquence 18-2 sont présentés en Figure 43 : dans l'échantillon A l'aptamère migre à 7,8 minutes, tandis que dans l'échantillon B, 2 pics majoritaires apparaissent à des temps de migration plus élevés (8,8 et 9,0 minutes). Le pic 1 semble correspondre au sel d'iridium après réaction et le pic 2 à l'EDTA (Figure 43).

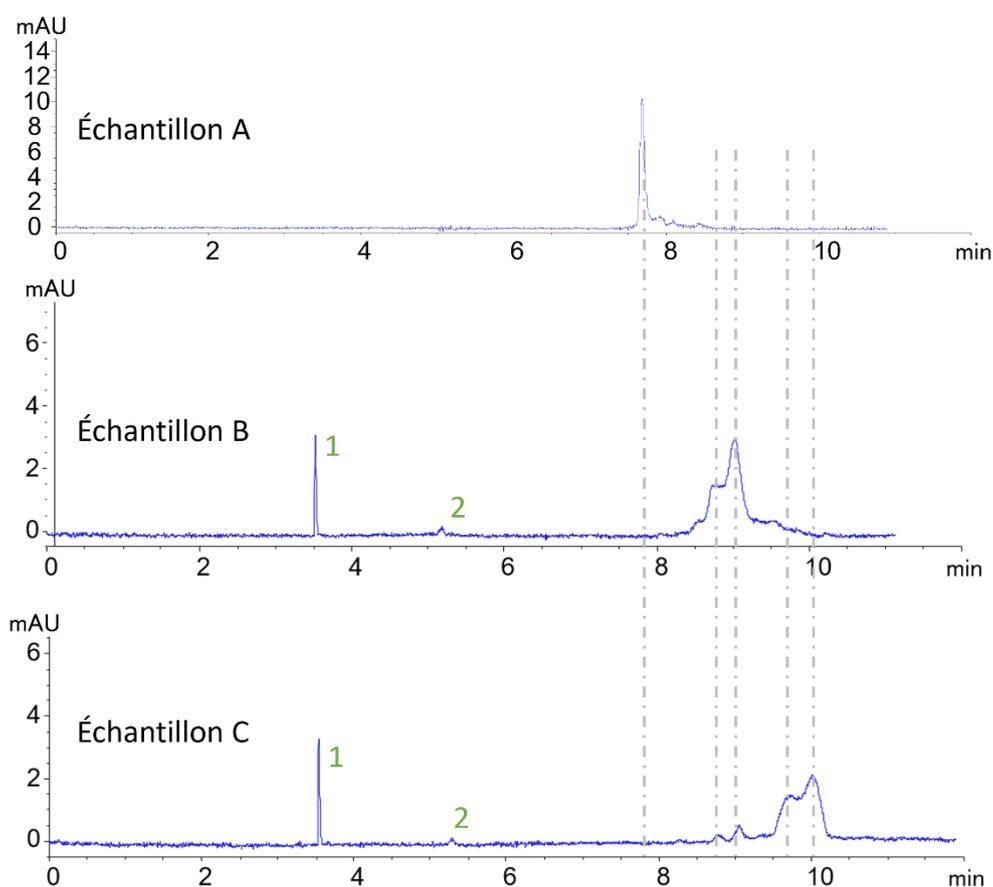


Figure 43 : Électrophérogrammes obtenus pour l'analyse des échantillons A, B et C pour la séquence 18-2 (5 μ M). A : 18-2 + EDTA 1 mM ; B : 18-2 + 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} 100 μ M + EDTA 1 mM ; C : 18-2 + L-Rm 1 mM + 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} 100 μ M + EDTA 1 mM. Tampon de migration : 20 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 50 mM NaCl

Ces observations permettent de supposer que le sel d'iridium est capable d'oxyder la 8-oxoguanine dans un aptamère et que les deux pics majoritaires détectés correspondent aux produits attendus Gh et Sp (Figure 41). L'oxydant employé ne semble pas capable d'oxyder les autres bases de l'ADN. Des analyses à l'aide d'une autre technique analytique est cependant nécessaire afin de vérifier si l'oxydation est spécifique à la 8-oxoguanine et si les produits formés sont bien ceux décrits dans la littérature.

1.2.2.2. En présence de cible

Les électrophérogrammes des échantillons C permettent d'examiner l'effet de l'oxydant sur des échantillons composés de complexes aptamère/cible. Pour les séquences contenant une OG (18-2 à 18-4), la disparition du pic correspondant à l'oligonucléotide est à nouveau constatée. Il est également possible de noter la diminution des pics correspondant aux produits Gh et Sp ainsi que l'apparition de 2 pics majoritaires à des temps de migration encore plus importants. Par exemple dans le cas de la séquence 18-2 (Figure 43), l'échantillon C montre des pics minoritaires aux temps de migration des produits Gh et Sp (8,8 et 9,0 minutes) et de nouveaux pics migrant à 9,7 et 10,0 minutes. Ces derniers pics ne sont pas observés pour la séquence ne contenant pas d'OG. Ces constatations permettent de supposer que l'oxydation de l'OG en présence de cible mène à la formation de nouveaux adduits potentiellement dérivés de Gh et Sp et décrits dans la Figure 42.

Des concentrations d'oxydant plus faibles (80, 50, 25 et 20 μM) ont ensuite été testées en présence de 5 μM d'aptamère (échantillons similaires aux B). Les analyses par EC montrent que des concentrations voisines de 25 et 50 μM de complexe d'iridium sont suffisantes pour oxyder quantitativement les séquences 18-2, 18-3 et 18-4.

La quantité de cible a également été diminuée progressivement, passant de 1 mM à 0,05 mM. Aucune différence significative n'est observée entre les électrophérogrammes obtenus, ce qui semble indiquer que les pontages potentiels se forment efficacement même en présence de 50 μM de L-Rm.

Les analyses réalisées par électrophorèse capillaire ont donc montré que 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} a un effet sur les échantillons d'aptamères contenant une OG, mais pas sur ceux composés uniquement de bases normales. Cet effet semble différent selon si la cible L-Rm est présente ou non dans ces échantillons. L'hypothèse est faite que l'oxydation de la 8-oxoganine dans les aptamères par ce sel d'iridium est efficace et sélective, et qu'elle entraîne la formation de 2 produits dans chaque cas. Des analyses ont donc été faites par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) afin de caractériser ces produits.

2. Caractérisation des produits d'oxydation et de pontages

La chromatographie liquide à haute performance (principe expliqué page 121) est une technique analytique permettant la séparation de composés. Elle est couramment utilisée

pour l'analyse et la caractérisation d'acides nucléiques^{162,163} et a été employée au cours de ce projet avec des aptamères, couplée avec un spectromètre de masse (MS). Lorsqu'elle est utilisée pour la séparation d'acides nucléiques, la rétention est basée sur les interactions entre les nucléobases hydrophobes et la phase stationnaire non polaire. Pour ce projet, les charges négatives de l'oligonucléotide, qui le rendent très polaire, sont masquées par une amine quaternaire présente dans l'éluant (acétate de triéthylammonium, TEAA). Les analyses sont dites en mode suppression d'ions.

Les échantillons A, B et C préparés pour les analyses par électrophorèse capillaire ont été réutilisés pour cette partie.

2.1. Caractérisation des produits formés en absence de cible

Les premières analyses effectuées par HPLC-MS ont eu pour objectif de confirmer les observations faites lors de la comparaison des électrophérogrammes des échantillons des séquences contenant une OG et exposées ou non au sel d'iridium et selon lesquelles ce dernier oxyde sélectivement la base 8-oxoguanine.

Pour cela, les échantillons préparés précédemment et contenant les oligonucléotides seuls (A) ou les oligonucléotides en présence du sel d'iridium (B) pour les différentes séquences de 18 bases ont été analysés par HPLC-MS équipée d'une colonne C18. L'acquisition est faite en mode scan afin de détecter les masses comprises entre 1000 et 2000 Da. La source ESI présente la particularité de générer des ions multichargés notés $[M-XH]^{X-}$ pour une ionisation en mode négatif, avec M la masse du composé et X le numéro de l'état de charge. Leur rapport m/z est donc égal à : $\frac{[M-X \times m_H]}{X}$ avec m_H la masse d'un atome d'hydrogène. Il est donc possible de détecter des analytes dont la masse est supérieure à la limite haute de l'analyseur utilisé (2000 Da avec ce quadripôle). Le spectre de masse obtenu pour la séquence 18-1 seule est présentée en Figure 44.

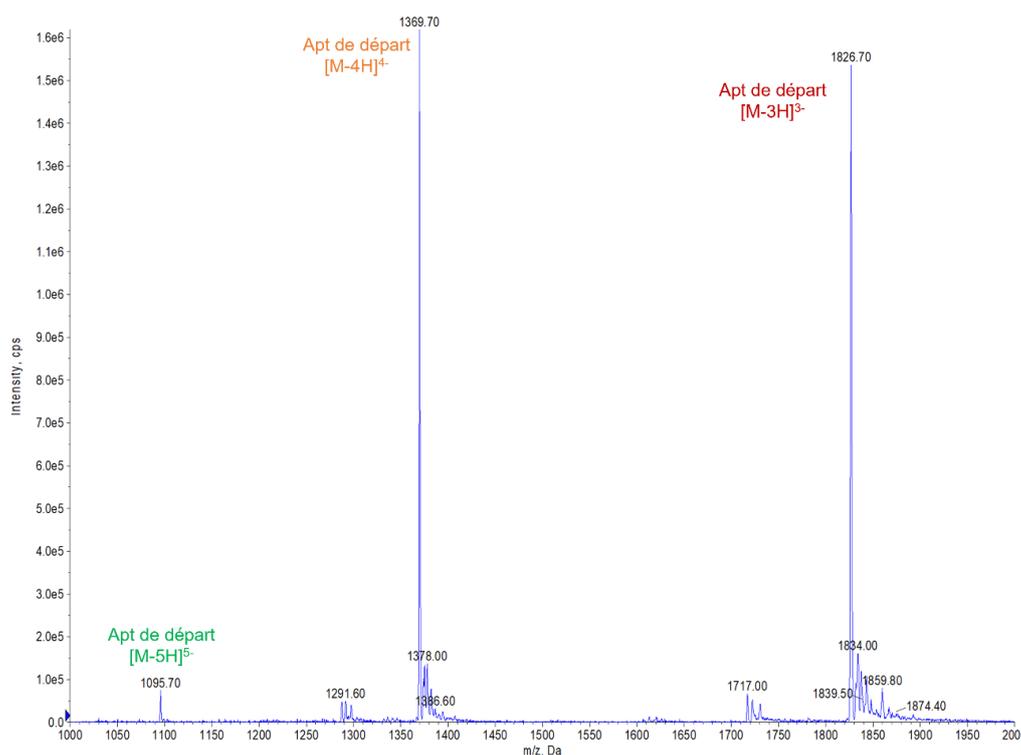


Figure 44 : Spectre de masse en mode scan de la séquence 18-1 non traitée par le sel d'iridium (échantillon A)

Les masses majoritaires détectées correspondent aux états de charge 3⁻ et 4⁻ de l'aptamère de départ.

Tableau 5 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ et de ses états de charge [M-3H]3⁻ et [M-4H]4⁻ pour la séquence 18-1

	Aptamère de départ
M	5484,6
[M-3H]3⁻	1827,2
[M-4H]4⁻	1370,2

Le spectre de masse de l'aptamère 18-1 traité par le sel d'iridium (échantillon B) est identique à celui de l'oligonucléotide seul (Figure 44).

La comparaison des spectres de masses des aptamères contenant une OG (Figure 45 pour 18-2) permet de faire différentes observations.

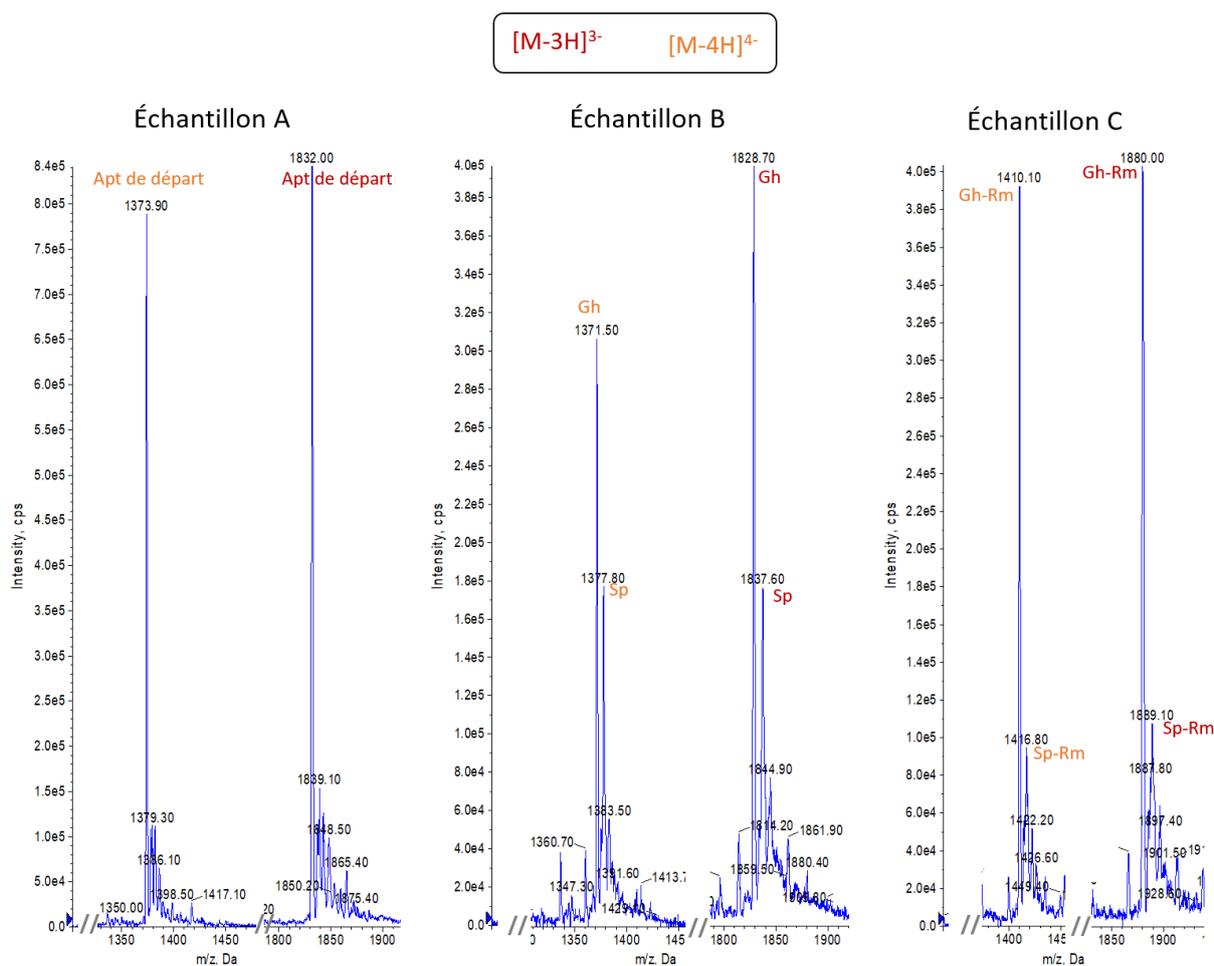


Figure 45 : Spectres de masse des échantillons A, B et C pour la séquence 18-2 ; mode scan, états de charge 3⁻ en rouge et 4⁻ en orange ; composition des échantillons présentées page 90

Pour ces 3 séquences, le spectre obtenu en présence d'oxydant est différent de celui de l'oligonucléotide de départ seul, qui lui n'est plus détecté. De plus, d'autres masses mesurées dans ces échantillons sont cohérentes avec celles prédites pour les états de charge 3⁻ et 4⁻ des produits d'oxydation théoriques Gh et Sp représentés en Figure 41 (Tableau 6).

Tableau 6 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ, des produits d'oxydation, de pontages avec la L-Rm et de leurs états de charge 3⁻ et 4⁻ pour les aptamères 18-2, 18-3 et 18-4

Séquence	18-X				
	Apt de départ	Produits d'oxydation (Figure 41)		Pontages avec L-Rm (Figure 42)	
	18-X	Gh	Sp	Gh-Rm	Sp-Rm
M	5500,6	5490,6	5516,6	5645,8	5671,8
[M-3H]³⁻	1832,5	1829,2	1837,9	1880,9	1889,6
[M-4H]⁴⁻	1374,2	1371,7	1378,2	1410,5	1417,0

Ces résultats confirment les premières hypothèses faites suite aux analyses par électrophorèse capillaire et selon lesquelles l'oxydation de l'OG par 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} dans les aptamères est efficace, spécifique et génère les produits de forme Sp et Gh prédits par la littérature.

2.2. Caractérisation des produits formés en présence de cible

Les échantillons contenant les oligonucléotides traités par le sel d'iridium en présence de la cible (échantillons C) ont également été analysés par HPLC-MS.

Le spectre de masse obtenu pour la séquence 18-1 ne contenant pas de 8-oxoguanine est similaire à celui de l'oligonucléotide seul (Figure 44). Au contraire, ceux des séquences contenant une OG (Figure 45 pour 18-2) révèlent à nouveau la disparition des pics correspondant aux aptamères de départ, mais également la présence de pics donc les masses sont cohérentes avec les produits de pontages avec la cible Gh-Rm et Sp-Rm (Figure 42) prédits d'après la littérature (Tableau 6). Les masses correspondant à Gh et Sp ne sont pas détectées sur ces spectres.

Des pontages covalents entre un aptamère et sa cible *via* l'oxydation spécifique d'une base 8-oxoguanine par le sel d'iridium sont donc formés. Les masses obtenues en présence de cible sont en accord avec des produits Gh-Rm et Sp-Rm dérivés des formes Gh et Sp.

Les échantillons analysés en électrophorèse capillaire afin de vérifier l'impact de la diminution des concentrations de cible L-Rm et d'oxydant ont également été analysés par HPLC-MS. Une analyse qualitative des spectres de masse obtenus permet de confirmer les observations faites à l'aide des électrophérogrammes : entre 25 et 50 μM de 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} sont suffisants pour oxyder totalement 5 μM d'aptamère contenant une OG, et la réduction de la concentration de cible jusqu'à 50 μM n'a pas d'un impact significatif sur les produits formés.

2.3. Contrôle avec un oligonucléotide « scramble » non susceptible de reconnaître la cible

Ces résultats sur la formation de pontages covalents entre un aptamère et sa cible sont encourageants. Un contrôle a alors été fait à l'aide d'une séquence nommée 18Scramble2.

Celle-ci est similaire au 18Scramble, mais a une 8-oxoguanine en position 8 et peut donc être oxydée par le sel d'iridium.

L'étude des électrophérogrammes et des spectres de masses de l'oligonucléotide seul et traité en absence de cible amène aux mêmes observations que celles faites précédemment : l'ajout du sel d'iridium entraîne la disparition des pics correspondant à l'oligonucléotide de départ, ce qui indique que l'oligonucléotide a bien été oxydé. Les nouveaux produits détectés ont des masses cohérentes avec les structures des produits d'oxydation Gh et Sp présentées précédemment (Figure 41). Le spectre de masse de cet oligonucléotide oxydé en présence de cible a révélé des pics similaires à ceux obtenus pour les aptamères 18-2 à 18-4, contrairement à ce qui était attendu, traduisant une formation significative de pontage avec la L-Rm. La séquence scramble n'étant pas censée reconnaître la cible, une proportion importante de Gh et Sp formés par l'attaque nucléophile de l'eau sur l'OG oxydée était espérée. Cela confirme l'existence d'interactions non-spécifiques entre l'aptamère et la cible favorisant ainsi la formation des pontages.

2.4. Digestion des oligonucléotides pontés

Afin de confirmer la position de la base impliquée dans le pontage avec la cible, des échantillons pontés avec la Rm et préparés avec les séquences 18-2 et 18Scramble2 ont été digérés à l'aide de la phosphodiesterase II, puis analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF ((désorption ionisation laser assistée par matrice - temps de vol) en mode négatif. Cette enzyme hydrolyse les oligonucléotides de l'extrémité 5' vers la 3'. La Figure 46 présente le spectre de l'échantillon d'aptamère 18-2 ponté et digéré.

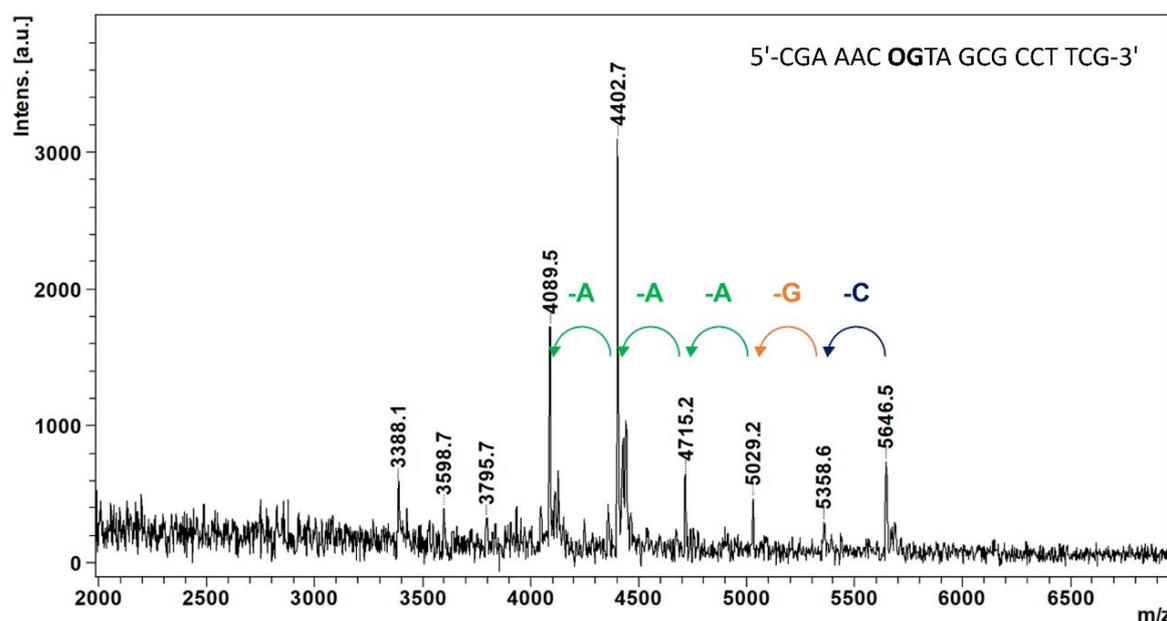


Figure 46 : Spectre de masse MALDI-TOF de la séquence 18-2 pontée à la L-Rm et digérée par la phosphodiesterase II

Les spectres de masse obtenus pour les 2 séquences pontées après 2h30 de digestion montrent la perte de plusieurs nucléotides. La digestion enzymatique semble stoppée une base avant la position de la 8-oxoguanine dans l'oligonucléotide de départ. Les travaux de Romieu *et al.* ont montré que la digestion d'un oligonucléotide contenant un produit d'oxydation de l'OG de forme spiro était stoppée juste avant cette base.¹⁶⁴ La gêne stérique au niveau de la base impliquée dans le pontage avec la L-Rm pourrait expliquer l'impossibilité de l'enzyme de digérer la dernière base avant la position de l'OG pontée.

Pour conclure, les analyses par électrophorèse capillaire et par HPLC-MS ont confirmé que l'oxydation des séquences contenant une OG est quantitative dans les conditions testées et s'accompagne de l'apparition de nouvelles espèces dont les masses correspondent à celles des produits prévus d'après la littérature : Gh et Sp en absence de cible et Gh-Rm et Sp-Rm en présence de L-Rm. Cependant, les tests réalisés avec la séquence scramble contrôle attestent de l'existence d'interactions non-spécifiques significatives entre l'aptamère poly anionique et la cible dicationique, comme constaté dans le chapitre 2. Différentes stratégies ont alors été mises en œuvre afin de tenter de réduire ces interactions non-spécifiques.

Chapitre 4 : Stratégies mises en œuvre afin de réduire les interactions non-spécifiques

L'objectif principal du projet est d'exploiter la reconnaissance de la cible par l'aptamère contenant une base 8-oxoguanine afin que cette dernière soit attaquée par un site nucléophile de la L-Rm à la suite de son oxydation, et ainsi créer un pontage covalent entre l'aptamère et sa cible. La formation du pontage covalent entre ces 2 espèces est donc en théorie possible grâce à leur rapprochement lors de la complexation de la cible. Les analyses réalisées au cours du chapitre précédent ont confirmé la possibilité de former des pontages covalents entre les aptamères 18-2, 18-3 et 18-4 et la L-Rm grâce à l'oxydation spécifique par un sel d'iridium de leur base 8-oxoguanine. La formation du pontage avec la cible, qui est en compétition avec l'addition d'une molécule d'eau formant les produits d'oxydation de l'OG (Gh et Sp) est donc efficace. Des tests ont également été fait pour une séquence scramble contenant une OG. L'absence de reconnaissance de la cible par cet oligonucléotide devrait limiter l'interaction de la cible avec l'OG, et donc la formation de pontages avec celle-ci. Cependant, une formation quantitative de pontage a été observée avec cette séquence, ce qui a confirmé l'existence d'interactions non-spécifiques entre l'aptamère poly anionique et la cible cationique.

Ce chapitre se consacre donc aux différentes stratégies mises en place dans le but de réduire ces interactions non-spécifiques.

1. Modifications des paramètres expérimentaux

La première approche a consisté à modifier différents paramètres expérimentaux tels que la force ionique du tampon d'incubation, son pH ou sa composition.

1.1. Étude préliminaire sur les séquences de 18 bases

Les premiers tests ont consisté à augmenter la concentration de phosphate de sodium du tampon d'incubation de 5 à 95 mM. Les interactions non-spécifiques étant sûrement dues à des interactions électrostatiques entre la cible chargée positivement et les groupement phosphates de l'oligonucléotide, l'augmentation de la concentration en ions phosphate dans le milieu devrait les diminuer grâce à un phénomène de compétition. Des échantillons préparés avec les séquences 18-2 et 18Scramble2 (5 μ M) exposées au sel d'iridium (25 μ M) en présence de cible (50 μ M) dans 95 mM de phosphate de sodium sont analysés par HPLC-MS (mode scan). Les spectres de masses obtenus pour les 2 séquences (non montrés) révèlent la présence de pontages avec la L-Rm comme attendu, mais également celle des produits d'oxydation Gh et Sp. Ces derniers produits n'étaient pas détectés à 5 mM phosphate de

sodium, ce qui laisse supposer que l'augmentation de la concentration en sel dans le tampon se traduit par une diminution des interactions non-spécifiques. Ces premiers résultats sont encourageants mais nécessitent d'être approfondis.

L'étude par mesures d'anisotropie de fluorescence reportée dans le chapitre 2 ayant montré que le raccourcissement de 3 paires de bases au niveau de la tige de l'aptamère entraîne une perte d'affinité, il a été décidé de réaliser la suite des optimisations avec les séquences de 24 bases.

1.2. Étude sur les séquences de 24 bases

Les masses des espèces présentes dans les échantillons préparés avec les séquences de 24 bases étant plus élevées qu'avec les séquences de 18 bases, les masses détectées par spectrométrie de masse correspondent à leurs états de charge 4⁻ et 5⁻, notés [M-4H]⁴⁻ et [M-5H]⁵⁻ (Tableau 7).

Tableau 7 : Masses théoriques (Da) de l'aptamère de départ, des produits d'oxydation, de pontages avec la L-Rm et de leurs états de charge 4⁻ et 5⁻ pour les aptamères 24-1, 24-2, 24-3 et 24-4

Séquence	Aptamère de départ		Produits d'oxydation		Pontages avec L-Rm	
	24-1	24-2, 3 ou 4	Gh	Sp	Gh-Rm	Sp-Rm
M	7336,8	7353,8	7343,8	7369,8	7499,0	7525,0
[M-4H]⁴⁻	1833,2	1837,5	1835,0	1841,5	1873,8	1880,3
[M-5H]⁵⁻	1466,4	1469,8	1467,8	1473,0	1498,8	1504,0

Les analyses sont réalisées en mode SIM (single ion monitoring), ce qui signifie que des masses choisies sont détectées par le spectromètre de masse. Une méthode semi-quantitative (méthode 1 page 130) a été mise au point. Les proportions de pontages formés avec la L-Rm par rapport au total de l'aptamère non oxydé et des pontages avec l'eau sont comparées en fonction des conditions expérimentales appliquées.

1.2.1. Diminution de la concentration de cible

L'influence de la concentration de cible a tout d'abord été étudiée plus en détail. Des échantillons ont donc été préparés avec 500, 50 ou 10 µM de cible (correspondant à 77 %, 25 % et 6 % de complexe aptamère/cible respectivement avec un K_{dL-Rm} de 150 µM) en tampon

200 mM phosphate de sodium pH 7,5 afin de révéler l'effet de ce paramètre sur la proportion de pontages formés avec la L-Rm pour les séquences 24-2, 24-3 et 24-4. Les analyses précédentes par électrophorèse capillaire et HPLC-MS avaient montré que les pontages avec la L-Rm étaient formés même avec 50 μ M.

La méthode semi-quantitative 1 est appliquée et permet de révéler une baisse importante de la proportion des Gh-Rm et Sp-Rm avec la diminution de la concentration de L-Rm pour les 3 séquences reconnaissant la L-Rm :

Tableau 8 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en fonction de la concentration de cible ; Quantification sur les aires des états de charge 4⁻ selon la méthode 1 ; écarts types ≤ 4 %

[L-Rm]	24-2	24-3	24-4	24Scramble 1
500 μ M	73	66	72	73
50 μ M	24	26	29	29
10 μ M	10	11	10	10

Cette observation était attendue en raison de la diminution du pourcentage de complexe formé entre l'aptamère et la cible. Les analyses sont ensuite faites avec une séquence scramble de 24 bases contenant une OG et notée 24Scramble1. Des proportions de pontages avec la cible et avec l'eau similaires à celles obtenues avec les aptamères 24-2 à 24-4 sont mesurées pour cette séquence.

Une étude comparable a été effectuée en augmentant le pH du tampon d'incubation à 8,5 puis 9 afin de limiter la proportion de cible doublement cationique et donc de limiter les interactions ioniques avec l'oligonucléotide. Elle a amené à des observations identiques (résultats non montrés).

La diminution de la concentration de cible semble donc permettre de limiter la formation de pontages covalents avec la cible. Cependant, l'impact de ce paramètre semble équivalent sur les séquences reconnaissant ou non la L-Rm. Il est donc difficile de conclure si les baisses de pontages observées sont dues à un impact sur les interactions spécifiques ou non-spécifiques.

1.2.2. Augmentation de la force ionique et du pH du tampon d'incubation

D'autres paramètres expérimentaux ont ensuite été modifiés : la composition et le pH du tampon d'incubation. Le premier peut permettre de stabiliser le complexe aptamère/cible en modifiant la force ionique du milieu et de favoriser la reconnaissance de la L-Rm, comme cela

a été constaté précédemment avec les 18 mer (page 99). Le deuxième paramètre module les proportions de cible mono et dicationique, et aide donc théoriquement à limiter les interactions électrostatiques non-spécifiques avec l'oligonucléotide.

Les séquences 24-2, 24-3, 24-4, et 24Scramble1 sont oxydées en présence de cible (50 µM) par le sel d'iridium dans différents tampons à pH 7,5 : 100 mM phosphate de sodium, 200 mM phosphate de sodium ou 100 mM phosphate de sodium + 100 mM NaCl. La méthode semi-quantitative 1 est appliquée (Tableau 9).

Tableau 9 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse; Quantification sur les aires des états de charge 4⁻ selon la méthode 1

Composition du tampon d'incubation	24-2	24-3	24-4	24Scramble 1
100 mM phosphate de sodium	41	40	45	42
200 mM phosphate de sodium	25	25	27	28
100 mM phosphate de sodium + 100 m NaCl	30	33	35	36

Les résultats indiquent que l'augmentation de la concentration de phosphate de sodium entraîne une baisse significative de la proportion de pontages avec la L-Rm (Gh-Rm + Sp-Rm) d'environ 14 % pour les 3 aptamères reconnaissant la cible. L'ajout de 100 mM de chlorure de sodium aux 100 mM de phosphate de sodium diminue également ces pontages, mais de façon moins significative.

Les échantillons sont également préparés dans ces 3 tampons à pH 8,5 et 9 afin d'étudier l'influence de ce paramètre. Les analyses montrent que, contrairement à ce qui était attendu, la hausse du pH n'est pas accompagnée d'une diminution significative des pontages avec la L-Rm (résultats non montrés).

Les données obtenues pour les échantillons préparés avec la séquence 24Scramble1 s'avèrent très proches de celles observées pour les 3 aptamères : la modification de la composition du tampon d'incubation a un impact plus significatif que celle de son pH.

La modification de la composition du tampon d'incubation semble donc aider à réduire les interactions non-spécifiques car la proportion de pontages de la séquence scramble avec la cible, qui sont uniquement formés grâce aux interactions électrostatiques non-spécifiques, diminuent. Cependant, ces proportions restent du même ordre de grandeur qu'avec les aptamères reconnaissant la cible. De plus, les analyses par polarisation de fluorescence ayant

montré des écarts d'affinités pour L-Rm en fonction de la position de la 8-oxoguanine, des différences d'efficacité de pontages étaient attendues entre les aptamères 24-2, 24-3 et 24-4. Cela n'a néanmoins pas été constaté lors des analyses. Il est donc possible que les interactions spécifiques de reconnaissance aient été impactées par la modification de ces paramètres expérimentaux.

2. Ajout de compétiteurs

D'autres stratégies ont alors été mises en œuvre. L'ajout de compétiteurs de la cible et de l'aptamère a été réalisé. Cette étude a été réalisée dans le tampon 10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl afin de se placer dans des conditions similaires à celles de l'étude d'affinités par polarisation de fluorescence. Des tests rapides sont réalisés afin d'étudier dans quelle proportion des pontages peuvent être formés entre l'aptamère et le tris contenu dans le tampon d'incubation. Une méthode semi-quantitative utilisant les aires des pics des différentes espèces d'intérêt (aptamère non oxydé, produits d'oxydation Gh et Sp, pontages avec le tris, pontages avec le compétiteur utilisé, pontages avec le L-Rm) a été développée pour chaque compétiteur (méthodes 2 et 3 page 131) et appliquée à des échantillons préparés avec la séquence 18-4 oxydée en absence et en présence de L-Rm (Tableau 10).

Tableau 10 : Proportions de pontages (%) avec le tris ou la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et présence de L-Rm; Quantification sur les aires des états de charge 3⁻ selon la méthode 2 adaptée à un aptamère de 18 bases

[L-Rm]	0 μ M	250 μ M
Pontages Sp avec le tris	50	10
Gh-Rm + Sp-Rm	8	69

Les données obtenues montrent qu'en absence de cible, le pontage majoritaire a lieu avec le tris. Après ajout de L-Rm, ceux avec la cible deviennent prédominants et il est donc possible de travailler dans ce tampon.

2.1. Compétiteur négatif de l'ADN

L'ajout d'un compétiteur poly anionique de l'aptamère a été testé afin de réduire les interactions non-spécifiques avec la L-Rm. Un autre aptamère a été choisi : l'oligonucléotide de 25 bases reconnaissant l'adénosine et l'AMP noté 25DA précédemment utilisé (Figure 23).

Des échantillons ont été préparés avec les séquences 24-2 à 24-4 oxydées en présence de cible et avec des quantités croissantes de 25DA (jusqu'à 50 μ M) dans un tampon 10 mM Tris-HCl

pH 7,5 + 100 mM NaCl. Le compétiteur est ajouté après environ 5 minutes de complexation entre l'oligonucléotide reconnaissant la L-Rm et sa cible et avant l'oxydation. Des échantillons ont été préparés de la même façon et avec le même compétiteur pour 2 séquences scramble de l'aptamère reconnaissant la L-Rm et contenant une OG. La première est 24Scramble1, utilisée plus tôt dans cette partie, et la seconde est une autre séquence scramble de 24 bases possédant une 8-oxoguanine en position 11 et notée 24Scramble2.

Les analyses de ces échantillons avec la méthode 1 montrent que l'augmentation de la concentration en 25DA entraîne une baisse de la proportion de pontages avec la L-Rm pour toutes les séquences (Tableau 11). Elle reste cependant assez faible (9 % en moyenne) et du même ordre de grandeur que pour les séquences reconnaissant la L-Rm que pour les scrambles.

Tableau 11 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et en présence de 25DA; Quantification sur les aires des états de charge 4⁻ selon la méthode 1 ; écarts types ≤ 3 %

25DA	24-2	24-3	24-4	24Scramble 1	24Scramble 2
0 μM	83	81	84	81	74
50 μM	74	71	75	73	66

2.2. Compétiteurs chargés positivement

Plusieurs compétiteurs cationiques de la cible ont alors été considérés. Les premiers sont des polyamines. Ces espèces sont connues pour se lier non-spécifiquement à l'ADN¹⁶⁵ et 3 d'entre-elles classiquement utilisées ont été envisagées : la putrescine, la spermine et la spermidine (Figure 47).

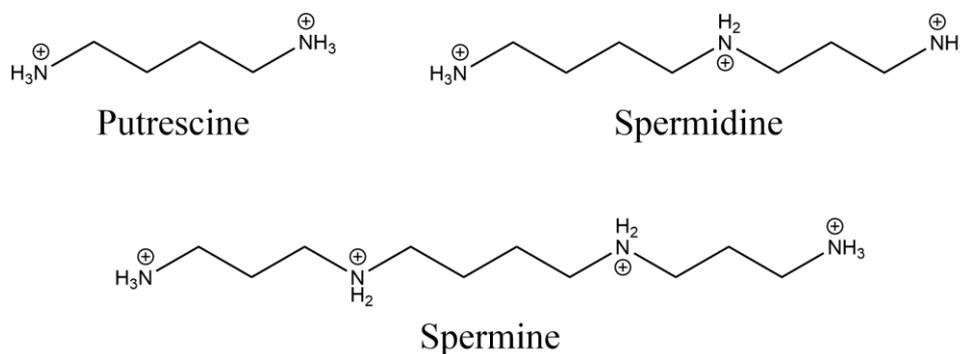
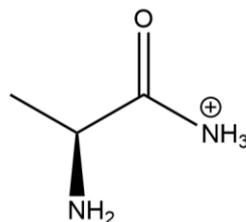


Figure 47 : Structures des polyamines envisagées à pH physiologique¹⁶⁶

L'ADN d'*Escherichia coli* se lie par exemple de façon non-spécifique à la putrescine avec une constante de dissociation de 1 mM.¹³⁹ La spermine et la spermidine n'ont pas pu être utilisées

pour ce projet car les masses des produits de pontage avec ces molécules sont en partie confondues avec celles des pontages avec la L-Rm, ce qui aurait perturbé leur quantification.

Le deuxième compétiteur choisi est la L-alaninamide (Figure 48).



L-alaninamide

Figure 48 : Structure de la L-alaninamide à pH physiologique

Les deux compétiteurs sélectionnés possèdent donc des similarités de structure avec la cible L-Rm.

Des échantillons ont été préparés avec les séquences 24-2 à 24-4, 24Scramble1 et 24Scramble2 oxydées en présence de cible et avec des quantités croissantes de chaque compétiteur dans un tampon 10 mM Tris-HCl pH 7,5 + 100 mM NaCl. Ils sont préparés avec un compétiteur à la fois. La concentration maximale de putrescine testée est de 2 mM, et celle de L-alaninamide est de 5 mM.

Les aires des pics correspondant aux différentes espèces contenues dans le milieu sont relevées et les méthodes semi-quantitatives 2 et 3 sont appliquées. Les 2 compétiteurs testés permettent de diminuer la proportion des pontages entre la L-Rm et les séquences scramble de façon plus significative que lors de l'ajout du compétiteur ADN (25DA) chargé négativement. L'ajout de L-alaninamide (5 mM) entraîne cependant une diminution plus importante qu'avec 2 mM de putrescine (Figure 49). Ce compétiteur semble donc efficace pour limiter les interactions non-spécifiques. Des constatations similaires peuvent être faites avec les aptamères 24-2, 24-3 et 24-4. Les proportions de pontages avec la L-Rm restent cependant proches pour ces 3 séquences, malgré les différences d'affinité pour la cible qui avaient été constatées par polarisation de fluorescence. La séquence 24-3 semble cependant subir une diminution plus importante.

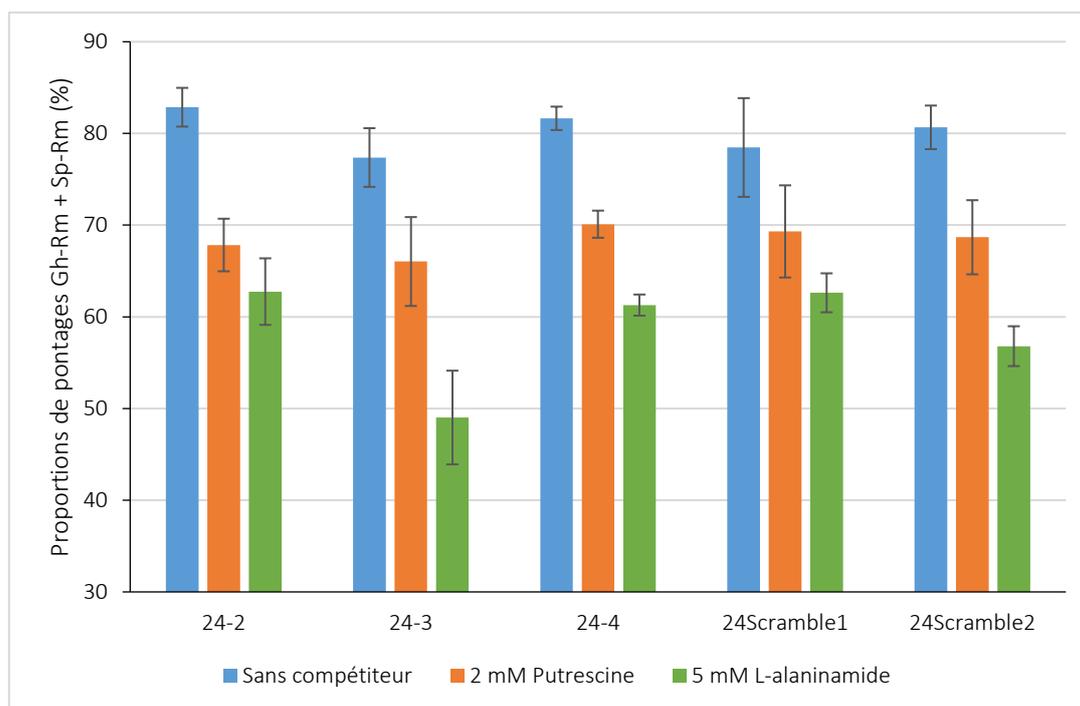


Figure 49 : Proportions de pontages (%) avec la L-Rm par rapport aux autres espèces détectées par spectrométrie de masse en absence et présence de putrescine et de L-alaninamide ; quantification sur les aires des états de charge 4- selon les méthodes 2 et 3

Les mêmes échantillons ont été préparés dans un tampon plus basique (pH 8,5) afin de tenter de combiner l'action des compétiteurs et la diminution de la proportion de cible doublement chargée dans le milieu. Les résultats obtenus (non montrés) dans ce tampon montrent une diminution encore plus significative de la proportion de pontages avec la L-Rm qu'à pH 7,5. Cependant, les valeurs obtenues pour les 2 séquences scramble restent proches de celles des aptamères reconnaissant la L-Rm et la variabilité des résultats est plus importante.

2.3. Étude de l'influence du pH du tampon d'incubation sur l'affinité pour la cible

Afin de vérifier si l'augmentation du pH du tampon 10 mM Tris-HCl + 100 mM NaCl a une influence sur les interactions spécifiques de reconnaissance de la cible par l'aptamère, une étude par polarisation de fluorescence a été effectuée.

Le dosage inversé assisté par SSB développé dans le chapitre 2 a été appliqué à température ambiante avec l'aptamère F24-1 dont l'extrémité 5' est marquée par une fluorescéine. Les courbes d'interaction entre cette séquence et la protéine ont été établies à pH 7,5, 8,5 et 9. Les concentrations de SSB nécessaires pour obtenir des fractions d'aptamères complexées à

la SSB proches ont été déterminées pour chaque pH, puis le dosage a été appliqué. Les résultats obtenus permettent d'estimer l'évolution de l'affinité pour la cible lors de l'augmentation du pH : elle est diminuée d'un facteur 2,2 environ à pH 8,5, et d'un facteur 4,4 à pH 9.

Cette étude montre que l'augmentation du pH du tampon d'incubation tend à diminuer l'affinité de l'aptamère pour la cible. La partie précédente a montré que la réduction de la proportion de pontages avec la L-Rm est plus importante à pH 8,5 qu'à 7,5. Cette diminution semble donc pouvoir être attribuée en partie à la réduction des interactions spécifiques, en plus de celle des non-spécifiques.

2.4. Effet du sel d'iridium sur la conformation de l'aptamère

Afin de vérifier que le sel d'iridium ne perturbe pas la conformation des oligonucléotides, et donc la reconnaissance de la cible, la température de fusion (T_m) de l'aptamère 24-1 en présence et en l'absence de 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} a été déterminée. En effet, la chauffe d'un échantillon peut entraîner un changement de conformation des espèces qu'il contient, ce qui se traduit par une modification de leurs propriétés d'absorbance. Il est alors possible d'obtenir des informations sur la stabilité de leur structure secondaire. Des cycles successifs de chauffe puis refroidissement peuvent être appliqués aux oligonucléotides car leur dénaturation est réversible, contrairement aux protéines. Au cours de ces manipulations, l'absorbance à 260 nm est mesurée en fonction de la température.¹⁶⁷

Deux échantillons contenant l'aptamère 24-1 à $5 \mu\text{M}$ dans 10 mM Tris-HCl pH 7,5 et 100 mM NaCl, sont préparés sans et avec $50 \mu\text{M}$ de $[\text{IrCl}_6]^{2-}$. Des cycles de chauffe et refroidissement sont appliqués à ces échantillons et leur absorbance à 260 nm est suivie à l'aide d'un spectromètre UV-visible. Les courbes obtenues pour les 2 échantillons sont de forme sigmoïde. La méthode des tangentes est appliquée afin de déterminer les T_m .¹⁶⁷ Les résultats obtenus permettent d'estimer la température de fusion de l'aptamère seul à $49,5 \text{ }^\circ\text{C}$, ce qui semble cohérent avec la littérature. Bishop *et al.* ont mesuré une T_m d'environ $48,3^\circ\text{C}$ grâce à cette technique en tampon 10 mM phosphate de sodium pH 6,5, 50 mM KCl. Ces 2 valeurs sont également en accord avec la valeur de $49,6 \text{ }^\circ\text{C}$ prédite par l'algorithme de repliement de l'ADN *Mfold* dans un tampon dont la force ionique est fixée à 60 mM . La T_m de l'aptamère obtenue en présence du sel d'iridium est d'environ $49 \text{ }^\circ\text{C}$.¹⁵¹

Ces résultats semblent indiquer que la structure en tige-boucle de l'aptamère n'est pas affectée par la présence de $(\text{NH}_4)_2\text{IrCl}_6$. Cet oxydant ne semble donc pas perturber la reconnaissance de la L-Rm.

Pour conclure, différentes stratégies ont été appliquées afin de réduire les interactions non-spécifiques existant entre l'aptamère anti-L-argininamide et sa cible cationique. La diminution de la concentration de cible s'est révélée efficace, mais dans une moindre mesure. La modification de la force ionique du tampon d'incubation (phosphate de sodium) a également eu un impact modéré sur la proportion de pontages avec la L-Rm. L'augmentation du pH des tampons composés de phosphate de sodium n'a cependant pas eu l'effet escompté. L'ajout d'un compétiteur de l'ADN a montré une diminution modérée de ces pontages. L'effet de l'ajout de compétiteurs cationiques s'est révélé plus efficace pour diminuer les pontages avec la cible, notamment la L-alaninamide. Cependant, les proportions de pontages calculées pour les 2 séquences scramble restent du même ordre que pour les 3 aptamères. Il est donc difficile de conclure quant à la part de pontages formés *via* des interactions spécifiques ou non-spécifiques.

Partie expérimentale

24Scramble1 5'-ACC AGT TGC **AOGC** GAT CGA TGT CAC-3'

24Scramble2 5'-CGA TGG CCA **GOGT** ATC ACA CAT GCT-3'

24Scramble3 5'-CGA TGG CCA GGT ATC ACA CAT GCT-3'

- Séquences de 18 bases :

18-1 5'-CGA AAC GTA GCG CCT TCG-3'

18-2 5'-CGA AAC **OGTA** GCG CCT TCG-3'

18-3 5'-CGA AAC GTA **OGCG** CCT TCG-3'

18-4 5'-CGA AAC GTA **GCOG** CCT TCG-3'

18Scramble1 5'-CGG CCA GGT ACA CAT GTC-3'

18Scramble2 5'-CGG CCA **GOGT** ACA CAT GTC-3'

Les sondes fluorescentes marquées en 5' sont nommées « TRsonde » ou « Fsonde », et celles en 3' « SondeTR » ou « SondeF » selon le type de fluorophore (Texas Red ou fluorescéine)

1.3. Appareillages

2.4.1. Mesures d'anisotropies de fluorescence

2.4.1.1. Théorie de la technique

L'anisotropie de fluorescence est une méthode de détection optique couramment utilisée dans les essais utilisant les aptamères. Elle utilise le fait que les fluorophores ont des directions préférentielles pour l'absorption et l'émission de lumière. Ces moments de transition se situent le long de directions spécifiques à l'intérieur de la structure du fluorophore.

En solution homogène, les fluorophores, et donc leurs moments de transition, sont tous orientés de manière aléatoire à l'état fondamental. Lorsqu'ils sont exposés à une lumière polarisée, ceux dont le moment de transition d'absorption est orienté parallèlement à l'axe du vecteur électrique de la lumière incidente seront préférentiellement excités. Ce phénomène est appelé photosélection. La population de l'état excité est donc partiellement orientée. Les molécules excitées peuvent ensuite réémettre une lumière dans la direction de leur moment de transition d'émission. Cette lumière émise est alors plus ou moins dépolarisée

selon différents phénomènes (Figure 50). La diffusion rotationnelle et les mouvements locaux du fluorophore peuvent être des causes de dépolarisation. La diffusion rotationnelle est fonction de la viscosité du solvant et de la taille et de la forme de la molécule en rotation.

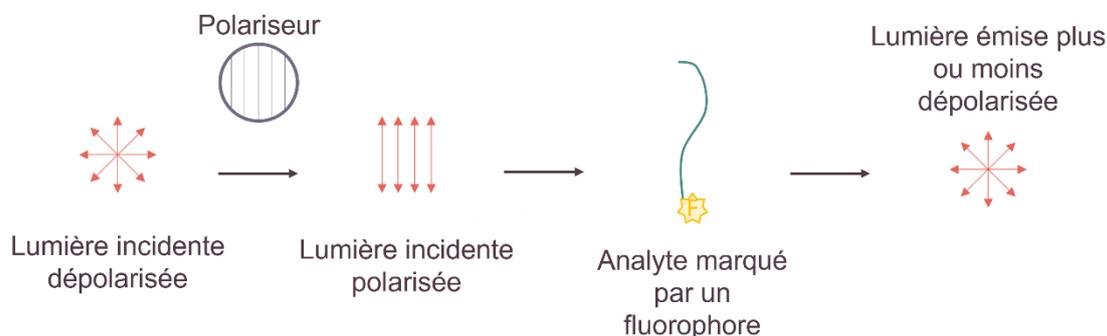


Figure 50 : Principe simplifié d'une analyse par anisotropie de fluorescence

Des mesures d'anisotropie de fluorescence (FA), notée r (Équation 10), ou de polarisation de fluorescence (FP), notée p (Équation 11), peuvent révéler le degré de polarisation de cette lumière émise. Ces deux grandeurs sont liées (Équation 12) et peuvent être calculées après mesure de l'intensité de la lumière émise polarisée dans la même direction que l'excitation ($I_{//}$) et dans une direction perpendiculaire (I_{\perp}) :

Équation 10 : Expression de l'anisotropie de fluorescence r

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

Équation 11 : Expression de la polarisation de fluorescence p

$$p = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}$$

Équation 12 : Relation entre la polarisation p et l'anisotropie r de fluorescence

$$p = \frac{3r}{2 + r}$$

Ces grandeurs sont sans dimension. La FA est normalisée par rapport à l'intensité totale ($I_{//} + 2 I_{\perp}$) alors que la FP l'est par rapport à l'intensité de fluorescence dans la direction d'observation. En l'absence d'artefacts, l'anisotropie mesurée est donc indépendante de la concentration du fluorophore. L'utilisation de la FA est ainsi généralement préférée car les calculs qui en découlent sont simplifiés. Par exemple, si l'échantillon analysé contient plusieurs

espèces fluorescentes, la valeur moyenne de FA mesurée sera la somme des anisotropies de fluorescence r_i des différentes espèces, chacune pondérée par sa fraction f_i :

Équation 13 : Expression de l'anisotropie de fluorescence d'un mélange contenant plusieurs espèces fluorescentes

$$\bar{r} = \sum_i f_i r_i$$

Il est également possible d'utiliser la formule de Perrin selon laquelle la fluorescence à l'état stationnaire dans le cas où le fluorophore est assimilé à une sphère peut être calculée par :

Équation 14 : Formule de Perrin modifiée pour l'expression de l'anisotropie de fluorescence à l'état stationnaire

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

avec r_0 l'anisotropie de fluorescence fondamentale, τ le temps de vie de l'état excité et θ le temps de corrélation rotationnelle.

θ peut aussi être décrit par :

Équation 15 : Expression du temps de corrélation rotationnelle θ

$$\theta = \frac{\eta V}{R T}$$

avec η la viscosité de la solution, V le volume de la molécule en rotation, R la constante des gaz parfaits et T la température. Ainsi, la taille de la molécule affecte la polarisation de la lumière émise.

Une petite molécule fluorescente (Figure 51 à gauche) a une rotation rapide. Le plan d'émission de la lumière sera donc différent de celui de la lumière incidente. L'émission sera donc dépolarisée et la valeur de r restera faible. Lorsque l'on considère un analyte de masse plus importante (Figure 51 à droite), le plan d'émission est moins modifié car la rotation est plus lente. La valeur d'anisotropie r sera donc plus élevée. Cela explique en partie pourquoi l'anisotropie augmente lorsqu'un petit analyte se lie à une molécule de volume moléculaire plus élevé.^{9,146,168}

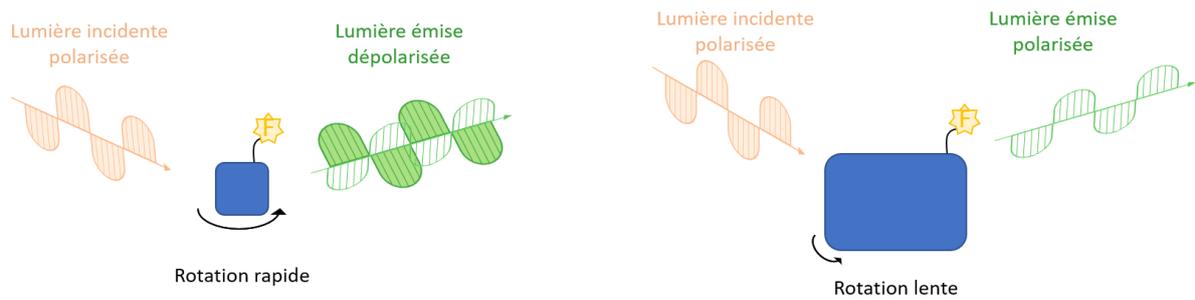


Figure 51 : Émission de lumière polarisée pour une petite molécule (à gauche) et pour une molécule de taille plus importante (à droite), toutes les deux marquées par un fluorophore

Afin de réaliser des mesures précises du degré de polarisation de la lumière émise par des molécules fluorescentes, il est nécessaire de connaître et prendre en compte les erreurs systématiques induites par le montage optique et les détecteurs utilisés. Ces erreurs sont combinées dans un paramètre appelé le facteur G. Celui-ci peut être déterminé grâce aux instructions du fournisseur de l'appareil de mesure.¹⁶⁹

2.4.1.2. Matériel utilisé

➤ Principe du lecteur de microplaques

Les mesures d'anisotropie de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques Infinite® F500 de la marque TECAN.¹⁷⁰ La température à l'intérieur de l'appareil peut être fixée. Les microplaques noires de chez Greiner utilisées contiennent 96 puits.

Pour des mesures de polarisation (ou anisotropie) de fluorescence, le système optique est composé de 3 parties principales : une source de lumière, des optiques de fluorescence et un détecteur (Figure 52).

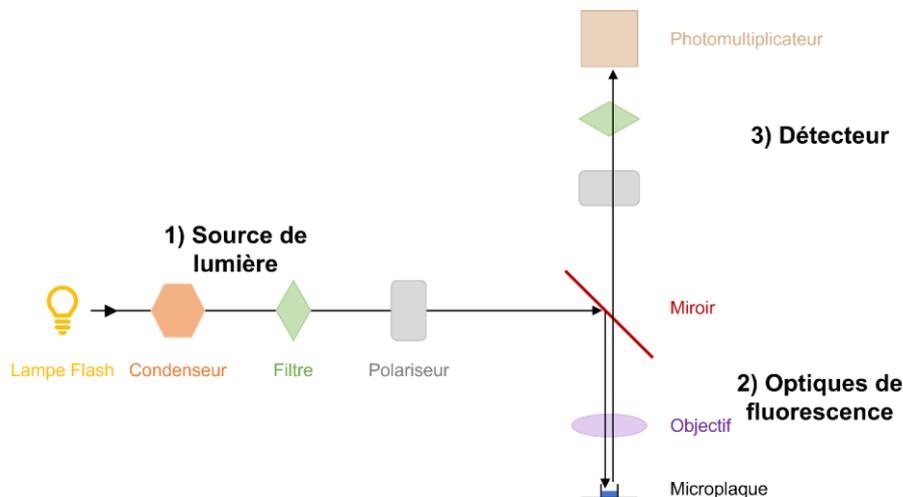


Figure 52 : Principe du lecteur de microplaques Infinite® F500 (adapté de¹⁷⁰)

La source de lumière est une lampe flash (lampe à arc au Xénon), suivie d'un condenseur optique. Des filtres passe-bande permettent de sélectionner une plage de longueurs d'onde. La lumière monochromatique est alors partiellement réfléchiée par un miroir semi-transparent et focalisée vers la microplaque grâce à un objectif.

Les mesures réalisées au cours de ce projet sont faites sur le dessus des microplaques. La lumière émise passe à nouveau par le miroir semi transparent après avoir été focalisée par l'objectif. La position de cet objectif, nommée « z-position », est ajustée par l'appareil afin de maximiser le rapport signal/bruit. La lumière arrive alors au détecteur. Pour des mesures d'anisotropie (ou polarisation) de fluorescence, la lumière émise doit être détectée parallèlement et perpendiculairement à la direction d'excitation (Équation 9). Deux filtres, chacun précédé d'un polariseur (l'un orienté perpendiculairement à la direction d'excitation et l'autre parallèlement) sont donc placés sur le chemin de la lumière.

Le détecteur est un tube photomultiplicateur. Celui-ci permet la détection de lumière de faible intensité. Il est possible de régler son gain afin d'agir sur l'amplification de la conversion de la lumière en courant électrique. Ce gain est déterminé expérimentalement selon les recommandations du fournisseur.

➤ Paramètres utilisés

Les différents paramètres utilisés lors des mesures d'anisotropie de fluorescence sont résumés dans le Tableau 12. Ils sont adaptés au type de fluorophore considéré. Les filtres d'excitation et d'émission sont différents pour le Texas Red et la fluorescéine. La transparence du miroir peut être modulée grâce à des miroirs dichroïques. Ceux-ci réfléchissent la quasi-totalité de la lumière d'excitation et transmettent la majeure partie de la lumière émise mais seulement pour des gammes réduites de longueurs d'onde. La z-position est ajustée sur un échantillon composé seulement de sonde fluorescente dans l'eau.

Tableau 12 : Paramètres utilisés pour les mesures d'anisotropie de fluorescence en fonction du fluorophore

	Texas Red	Fluorescéine
Longueur d'onde d'excitation	585 ± 20 nm	485 ± 20 nm
Longueur d'onde d'émission	635 ± 30 nm	535 ± 25 nm
Transparence du miroir	50 %	Automatique
Facteur G	0,90	0,98
Gain	Optimal	Optimal

La température à l'intérieur de l'appareil est réglée à 25 °C pour toutes les lectures.

2.4.2. Électrophorèse capillaire

2.4.2.1. Théorie de la technique

L'électrophorèse capillaire (EC) est une technique analytique de séparation de composés en phase liquide (Figure 53). Elle présente les avantages d'être rapide, quantitative, reproductible et automatisable. La séparation est réalisée dans un capillaire de quelques dizaines de centimètres de longueur et de quelques dizaines de micromètres de diamètre interne rempli d'électrolyte. Chaque extrémité est plongée dans un flacon contenant l'électrolyte, aussi appelé tampon de migration. Une électrode reliée à un générateur de haute tension est plongée dans chaque flacon.

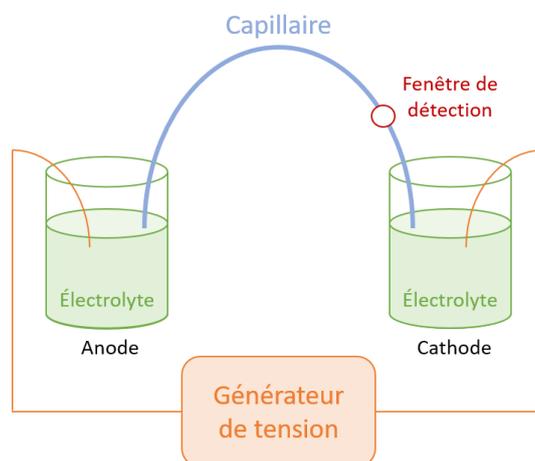


Figure 53 : Principe de l'électrophorèse capillaire

L'injection de l'échantillon peut être hydrodynamique, par exemple à l'aide d'une surpression imposée dans le flacon contenant l'échantillon, ou électrocinétique en appliquant une tension. Lorsqu'une tension de quelques dizaines de kV est appliquée aux extrémités du capillaire, un champ électrique longitudinal est généré et va entraîner la mise en mouvement des analytes. Ils migreront à des vitesses différentes en fonction de deux phénomènes : la migration électrophorétique et l'écoulement électroosmotique. La séparation des composés peut être influencée par différents paramètres tels que leur rapport charge sur taille, leur hydrophobicité, leur chiralité, ou leur point isoélectrique.¹⁷¹ L'application d'un champ électrique plutôt qu'un champ de pression pour séparer les analytes permet de limiter leur diffusion. La détection est réalisée à une extrémité du capillaire au niveau d'une fenêtre de

détection. Le mode de détection le plus classique est la spectrophotométrie d'absorption UV mais il est également possible d'utiliser la spectrométrie de masse¹⁷² ou la conductimétrie.

➤ La migration électrophorétique

Le premier phénomène à l'origine de la différence de vitesse de migration entre les composés est la migration électrophorétique. Elle représente le déplacement d'une espèce chargée sous l'action d'un champ électrique. Cette grandeur résulte de l'équilibre s'établissant entre les forces de friction et la force électrostatique subies par l'analyte lorsqu'une vitesse constante est atteinte. Deux espèces subissant des forces de friction différentes ou ayant des charges différentes seront donc séparées au cours de leur migration dans le capillaire. Les forces de friction dépendent de la taille et de la forme de l'analyte, ainsi que de la viscosité du milieu de séparation. La mobilité électrophorétique peut donc être exprimée par l'Équation 16 :

Équation 16 : Expression de la mobilité électrophorétique μ_{ep}

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

avec μ_{ep} en $m^2V^{-1}s^{-1}$, q la charge de l'ion en C, r son rayon hydrodynamique solvaté en m et η la viscosité de l'électrolyte en Pa.s. Cette grandeur sera donc positive pour un cation et négative pour un anion. Un ion solvaté de charge importante aura donc une mobilité électrophorétique plus importante qu'un ion de charge moins grande.

Il est possible de définir la vitesse électrophorétique v_{ep} ($m.s^{-1}$, Équation 17) comme le produit de la mobilité électrophorétique et du champ électrique E en $V.m^{-1}$ (égal au ratio de la tension appliquée aux extrémités du capillaire sur sa longueur totale).

Équation 17 : Expression de la vitesse électrophorétique v_{ep}

$$v_{ep} = \mu_{ep} \times E$$

Le pH de l'électrolyte peut influencer la vitesse électrophorétique de certains composés car il agit sur leur degré de dissociation et leur charge.¹⁷¹

➤ La migration électroosmotique

Le deuxième phénomène à l'origine de la différence de vitesse de migration entre les composés est appelé mobilité électroosmotique. Celui-ci est dû à l'écoulement de l'électrolyte

à l'intérieur d'un capillaire portant des groupements chargés à sa surface lorsqu'une tension est appliquée à ses extrémités.

Les capillaires utilisés sont généralement en silice fondue et possèdent donc des groupements silanols -SiOH à leur surface. Ces groupements sont des acides faibles et peuvent être déprotonés lorsque le pH de l'électrolyte devient supérieur à 2. Sous la forme silanolate -SiO⁻, la surface interne du capillaire devient alors négative. Des cations présents dans l'électrolyte s'adsorbent donc sur cette surface et créent ainsi une double-couche. Lors de l'application de la tension, ces cations vont se déplacer dans le capillaire vers l'électrode négative appelée conventionnellement cathode en EC. Les autres composés présents dans l'électrolyte sont alors eux aussi entraînés par cet écoulement électroosmotique.

La mobilité (μ_{eo}) et la vitesse (v_{eo}) électroosmotiques, égales pour tous les composés, peuvent être exprimées par les équations suivantes :

Équation 18 : Expression de la mobilité électroosmotique μ_{eo}

$$\mu_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta}$$

avec en μ_{eo} en $\text{m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$, ζ le potentiel zeta de la paroi en V, η la viscosité de l'électrolyte en Pa.s, ϵ_r la permittivité relative du milieu sans unité et ϵ_0 la permittivité du vide F.m^{-1} .¹⁷³

Équation 19 : Expression de la vitesse électroosmotique v_{eo}

$$v_{eo} = \mu_{eo} \times E$$

Le pH de l'électrolyte influence la vitesse électroosmotique des composés car il agit sur la proportion de groupements silanolates, et donc sur la charge de la surface interne du capillaire. Lorsqu'il est plus basique, la proportion de silanolates devient plus importante donc la charge surfacique et la mobilité électroosmotique augmentent. La force ionique de l'électrolyte peut également impacter la mobilité électroosmotique. Une augmentation de la force ionique s'accompagne d'une diminution de l'épaisseur de la double couche et de la mobilité électroosmotique.

Le bilan des phénomènes de transport subis par un ion permet d'exprimer sa vitesse apparente v_{app} selon l'Équation 20 :

Équation 20 : Expression de la vitesse apparente d'un composé v_{app}

$$v_{app} = (\mu_{ep} + \mu_{eo}) \times E = \mu_{app} \times E \quad \text{avec } \mu_{app} = \mu_{ep} + \mu_{eo}$$

➤ L'électrophorèse de zone

Un grand nombre de modes de séparation par électrophorèse capillaire ont été développés. La chromatographie électrocinétique (EKC) s'appuie sur une dimension supplémentaire de séparation des analytes : des interactions entre les analytes d'intérêt et des composés ajoutés à l'électrolyte. Dans le cas de la chromatographie électrocinétique micellaire, des tensioactifs sont ajoutés dans l'électrolyte à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique afin qu'ils forment des micelles. L'ajout de cyclodextrines permet quant à lui de réaliser des énantiométries de composés. L'électrophorèse sur gel utilise un capillaire rempli d'un gel jouant le rôle de tamis et permet donc la séparation de composés selon leur taille.¹⁷³

L'électrophorèse de zone (CZE), utilisée dans ce projet, est un mode de séparation assez simple qui utilise un capillaire rempli d'électrolyte au sein duquel les espèces sont séparées selon les seuls effets des migrations électrophorétique et électroosmotique :

Le flux électroosmotique est en général dirigé vers la cathode (électrode négative) et est subit de façon égale par toutes les espèces. Le détecteur est donc placé proche de cette extrémité alors que l'injection est réalisée au niveau de l'extrémité anodique. La séparation est ainsi influencée par les paramètres de l'électrolyte comme son pH ou sa force ionique. A charge nette égale, une espèce de plus petite taille sera soumise à une vitesse électrophorétique plus élevée qu'une espèce de rayon plus important.¹⁷¹ Les espèces de charge nette négative subissant une mobilité électrophorétique dirigée vers l'anode positive, ces espèces seront donc entraînées vers la cathode ou l'anode en fonction de la direction de leur vitesse apparente. La mobilité électrophorétique des espèces de charge nette positive est quant à elle dirigée dans la même direction que l'écoulement électroosmotique.

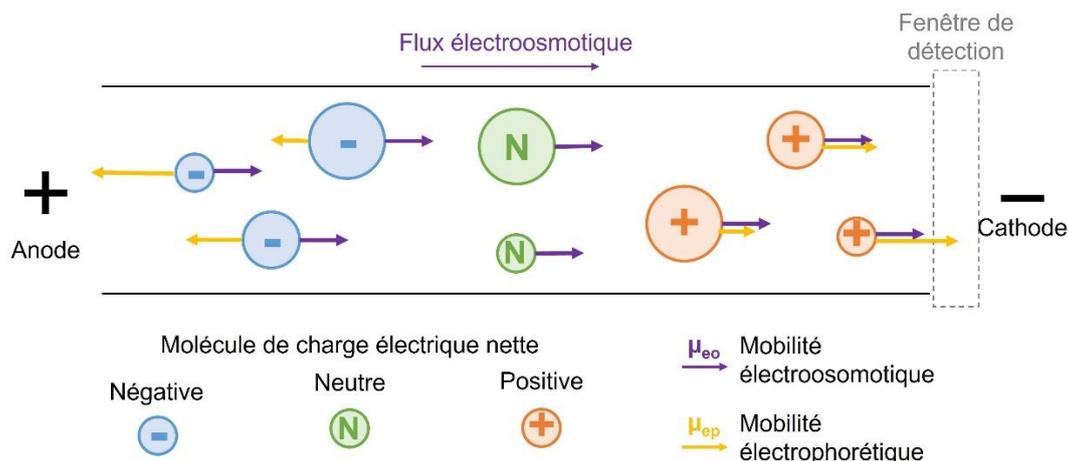


Figure 54 : Principe de séparation d'espèces chargées ou non par électrophorèse de zone CZE

Un capillaire dont la paroi interne est recouverte d'alcool polyvinylique (PVA) a été utilisé au cours de ce projet. Ce revêtement permet de limiter les interactions entre le soluté et les parois du capillaire. Dans ce type de capillaire, les espèces ne migrent que grâce à leur mobilité électrophorétique car le flux électroosmotique est supprimé.

➤ Le détecteur UV

Un détecteur classiquement utilisé avec l'EC est le détecteur UV-visible car beaucoup d'espèces absorbent à des longueurs d'ondes correspondant à ces domaines (d'environ 190 à 800 nm). Le choix du tampon de migration utilisé pour la séparation doit être fait de façon qu'il n'absorbe pas à la longueur d'onde de détection des analytes. Les premiers détecteurs UV-visible assuraient une détection à une longueur d'onde fixe. Des détecteurs à longueur d'onde variable ont donc été introduits et permettent d'envoyer une longueur d'onde choisie au travers de la cellule de mesure. Celle-ci est sélectionnée grâce à une fente à partir de la lumière générée par une lampe au deutérium. Les détecteurs à réseau de photodiodes (PDA) présentent quant à eux le même chemin optique que les détecteurs précédents, mais la lumière est répartie sur un réseau de photodiodes après avoir traversé la cellule de mesure.¹⁷⁴

2.4.2.2. Matériel utilisé

Une électrophorèse Agilent a été utilisée. Le capillaire utilisé est un capillaire PVA à bulle de longueur totale égale à 64,5 cm et de 50 μm de diamètre interne. Sa longueur effective, c'est-à-dire la distance entre l'entrée et la fenêtré de détection est de 56 cm. La température de la cassette contenant le capillaire est fixée à 20 °C. La tension appliquée est de -25 kV. L'injection

hydrodynamique est réalisée grâce à l'application d'une pression de 50 mbar pendant 32 secondes. La détection est faite à l'aide d'un détecteur à barrettes de diodes à 254 nm.

2.4.3. HPLC-MS

2.4.3.1. Théorie de la technique

➤ La chromatographie liquide haute performance

La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est une méthode analytique très répandue et utilisée dans de nombreux secteurs d'activités. Elle est par exemple employée pour l'analyse de matrices environnementales¹⁷⁵, pharmaceutiques¹⁷⁶ ou agroalimentaires¹⁷⁷.

Ce système est constitué de différentes parties, permettant la séparation des composés jusqu'à leur détection : une ou plusieurs pompes, un injecteur, une colonne et un détecteur (Figure 55).

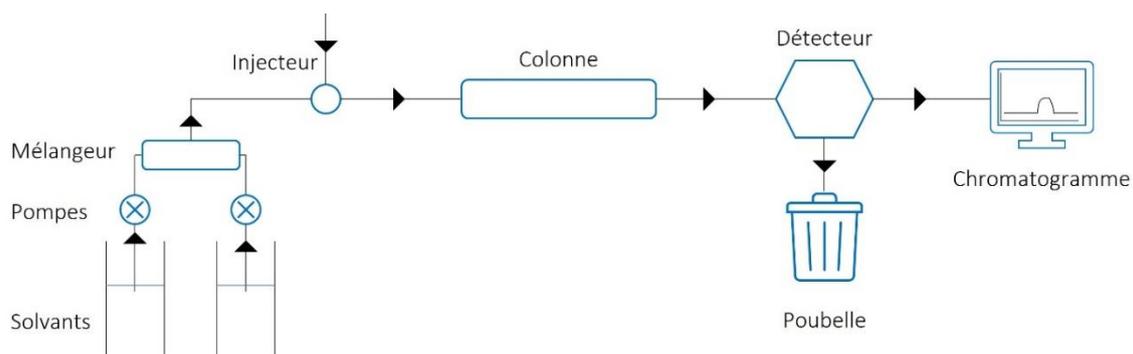


Figure 55 : Système classique de chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

Des pompes haute pression permettent le pompage des solvants depuis des réservoirs, ainsi que leur introduction dans le système à un débit spécifique (généralement de l'ordre de quelques micro à quelques millilitres par minute) après avoir été mélangés. Les solvants sont dégazés avant d'être introduits dans le circuit. Il existe deux modes différents concernant l'évolution de la composition de cette phase mobile au cours de l'analyse : le mode gradient et le mode isocratique. Au cours d'une analyse avec le premier mode, la concentration des constituants du mélange d'éluant évolue alors qu'elle reste constante pour le mode isocratique. Des solvants organiques, généralement de l'acétonitrile ou du méthanol dans l'eau, sont employés.¹⁶²

Le deuxième composant d'une HPLC est l'injecteur. Il permet l'introduction de l'échantillon à analyser dans le flux continu de la phase mobile, généralement à l'aide d'une boucle

d'injection. La phase mobile transporte les analytes jusqu'à la colonne. Les vannes 6 voies permettant le chargement d'une boucle, puis l'injection dans le système sont très utilisées

La séparation a alors lieu dans une colonne contenant une phase stationnaire choisie. La colonne est généralement constituée d'acier inoxydable inerte et résistant aux fortes pressions. Les analytes entrent par une extrémité, sont séparés en fonction de leur affinité pour les phases mobile et stationnaire, puis ressortent avant d'être élués jusqu'au détecteur. Les colonnes font le plus souvent 15 à 25 cm de long, avec un diamètre interne de l'ordre de 1 à 6 mm. Il existe un très grand nombre de phases stationnaires commercialisées et adaptées aux différents analytes. Une des plus courante, nommée C18, est composée de silice greffée avec des chaînes alkylées de 18 atomes de carbone. Cette phase organique est donc apolaire et permet la séparation, dite en phase inverse, d'un grand nombre de composés. Une séparation en phase normale est faite grâce à une colonne contenant de la silice non modifiée, ou greffée avec des groupements polaires (par exemple NH₂).

Un détecteur ou plusieurs détecteurs assurent enfin la détection des analytes. L'HPLC peut être couplée avec une très grande variété de détecteurs spectroscopiques (UV-visible, fluorescence...), électrochimiques (ampérométrie, conductimétrie...) ou avec un spectromètre de masse selon les performances analytiques désirées et le type d'analyte.¹⁷⁴

Les différentes parties du système sont reliées entre elles grâce à des tubulures.^{178,179}

➤ La spectrométrie de masse

Un détecteur très fréquemment utilisé après une HPLC est le spectromètre de masse (MS). Celui-ci permet d'obtenir des informations qualitatives de structure (masse moléculaire) et quantitatives (concentration) sur les analytes d'intérêt après leur conversion en ions. Ce détecteur trie les molécules selon leur rapport masse sur charge (m/z). Il se compose de trois parties principales : la source d'ionisation, l'analyseur et le détecteur.

Les molécules d'intérêt sont tout d'abord introduites dans la source d'ionisation. Cette partie du système a pour but de vaporiser et d'ioniser positivement ou négativement les composés. De très nombreuses sources existent. Elles peuvent être douces, c'est-à-dire qu'elles produisent des ions avec un nombre pair d'électrons et donc relativement stables. Elles sont souvent utilisées afin de vérifier la présence d'une molécule dans un échantillon. L'ionisation chimique sous-vide (CI) ou à pression atmosphérique (APCI) et l'ionisation par électrospray

(ESI) sont des sources douces couramment utilisées. Les sources dures génèrent quant à elle des radicaux instables qui pourront ensuite se fragmenter, et ainsi aider à la détermination de structure. L'ionisation par impact électronique (EI), la spectrométrie à plasma à couplage inductif (ICP) sont considérées comme dures.^{180,181}

Les molécules ionisées sont ensuite dirigées vers un analyseur dont le rôle est de les séparer en fonction de leur rapport m/z . Le quadripôle est un analyseur largement employé.¹⁸² D'autres analyseurs sont également courants, comme le temps de vol (TOF) ou les trappes d'ions (exemple l'Orbitrap®).

Le détecteur permet enfin de convertir le courant ionique reçu en signal et d'obtenir des spectres de masses représentant l'intensité relative des différentes espèces détectées en fonction de leur rapport masse sur charge. Le faisceau d'ion peut être converti en électrons, puis amplifié par un électromultiplicateur. Il est également possible de convertir les électrons formés en photons grâce à un scintillateur, qui sont ensuite envoyés dans un photomultiplicateur.¹⁸³

2.4.3.2. Matériel utilisé

La chromatographie en phase inverse avec une colonne C18 en mode de suppression d'ions a été utilisée au cours de ce projet. Les analyses par HPLC-MS ont été réalisées à l'aide d'une chaîne HPLC, d'un détecteur Uv-visible et d'un spectromètre de masse Triple Quad 6500+ de chez SCIEX. La chaîne HPLC est composée d'une pompe, d'un injecteur thermostaté, d'un four à colonne et d'un détecteur à barrettes de diodes.

La colonne HPLC utilisée est une C18 Macherey Nagel de 10 cm de long et 2 mm de diamètre interne. La phase stationnaire est composée de particules core-shell de 2,7 μM . La température du four est fixée à 40 °C. Le volume d'échantillon injecté est de 5 μL . Les 2 éluants utilisés pour la phase mobile sont le TEAA 5 mM dans l'eau (éluant A) et l'acétonitrile (éluant B). Le gradient utilisé est résumé dans le Tableau 13. Le débit est fixé à 0,35 mL/min.

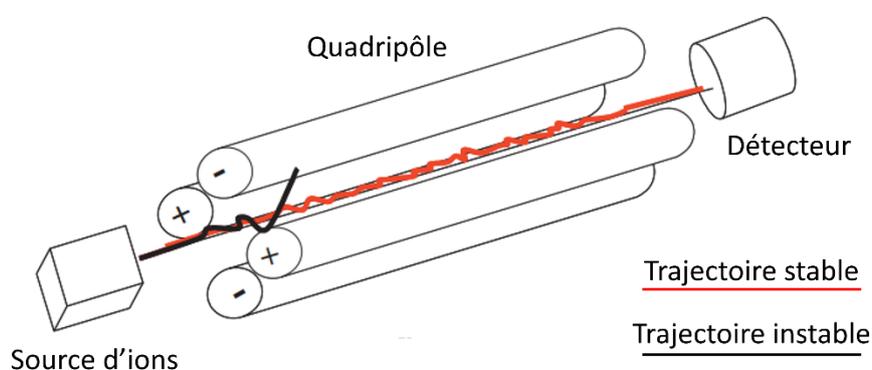
Tableau 13 : Gradient utilisé pour les analyses par HPLC-MS

Temps (min)	Concentration de l'éluant A	Concentration de l'éluant B
0,00	100	0
7,00	70	30
7,10	30	70
8,00	30	70
8,10	100	0
11,00	100	0

La détection UV-visible est réalisée à 254 nm.

Le spectromètre de masse utilisé est équipé d'une source ESI et d'un analyseur quadripolaire. L'analyte est introduit dans la source à pression atmosphérique dans un capillaire et une tension élevée est appliquée entre la sortie et l'entrée de ce capillaire. La taille des gouttes diminue grâce à l'évaporation du solvant augmentant la densité de charge à leur surface et menant à leur explosion. Les ions désolvatés en phase gazeuse sont alors envoyés à l'analyseur.^{184,185}

L'analyseur quadripolaire est composé de 4 barres parallèles et au sein desquelles sont appliquées une tension oscillante. Les barres opposées sont au même potentiel, et les 2 autres ont un potentiel opposé. Selon la tension appliquée, certains ions vont rentrer en résonance et auront une trajectoire stable leur permettant de traverser le séparateur de masse et d'en sortir avant d'être dirigés jusqu'au détecteur. D'autres seront perdus en passant entre les barres ou en les heurtant (Figure 56).¹⁸² La détection est faite en mode négatif. Les données sont exploitées grâce au logiciel Analyst.

Figure 56 : Schéma d'un quadripôle (adapté de¹⁸⁶)

Les paramètres du spectromètre de masse utilisés sont :

- Source temperature: 300 °C
- Ion spray voltage: - 4500 V
- Declustering potential: - 120 V
- Entrance potential: - 10 V
- Ion source gas 1: 35
- Ion source gas 2: 35

2.4.4. Mesures de températures de fusion

Afin de mesurer la température de fusion T_m d'un oligonucléotide, l'absorbance de l'échantillon est mesurée à 254 nm alors qu'il subit des cycles de chauffe et refroidissement.

Un spectromètre UV-visible Varian Cary 400 thermostaté a été utilisé pour ces mesures de température de fusion.

2. Méthodes

Les différents stocks d'aptamères ont été préparés dans de l'eau pure et conservés à -20 °C. Avant utilisation, les solutions d'aptamères ont été dénaturées pendant 5 minutes à 80 °C, puis laissées à température ambiante pendant 30 minutes. Une solution « AX » correspond à une solution A fois concentrée. Sauf mention contraire, les manipulations sont faites en duplicats de duplicats.

2.1. Mesures d'anisotropies de fluorescence

Les puits correspondants aux blancs sont remplis de 100 µL de tampon 1X utilisé au cours des manipulations considérées.

La solution commerciale de SSB (66 µM dans son tampon de stockage 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1,0 mM DTT et 50% de glycérol) est stockée à -20 °C. Pour les essais, cette solution de protéine est tout d'abord diluée 733 fois dans une solution aqueuse contenant du DTT (1,5 mM) et du Triton-X100 (0,06%). La concentration finale en protéine SSB est de 90 nM. Cette solution est préparée juste avant utilisation. Toutes les concentrations en SSB correspondent à celles du tétramère de masse molaire 76500 Da.

2.1.1. Dosage direct

Le dosage direct a été réalisé pour l'aptamère F24-1 dans un tampon composé de 5 mM phosphate de sodium à pH 7,5. Pour cela, la solution d'aptamère (80 µL à 37,5 nM dans un tampon 1,25X) préalablement dénaturée est incubée avec des concentrations croissantes de cible L-Rm 5X (20 µL) dans une plaque 96 puits. Le volume total des échantillons est donc de 100 µL. Après environ 5 minutes d'incubation, la mesure d'anisotropie de fluorescence est réalisée dans le lecteur de microplaques. Les échantillons contiennent alors 30 nM d'aptamère et la L-Rm en concentration croissante, de 0,01 à 1 mM. Ils ont été préparés en duplicats.

2.1.2. Courbe d'interaction aptamère/cible

Différentes courbes d'interaction aptamère/cible ont été tracées. Pour cela, l'oligonucléotide (100 µL à 20 nM dans un tampon 2X ou 50 µL à 40 nM dans un tampon 4X) est incubé avec des volumes croissants de SSB dans des tubes individuels pendant au moins 5 minutes. De l'eau est ajoutée afin d'atteindre un volume final de 200 µL. 100 µL de chaque échantillon ont ensuite été transférés dans les puits de la microplaque pour lecture dans le lecteur. Les concentrations finales de SSB varient jusqu'à 36 nM selon les séquences et conditions utilisées. Celle de l'aptamère est de 10 nM en tampon 1X.

Les échantillons ayant pour objectif d'étudier l'effet de l'augmentation du pH 10 mM tris-HCl + 100 mM NaCl (page 106) ont été préparés en duplicats.

2.1.3. Dosage classique

Le dosage classique assisté par SSB (Figure 26) est appliqué en incubant dans un premier temps l'aptamère avec la protéine SSB en concentration souhaitée pendant 5 minutes dans des tubes individuels. La cible est alors ajoutée (50 µL de solution 4X) en concentration croissante. Après 5 minutes, 100 µL de chaque échantillon est transféré dans la microplaque pour lecture. La concentration finale en aptamère est de 10 nM en tampon 1X et les concentrations de cible L-Ym varient entre 0 et 99,9 µM.

2.1.4. Dosage inversé

Le dosage inversé assisté par SSB (Figure 29) est effectué en incubant d'abord l'aptamère avec sa cible, avant l'ajout de protéine.

Pour cela, l'oligonucléotide (100 μL à 20 nM dans un tampon 2X ou 50 μL à 40 nM dans un tampon 4X) est incubé avec la cible 4X (50 μL) en concentration croissante dans des tubes individuels (et une quantité ajustée d'eau est ajoutée). Après 5 minutes, le volume adapté de SSB est introduit dans chaque tube à l'aide d'une pipette multicanaux. Le volume final des échantillons est donc de 200 μL . Cette pipette est à nouveau utilisée pour transférer 100 μL de chaque dans une microplaque et la lecture est effectuée 120 (à température ambiante) ou 90 secondes (à basse température) après l'ajout de la protéine.

La différence d'anisotropie $r_{\text{SSB}} - r_f$ est déterminée à l'aide d'un échantillon ne contenant que l'aptamère dans son tampon 1X.

2.1.5. Manipulations à basse température

Certaines manipulations ont été répétées à basse température dans une chambre froide dont la température est contrôlée et comprise entre 2 et 4 °C. Tout le matériel utilisé pour la préparation des échantillons a été placé la veille des manipulations dans cette pièce afin d'atteindre l'équilibre thermique. Les solutions d'aptamères sont placées dans cette pièce directement après leur dénaturation de 5 min à 80 °C et toutes les étapes de préparation y ont été effectuées jusqu'à la lecture dans le lecteur de microplaques réglé à 25 °C.

2.2. Détection des produits d'oxydation et de pontages par électrophorèse capillaire

Avant toute analyse, le capillaire est rempli de tampon de migration. Chacune des deux extrémités trempe dans un flacon contenant ce tampon. Le contenu des flacons est changé entre deux analyses.

2.2.1. Mise au point de conditions d'analyse

2.2.1.1. Tampon de migration

Pour la mise au point de la composition du tampon de migration, un échantillon contenant l'aptamère 18-4 à 5 μM , 5 mM de L-Rm, 100 μM de 2 NH_4^+ , IrCl_6^{2-} et 1 mM EDTA pH 8 dans 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 est analysé. Pour cela, l'aptamère à 20 μM est dénaturé dans le tampon d'incubation 4X à 80 °C pendant 5 minutes puis laissé 30 minutes à température ambiante. A 10 μL de cette solution sont ajoutés de l'eau ultrapure. L'échantillon est mélangé avec la cible L-Rm (4 μL à 10 mM). Après 5 minutes de complexation, l'oxydant (4

μL à 1 mM) est ajouté, puis après 15 minutes, l'EDTA pH 8 (4 μL à 10 mM) l'est également. Le volume total de l'échantillon est donc de 40 μL . L'échantillon est ensuite analysé et les compositions testées pour le tampon de migration sont : 20 mM phosphate de sodium pH 7,5 ou 20 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 50 mM NaCl. La composition conservée pour les prochaines analyses est la deuxième.

2.2.1.2. Tampon d'incubation

Un échantillon contenant l'aptamère 18-2 à 5 μM , 5 mM de L-Rm, 100 μM de 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} et 1 mM EDTA pH est préparé dans différents tampons d'incubation. Le même protocole de préparation que pour le choix du tampon de migration est utilisé. Seule la composition du tampon d'incubation est différente et celles testées (1X) sont :

- 5 mM phosphate de sodium pH 7,5
- 20 mM phosphate de sodium pH 7,5
- 95 mM phosphate de sodium pH 7,5
- 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 20 mM NaCl
- 5 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 100 mM NaCl

Les échantillons sont analysés avec le tampon de migration 20 mM phosphate de sodium pH 7,5 + 50 mM NaCl. Le tampon d'incubation sélectionné pour la suite de l'étude est composé de 5 mM phosphate de sodium pH 7,5.

2.2.2. Effet de $\text{Ir}(\text{Cl})_6^{2-}$ sur les aptamères contenant ou non une OG

L'effet de 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} sur les aptamères contenant ou non une OG et en présence ou en absence de cible est étudié en analysant des échantillons préparés avec les aptamères 18-1 à 18-4. Pour chaque séquence, 3 échantillons (notés A, B et C) dont les compositions finales sont reportées dans le Tableau 14 ont été préparés.

Tableau 14 : Compositions finales des échantillons A, B, C et D ; Tampon 1X : 5 mM phosphate de sodium pH 7,5

Échantillon	Composition finale
A	Oligonucléotide 5 μM + EDTA pH 8 1 mM dans le tampon 1X
B	Oligonucléotide 5 μM + 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} 100 μM + EDTA pH 8 1 mM dans le tampon 1X
C	Oligonucléotide 5 μM + L-Rm 1 mM + 2NH_4^+ , IrCl_6^{2-} 100 μM + EDTA pH 8 1 mM dans le tampon 1X

Selon les échantillons, les solutions mère d'aptamère (20 μM dans le tampon d'incubation 4X) sont incubées avec la cible (4 μL à 10 mM) pendant 5 minutes. L'oxydant est ensuite ajouté et la réaction est stoppée au bout de 15 minutes par l'EDTA (4 μL à 10 mM). Le volume final des échantillons est de 40 μL .

La quantité d'oxydant minimale à utiliser pour faire disparaître le pic correspondant à l'oligonucléotide a été étudiée en faisant varier la concentration de la solution d'iridium ajoutée. Le même procédé a été utilisé pour la réduction de la concentration de cible L-Rm.

2.3. Caractérisation des produits d'oxydation et de pontages par HPLC-MS

2.3.1. Préparation des échantillons

Les échantillons A, B et C préparés précédemment ont aussi été analysés par HPLC-MS.

La concentration de cible, la composition et le pH du tampon d'incubation ont été modifiés en adaptant les protocoles de préparation d'échantillons préalablement décrits.

Pour les échantillons contenant la séquence 25DA comme compétiteur, l'oligonucléotide reconnaissance la L-Rm (10 μL à 20 nM dans un tampon 1X) préalablement dénaturé est mélangé à la séquence 25DA en concentration croissante (2, 4 ou 8 μL à 100 μM ou 2 μL à 1 mM). Après environ 5 minutes, la cible L-Rm 10X est ajoutée. De l'eau et du tampon 4X sont ajoutés avant que l'oxydation ait lieu avec 4 μL de sel d'iridium à 0,5 mM pendant 15 min et soit ensuite stoppée par l'EDTA (4 μL à 10 mM). Le volume final de l'échantillon et les concentrations finales des différentes espèces sont : oligonucléotide à 5 μM , la séquence DA en concentration croissante de 0 à 50 μM , L-Rm à 250 μM , $\text{Ir}(\text{Cl})_6^{2-}$ à 50 μM , EDTA à 1 mM dans le tampon 1X. Ces échantillons ont été préparés une fois.

Les échantillons utilisant la putrescine ou la L-alaninamide sont préparés de façon similaire, mais le compétiteur (putrescine 4X ou L-alaninamide 4X) est dans ce cas après que la complexation entre l'aptamère et la cible L-Rm ait eu lieu pendant environ 5 minutes et avant l'ajout de l'oxydant. Les concentrations finales de putrescine testées allaient de 0 à 2 mM et celles de L-alaninamide de 0 à 5 mM.

2.3.2. Types d'analyse par MS

2.3.2.1. Mode scan

Les analyses réalisées en mode scan permettent d'obtenir des spectres de masses sur une plage de masses choisie. Ici, les masses de 1000 à 2000 Da ont été détectées.

2.3.2.2. Méthodes semi-quantitatives

Différentes méthodes semi-quantitatives utilisant les aires des pics HPLC ont été mises au point avec le logiciel Mutliquant en fonction des espèces présentes dans les échantillons. La résolution unitaire est utilisée. Chaque échantillon auquel une méthode semi-quantitative a été appliquée a été préparé en duplicat et analysé 3 fois.

➤ Méthode 1

La première méthode semi-quantitative est utilisée afin d'étudier l'influence de la concentration de cible, de la composition et du pH du tampon d'incubation sur la formation de pontages covalents avec la L-Rm. Les espèces d'intérêt sont donc : l'oligonucléotide non oxydé, les produits d'oxydation Gh et Sp et les produits de pontages avec la cible Gh-Rm et Sp-Rm. Les masses correspondant à l'état de charge 4⁻ de ces espèces ont été mesurées (Tableau 15).

Tableau 15 : Masses (Da) des états de charge 4⁻ des espèces d'intérêt mesurées avec la méthode 1

Séquence	Aptamère non oxydé	Produits d'oxydation		Pontages avec L-Rm	
	24-2, 24-3 ou 24-4	Gh	Sp	Gh-Rm	Sp-Rm
[M-4H] ⁴⁻	1837,5	1835,0	1841,5	1873,8	1880,3

La proportion de pontages avec la L-Rm (%) est calculée grâce à la somme des aires des pics de Gh-Rm et Sp-Rm par rapport à la somme des aires des pics de toutes les espèces d'intérêt.

➤ Méthode 2

La deuxième méthode semi-quantitative est utilisée lors de l'ajout de putrescine comme compétiteur. Les espèces d'intérêt sont donc les mêmes que pour la méthode 1 (Tableau 15), ainsi que les pontages avec la putrescine et les pontages avec le tris. Des analyses en mode

scan ayant révélé que seule la forme Sp de ces pontages se détachent du bruit de fond, les formes Gh n'ont pas été intégrées dans la méthode (Tableau 16).

Tableau 16 : Masses (Da) des états de charge 4⁻ des pontages Sp avec le tris et la putrescine

	Sp-tris	Sp-putrescine
[M-4H]⁴⁻	1867,7	1859,5

La proportion de pontages avec la L-Rm (%) est calculée comme pour la méthode 1.

Cette méthode a été adaptée aux masses générées pour ces mêmes produits avec un aptamère de 18 bases et appliquée lors l'étude de l'évolution de la proportion de pontages formés avec le tris du tampon en présence et absence de cible L-Rm (Tableau 10).

➤ Méthode 3

La dernière méthode semi-quantitative est employée avec les échantillons contenant la L-alaninamide comme compétiteur. Les espèces d'intérêt sont les mêmes que pour la méthode 1 (Tableau 15), ainsi que les pontages avec le tris (Tableau 16) et les pontages avec la L-alaninamide ([M-4H]⁴⁻ : 1859,0 Da)

2.4. Mesures de température de fusion

Les échantillons utilisés pour la détermination des températures de fusion ont été préparés en l'aptamère (5 µL à 100 µM) dans le tampon 2X (50 µL) avant d'ajouter l'oxydant (2,5 µL à 1 mM). Le volume final des échantillons est de 100 µL. Ils ont subi des cycles de chauffe et refroidissement de 10 à 65 °C, ou de 20 à 80 °C avec une vitesse de 1 °C par minute.

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce projet de thèse est d'étudier si des pontages covalents peuvent être formés entre un aptamère contenant une 8-oxoguanine et sa cible *via* l'oxydation spécifique de cette base. La complexation de la cible doit en effet la rapprocher de l'OG. L'attaque des sites nucléophiles de la cible sur l'OG après oxydation est ainsi privilégiée. La preuve de concept a été faite avec un sel d'iridium comme oxydant spécifique de l'OG sur un système modèle : un aptamère de 24 bases reconnaissant la L-argininamide.

Le premier axe de travail a concerné l'évaluation de l'impact de l'introduction et de la position d'une OG dans la séquence de l'aptamère sur son affinité pour la cible. Pour cela, une méthode de dosage inversé assistée par la protéine SSB utilisant des mesures d'anisotropie de fluorescence a été développée au cours d'un projet parallèle avec un aptamère reconnaissant la L-tyrosinamide. Ce dosage a ensuite été appliqué aux trois séquences contenant une OG et générées à partir de l'aptamère d'intérêt. Les résultats obtenus à basse température ont permis de montrer que la présence d'une OG dans la séquence de l'aptamère a une influence sur son affinité pour la cible, et que celle-ci peut être augmentée ou diminuée en fonction de la position de la base.

Ensuite, l'effet de l'oxydation de la 8-oxoguanine au sein des complexes aptamère-cible en présence ou en absence de cible L-Rm a été étudié afin de vérifier si cette réaction peut former un pontage covalent entre ces deux espèces. Pour cela, des analyses ont été réalisées par électrophorèse capillaire en HPLC-MS. Elles ont permis de confirmer que l'oxydation de l'OG contenue dans les aptamères est efficace, spécifique et génère, en l'absence de cible, des produits dont les structures sont en accord avec ceux prédits par la littérature : un de forme spiro et l'autre contenant un groupement guanidinium. La caractérisation des produits formés par l'oxydation en présence de cible a montré que leurs structures sont également de cette forme. Cependant, des interactions électrostatiques non-spécifiques ont lieu entre l'aptamère poly anionique et la L-Rm cationique, permettant à des séquences contrôles non-susceptibles de reconnaître la cible de former également quantitativement des pontages.

La dernière partie du projet a donc été consacrée aux différentes stratégies mises en application afin de tenter de réduire ces interactions. Certains paramètres expérimentaux, tels que la composition et le pH du tampon d'incubation ont été modifiés. Différents compétiteurs,

chargés positivement ou négativement, ont ensuite été ajoutés au milieu. Plusieurs de ces stratégies ont permis de réduire les pontages formés *via* les interactions non-spécifiques, l'ajout de L-alaninamide étant la plus efficace. Les proportions de pontages avec la cible des séquences scramble restent cependant du même ordre qu'avec les séquences reconnaissant la L-Rm. Il semble donc difficile de conclure dans quelle mesure les pontages observés résultent d'interaction spécifiques ou non-spécifiques.

Ce projet a donc permis de montrer que le remplacement d'une guanine dans la séquence d'un aptamère reconnaissant une petite molécule par une 8-oxoguanine peut augmenter ou diminuer l'affinité pour la cible jusqu'à un facteur 7,4 dans les conditions utilisées. Cette modification pourrait être faite sur d'autres aptamères afin d'étudier l'effet de cette modification sur leur affinité. L'utilisation de la modélisation serait également intéressante afin de déterminer si l'incorporation d'une base modifiée induit un changement conformationnel du complexe aptamère/cible. Des approches RMN pourraient également permettre d'étudier expérimentalement ce possible changement conformationnel. La facilité avec laquelle des modifications peuvent être introduites dans la séquence d'un aptamère au cours de sa synthèse chimique permet d'envisager le remplacement de plusieurs guanines par des OG ou l'introduction d'autres modifications (8-oxo-7,8-dihydroadénine, base halogénée...).

Les résultats obtenus démontrent qu'il est possible de former des pontages covalents entre un aptamère contenant une 8-oxoguanine et sa cible à l'aide d'une oxydation spécifique par un sel d'iridium. La charge positive de la cible est cependant à l'origine d'interactions non-spécifiques générant également une partie des pontages. Il serait donc intéressant d'appliquer le concept à un aptamère reconnaissant une cible non cationique, comme l'aptamère 25DA reconnaissant la D-adénosine et l'AMP.³⁶ D'autres modes d'oxydation de l'OG, tels que la photooxydation en présence de riboflavine¹¹⁵ pourraient être envisagés. Des tests préliminaires réalisés au laboratoire et suggérant que des pontages peuvent être formés entre un aptamère contenant une 8-oxo-7,8-dihydroadénine (OA)¹¹⁹ oxydée par un sel d'iridium et sa cible pourraient être approfondis. Il est également possible d'envisager la formation de pontages entre un aptamère non modifié et sa cible grâce à la photooxydation directe d'une guanine, comme cela avait été observé au laboratoire entre une lysine et un oligonucléotide non modifié.¹²⁵

Valorisation des résultats

➤ Articles scientifiques

Deux articles scientifiques ont été rédigés afin de valoriser les résultats obtenus et sont en cours de correction avant d'être soumis à des revues scientifiques. Le premier, « *Fast SSB protein-assisted FAAA for highly sensitive and enantioselective L-tyrosinamide biosensing* », aborde le développement et l'optimisation du dosage inversé assisté par SSB sur le système anti-L-tyrosinamide (Chapitre 2) et sera soumis à *Biosensors and Bioelectronics*. Le deuxième, « *Aptamers containing 8-oxoguanine to improve affinity and promote crosslinks to its target* », concerne le travail réalisé avec l'aptamère anti-L-argininamide (mesures d'affinité des séquences contenant une OG, oxydation spécifique de l'OG dans les aptamères, formation de pontages covalents entre les séquences et la cible et stratégies mises en place pour réduire les interactions non-spécifiques). Il sera soumis à *Nucleic Acids Research*.

➤ Présentations des travaux

J'ai eu l'opportunité de présenter les travaux réalisés pendant cette thèse à différentes occasions :

- Novembre 2021 : *Journée scientifique de l'unité SyMMES/CEA* (Grenoble, France) – Communication orale
- Avril 2022 : *Aptamers 2022* (Oxford, RU) – Communication orale et poster
- Juin 2022 : *Journée Scientifique du médicament* (Grenoble, France) – Communication orale
- *Journée annuelle des doctorants de l'EDCSV* (Grenoble, France) – Poster
- *4^{ème} symposium international sur Advances in Pharmaceutical Analysis* (événement en ligne) – Communication orale
- Juillet 2022 : *Réunion du comité CBH Graduate School* (Grenoble, France) – Poster
- Mai 2023 : *Journée scientifique du labex Arcane* (Grenoble, France) – Communication orale
- Juin 2023 : *International Oligonucleotides and Peptides Conference 2023* (Milan, Italy) – Communication flash et poster

Bibliographie

- (1) Johansen, M. E.; Muller, J. G.; Xu, X.; Burrows, C. J. Oxidatively Induced DNA–Protein Cross-Linking between Single-Stranded Binding Protein and Oligodeoxynucleotides Containing 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine. *Biochemistry* **2005**, *44* (15), 5660–5671. <https://doi.org/10.1021/bi047580n>.
- (2) Toulmé, J.; Giegé, R. Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro. *Med Sci (Paris)* **1998**, *14* (2), 155. <https://doi.org/10.4267/10608/1003>.
- (3) Kedzierski, S.; Caltagirone, T.; Khoshnejad, M. Synthetic Antibodies: The Emerging Field of Aptamers. *BioProcess J* **2013**, *11* (4), 46–49. <https://doi.org/10.12665/J114.KedzierskiCaltagirone>.
- (4) Harada, K.; Frankel, A. D. Identification of Two Novel Arginine Binding DNAs. *The EMBO Journal* **1995**, *14* (23), 5798–5811. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00268.x>.
- (5) Bank, R. P. D. 3D View: 1OLD. *NMR STRUCTURE OF 24-MER DEOXYRIBONUCLEIC ACID, 7 STRUCTURES*.
- (6) Ciesiolka, J.; Gorski, J.; Yarus, M. Selection of an RNA Domain That Binds Zn²⁺. *RNA* **1995**, *1* (5), 538–550.
- (7) Tasset, D. M.; Kubik, M. F.; Steiner, W. Oligonucleotide Inhibitors of Human Thrombin That Bind Distinct Epitopes. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *272* (5), 688–698. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1275>.
- (8) Stojanovic, M. N.; de Prada, P.; Landry, D. W. Aptamer-Based Folding Fluorescent Sensor for Cocaine. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (21), 4928–4931. <https://doi.org/10.1021/ja0038171>.
- (9) Perrier, S.; Guieu, V.; Chovelon, B.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Panoply of Fluorescence Polarization/Anisotropy Signaling Mechanisms for Functional Nucleic Acid-Based Sensing Platforms. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (7), 4236–4248. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04593>.
- (10) Dong Huy, G.; Jin, N.; Yin, B.-C.; Ye, B.-C. A Novel Separation and Enrichment Method of 17β-Estradiol Using Aptamer-Anchored Microbeads. *Bioprocess Biosyst Eng* **2011**, *34* (2), 189–195. <https://doi.org/10.1007/s00449-010-0460-4>.
- (11) *SYNTHÈSE D'AVIS DE LA COMMISSION DE LA TRANSPARENCE : MACUGEN (pegaptanib), anticorps monoclonal anti-VEGF*. Haute Autorité de Santé. https://www.has-sante.fr/jcms/c_1714255/en/macugen-pegaptanib-anticorps-monoclonal-anti-vegf (accessed 2023-04-03).
- (12) Mok, W.; Li, Y. Recent Progress in Nucleic Acid Aptamer-Based Biosensors and Bioassays. *Sensors* **2008**, *8* (11), 7050–7084. <https://doi.org/10.3390/s8117050>.
- (13) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171* (4356), 737–738. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.
- (14) Ellington, A. D.; Szostak, J. W. In Vitro Selection of RNA Molecules That Bind Specific Ligands. *Nature* **1990**, *346* (6287), 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>.
- (15) Tuerk, C.; Gold, L. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase. *Science* **1990**, *249* (4968), 505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>.

- (16) Oliphant, A. R.; Brandl, C. J.; Struhl, K. Defining the Sequence Specificity of DNA-Binding Proteins by Selecting Binding Sites from Random-Sequence Oligonucleotides: Analysis of Yeast GCN4 Protein. *Molecular and Cellular Biology* **1989**, *9* (7), 2944–2949. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.7.2944-2949.1989>.
- (17) Kinzler, K. W.; Vogelstein, B. Whole Genome PCR: Application to the Identification of Sequences Bound by Gene Regulatory Proteins. *Nucleic Acids Res* **1989**, *17* (10), 3645–3653.
- (18) Chauveau, F.; Pestourie, C.; Tavitian, B. Les aptamères ou l'évolution moléculaire dirigée : sélection et applications. *Pathologie Biologie* **2006**, *54* (4), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2006.03.002>.
- (19) Toulmé, J.-J.; Da Rocha, S.; Dausse, E.; Azéma, L.; Lebars, I.; Moreau, S. Les aptamères : du concept à l'outil. *Médecine Nucléaire* **2007**, *31* (9), 478–484. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2007.07.009>.
- (20) Mendonsa, S. D.; Bowser, M. T. In Vitro Selection of High-Affinity DNA Ligands for Human IgE Using Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (18), 5387–5392. <https://doi.org/10.1021/ac049857v>.
- (21) Yang, J.; Bowser, M. T. Capillary Electrophoresis–SELEX Selection of Catalytic DNA Aptamers for a Small-Molecule Porphyrin Target. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1525–1530. <https://doi.org/10.1021/ac302721j>.
- (22) Darwin, C. *L'Origine des espèces de Charles Darwin*. <https://editions.flammarion.com/lorigine-des-especes/9782080290502> (accessed 2023-03-16).
- (23) Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. Analytical Applications of Aptamers. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *20* (12), 2424–2434. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.11.006>.
- (24) Cox, J. C.; Ellington, A. D. Automated Selection of Anti-Protein Aptamers. *Bioorg Med Chem* **2001**, *9* (10), 2525–2531. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(01\)00028-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(01)00028-1).
- (25) Dhiman, A.; Halder, S.; Mishra, S. K.; Sharma, N.; Bansal, A.; Ahmad, Y.; Kumar, A.; Sharma, T. K.; Tyagi, J. S. Generation and Application of DNA Aptamers against HspX for Accurate Diagnosis of Tuberculous Meningitis. *Tuberculosis* **2018**, *112*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.07.004>.
- (26) O'Sullivan, C. K. Aptasensors – the Future of Biosensing? *Anal Bioanal Chem* **2002**, *372* (1), 44–48. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1189-3>.
- (27) Tan, S. Y.; Acquah, C.; Sidhu, A.; Ongkudon, C. M.; Yon, L. S.; Danquah, M. K. SELEX Modifications and Bioanalytical Techniques for Aptamer–Target Binding Characterization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2016**, *46* (6), 521–537. <https://doi.org/10.1080/10408347.2016.1157014>.
- (28) Lauridsen, L. H.; Shamaileh, H. A.; Edwards, S. L.; Taran, E.; Veedu, R. N. Rapid One-Step Selection Method for Generating Nucleic Acid Aptamers: Development of a DNA Aptamer against α -Bungarotoxin. *PLoS ONE* **2012**, *7* (7), e41702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041702>.
- (29) Lyu, C.; Khan, I. M.; Wang, Z. Capture-SELEX for Aptamer Selection: A Short Review. *Talanta* **2021**, *229*, 122274. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122274>.
- (30) Zhong, Y.; Zhao, J.; Li, J.; Liao, X.; Chen, F. Advances of Aptamers Screened by Cell-SELEX in Selection Procedure, Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Analytical Biochemistry* **2020**, *598*, 113620. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113620>.

- (31) Chen, M.; Yu, Y.; Jiang, F.; Zhou, J.; Li, Y.; Liang, C.; Dang, L.; Lu, A.; Zhang, G. Development of Cell-SELEX Technology and Its Application in Cancer Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **2016**, *17* (12), 2079. <https://doi.org/10.3390/ijms17122079>.
- (32) Maradani, B. S.; Parameswaran, S.; Subramanian, K. Development and Characterization of DNA Aptamer against Retinoblastoma by Cell-SELEX. *Sci Rep* **2022**, *12* (1), 16178. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20660-3>.
- (33) Tuerk, C.; MacDougall-Waugh, S. In Vitro Evolution of Functional Nucleic Acids: High-Affinity RNA Ligands of HIV-1 Proteins. *Gene* **1993**, *137* (1), 33–39. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90248-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90248-2).
- (34) Davis, J. T. G-Quartets 40 Years Later: From 5'-GMP to Molecular Biology and Supramolecular Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (6), 668–698. <https://doi.org/10.1002/anie.200300589>.
- (35) Hofmann, H. P.; Limmer, S.; Hornung, V.; Sprinzl, M. Ni²⁺-Binding RNA Motifs with an Asymmetric Purine-Rich Internal Loop and a G-A Base Pair. *RNA* **1997**, *3* (11), 1289–1300.
- (36) Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. A DNA Aptamer That Binds Adenosine and ATP. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 656–665. <https://doi.org/10.1021/bi00002a033>.
- (37) White, R.; Rusconi, C.; Scardino, E.; Wolberg, A.; Lawson, J.; Hoffman, M.; Sullenger, B. Generation of Species Cross-Reactive Aptamers Using “Toggle” SELEX. *Molecular Therapy* **2001**, *4* (6), 567–573. <https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0495>.
- (38) Wiegand, T.; Williams, P.; Dreskin, S.; Jouvin, M.; Kinet, J.-P.; DJ, T. High-Affinity Oligonucleotide Ligands to Human IgE Inhibit Binding to Fc Epsilon Receptor I. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **1996**, *157*, 221–230. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.157.1.221>.
- (39) Godonoga, M.; Lin, T.-Y.; Oshima, A.; Sumitomo, K.; Tang, M. S. L.; Cheung, Y.-W.; Kinghorn, A. B.; Dirkwager, R. M.; Zhou, C.; Kuzuya, A.; Tanner, J. A.; Heddle, J. G. A DNA Aptamer Recognising a Malaria Protein Biomarker Can Function as Part of a DNA Origami Assembly. *Sci Rep* **2016**, *6* (1), 21266. <https://doi.org/10.1038/srep21266>.
- (40) Hermann, T.; Patel, D. J. Adaptive Recognition by Nucleic Acid Aptamers. *Science* **2000**, *287* (5454), 820–825. <https://doi.org/10.1126/science.287.5454.820>.
- (41) Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* **1994**, *263* (5152), 1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>.
- (42) Geiger, A.; Burgstaller, P.; von der Eltz, H.; Roeder, A.; Famulok, M. RNA Aptamers That Bind L-Arginine with Sub-Micromolar Dissociation Constants and High Enantioselectivity. *Nucleic Acids Res* **1996**, *24* (6), 1029–1036. <https://doi.org/10.1093/nar/24.6.1029>.
- (43) Ruta, J. Aptamères énantiométriques en série ADN et ARN : applications à la séparation chirale en micro-chromatographie et en électrophorèse capillaire (EC). phdthesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. <https://theses.hal.science/tel-00333622> (accessed 2023-03-24).
- (44) Osborne, S. E.; Ellington, A. D. Nucleic Acid Selection and the Challenge of Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **1997**, *97* (2), 349–370. <https://doi.org/10.1021/cr960009c>.
- (45) Mann, D.; Reinemann, C.; Stoltenburg, R.; Strehlitz, B. In Vitro Selection of DNA Aptamers Binding Ethanolamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2005**, *338* (4), 1928–1934. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.172>.

- (46) Connell, G. J.; Illangsekare, M.; Yarus, M. Three Small Ribooligonucleotides with Specific Arginine Sites. *Biochemistry* **1993**, *32* (21), 5497–5502. <https://doi.org/10.1021/bi00072a002>.
- (47) Sazani, P. L.; Larralde, R.; Szostak, J. W. A Small Aptamer with Strong and Specific Recognition of the Triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (27), 8370–8371. <https://doi.org/10.1021/ja049171k>.
- (48) Song, K.-M.; Cho, M.; Jo, H.; Min, K.; Jeon, S. H.; Kim, T.; Han, M. S.; Ku, J. K.; Ban, C. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Detection of Kanamycin Using a DNA Aptamer. *Analytical Biochemistry* **2011**, *415* (2), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.04.007>.
- (49) Cruz-Aguado, J. A.; Penner, G. Determination of Ochratoxin A with a DNA Aptamer. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (22), 10456–10461. <https://doi.org/10.1021/jf801957h>.
- (50) Ruckman, J.; Green, L. S.; Beeson, J.; Waugh, S.; Gillette, W. L.; Henninger, D. D.; Claesson-Welsh, L.; Janjic, N. 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 *. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273* (32), 20556–20567. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20556>.
- (51) Marton, S.; Cleto, F.; Krieger, M. A.; Cardoso, J. Isolation of an Aptamer That Binds Specifically to E. Coli. *PLOS ONE* **2016**, *11* (4), e0153637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153637>.
- (52) Binning, J. M.; Wang, T.; Luthra, P.; Shabman, R. S.; Borek, D. M.; Liu, G.; Xu, W.; Leung, D. W.; Basler, C. F.; Amarasinghe, G. K. Development of RNA Aptamers Targeting Ebola Virus VP35. *Biochemistry* **2013**, *52* (47), 8406–8419. <https://doi.org/10.1021/bi400704d>.
- (53) Shanguan, D.; Li, Y.; Tang, Z.; Cao, Z. C.; Chen, H. W.; Mallikaratchy, P.; Sefah, K.; Yang, C. J.; Tan, W. Aptamers Evolved from Live Cells as Effective Molecular Probes for Cancer Study. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2006**, *103* (32), 11838–11843. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602615103>.
- (54) Xie, Y.; Eriksson, L. A.; Zhang, R. Molecular Dynamics Study of the Recognition of ATP by Nucleic Acid Aptamers. *Nucleic Acids Research* **2020**, *48* (12), 6471–6480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa428>.
- (55) White, R. R.; Sullenger, B. A.; Rusconi, C. P. Developing Aptamers into Therapeutics. *J Clin Invest* **2000**, *106* (8), 929–934. <https://doi.org/10.1172/JCI11325>.
- (56) Luzi, E.; Minunni, M.; Tombelli, S.; Mascini, M. New Trends in Affinity Sensing. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, *22* (11), 810–818. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)01208-1](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)01208-1).
- (57) Jayasena, S. D. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clinical Chemistry* **1999**, *45* (9), 1628–1650. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.9.1628>.
- (58) Iliuk, A. B.; Hu, L.; Tao, W. A. Aptamer in Bioanalytical Applications. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (12), 4440–4452. <https://doi.org/10.1021/ac201057w>.
- (59) Gronow, M. Biosensors. *Trends in Biochemical Sciences* **1984**, *9* (8), 336–340. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90055-0](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90055-0).
- (60) Ikebukuro, K.; Kiyohara, C.; Sode, K. Electrochemical Detection of Protein Using a Double Aptamer Sandwich. *Analytical Letters* **2004**, *37* (14), 2901–2909. <https://doi.org/10.1081/AL-200035778>.

- (61) Radi, A.-E.; Abd-Elattief, M. R. Electrochemical Aptasensors: Current Status and Future Perspectives. *Diagnostics* **2021**, *11* (1), 104. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11010104>.
- (62) Rabai, S.; Benounis, M.; Catanante, G.; Baraket, A.; Errachid, A.; Jaffrezic Renault, N.; Marty, J.-L.; Rhouati, A. Development of a Label-Free Electrochemical Aptasensor Based on Diazonium Electrodeposition: Application to Cadmium Detection in Water. *Analytical Biochemistry* **2021**, *612*, 113956. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113956>.
- (63) Savran, C. A.; Knudsen, S. M.; Ellington, A. D.; Manalis, S. R. Micromechanical Detection of Proteins Using Aptamer-Based Receptor Molecules. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (11), 3194–3198. <https://doi.org/10.1021/ac049859f>.
- (64) Zhang, G.; Li, C.; Wu, S.; Zhang, Q. Label-Free Aptamer-Based Detection of Microcystin-LR Using a Microcantilever Array Biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2018**, *260*, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.12.112>.
- (65) De-los-Santos-Álvarez, N.; Lobo-Castañón, M. J.; Miranda-Ordieres, A. J.; Tuñón-Blanco, P. Aptamers as Recognition Elements for Label-Free Analytical Devices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (5), 437–446. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.03.003>.
- (66) Zhao, Q.; Tao, J.; Uppal, J. S.; Peng, H.; Wang, H.; Le, X. C. Nucleic Acid Aptamers Improving Fluorescence Anisotropy and Fluorescence Polarization Assays for Small Molecules. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *110*, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.018>.
- (67) Ruta, J.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fize, J.; Peyrin, E. Noncompetitive Fluorescence Polarization Aptamer-Based Assay for Small Molecule Detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81* (17), 7468–7473. <https://doi.org/10.1021/ac9014512>.
- (68) Moutsipoulou, A.; Broyles, D.; Dikici, E.; Daunert, S.; Deo, S. K. Molecular Aptamer Beacons and Their Applications in Imaging and Diagnostics. *Small* **2019**, *15* (35), e1902248. <https://doi.org/10.1002/sml.201902248>.
- (69) Zon, G. Recent Advances in Aptamer Applications for Analytical Biochemistry. *Analytical Biochemistry* **2022**, *644*, 113894. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113894>.
- (70) Tyagi, S.; Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes That Fluoresce upon Hybridization. *Nat Biotechnol* **1996**, *14* (3), 303–308. <https://doi.org/10.1038/nbt0396-303>.
- (71) Lerga, T. M.; O'Sullivan, C. K. Rapid Determination of Total Hardness in Water Using Fluorescent Molecular Aptamer Beacon. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *610* (1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.01.031>.
- (72) Li, H.; Rothberg, L. Colorimetric Detection of DNA Sequences Based on Electrostatic Interactions with Unmodified Gold Nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101* (39), 14036–14039. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406115101>.
- (73) Wei, H.; Li, B.; Li, J.; Wang, E.; Dong, S. Simple and Sensitive Aptamer-Based Colorimetric Sensing of Protein Using Unmodified Gold Nanoparticle Probes. *Chem. Commun.* **2007**, No. 36, 3735. <https://doi.org/10.1039/b707642h>.
- (74) Wang, S.; Dong, Y.; Liang, X. Development of a SPR Aptasensor Containing Oriented Aptamer for Direct Capture and Detection of Tetracycline in Multiple Honey Samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *109*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.02.051>.
- (75) Michaud, M.; Jourdan, E.; Ravelet, C.; Villet, A.; Ravel, A.; Grosset, C.; Peyrin, E. Immobilized DNA Aptamers as Target-Specific Chiral Stationary Phases for Resolution of Nucleoside and Amino Acid Derivative Enantiomers. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (4), 1015–1020. <https://doi.org/10.1021/ac035090f>.

- (76) Zhang, Y.; Zhu, L.; He, P.; Zi, F.; Hu, X.; Wang, Q. Sensitive Assay of Escherichia Coli in Food Samples by Microchip Capillary Electrophoresis Based on Specific Aptamer Binding Strategy. *Talanta* **2019**, *197*, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.040>.
- (77) Olabi, M.; Stein, M.; Wätzig, H. Affinity Capillary Electrophoresis for Studying Interactions in Life Sciences. *Methods* **2018**, *146*, 76–92. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2018.05.006>.
- (78) German, I.; Buchanan, D. D.; Kennedy, R. T. Aptamers as Ligands in Affinity Probe Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (21), 4540–4545. <https://doi.org/10.1021/ac980638h>.
- (79) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-x](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-x).
- (80) Drolet, D. W.; Moon-McDermott, L.; Romig, T. S. An Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay. *Nat Biotechnol* **1996**, *14* (8), 1021–1025. <https://doi.org/jayasanj>.
- (81) Mok, J.; Kim, E.; Kang, M.; Jeon, J.; Ban, C. Development of an Optical Sandwich ELONA Using a Pair of DNA Aptamers for Yellow Fever Virus NS1. *Talanta* **2023**, *253*, 123979. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123979>.
- (82) Zhou, W.; Zhao, L.; Yuan, H.; Xu, L.; Tan, W.; Song, Y.; Fang, X. A New Small Cell Lung Cancer Biomarker Identified by Cell-SELEX Generated Aptamers. *Experimental Cell Research* **2019**, *382* (2), 111478. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.06.023>.
- (83) Yuhan, J.; Zhu, L.; Zhu, L.; Huang, K.; He, X.; Xu, W. Cell-Specific Aptamers as Potential Drugs in Therapeutic Applications: A Review of Current Progress. *Journal of Controlled Release* **2022**, *346*, 405–420. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.039>.
- (84) Center for Drug Evaluation and research. Approval Package for Macugen, 2014. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/21-756_Macugen_approv.pdf.
- (85) Ophthotech Corporation. *A Phase 3 Randomized, Double-Masked, Controlled Trial to Establish the Safety and Efficacy of Intravitreal Administration of Fovista® (Anti PDGF-B Pegylated Aptamer) Administered in Combination With Lucentis® Compared to Lucentis® Monotherapy in Subjects With Subfoveal Neovascular Age-Related Macular Degeneration.*; Clinical trial registration NCT01940900; clinicaltrials.gov, 2018. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01940900> (accessed 2023-04-02).
- (86) Yousefzadeh, M.; Henpita, C.; Vyas, R.; Soto-Palma, C.; Robbins, P.; Niedernhofer, L. DNA Damage—How and Why We Age? *eLife* **2021**, *10*, e62852. <https://doi.org/10.7554/eLife.62852>.
- (87) *The Chemical Biology of DNA Damage*; Geacintov, N. E., Broyde, S., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2010.
- (88) Bernstein, C.; Prasad, A. R.; Nfonsam, V.; Bernstein, H.; Bernstein, C.; Prasad, A. R.; Nfonsam, V.; Bernstein, H. *DNA Damage, DNA Repair and Cancer*; IntechOpen, 2013. <https://doi.org/10.5772/53919>.
- (89) Chatterjee, N.; Walker, G. C. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis: DNA Damage and Repair. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58* (5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- (90) Giglia-Mari, G.; Zotter, A.; Vermeulen, W. DNA Damage Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2011**, *3* (1), a000745–a000745. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000745>.

- (91) Abbotts, R.; Wilson, D. M. Coordination of DNA Single Strand Break Repair. *Free Radical Biology and Medicine* **2017**, *107*, 228–244. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039>.
- (92) Basu, A. Mutagenesis: The Outcome of Faulty Replication of DNA. In *Current Cancer Research*; 2011; Vol. 6, pp 375–399. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-995-6_17.
- (93) Svobodova, A.; Walterova, D.; Vostalova, J. Ultraviolet Light Induced Alteration to the Skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2006**, *150* (1), 25–38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>.
- (94) Thomaz, D. V.; de Oliveira, M. G.; Rodrigues, E. S. B.; da Silva, V. B.; dos Santos, P. A. Physicochemical Investigation of Psoralen Binding to Double Stranded DNA through Electroanalytical and Cheminformatic Approaches. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (6), 108. <https://doi.org/10.3390/ph13060108>.
- (95) Jiao, S.; Liu, B.; Ye, M.; Jiao, S.; Liu, B.; Ye, M. *Benzo[a]Pyrene and Human Embryo*; IntechOpen, 2012. <https://doi.org/10.5772/33995>.
- (96) *Témazolomide : substance active à effet thérapeutique*. VIDAL. <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/temozolomide-18580.html> (accessed 2023-06-14).
- (97) Pilié, P. G.; Tang, C.; Mills, G. B.; Yap, T. A. State-of-the-Art Strategies for Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **2019**, *16* (2), 81–104. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0114-z>.
- (98) *The Nobel Prize in Chemistry 2015*. NobelPrize.org. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2015/summary/> (accessed 2023-06-22).
- (99) Fedeles, B. I.; Singh, V.; Delaney, J. C.; Li, D.; Essigmann, J. M. The AlkB Family of Fe(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases: Repairing Nucleic Acid Alkylation Damage and Beyond. *Journal of Biological Chemistry* **2015**, *290* (34), 20734–20742. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.656462>.
- (100) Fang, Q.; Kanugula, S.; Pegg, A. E. Function of Domains of Human O6-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Biochemistry* **2005**, *44* (46), 15396–15405. <https://doi.org/10.1021/bi051460d>.
- (101) Zharkov, D. O. Base Excision DNA Repair. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65* (10), 1544–1565. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7543-2>.
- (102) Seeberg, E.; Eide, L.; Bjørås, M. The Base Excision Repair Pathway. *Trends Biochem Sci* **1995**, *20* (10), 391–397. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(00\)89086-6](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(00)89086-6).
- (103) Laat, W. L. de; Jaspers, N. G. J.; Hoeijmakers, J. H. J. Molecular Mechanism of Nucleotide Excision Repair. *Genes Dev.* **1999**, *13* (7), 768–785.
- (104) Iyer, R. R.; Pluciennik, A.; Burdett, V.; Modrich, P. L. DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (2), 302–323. <https://doi.org/10.1021/cr0404794>.
- (105) Kunkel, T. A.; Erie, D. A. DNA Mismatch Repair. *Annu Rev Biochem* **2005**, *74*, 681–710. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243>.
- (106) Zhang, J.; Walter, J. C. Mechanism and Regulation of Incisions during DNA Interstrand Cross-Link Repair. *DNA Repair* **2014**, *19*, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.03.018>.
- (107) Deans, A. J.; West, S. C. DNA Interstrand Crosslink Repair and Cancer. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11* (7), 467–480. <https://doi.org/10.1038/nrc3088>.

- (108) Caldecott, K. Mammalian Single-Strand Break Repair: Mechanisms and Links with Chromatin. *DNA Repair* **2007**, *6* (4), 443–453. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.006>.
- (109) Guirouilh-Barbat, J.; Huck, S.; Bertrand, P.; Pirzio, L.; Desmaze, C.; Sabatier, L.; Lopez, B. S. Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Molecular Cell* **2004**, *14* (5), 611–623. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.008>.
- (110) Ceccaldi, R.; Rondinelli, B.; D'Andrea, A. D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* **2016**, *26* (1), 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>.
- (111) Chiorcea-Paquim, A.-M. 8-Oxoguanine and 8-Oxodeoxyguanosine Biomarkers of Oxidative DNA Damage: A Review on HPLC–ECD Determination. *Molecules* **2022**, *27* (5), 1620. <https://doi.org/10.3390/molecules27051620>.
- (112) Hickerson, R. P.; Prat, F.; Muller, J. G.; Foote, C. S.; Burrows, C. J. Sequence and Stacking Dependence of 8-Oxoguanine Oxidation: Comparison of One-Electron vs Singlet Oxygen Mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (40), 9423–9428. <https://doi.org/10.1021/ja991929q>.
- (113) Grollman, A. P.; Moriya, M. Mutagenesis by 8-Oxoguanine: An Enemy Within. *Trends Genet* **1993**, *9* (7), 246–249. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90089-z](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90089-z).
- (114) Muller, J. Gel Electrophoretic Detection of 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine and 7, 8-Dihydro-8-Oxoadenine via Oxidation by Ir (IV). *Nucleic Acids Research* **1998**, *26* (9), 2247–2249. <https://doi.org/10.1093/nar/26.9.2247>.
- (115) Luo, W.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. The PH-Dependent Role of Superoxide in Riboflavin-Catalyzed Photooxidation of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanosine. *Org. Lett.* **2001**, *3* (18), 2801–2804. <https://doi.org/10.1021/ol0161763>.
- (116) Duarte, V.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. Insertion of DGMP and DAMP during in Vitro DNA Synthesis Opposite an Oxidized Form of 7,8-Dihydro-8-Oxoguanine. *Nucleic Acids Research* **1999**, *27* (2), 496–502. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.496>.
- (117) Luo, W.; Muller, J. G.; Rachlin, E. M.; Burrows, C. J. Characterization of Spiroiminodihydantoin as a Product of One-Electron Oxidation of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanosine. *Org. Lett.* **2000**, *2* (5), 613–616. <https://doi.org/10.1021/ol9913643>.
- (118) Luo, W.; Muller, J. G.; Rachlin, E. M.; Burrows, C. J. Characterization of Hydantoin Products from One-Electron Oxidation of 8-Oxo-7,8-Dihydroguanosine in a Nucleoside Model. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14* (7), 927–938. <https://doi.org/10.1021/tx010072j>.
- (119) Burrows, C. J.; Muller, J. G.; Korniyushyna, O.; Luo, W.; Duarte, V.; Leipold, M. D.; David, S. S. Structure and Potential Mutagenicity of New Hydantoin Products from Guanosine and 8-Oxo-7,8-Dihydroguanine Oxidation by Transition Metals. *Environmental Health Perspectives* **2002**, *110* (suppl 5), 713–717. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s5713>.
- (120) Xu, X.; Muller, J. G.; Ye, Y.; Burrows, C. J. DNA–Protein Cross-Links between Guanine and Lysine Depend on the Mechanism of Oxidation for Formation of C5 Vs C8 Guanosine Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (2), 703–709. <https://doi.org/10.1021/ja077102a>.
- (121) Silerme, S.; Bobyk, L.; Taverna-Porro, M.; Cuier, C.; Saint-Pierre, C.; Ravanat, J.-L. DNA-Polyamine Cross-Links Generated upon One Electron Oxidation of DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (6), 1011–1018. <https://doi.org/10.1021/tx500063d>.
- (122) Azacitidine : substance active à effet thérapeutique. VIDAL. <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/azacitidine-23089.html> (accessed 2023-04-26).

- (123) Silerme, S. Etude des dommages de l'ADN impliquant des pontages ADN-protéines et ADN-polyamines. phdthesis, Université de Grenoble, 2014. <https://theses.hal.science/tel-01558987> (accessed 2023-04-26).
- (124) Margolis, S. A.; Coxon, B.; Gajewski, E.; Dizdaroglu, M. Structure of a Hydroxyl Radical Induced Cross-Link of Thymine and Tyrosine. *Biochemistry* **1988**, *27* (17), 6353–6359. <https://doi.org/10.1021/bi00417a024>.
- (125) Perrier, S.; Hau, J.; Gasparutto, D.; Cadet, J.; Favier, A.; Ravanat, J.-L. Characterization of Lysine–Guanine Cross-Links upon One-Electron Oxidation of a Guanine-Containing Oligonucleotide in the Presence of a Trilycine Peptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (17), 5703–5710. <https://doi.org/10.1021/ja057656i>.
- (126) Hickerson, R. P.; Chepanoske, C. L.; Williams, S. D.; David, S. S.; Burrows, C. J. Mechanism-Based DNA–Protein Cross-Linking of MutY via Oxidation of 8-Oxoguanosine. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (42), 9901–9902. <https://doi.org/10.1021/ja9923484>.
- (127) Xu, X.; Fleming, A. M.; Muller, J. G.; Burrows, C. J. Formation of Tricyclic [4.3.3.0] Adducts between 8-Oxoguanosine and Tyrosine under Conditions of Oxidative DNA–Protein Cross-Linking. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (31), 10080–10081. <https://doi.org/10.1021/ja803896d>.
- (128) PubChem. *Tyrosine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6057> (accessed 2023-05-16).
- (129) Vianini, E.; Palumbo, M.; Gatto, B. In Vitro Selection of DNA Aptamers That Bind L-Tyrosinamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2001**, *9* (10), 2543–2548. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00054-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00054-2).
- (130) Challier, L.; Miranda-Castro, R.; Barbe, B.; Fave, C.; Limoges, B.; Peyrin, E.; Ravelet, C.; Fiore, E.; Labbé, P.; Coche-Guérente, L.; Ennifar, E.; Bec, G.; Dumas, P.; Mavré, F.; Noël, V. Multianalytical Study of the Binding between a Small Chiral Molecule and a DNA Aptamer: Evidence for Asymmetric Steric Effect upon 3'- versus 5'-End Sequence Modification. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (23), 11963–11971. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04046>.
- (131) Souard, F.; Perrier, S.; Noël, V.; Fave, C.; Fiore, E.; Peyrin, E.; Garcia, J.; Vanhaverbeke, C. Optimization of Experimental Parameters to Explore Small-Ligand/Aptamer Interactions through Use of ¹H NMR Spectroscopy and Molecular Modeling. *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (44), 15740–15748. <https://doi.org/10.1002/chem.201501527>.
- (132) Shiraki, K.; Kudou, M.; Nishikori, S.; Kitagawa, H.; Imanaka, T.; Takagi, M. Arginine Ethylester Prevents Thermal Inactivation and Aggregation of Lysozyme. *European Journal of Biochemistry* **2004**, *271* (15), 3242–3247. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04257.x>.
- (133) Lin, C. H.; Patel, D. J. Encapsulating an Amino Acid in a DNA Fold. *Nature Structural Biology* **1996**, *3* (12), 1046–1050. <https://doi.org/10.1038/nsb1296-1046>.
- (134) Hamada, H.; Shiraki, K. L-Argininamide Improves the Refolding More Effectively than L-Arginine. *Journal of Biotechnology* **2007**, *130* (2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.003>.
- (135) Nirody, J. A.; Budin, I.; Rangamani, P. ATP Synthase: Evolution, Energetics, and Membrane Interactions. *Journal of General Physiology* **2020**, *152* (11), e201912475. <https://doi.org/10.1085/jgp.201912475>.
- (136) Perrier, S.; Ravelet, C.; Guieu, V.; Fize, J.; Roy, B.; Perigaud, C.; Peyrin, E. Rationally Designed Aptamer-Based Fluorescence Polarization Sensor Dedicated to the Small Target

- Analysis. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25* (7), 1652–1657. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.12.005>.
- (137) Lin, C. H.; Patel, D. J. Structural Basis of DNA Folding and Recognition in an AMP-DNA Aptamer Complex: Distinct Architectures but Common Recognition Motifs for DNA and RNA Aptamers Complexed to AMP. *Chemistry & Biology* **1997**, *4* (11), 817–832. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(97\)90115-0](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(97)90115-0).
- (138) Bank, R. P. D. 3D View: 1AW4. *STRUCTURAL BASIS OF DNA FOLDING AND RECOGNITION IN AMP-DNA APTAMER COMPLEX, NMR, 7 STRUCTURES*.
- (139) Guo, X.; Liu, Z.; Liu, S.; Bentzley, C. M.; Bruist, M. F. Structural Features of the L-Argininamide-Binding DNA Aptamer Studied with ESI-FTMS. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (20), 7259–7266. <https://doi.org/10.1021/ac060606r>.
- (140) Cui, L.; Zou, Y.; Lin, N.; Zhu, Z.; Jenkins, G.; Yang, C. J. Mass Amplifying Probe for Sensitive Fluorescence Anisotropy Detection of Small Molecules in Complex Biological Samples. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (13), 5535–5541. <https://doi.org/10.1021/ac300182w>.
- (141) Fang, X.; Cao, Z.; Beck, T.; Tan, W. Molecular Aptamer for Real-Time Oncoprotein Platelet-Derived Growth Factor Monitoring by Fluorescence Anisotropy. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (23), 5752–5757. <https://doi.org/10.1021/ac010703e>.
- (142) Liu, J.; Wang, C.; Jiang, Y.; Hu, Y.; Li, J.; Yang, S.; Li, Y.; Yang, R.; Tan, W.; Huang, C. Z. Graphene Signal Amplification for Sensitive and Real-Time Fluorescence Anisotropy Detection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (3), 1424–1430. <https://doi.org/10.1021/ac3023982>.
- (143) Zhu, Z.; Ravelet, C.; Perrier, S.; Guieu, V.; Fiore, E.; Peyrin, E. Single-Stranded DNA Binding Protein-Assisted Fluorescence Polarization Aptamer Assay for Detection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (16), 7203–7211. <https://doi.org/10.1021/ac301552e>.
- (144) Berezovski, M.; Krylov, S. N. Using DNA-Binding Proteins as an Analytical Tool. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (44), 13451–13454. <https://doi.org/10.1021/ja037186x>.
- (145) Raghunathan, S.; Kozlov, A. G.; Lohman, T. M.; Waksman, G. Structure of the DNA Binding Domain of E. Coli SSB Bound to SsDNA. *Nat Struct Mol Biol* **2000**, *7* (8), 648–652. <https://doi.org/10.1038/77943>.
- (146) Zhao, Q.; Tao, J.; Feng, W.; Uppal, J. S.; Peng, H.; Le, X. C. Aptamer Binding Assays and Molecular Interaction Studies Using Fluorescence Anisotropy - A Review. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1125*, 267–278. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.061>.
- (147) Unruh, J. R.; Gokulrangan, G.; Lushington, G. H.; Johnson, C. K.; Wilson, G. S. Orientational Dynamics and Dye-DNA Interactions in a Dye-Labeled DNA Aptamer. *Biophysical Journal* **2005**, *88* (5), 3455–3465. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.054148>.
- (148) Billet, B.; Chovelon, B.; Fiore, E.; Faure, P.; Ravelet, C.; Peyrin, E. Detection of Small Molecules by Fluorescence Intensity Using Single Dye Labeled Aptamers and Quencher Transition Metal Ions. *Biosensors and Bioelectronics* **2022**, *205*, 114091. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114091>.
- (149) Jameson, D. M.; Ross, J. A. Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2685–2708. <https://doi.org/10.1021/cr900267p>.
- (150) Krauss, G.; Sindermann, H.; Schomburg, U.; Maass, G. Escherichia Coli Single-Strand Deoxyribonucleic Acid Binding Protein: Stability, Specificity, and Kinetics of Complexes with Oligonucleotides and Deoxyribonucleic Acid. *Biochemistry* **1981**, *20* (18), 5346–5352. <https://doi.org/10.1021/bi00521a040>.

- (151) Bishop, G. R.; Ren, J.; Polander, B. C.; Jeanfreau, B. D.; Trent, J. O.; Chaires, J. B. Energetic Basis of Molecular Recognition in a DNA Aptamer. *Biophysical Chemistry* **2007**, *126* (1–3), 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.07.009>.
- (152) Ni, S.; Yao, H.; Wang, L.; Lu, J.; Jiang, F.; Lu, A.; Zhang, G. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (8), 1683. <https://doi.org/10.3390/ijms18081683>.
- (153) Elskens, J. P.; Elskens, J. M.; Madder, A. Chemical Modification of Aptamers for Increased Binding Affinity in Diagnostic Applications: Current Status and Future Prospects. *International Journal of Molecular Sciences* **2020**, *21* (12), 4522. <https://doi.org/10.3390/ijms21124522>.
- (154) Hasegawa, H.; Savory, N.; Abe, K.; Ikebukuro, K. Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules* **2016**, *21* (4), 421. <https://doi.org/10.3390/molecules21040421>.
- (155) Davies, D. R.; Gelinas, A. D.; Zhang, C.; Rohloff, J. C.; Carter, J. D.; O’Connell, D.; Waugh, S. M.; Wolk, S. K.; Mayfield, W. S.; Burgin, A. B.; Edwards, T. E.; Stewart, L. J.; Gold, L.; Janjic, N.; Jarvis, T. C. Unique Motifs and Hydrophobic Interactions Shape the Binding of Modified DNA Ligands to Protein Targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109* (49), 19971–19976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213933109>.
- (156) Kimoto, M.; Yamashige, R.; Matsunaga, K.; Yokoyama, S.; Hirao, I. Generation of High-Affinity DNA Aptamers Using an Expanded Genetic Alphabet. *Nat Biotechnol* **2013**, *31* (5), 453–457. <https://doi.org/10.1038/nbt.2556>.
- (157) Wang, C.; Sun, Y.; Zhao, Q. A Sensitive Thrombin-Linked Sandwich Immunoassay for Protein Targets Using High Affinity Phosphorodithioate Modified Aptamer for Thrombin Labeling. *Talanta* **2020**, *207*, 120280. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120280>.
- (158) Ni, S.; Zhuo, Z.; Pan, Y.; Yu, Y.; Li, F.; Liu, J.; Wang, L.; Wu, X.; Li, D.; Wan, Y.; Zhang, L.; Yang, Z.; Zhang, B.-T.; Lu, A.; Zhang, G. Recent Progress in Aptamer Discoveries and Modifications for Therapeutic Applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13* (8), 9500–9519. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c05750>.
- (159) Gold, L.; Ayers, D.; Bertino, J.; Bock, C.; Bock, A.; Brody, E. N.; Carter, J.; Dalby, A. B.; Eaton, B. E.; Fitzwater, T.; Flather, D.; Forbes, A.; Foreman, T.; Fowler, C.; Gawande, B.; Goss, M.; Gunn, M.; Gupta, S.; Halladay, D.; Heil, J.; Heilig, J.; Hicke, B.; Husar, G.; Janjic, N.; Jarvis, T.; Jennings, S.; Katilius, E.; Keeney, T. R.; Kim, N.; Koch, T. H.; Kraemer, S.; Kroiss, L.; Le, N.; Levine, D.; Lindsey, W.; Lollo, B.; Mayfield, W.; Mehan, M.; Mehler, R.; Nelson, S. K.; Nelson, M.; Nieuwlandt, D.; Nikrad, M.; Ochsner, U.; Ostroff, R. M.; Otis, M.; Parker, T.; Pietrasiewicz, S.; Resnicow, D. I.; Rohloff, J.; Sanders, G.; Sattin, S.; Schneider, D.; Singer, B.; Stanton, M.; Sterkel, A.; Stewart, A.; Stratford, S.; Vaught, J. D.; Vrkljan, M.; Walker, J. J.; Watrobka, M.; Waugh, S.; Weiss, A.; Wilcox, S. K.; Wolfson, A.; Wolk, S. K.; Zhang, C.; Zichi, D. Aptamer-Based Multiplexed Proteomic Technology for Biomarker Discovery. *PLOS ONE* **2010**, *5* (12), e15004. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015004>.
- (160) Verdonck, L.; Buyst, D.; de Vries, A.-M.; Gheerardijn, V.; Madder, A.; Martins, J. C. Tethered Imidazole Mediated Duplex Stabilization and Its Potential for Aptamer Stabilization. *Nucleic Acids Research* **2018**, *46* (22), 11671–11686. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1062>.
- (161) Polyvinyl Alcohol (PVA) Coated Capillaries | Agilent. <https://www.agilent.com/en/product/capillary-electrophoresis-ce-ms/capillary->

- electrophoresis-ce-ms-consumables/ce-ce-ms-capillary-supplies/polyvinyl-alcohol-pva-coated-capillaries (accessed 2023-06-30).
- (162) Huber, C. G.; Oberacher, H. Analysis of Nucleic Acids by On-Line Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2001**, *20* (5), 310–343. <https://doi.org/10.1002/mas.10011>.
- (163) Andrus, A.; Kuimelis, R. G. Analysis and Purification of Synthetic Nucleic Acids Using HPLC. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* **2000**, *1* (1). <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc1005s01>.
- (164) Romieu, A.; Gasparutto, D.; Molko, D.; Ravanat, J.-L.; Cadet, J. Synthesis of Oligonucleotides Containing the (4R) and (4S) Diastereoisomers of 4,8-Dihydro-4-Hydroxy-8-Oxo-2'-Deoxyguanosine. *European Journal of Organic Chemistry* **1999**, *1999* (1), 49–56. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0690\(199901\)1999:1<49::AID-EJOC49>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0690(199901)1999:1<49::AID-EJOC49>3.0.CO;2-I).
- (165) Takeda, Y.; Nara, H.; Iwahashi, K.; Mitsui, Y.; Iitaka, Y. Preliminary Chemical and X-Ray Studies on the Interactions of E. Coli DNA with Putrescine. *The Journal of Biochemistry* **1983**, *94* (1), 275–282. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134340>.
- (166) Blagbrough, I. S.; Metwally, A. A.; Geall, A. J. Measurement of Polyamine PKa Values. In *Polyamines: Methods and Protocols*; Pegg, A. E., Casero, Jr., Robert A., Eds.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 493–503. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-034-8_32.
- (167) Mergny, J.-L.; Lacroix, L. Analysis of Thermal Melting Curves. *Oligonucleotides* **2003**, *13*, 515–537. <https://doi.org/10.1089/154545703322860825>.
- (168) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2010.
- (169) Ströhl, F.; Wong, H. H. W.; Holt, C. E.; Kaminski, C. F. Total Internal Reflection Fluorescence Anisotropy Imaging Microscopy: Setup, Calibration, and Data Processing for Protein Polymerization Measurements in Living Cells. *Methods Appl. Fluoresc.* **2017**, *6* (1), 014004. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aa872e>.
- (170) TECAN. Infinite® F500 Instructions for Use, 2011. https://bif.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/389/2017/11/Infinite_F500_Manual.pdf.
- (171) Delaunay, N. Électrophorèse capillaire - Principes. *Techniques d'analyse* **2019**. <https://doi.org/10.51257/a-v2-p3365>.
- (172) Cai, J.; Henion, J. Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry.
- (173) Wallingford, R. A.; Ewing, A. G. Capillary Electrophoresis. *Adv Chromatogr* **1989**, *29*, 1–76.
- (174) Swartz, M. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2010**.
- (175) Bester, K. Quantification with HPLC–MS/MS for Environmental Issues: Quality Assurance and Quality Assessment. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *391* (1), 15–20. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1991-2>.
- (176) Ahuja, S.; Dong, M. *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*; Elsevier, 2005.
- (177) Fappiano, L.; Carriera, F.; Iannone, A.; Notardonato, I.; Avino, P. A Review on Recent Sensing Methods for Determining Formaldehyde in Agri-Food Chain: A Comparison with the Conventional Analytical Approaches. *Foods* **2022**, *11* (9), 1351. <https://doi.org/10.3390/foods11091351>.
- (178) McMaster, M. C.; McMaster, M. *Lc/Ms: A Practical User's Guide*; John Wiley & Sons, Incorporated: Hoboken, UNITED STATES, 2005.

- (179) Hanai, T. T. *HPLC: A Practical Guide*; 1999. <https://doi.org/10.1039/9781847551078>.
- (180) Bhardwaj, C.; Hanley, L. Ion Sources for Mass Spectrometric Identification and Imaging of Molecular Species. *Natural Product Reports* **2014**, *31* (6), 756–767. <https://doi.org/10.1039/C3NP70094A>.
- (181) Ayala-Cabrera, J. F.; Montero, L.; Meckelmann, S. W.; Uteschil, F.; Schmitz, O. J. Review on Atmospheric Pressure Ionization Sources for Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Part I: Current Ion Source Developments and Improvements in Ionization Strategies. *Analytica Chimica Acta* **2023**, *1238*, 340353. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.340353>.
- (182) Dawson, P. H. *Quadrupole Mass Spectrometry and Its Applications*; Elsevier, 2013.
- (183) Collins, R. D. The Use of Electron Multipliers in Mass Spectrometry. *Vacuum* **1969**, *19* (3), 105–111. [https://doi.org/10.1016/S0042-207X\(69\)90023-2](https://doi.org/10.1016/S0042-207X(69)90023-2).
- (184) Banerjee, S.; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry* **2012**, *2012*, e282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- (185) Ho, C.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M.; Tai, H. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev* **2003**, *24* (1), 3–12.
- (186) Menet, M.-C. Principes de la spectrométrie de masse. *Revue Francophone des Laboratoires* **2011**, *2011* (437), 41–53. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(11\)71211-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(11)71211-4).

Formation de pontages covalents entre un aptamère et sa cible via l'oxydation spécifique d'une 8-oxoguanine

Résumé : Des pontages covalents entre des protéines et des brins d'ADN contenant un produit d'oxydation de la guanine, la 8-oxoguanine (OG), via l'oxydation spécifique de cette base ont été mis en évidence dans différents travaux. Ce projet vise à étudier si ce concept peut être appliqué à un aptamère contenant une OG afin de générer un adduit avec sa cible. Les aptamères sont de courts oligonucléotides simple-brin en série ARN ou ADN sélectionnés pour reconnaître avec une grande affinité et de manière spécifique une cible par le biais d'interactions à faible énergie. Ces éléments de reconnaissance présentent de nombreux avantages tels que la capacité de subir plusieurs dénaturations ou encore la facilité d'introduire des modifications dans leur séquence lors de leur synthèse chimique. Le système modèle choisi est un aptamère reconnaissant la L-argininamide. Trois bases guanine de cet aptamère, situées dans le site de reconnaissance, ont été remplacées une à la fois par une 8-oxoguanine. Des mesures d'anisotropie de fluorescence ont permis de démontrer qu'un tel remplacement peut entraîner une baisse ou une augmentation d'affinité pour la cible en fonction de la position de la base oxydée. Des analyses par électrophorèse capillaire et HPLC-MS ont montré la formation efficace d'adduits entre les trois aptamères contenant une OG et la cible à la suite de l'oxydation de cette base par un sel d'iridium. La caractérisation des produits atteste que leurs structures sont des spiro et guanidino en accord avec la littérature. Enfin, différentes stratégies ont été mises en œuvre afin de tenter de réduire les interactions non-spécifiques existant entre l'aptamère poly anionique et la cible cationique.

Mots clés : aptamère, pontage covalent, oxydation spécifique, électrophorèse capillaire, HPLC-MS

Formation of covalent crosslinks between an aptamer and its target via specific oxidation of an 8-oxoguanine

Abstract: Covalent crosslink between proteins and DNA strands containing a guanine oxidation product, the 8-oxoguanine (OG), via the specific oxidation of this base has been demonstrated in various works. This project aims to investigate whether this concept can be applied to an OG-containing aptamer to generate an adduct with its target. Aptamers are short, single-stranded RNA or DNA oligonucleotides selected to recognize a target with high affinity and specificity via low-energy interactions. These recognition elements offer a number of advantages, such as the ability to undergo multiple denaturations, or the facility to introduce modifications in their sequence during chemical synthesis. The model system chosen is an aptamer recognizing L-argininamide. Three guanine bases of this aptamer, located in the recognition site, were replaced one at a time by an 8-oxoguanine. Fluorescence anisotropy measurements demonstrated that such replacement results to a decrease or increase in affinity for the target, depending on the position of the oxidized base. Analysis by capillary electrophoresis and HPLC-MS demonstrated the effective formation of adducts between the three OG-containing aptamers and the target following oxidation of this base by an iridium salt. Characterization of the products shows that their structures are spiro and guanidino, which is consistent with the literature. Finally, various strategies were implemented in an attempt to reduce the non-specific interactions existing between the polyanionic aptamer and the cationic target.

Key words: aptamer, covalent crosslink, specific oxidation, capillary electrophoresis, HPLC-MS